

Université de Montréal

Récepteurs aux estrogènes: rôle sur la prolifération, la migration, les MAPKs et CD40/CD40L des cellules endothéliales et musculaires lisses porcines

par

Pedro Miguel Geraldès

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (PhD)
en sciences biomédicales

Septembre 2006

© Pedro Miguel Geraldès, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Récepteurs aux estrogènes: rôle sur la prolifération, la migration, les MAPKs et
CD40/CD40L des cellules endothéliales et musculaires lisses porcines

présentée par :
Pedro Miguel Geraldès

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Christian Deschepper, président-rapporteur
Dr Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dr Louis Paul Perrault, membre du jury
Dr Vincent Giguère, examinateur externe
Dr Gilles Soulez, représentant du doyen de la FES

Résumé

Avant le développement des endoprothèses enrobées de médicaments, la resténose représentait la première limitation à l'angioplastie coronarienne transluminale percutanée apparaissant dans 20% à 40% des patients. La pathogenèse de la resténose est un processus complexe et multifactoriel impliquant une lésion de la paroi endothéliale ou dysfonction endothéliale, l'agrégation des plaquettes et des leucocytes, la production et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (CML), la synthèse de matrice extracellulaire et le remodelage vasculaire. Il a été suggéré que la thérapie de remplacement hormonal protégeait les femmes ménopausées contre les maladies cardiovasculaires. Toutefois, les études randomisées ont installé un doute sur les effets cardioprotecteurs de l'hormonothérapie. Des études dans le laboratoire du Dr Tanguay ont démontré que la livraison locale de 17- β -estradiol (17 β E) prévient significativement la formation de resténose favorisant la réendothélialisation tout en réduisant l'infiltration de cellules proinflammatoires au site de lésion à la suite d'une angioplastie ou l'implantation d'une endoprothèse coronarienne. Les objectifs de ma thèse de doctorat étaient de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires et le rôle exact de chaque récepteur aux estrogènes (RE), utilisant un traitement aux antisens, sur la prolifération, la migration et l'activité de la p42/44 et p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) des cellules endothéliales (CE) et CML de porc. Au cours de ma formation, nous avons démontré que le traitement d'une dose physiologique de 17 β E (10^{-8} M) inhibe la phosphorylation de la p42/44 et p38 MAPK, la prolifération et la migration des CML stimulée au facteur de croissance dérivés des plaquettes-BB, un mécanisme dépendant des RE β . Contrairement aux CML, le 17 β E, via l'interaction des RE α , stimule l'activité de la p42/44 et p38 MAPK, la prolifération et la migration des CE de porc. Certaines conditions proinflammatoires, des cytokines telles que l'interféron gamma (IFN- γ) induisent l'expression des marqueurs CD40 et CD40L à la surface des CE. Le potentiel pro- et anti-inflammatoire des estrogènes est bien connu mais les mécanismes d'action par lesquels ces effets sont induits et le rôle des RE restent à déterminer. Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de CD40 et CD40L respectivement, suite à un traitement de 24 heures à l'IFN- γ (1000 U) en culture sur des CE. Un prétraitement au 17 β E inhibe à

93% l'effet de l'IFN- γ . À l'aide d'antisens sélectifs, nous avons montré qu'une baisse de l'expression du RE α réduit jusqu'à 74% la capacité du 17 β E à prévenir l'expression de CD40 et CD40L induit par l'IFN- γ . De plus, le 17 β E via l'activation du RE α inhibe l'expression du *signal transducer and activator of transcription 1* (Stat1), une kinase impliquée dans la voie de signalisation du récepteur de l'IFN- γ et prévient l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE. En conclusion, nos résultats suggèrent que la capacité des estrogènes à prévenir la resténose, tout en favorisant la guérison vasculaire, serait en partie liée à l'inhibition de la prolifération et la migration des CML via son RE β et par l'activation de ces mêmes mécanismes chez les CE via son RE α . De plus, nos données démontrent que le 17 β E, en se liant à son RE α , possède un effet anti-inflammatoire en inhibant l'activité de Stat1, l'augmentation de l'expression de CD40 et CD40L et l'adhésion des neutrophiles induit par l'IFN γ au niveau des CE.

Mots clés : Resténose, hormones, récepteur aux estrogènes, cellules musculaires lisses vasculaires, cellules endothéliales, MAPK, inflammation, neutrophiles, CD40/CD40L.

Abstract

Before the development of drug eluting stents, restenosis formation was the primary limitation of percutaneous transluminal coronary angioplasty and stenting occurring in 20% to 40% of patients. Restenosis is a complex process involving endothelial dysfunction, platelet and neutrophil aggregation, inflammatory cytokine production and secretion, vascular smooth muscle cell (SMC) proliferation and migration, extracellular matrix synthesis and vascular remodeling. Epidemiological studies over the past years suggested a protective effect of hormonal replacement therapy (HRT). In contrast, randomized clinical trials did not provide conclusive data that HRT confers cardioprotection against coronary artery disease in postmenopausal women. Our laboratory demonstrated that a local delivery of 17-beta-estradiol ($17\beta\text{E}$) during porcine coronary angioplasty and stent implantation reduced restenosis while improving the reendothelialization process and inhibiting infiltration of inflammatory cells. The objectives of the present thesis were to better understand the intracellular mechanisms of $17\beta\text{E}$ and the role of each estrogen receptor (ER) using an antisense gene therapy approach to study porcine SMCs and endothelial cell (EC) proliferation, migration and p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. Treatment of porcine SMCs with platelet-derived growth factor-BB induces p38 and p42/44 MAPK activation which lead to SMC migration and proliferation. These effects are prevented by a pretreatment with a physiological dose of $17\beta\text{E}$ (10^{-8} M). The inhibitory effects of $17\beta\text{E}$ on SMCs are abrogated by the downregulation of $\text{ER}\beta$ protein expression with selective $\text{ER}\beta$ mRNA antisense oligomers, whereas the downregulation of $\text{ER}\alpha$ has no effect. On the opposite, treatment with $17\beta\text{E}$ promotes porcine EC proliferation, migration and p42/44 and p38 MAPK phosphorylation. These effects are $\text{ER}\alpha$ -dependent as defined by antisense gene therapy. Interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) has been shown to induce CD40 and CD40L expression on ECs which lead to neutrophil adhesion onto ECs. The pro- and anti-inflammatory effects of estrogens are well recognized but the role of estrogens and their receptors ($\text{ER}\alpha$, $\text{ER}\beta$) on the regulation of CD40 and CD40L expression on ECs remains undefined. Treatment of cultured porcine EC with $\text{IFN-}\gamma$ for 24 hours enhances CD40 and CD40L expression. We demonstrated that treatment of porcine ECs with $17\beta\text{E}$ for 24 hours prevented these events on CD40/CD40L

expression. Treatment of EC with antisense oligomers targeting ER α mRNA reduced by up to 74% the ability of 17 β E to prevent the IFN- γ -induced CD40 and CD40L protein expression. The IFN- γ activation pathway of CD40 is known to involve the phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1). We also demonstrated that 17 β E, through an interaction with ER α , abrogated Stat1 phosphorylation and neutrophil adhesion onto EC thus interfering with IFN- γ -mediated effects. In conclusion, our results suggest that, in porcine SMC, 17 β E reduces p42/44 and p38 MAPK activity through ER β stimulation, whereas in contrast, in EC, 17 β E induces p42/44 and p38 MAPK through ER α activation. Indeed, treatment with 17 β E prevents IFN- γ -mediated Stat1 phosphorylation, CD40 and CD40L protein expression and neutrophil adhesion onto ECs through ER α activation. Estrogens may contribute to the vascular healing process and to the prevention of restenosis by inhibiting the inflammatory process and improving reendothelialization through ER α activation, and by decreasing SMC migration and proliferation through ER β stimulation.

Keywords : Restenosis, hormones, estrogen receptors, vascular smooth muscle cells, endothelial cells, MAPK, inflammation, neutrophils, CD40/CD40L.

Table des matières

Introduction	1
1.1 L'athérosclérose	2
1.1.1 Processus de formation de l'athérosclérose	2
1.1.1.1 La dysfonction endothéliale	2
1.1.1.2 L'incorporation des LDL	4
1.1.1.3 Recrutement et infiltration des macrophages	5
1.1.1.4 Production de cytokines et prolifération des CML	6
1.1.1.5 Instabilité et rupture de la plaque	8
1.1.1.6 Les mécanismes de rupture de la plaque	10
1.1.2 Les traitements	11
1.1.2.1 L'angioplastie coronarienne	12
1.1.2.2 L'endoprothèse coronarienne	12
1.1.2.3 Autres techniques	13
1.1.2.4 Les inconvénients	13
1.2 La resténose	14
1.2.1 Dénudation endothéliale	14
1.2.2 Agrégation des plaquettes et formation de thrombus	15
1.2.2.1 Le <i>platelet-derived growth factor</i> (PDGF)	15
1.2.2.2 Le <i>transforming growth factor-beta</i> (TGF- β)	16
1.2.2.3 Le <i>plasminogen activator inhibitor-1</i> (PAI-1)	16
1.2.2.4 Le facteur tissulaire	17
1.2.2.5 La glycoprotéine IIb/IIIa	17
1.2.2.6 Le facteur d'activation plaquettaire	17
1.2.3 La migration et la prolifération des CML et synthèse de MEC	18
1.2.3.1 Implication du cycle cellulaire dans la prolifération des CML	18
1.2.3.2 Les <i>mitogen-activated protein kinases</i> (MAPKs)	20
1.2.3.2.1 ERK-1 et ERK-2	21
1.2.3.2.2 p38 MAPK et JNK	21
1.2.4 Le remodelage vasculaire	22
1.2.5 Les nouveaux traitements pour prévenir la resténose	22

1.2.5.1	La brachythérapie.....	22
1.2.5.2	La thérapie génique.....	23
1.2.5.3	Les endoprothèses enduits de médicament (<i>drug eluting stent</i>).....	24
1.2.5.4	Réendothélialisation.....	25
1.3	L'inflammation.....	26
1.3.1	Les cytokines.....	26
1.3.1.1	Le facteur de tumeur nécrotique alpha (TNF- α).....	26
1.3.1.2	L'interféron (IFN).....	27
1.3.1.2.1	Les récepteurs de l'IFN.....	28
1.3.1.2.2	La voie de signalisation de JAK/STAT.....	29
1.3.1.2.2.1	Les protéines JAK.....	29
1.3.1.2.2.2	Les facteurs de transcription STAT.....	30
1.3.1.3	Le CD40/CD40L.....	30
1.3.1.3.1	La signalisation de CD40.....	31
1.3.1.3.2	Le rôle de CD40/CD40L dans l'athérosclérose et la resténose.....	32
1.3.2	Les molécules d'adhésion.....	33
1.3.2.1	Les sélectines.....	34
1.3.2.1.1	La L-sélectine.....	35
1.3.2.1.2	La E-sélectine.....	36
1.3.2.1.3	La P-sélectine.....	36
1.3.2.2	La superfamille des immunoglobulines – CAM.....	37
1.3.2.2.1	La molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM).....	37
1.3.2.2.2	La molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM).....	37
1.3.2.3	Les intégrines.....	38
1.3.2.4	Les cadhérines.....	38
2	Les hormones stéroïdiennes.....	39
2.1	Le type d'hormone.....	39
2.1.1	Les estrogènes.....	40
2.1.2	La progestérone.....	41
2.1.3	L'hormonothérapie.....	41
2.1.4	Les alternatives.....	45

2.2	Le rôle des estrogènes et de leurs récepteurs	45
2.2.1	La structure des RE	46
2.2.2	Les isoformes des RE α et RE β	48
2.2.3	La régulation des RE	49
2.2.4	La phosphorylation des RE	50
2.2.5	Les mécanismes d'action des RE	50
2.2.5.1	Les coactivateurs et corépresseurs	51
2.2.5.2	Les mécanismes régulateurs des estrogènes et des RE	52
2.2.5.2.1	Les canaux ioniques	52
2.2.5.2.2	Les MAPKs	53
2.2.5.2.3	La phosphoinositide-3 kinase	54
2.2.5.2.4	Les récepteurs couplés aux protéines G	55
2.2.5.2.5	Les autres récepteurs membranaires	55
2.2.5.3	Les effets des estrogènes sur la paroi vasculaire artérielle	56
2.2.5.3.1	Le profil lipidique	56
2.2.5.3.2	La fonction vasculaire	57
2.2.5.3.3	Les effets dépendants de l'endothélium	57
2.2.5.3.3.1	Les mécanismes génomiques des estrogènes sur le NO	57
2.2.5.3.3.2	Les mécanismes nongénomiques des estrogènes sur le NO	58
2.2.5.3.4	Les effets indépendants de l'endothélium	59
2.2.5.3.5	Les effets des estrogènes sur le système de coagulation	59
2.2.5.3.6	Les estrogènes et les marqueurs inflammatoires	61
2.2.5.3.6.1	Le NF κ B	61
2.2.5.3.6.2	Les CAM	61
2.2.5.3.6.3	Le TNF- α	62
2.2.5.3.6.4	Le MCP-1	62
2.2.5.3.6.5	L'IL-1, l'IL-6 et le TGF- β	63
2.2.5.3.6.6	La protéine réactive C (CRP)	63
2.2.5.3.7	Les estrogènes et l'hypertension artérielle systémique	64
2.2.5.3.7.1	Le caractère hémodynamique	64
2.2.5.3.7.2	Les influences sur l'hypertrophie cardiaque	65

2.2.5.3.7.3	Les influences sur les facteurs circulants (ANG II, ET-1 et AMP cyclique)	65
2.2.5.3.8	Les estrogènes et la croissance cellulaire, le remodelage vasculaire et l'ischémie	66
2.2.5.3.9	Les estrogènes et l'angiogénèse	67
2.2.6	Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERMs)	68
3	Problématique	71
3.1	But du projet de thèse	72
4	Article #1	73
4.1	Abstract	74
4.1.1	Condensed abstract	74
4.2	Introduction	75
4.3	Materials and Methods	76
4.3.1	Cell Culture	76
4.3.2	Mitogenic Assay	76
4.3.3	Chemotactic Assay	77
4.3.4	Western Blot Analysis of p38 and p42/44 MAPK Phosphorylation	77
4.3.5	Statistical Analysis	79
4.4	Results	79
4.4.1	Effects of 17 β E on PSMC Proliferation	79
4.4.2	Effects of 17 β E on PSMC Migration	79
4.4.3	Effects of 17 β E on PSMC p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation	80
4.4.4	Effects of 17 β E on PAEC Proliferation	81
4.4.5	Effects of 17 β E on PAEC Migration	81
4.4.6	Effects of 17 β E on PAEC p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation	81
4.5	Discussion	82
4.5.1	Anti-mitogenic and Anti-chemotactic Effects of 17 β E in PSMC	83
4.5.2	17 β E Promotes Reendothelialization by Increasing the Proliferation and the Migration of PAEC	84
4.6	References	85
4.7	Figure Legends	88

5	Article #2.....	96
5.1	Abstract	97
5.2	Introduction.....	98
5.3	Materials and Methods.....	99
5.3.1	Cell Culture.....	99
5.3.2	Antisense Oligonucleotide Gene Therapy	99
5.3.3	Western Blot Analyses of ER α and ER β Expression, p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation	100
5.3.4	Mitogenic Assay	102
5.3.5	Chemotactic Assay.....	102
5.3.6	Statistical Analysis.....	103
5.4	Results.....	103
5.4.1	Modulation of ER α and ER β Protein Expression by Antisense Oligonucleotide Gene Therapy.....	103
5.4.2	Contribution of ER α and ER β on PSMC Proliferation	104
5.4.3	Anti-Chemotactic Effect of 17 β E on PSMC: Role of ER α and ER β	105
5.4.4	Role of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation in PSMC 105	
5.4.5	Contribution of ER α and ER β on PAEC Proliferation.....	106
5.4.6	Anti-Chemotactic Effects of 17 β E on PAEC: Role of ER α and ER β mRNA 106	
5.4.7	Role of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation in PAEC 107	
5.5	Discussion	107
5.5.1	Regulation of ER α and ER β Protein Expression by Antisense Gene Therapy 108	
5.5.2	Biological Activities of 17 β E Are Mediated Through ER β in PSMC.....	108
5.5.3	ER α Activation by 17 β E Induces MAPK Phosphorylation in PAEC.....	109
5.6	Acknowledgements.....	110
5.7	References.....	110
5.8	Figure Legends.....	113

6	Article #3.....	123
6.1	Abstract.....	124
6.2	Introduction.....	125
6.3	Materials and Methods.....	126
6.3.1	Cell culture.....	126
6.3.2	Antisense oligonucleotide gene therapy.....	126
6.3.3	Analyses of CD40 and CD40L expression.....	127
6.3.4	Analyses of CD40 mRNA levels.....	128
6.3.5	Neutrophil isolation and purification.....	128
6.3.6	Neutrophil adhesion assay.....	129
6.3.7	Statistical Analysis.....	129
6.4	Results.....	130
6.4.1	Effect of 17 β E on CD40 and CD40L mRNA and Protein Expression.....	130
6.4.2	Role of ER α and ER β on CD40 and CD40L Expression.....	130
6.4.3	Effect of ER α on IFN- γ Signalling Pathway.....	131
6.4.4	17 β E Inhibits Neutrophil Adhesion.....	131
6.5	Discussion.....	133
6.6	Acknowledgements.....	136
6.7	References.....	137
6.8	Figure Legends.....	141
7	Discussion.....	149
7.1	La régulation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses et endothéliales par le 17 β E : Rôle de la p42/44 et p38 MAPK.....	150
7.2	La caractérisation du rôle des RE α et RE β dans les mécanismes de régulation de la p42/44 et p38 MAPK, de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses et endothéliales de porc.....	153
7.3	Les effets du 17 β E sur la phosphorylation de Stat1, l'expression protéique de CD40 et CD40L et l'adhésion des neutrophiles induits par l'IFN- γ au niveau des CE : implication du RE α	158
	Conclusions.....	166
	Bibliographie.....	167

Annexe 1 I

Liste des tableaux

Tableau I: Résumé des études observationnelles et randomisées en prévention primaire et secondaire sur les effets de la thérapie de remplacement hormonale.	42
Tableau II: Les différentes voies d'activation des RE.	51

Liste des figures

Figure 1: Processus initial de la formation de la plaque athéromateuse	5
Figure 2: Progression de la plaque athéromateuse et formation de la chape fibreux.....	8
Figure 3: Processus de rupture de la plaque et de la formation d'un thrombus.....	10
Figure 4: Formation de la resténose à la suite d'une ACTP ou l'implantation d'une endoprothèse vasculaire	14
Figure 5: Déroulement du cycle cellulaire.....	19
Figure 6: La cascade des MAPKs	20
Figure 7: Blocage de la traduction par les antisens.....	24
Figure 8: Récepteurs à l'IFN et activation classique des protéines JAK/STAT.....	29
Figure 9: Forme trimérique du récepteur CD40 et ses voies de signalisation	32
Figure 10: Famille des molécules d'adhésion.....	34
Figure 11: Concentrations plasmatiques des hormones ovariennes.....	40
Figure 12: Structure des récepteurs aux estrogènes alpha et bêta.....	47
Figure 13: Représentation des voies de signalisation et d'activation des estrogènes	52

Article #1

Figure 1: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC proliferation	90
Figure 2: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC migration.....	91
Figure 3: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC p42/44 and p38 MAPK activity. .	92
Figure 4: Effects of 17 β E and ER antagonists on PAEC proliferation.....	93
Figure 5: Effects of 17 β E and ER antagonists on PAEC migration	94
Figure 6: Effects of 17 β E and ER antagonists on PAEC p42/44 and p38 MAPK activity .	95

Article #2

Figure 1: Antisense regulation of ER α and ER β expression on PSMC and PAEC	116
Figure 2: Contribution of ER α and ER β on PSMC proliferation.....	117
Figure 3: Contribution of ER α and ER β on PSMC migration	118
Figure 4: Contribution of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK activation in PSMC	119

Figure 5: Contribution of ER α and ER β on PAEC proliferation	120
Figure 6: Contribution of ER α and ER β on PAEC migration.....	121
Figure 7: Contribution of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK activation in PAEC	122

Article #3

Figure 1: Effect of 17 β E on CD40 and CD40L expression induced by IFN- γ	143
Figure 2: Effect of 17 β E on CD40 and CD40L mRNA expression induced by IFN- γ in PAEC	144
Figure 3: Contribution of ER α and ER β on the regulation of CD40 and CD40L expression in PAEC	145
Figure 4: Role of 17 β E and ER on Jak1, Jak2 and Stat1 phosphorylation induced by IFN- γ	146
Figure 5: Contribution of ICAM, CD40 and CD40L on neutrophil adhesion on PAEC...	147
Figure 6: Effects of 17 β E on neutrophil adhesion on PAEC	148

Liste des abréviations

17 β E = 17-bêta-estradiol

ACTP = angioplastie coronarienne transluminale percutanée

ADN = acide désoxyribonucléique

AF = *activation factor*

ANG II = angiotensine II

ARN = acide ribonucléique

BK_{ca+} = canaux potassiques et voltage-dépendants

CAM = *cell adhesion molecule*

CE = cellules endothéliales

CEE = conjugué d'éthinylestradiol

CML = cellules musculaires lisses

CRP = *C reactive protein*

eNOS = *endothelial nitric oxide synthase*

ERK = *extracellular signal-regulated kinase*

ET-1 = endothéline-1

FM = femmes ménopausées

HDL = *high density lipoprotein*

HSP = *heat shock protein*

IFN- γ = interféron-gamma

ICAM = *intercellular adhesion molecule*

IL = interleukine

JAK = *janus kinase*

JNK = *c-jun N-terminal kinase*

LDL = *low density lipoprotein*

LPS = lipopolysaccharide

MAPKs = *mitogen-activated protein kinases*

MCP-1 = *macrophage chemoattractant protein-1*

MCV = maladies cardiovasculaires

MEC = matrice extracellulaire

MMP = *matrix metalloproteinase*

MPA = médroxyprogestérone

NADPH = *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced*

NF κ B = *nuclear factor kappa B*

NO = *nitric oxide*

ODN = *oligodésoxynucléotides*

PAI-1 = *plasminogen activator inhibitor-1*

PDGF = *platelet-derived growth factor*

PI3K = *phosphoinositide-3 kinase*

PRG = *progestérone*

RE = *récepteur aux estrogènes*

RIFN = *récepteur de l'interféron*

SERM = *selective estrogen receptor modulators*

STAT = *signal transducer and activator of transcription*

TGF- β = *transforming growth factor-beta*

TNF- α = *tumor necrosis factor-alpha*

t-PA = *tissue plasminogen activator*

TRH = *thérapie de remplacement hormonale*

VCAM = *vascular cell adhesion molecule*

VEGF = *vascular endothelial growth factor*

WHI = *Women health initiative*

*« Doubter de tout ou tout croire sont deux
solutions également commodes, qui l'une et
l'autre nous dispensent de réfléchir »
Henri Poincaré*

Remerciements

Au cours de ces années, j'ai côtoyé plusieurs personnes qui m'ont aidé, enduré, influencé et supporté tout au long de mon cheminement. Pour cela et pour tout ce qu'ils ont apporté, j'aimerais les remercier.

Tout d'abord, je remercie mon directeur, Dr Jean-François Tanguay, un mentor exceptionnel. Vous avez cru en moi et en mon potentiel. Vous m'avez également formé, instruit, encouragé et supporté au cours de toutes ces années. Vous avez été un modèle et un exemple à suivre. Je vous dois beaucoup. Merci mille fois.

Je remercie les membres de mon jury (Dr Christian Deschepper, Dr Jean-François Tanguay, Dr Louis Paul Perrault et Dr Vincent Giguère) d'avoir accepté et pris le temps de réviser ma thèse de doctorat.

Je remercie grandement le Dr Martin G. Sirois qui, sans avoir été officiellement mon codirecteur, a quand même agi de la sorte. J'ai énormément appris par vos judicieux conseils. Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire comme si j'étais l'un de vos étudiants et pour cela, je n'oublierai jamais.

Je remercie le Dre Isabelle Cloutier qui s'est jointe à l'équipe du Dr Tanguay en début de l'année 2004. Vous avez amené mon apprentissage et ma formation au doctorat à un niveau nettement supérieur.

Je remercie les membres de mon laboratoire pour leur aide précieuse et constante. Merci à Pascale Geoffroy, assistante de recherche hors pair, à Sandra Gilligan et Julie Lebel pour leur aide au niveau des techniques animales, à Dominique Lauzier et Véronique Philibert pour leur rigueur et leur aide au niveau des techniques d'histologie et d'immunohistochimie, à Louis-Robert Villeneuve pour son aide et ses précieux conseils pour les techniques d'immunofluorescence et à Chantal Sauvé pour son support au niveau administratif.

Je remercie le Dr Angelo Calderone, le Dr Yahye Merhi, le Dr Eric Thorin et le Dr Chantal Lambert pour leur collaboration, support, conseils et contributions à l'achèvement de mon doctorat.

Je remercie également Dr Pascal Bernatchez, Stéphanie Gagnon, Dre Roselyne Villiard, Dr Sofiane Hadjadj et Caroline Lemieux pour leur soutien technique et leurs précieux conseils.

Je remercie le Fonds de la Recherche en Santé du Québec en partenariat avec la Fondation des Maladies du Cœur du Québec et le réseau cardiovasculaire pour leur support financier.

Je remercie mes amis pour leur compréhension. Un merci tout à fait spécial à deux personnes, Eve-Amélie Morel et Émilie Gauthier pour leur compréhension, leur tolérance, leur sacrifice et leur soutien. À vous deux, vous avez toute ma gratitude. Vous m'avez influencé et contribué à faire de moi une meilleure personne.

Et finalement, je remercie mes parents pour leur dévouement, leur patience et leur support. À leur façon, ils ont su faire tout ce qu'il fallait sans poser aucune question, sans rien demander en retour.

Avant-propos

Les diverses recherches dans le passé nous ont permis d'affirmer que l'athérosclérose n'est pas un simple processus d'accumulation de matières grasses obstruant la lumière artérielle. Il est maintenant bien connu que l'athérosclérose est une forme d'inflammation chronique impliquant plusieurs médiateurs cellulaires et menant ultimement au développement de lésions complexes. Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité chez les femmes ménopausées des pays industrialisés. Les études observations ont suggéré que le traitement hormonal réduisait d'environ 50% les incidences de maladies cardiovasculaires. Cependant, les données d'études randomisées ont indiqué que la thérapie par remplacement hormonal ne présentait aucun effet bénéfique en prévention primaire ou secondaire après un événement cardiaque. Cette disparité entre les données des études cliniques randomisées et celles des études *in vitro* et *in vivo* démontre clairement que les mécanismes de régulation des estrogènes au niveau vasculaire sont encore mal compris. Notre laboratoire s'est grandement intéressé aux estrogènes et à leurs effets cardioprotecteurs. Par le passé, nous avons démontré que la livraison locale d'estrogènes réduisait la resténose tout en favorisant la guérison des vaisseaux suite à une blessure coronarienne dans un modèle porcin. Il est évident que les estrogènes agissaient à plusieurs niveaux afin de prévenir la formation de resténose. Toutefois, les mécanismes d'actions par lesquels les estrogènes et ses récepteurs aux estrogènes induisent leurs effets demeurent peu élucidés. Mes travaux de recherche explorent de façon approfondie les rôles précis des récepteurs aux estrogènes au niveau de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses et endothéliales. De plus, nous avons étudié et caractérisé le rôle des récepteurs aux estrogènes au niveau de certaines cascades de signalisation intracellulaire chez les cellules vasculaires porcines. Finalement, nous explorons les effets des récepteurs aux estrogènes dans l'expression de cytokines proinflammatoires ainsi que leurs impacts sur l'adhésion des neutrophiles à la surface des cellules endothéliales. Une meilleure compréhension du rôle des estrogènes et de ses récepteurs au niveau des mécanismes de guérison vasculaire permettrait de contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques afin de diagnostiquer et de traiter plus efficacement les maladies cardiovasculaires.

Introduction

Une maladie cardiovasculaire (MCV) est un trouble ou une lésion touchant l'appareil cardiovasculaire, qu'il s'agisse du cœur ou des vaisseaux sanguins. Au Canada, en 2001, environ le tiers (33%) de tous les décès étaient attribuables aux maladies cardiovasculaires.¹ Bien que les taux de mortalité aient diminués depuis les années 90, le nombre absolu de décès chez les hommes et les femmes est resté stable depuis le milieu des années 90. Les problèmes cardiaques les plus courants sont la maladie coronarienne athérosclérotique se manifestant par l'angine de poitrine, l'infarctus aigu du myocarde ou la mort subite, les arythmies, les valvulopathies, les atteintes myocardiques, l'insuffisance cardiaque, les péricardites, et les malformations cardiaques congénitales. Plusieurs facteurs de risque traditionnels tels que le tabagisme, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le diabète et l'obésité augmentent les risques d'événements cardiaques.¹

1.1 L'athérosclérose

Pendant longtemps, l'athérosclérose a été vue comme un processus par lequel des éléments composant les vaisseaux sanguins s'assemblent pour obstruer la lumière artérielle menant ainsi aux MCVs. L'athérosclérose pouvait ainsi prendre plusieurs années à être formée. Les travaux récents à l'aide de recherches cliniques et épidémiologiques, de recherches fondamentales et le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire ont permis de clarifier que l'athérosclérose est en fait un phénomène complexe impliquant de nombreux facteurs. Les connaissances sur la pathogénie et l'étiologie de la formation de l'athérosclérose ont été marquées par deux grands courants de pensée. La mise en évidence du rôle du cholestérol par Anitschkow et Chalutow (1914) a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'infiltration lipidique est le facteur déclenchant la formation de la plaque athéromateuse.² L'athérosclérose est également considérée comme une forme d'inflammation chronique résultant d'une interaction entre les lipoprotéines modifiées, les macrophages dérivés des monocytes, les lymphocytes T et les cellules endothéliales et musculaires lisses de la paroi artérielle. Ce processus inflammatoire, décrit par Russel Ross, peut ultimement mener au développement de lésions plus complexes ou de plaques athéromateuses avancées dont les plus fréquentes sont l'insuffisance coronaire qui se manifeste par l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde, conséquences de l'atteinte des artères coronaires, les accidents vasculaires cérébraux liés aux lésions des vaisseaux à destination cérébrale et l'artérite des membres inférieurs lorsque les artères fémorales sont obstruées.³

1.1.1 Processus de formation de l'athérosclérose

1.1.1.1 La dysfonction endothéliale

Dans des conditions physiologiques normales, l'endothélium forme une couche semi-perméable entre les éléments circulants du sang et la paroi du vaisseau sanguin. L'endothélium est maintenant considéré comme étant le plus gros organe endocrinien ayant un impact direct sur le développement de l'athérosclérose. Il sécrète des substances

vasoactives afin de réguler le tonus artérielle, de maintenir une surface antithrombotique, de moduler les réponses inflammatoires et d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires sous jacentes.⁴ La principale substance protectrice synthétisée par l'endothélium est le monoxyde d'azote (NO), synthétisé par les synthétases de NO. Lorsque produit, le NO cause une vasorelaxation des CML et inhibe l'agrégation des plaquettes. De plus, il stimule la prolifération des cellules endothéliales (CE), permettant ainsi la réparation des blessures à l'endothélium. Le NO est aussi un puissant anti-oxydant qui élimine les espèces réactives d'oxygène, dont l'anion superoxyde, qui peuvent endommager l'endothélium. Par contre, la production concomitante dans un même lieu de NO et d'anion superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxynitrite, un précurseur de radicaux libres. Ainsi, l'endothélium agit sur le tonus vasculaire à l'aide du NO, de la prostacycline et du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium. Il équilibre l'effet vasodilatateur de ces substances à l'aide de peptides vasoconstricteurs, tels que l'endothéline (ET-1) et l'angiotensine II (ANG II). La balance des effets de ces substances dicte donc le tonus vasculaire. Il a été longtemps considéré que les nombreuses conditions physiopathologiques observées chez les humains menant à la formation de l'athérosclérose débutaient par une réponse à une blessure qui provoquait une dénudation endothéliale. Toutefois, cette hypothèse s'est raffinée par l'introduction du concept de dysfonction endothéliale plutôt que d'une dénudation résultant d'une blessure artérielle ou mort des cellules endothéliales.⁵

La dysfonction endothéliale est donc un déséquilibre des facteurs homéostatiques de l'endothélium. Cet état est caractérisé par une diminution de la biodisponibilité du NO, par un tonus vasculaire anormal, par une activation du système de coagulation et par conséquent une augmentation de la croissance des CML.⁶ La diminution de la biodisponibilité du NO est une conséquence centrale car, en plus de la diminution des effets protecteurs du NO, elle entraîne l'augmentation du stress oxydatif qui favorise alors l'oxydation des *low density lipoproteins* (LDL). La dysfonction endothéliale est le processus permissif menant à l'état inflammatoire. Plusieurs facteurs contribuent à la dysfonction endothéliale et au développement de l'athérosclérose: l'hypercholestérolémie, le diabète de type 1 et 2, l'hypertension artérielle, l'élévation et l'oxydation des LDL, les

radicaux libres causés par le tabagisme, certaines cytokines, les facteurs génétiques, l'élévation des concentrations d'homocystéine plasmatique, les infections par différents microorganismes tels que les herpesvirus, le virus d'immunodéficience humaine et *chlamydia pneumoniae* ou la combinaison de ces facteurs.³

1.1.1.2 L'incorporation des LDL

Les LDL traversent la paroi des vaisseaux sanguins ce qui leur permet d'interagir avec les CE. Lors de leur migration, les LDL peuvent demeurer prisonnières de protéoglycans sécrétés par les CE au niveau de l'intima des artères. Cette accumulation se produit principalement à des sites privilégiés où l'on retrouve des conditions hémodynamiques et mécaniques particulières telles que les branches et les bifurcations où les niveaux de turbulence sont élevés et les forces de cisaillement sont faibles. L'accumulation de LDL dans l'espace sous-endothélial conduit à la formation de masses lipidiques. Subséquemment, l'oxydation des LDL représente une étape essentielle au processus athérosclérotique.⁷ Bien que les quantités de LDL oxydées circulants soient très faibles, les quantités présentes dans les plaques athéromateuses sont élevées.⁸ L'oxydation des LDL est provoquée par contact avec les CML et les macrophages, ou de façon chimique par des radicaux libres et produits de la cigarette.⁹ L'oxydation des LDL est ensuite reconnue par le système immunitaire comme étant une substance étrangère et les macrophages recrutés dans l'espace subendothélial au niveau de la lésion peuvent alors internaliser les LDL oxydées devenant par le fait même des cellules spumeuses (Figure 1).^{10, 11}

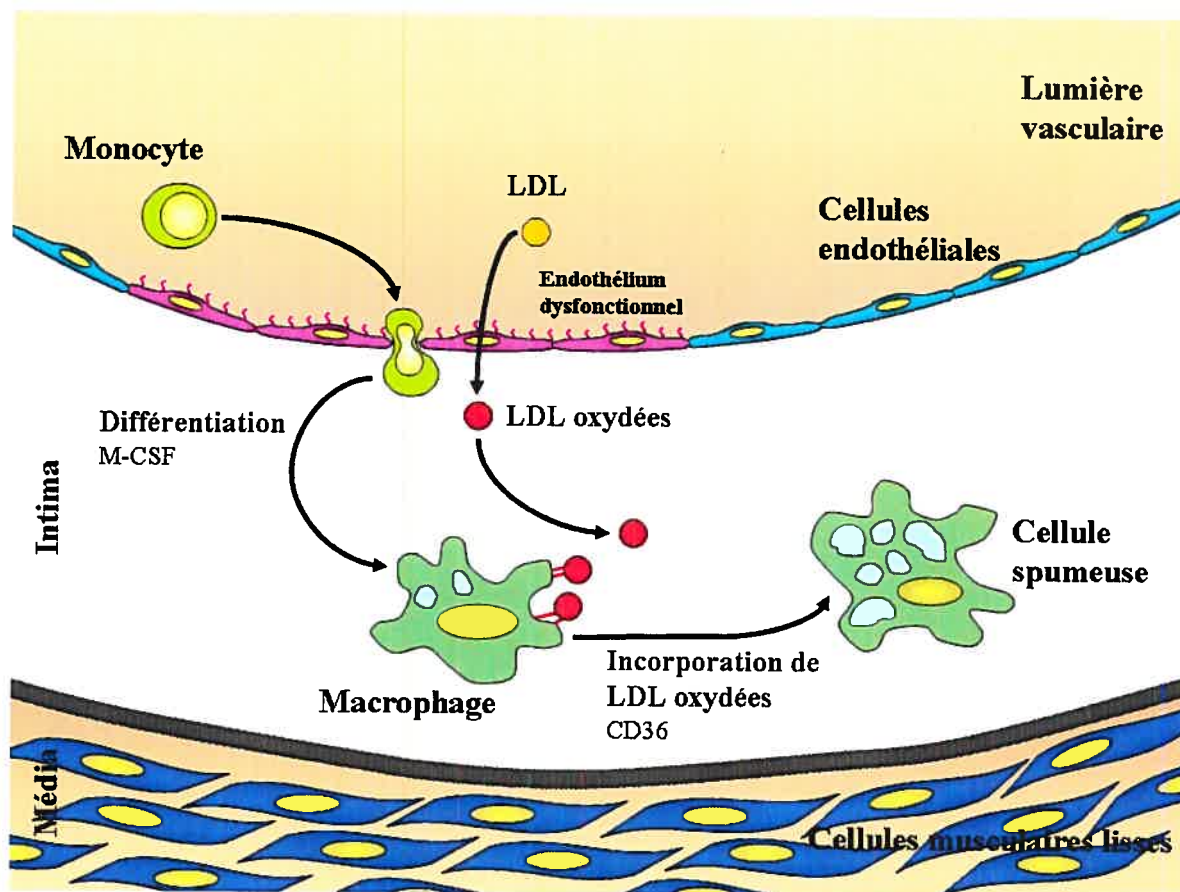


Figure 1: Processus initial de la formation de la plaque athéromateuse

Les LDL sont sujets à une oxydation et constituent un facteur de dysfonction endothéliale. L'expression de molécules d'adhésion favorise l'adhésion des monocytes à la paroi qui migrent dans l'espace sous-endothélial pour ensuite incorporer à l'aide de leurs récepteurs les LDL oxydées (adapté d'après Glass C.K. ¹¹).

1.1.1.3 Recrutement et infiltration des macrophages

Les altérations du flot sanguin à certains sites artériels spécifiques tels que les branches se division et les bifurcations, où les forces de cisaillement sont minimales et les turbulences sont maximales, élèvent l'expression des molécules d'adhésion, la migration et l'accumulation des monocytes et des lymphocytes T.³ Les monocytes adhérents pénètrent dans la paroi vasculaire par les jonctions interendothéliales sous l'effet de facteurs chimiotactiques tels que le *macrophage chemoattractant protein-1* (MCP-1). Cette protéine est fortement exprimée par les macrophages et les CML dans la plaque d'athérosclérose

humaine. Des études effectuées chez les souris déficientes pour le MCP-1 ou pour son récepteur, ont démontré que ces souris développent très peu de lésions athérosclérotiques suggérant leur rôle important dans cette pathologie.^{12, 13} La transformation des macrophages en cellules spumeuses débute par l'accumulation d'une grande quantité de LDL oxydées dans leur cytoplasme par l'intermédiaire des récepteurs piègeurs ou *scavengers* (SR-A, CD36 et CD68).¹⁴ Les monocytes et les macrophages ont la capacité de se multiplier. Ainsi, le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) contribue au processus de formation de la plaque athéromateuse en favorisant la multiplication et la différenciation des monocytes/macrophages.^{11, 15} Les macrophages, en association avec les LDL oxydées, forment donc une couche de stries lipidiques présente dès la vingtaine, lésion très précoce dans le développement de l'athérosclérose.

1.1.1.4 Production de cytokines et prolifération des CML

L'infiltration des macrophages dans la plaque athéromateuse a pour effet d'engendrer une réaction inflammatoire chronique. Cette inflammation s'accompagne d'une libération de certains médiateurs solubles, cytokines proinflammatoires telles que le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), l'interleukine-1 (IL-1), l'IL-6, l'IL-8 l'IL-12 et l'interféron gamma (IFN- γ) ainsi que les molécules immunorégulatrices membranaires CD40 et son ligand, le CD40L.^{11, 16} Ces cytokines sont synthétisées par les lymphocytes T cytotoxiques (TH1). Les cytokines proinflammatoires de la plaque peuvent aussi intervenir dans les complications thrombotiques associées à l'athérosclérose. Les propriétés antithrombotiques des CE sont profondément altérées par l'IL-1 ou le TNF- α , qui augmentent l'activité procoagulante du facteur tissulaire, diminuent l'expression de la thrombomoduline et suppriment l'activité anticoagulante du système thrombomoduline-protéine C.^{17, 18} De plus, l'activation des plaquettes permet la formation de l'acide arachidonique qui est transformée en prostaglandines telles que la thromboxane A₂, l'un des plus puissants vasoconstricteurs, et amplifie ainsi la réponse inflammatoire. Ces cytokines modifient également les propriétés fibrinolytiques des CE en réduisant la production du *tissue plasminogen activator* (tPA) et en augmentant la production du *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1).¹⁸ Toute réponse inflammatoire s'accompagne

de production de cytokines anti-inflammatoires dont l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 et le *transforming growth factor-beta* (TGF- β). Ces cytokines sont synthétisées par les lymphocytes T auxiliaires (TH2).¹⁹ Tous ces médiateurs ont la capacité d'induire l'expression des molécules d'adhésion et de moduler l'activité des CML. Ainsi, des facteurs de croissance tels que le *platelet-derived growth factor* (PDGF) et le facteur de croissance de la famille de l'insuline (*insulin-like growth factor*) sécrétés par les macrophages stimulent la prolifération et la migration des CML.^{3, 11} La multiplication des CML est accompagnée de la synthèse de matrice extracellulaire (MEC) soit le collagène, les protéoglycans et l'élastine. De plus, les macrophages sécrètent des enzymes protéolytiques, les *matrix metalloproteinases* (MMP) qui sont responsables de la dégradation des protéines de la MEC.²⁰ De plus, la dégradation par les MMP des limitantes élastiques des vaisseaux favorisent la migration des CML à la paroi subendothéliale contribuant à la formation de la plaque au stade initial. L'activité des MMP peut être réduite par des inhibiteurs tissulaires des MMP synthétisés de façon constitutive par les CML. Toutefois, dans les plaques athéromateuses, l'infiltration importante de cellules inflammatoires accroît l'expression de l'IL-1, du TNF- α et l'IFN- γ , favorise l'expression des MMP et diminue la production des protéines de la MEC sans modifier le taux d'expression des inhibiteurs tissulaires des MMP. La prolifération des CML et la synthèse de la MEC forment ainsi la chape fibreuse (Figure 2).

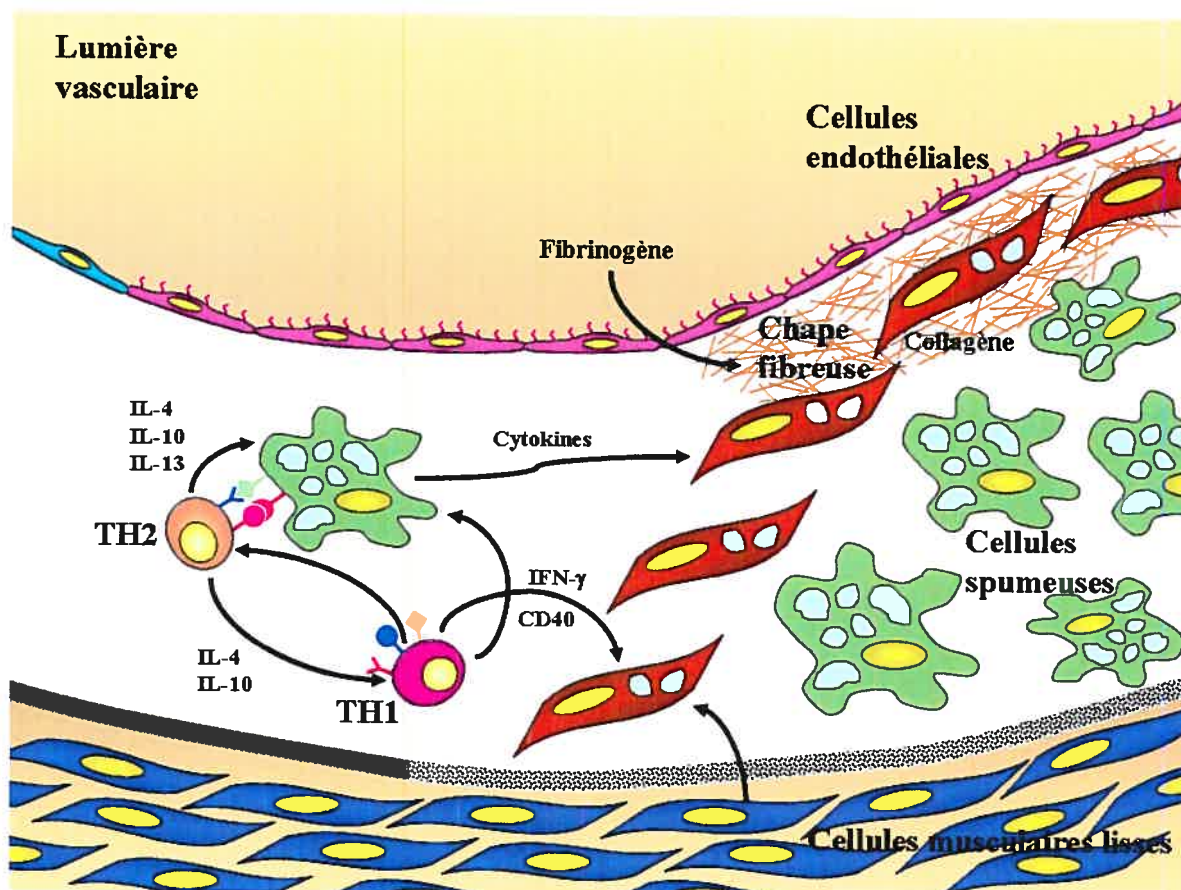


Figure 2: Progression de la plaque athéromateuse et formation de la chape fibreuse

Les macrophages interagissent avec les lymphocytes impliqués dans le processus inflammatoire. Les CML stimulées par les macrophages et les lymphocytes migrent de la média vers l'intima, prolifèrent et synthétisent de la matrice extracellulaire formant la chape fibreuse (adapté d'après Glass C.K. ¹¹).

1.1.1.5 Instabilité et rupture de la plaque

En réponse à une inflammation chronique, la mort des CML par apoptose, la protéolyse ainsi que la dégradation et l'érosion de la chape fibreuse provoquent l'érosion et la rupture de la plaque athéromateuse. De nombreuses données angiographiques, angioscopiques, d'exploration chirurgicale et d'autopsies ont démontré que l'occlusion abrupte des artères coronaires menant aux syndromes coronariens aigus est, dans 70 à 80% des cas, liée à une rupture de la plaque athérosclérotique.²¹⁻²³ Le site de rupture devient

alors très thrombogénique puisqu'elle expose aux éléments du sang circulant des substances pro-coagulantes telles que le collagène et la fibrine ce qui engendre des cascades d'activation, d'adhésion et d'agrégation plaquettaire. Différents facteurs extrinsèques (anomalies plaquettaires) et intrinsèques (libération de l'ADP, le Thromboxane A₂, les acides gras et le facteur tissulaire) par les plaquettes peuvent favoriser la thrombose. Les pathologistes ont par conséquent décrit que les plaques vulnérables sont associées à une coque fibreuse mince, à un centre lipidique riche en LDL et à une abondance de macrophages et autres cellules inflammatoires. Une telle plaque est susceptible de rupture parfois due à des causes extrinsèques telles qu'une poussée hypertensive ou une élévation de la pression artérielle suite à un effort physique important (on parle alors de rupture passive), mais surtout pour causes intrinsèques à la plaque telles que la réponse inflammatoire (on parle ici de rupture active). Le concept de plaque instable fait donc son apparition dans les années 90 (Figure 3).²⁴

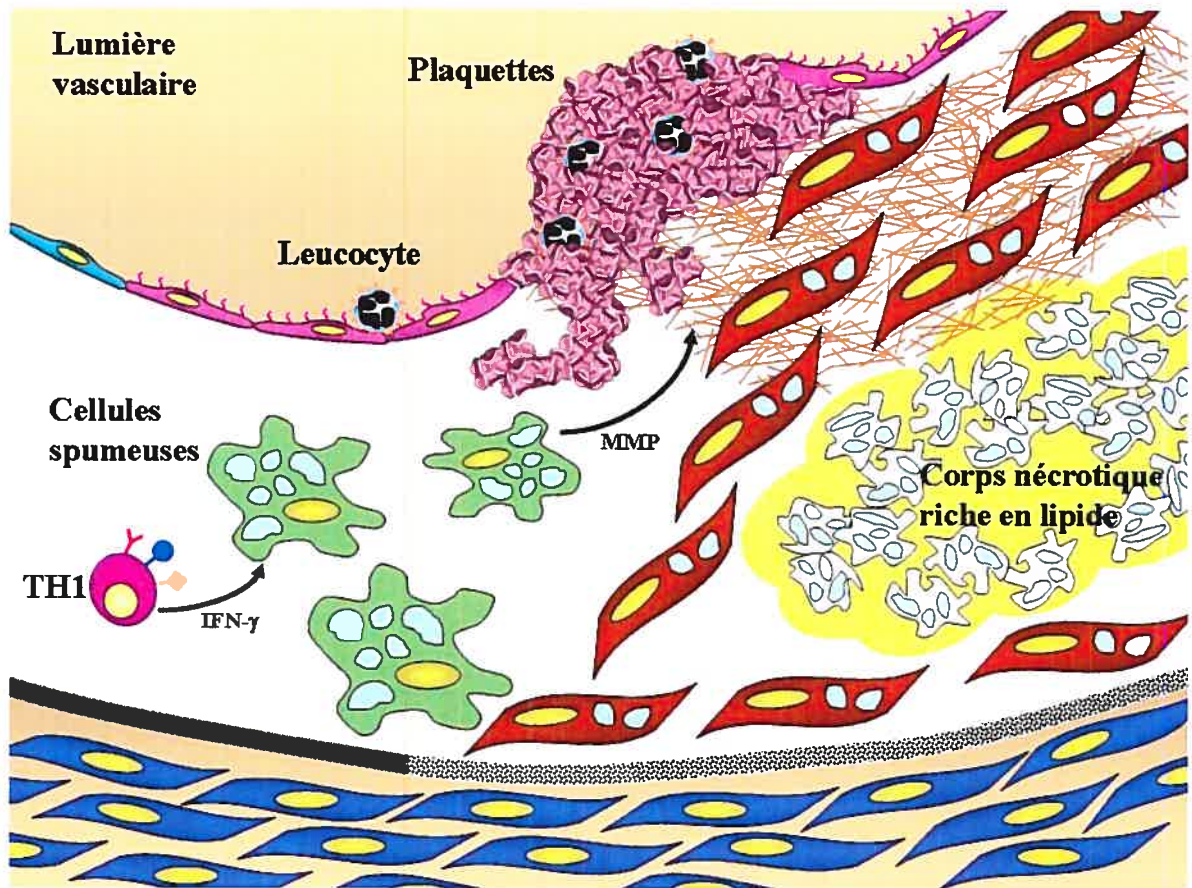


Figure 3: Processus de rupture de la plaque et de la formation d'un thrombus

La formation d'un corps nécrotique riche en lipides composé de cellules spumeuses et de MEC. Les macrophages sécrètent également des MMP qui contribuent à amincir la chape fibreuse. La rupture de la plaque provoque l'activation des plaquettes et la formation d'un thrombus (adapté d'après Glass C.K. ¹¹).

1.1.1.6 Les mécanismes de rupture de la plaque

Le pourcentage relatif occupé par le centre lipidique dans les lésions athérosclérotiques est l'une des principales différences anatomiques entre les plaques stables et instables. En effet, le centre lipidique de la plaque instable peut représenter jusqu'à 64% du volume total en comparaison à 14% pour la plaque stable.²⁵ De plus, les plaques instables se caractérisent par des changements phénotypiques des CML contenant deux fois plus de granules sécrétoires.²⁶ La libération par les macrophages de certaines

cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α engendrant l'apoptose des CML contribue à rendre la plaque de plus en plus instable. Les macrophages prolifèrent et produisent également de l'IFN- γ qui a pour effet d'inhiber la prolifération des CML. Cette suppression de la prolifération des CML entraîne une réduction de la synthèse de MEC. Ce phénomène s'amplifie par la dégradation de la MEC qui se fait essentiellement par les MMPs relâchées par les macrophages. Les LDL oxydées participent aussi à la surexpression des MMPs par les macrophages. D'autres molécules telles que IL-1 et IL-8 sont susceptibles aussi de dissoudre la chape fibreuse.²⁷ En plus de sa dégradation, l'inhibition de la synthèse de MEC est le résultat de la perte de fonctionnalité et de l'apoptose de CML induites par le TNF- α et l'IFN- γ .^{28, 29} La plaque instable se caractérise donc par une prédominance de macrophages et de cellules inflammatoires et par la réduction de CML et de la quantité de MEC. D'autres facteurs sont passibles de déstabiliser ou au contraire de « stabiliser » une plaque. Ainsi l'IL-1, l'IL-7, l'IL-8, le TNF- α , l'ET-1, la thrombine, l'ANG II sont des molécules proinflammatoires, alors que l'IL-10, l'IL-13 et le NO sont des facteurs protecteurs.^{27, 30-32} La rupture de la plaque augmente de façon massive l'adhérence des plaquettes et des leucocytes et mène éventuellement à l'occlusion totale du vaisseau. Cette réduction graduelle de la lumière du vaisseau engendre de l'angine de poitrine pouvant mener à des infarctus du myocarde. L'occlusion d'une artère coronarienne entraîne une nécrose du muscle myocardique suite à l'absence d'oxygénation. La mort des cellules myocardiques provoquent la libération d'enzymes telles que le TNF- α pour ainsi induire la mort des cellules avoisinant. Certains infarctus sévères peuvent mener à la mort subite du patient.

1.1.2 Les traitements

La progression de la plaque aboutissant à une réduction du calibre de l'artère fait donc apparaître de l'angor stable (angine de poitrine dont la plaque est stable, sans thrombose ni rupture de la plaque) et les syndromes coronariens aigus qui sont provoqués par la rupture de la plaque, une étape déterminante dans l'évolution de l'athérosclérose. Sur le plan thérapeutique, l'utilisation d'agents anti-plaquettaires, de l'aspirine, du clopidogrel, d'antagonistes des récepteurs anti-intégrines plaquettaires de la glycoprotéine IIb/IIIa et

d'agents thérapeutiques neutralisant la thrombine vise à contrôler la formation du thrombus coronarien.³³ Cependant, l'emploi d'agents anti-thrombotiques ne suffit pas à revasculariser le cœur. Afin de rétablir le flot sanguin, les chirurgies cardiovasculaires avaient traditionnellement recours aux pontages coronariens qui consistent à la greffe de veines prélevées dans les jambes ou d'artères prises dans la cavité thoracique et anastomosées distalement aux artères coronariennes sténosées. Toutefois, des méthodes moins invasives telle que l'angioplastie coronarienne transluminale percutanée (ACTP) et l'implantation d'endoprothèse apparues depuis presque une trentaine d'années ont révolutionné le traitement de la maladie coronarienne athérosclérotique..

1.1.2.1 L'angioplastie coronarienne

L'ACTP se pratique au moyen d'une sonde munie d'un ballonnet qui, lorsque gonflé au site d'obstruction, permet de comprimer la masse lipidique athéromateuse de façon radiaire et de dilater la paroi du vaisseau. Le ballon est monté par voie artérielle jusqu'au lieu du rétrécissement par l'intermédiaire d'une sonde introduite en pénétrant une artère périphérique comme l'artère fémorale au niveau de l'aîne ou l'artère radiale au niveau du poignet. Cette technique établie depuis 1978 comporte toutefois certaines limitations.³⁴ En effet, dans plusieurs cas, la dilatation par ballonnet seulement demeure insuffisante pour permettre une bonne revascularisation principalement lorsqu'il y a durcissement (calcification) de la plaque. De plus, le recul élastique suite à l'étirement initial du vaisseau et la guérison tissulaire peut provoquer un remodelage vasculaire et mener au rétrécissement de l'artère plutôt qu'à l'élargissement du vaisseau.³⁵

1.1.2.2 L'endoprothèse coronarienne

Afin de palier au phénomène de recul élastique et à la vasoconstriction du vaisseau à la suite d'une ACTP, l'introduction d'une endoprothèse coronarienne métallique, un tube expansible formé d'un filet en différents matériaux biocompatibles, permet d'élargir les artères coronaires rétrécies. Cette endoprothèse est délivrée à l'extrémité d'un cathéter porteur, puis déployée à la suite du gonflement du ballonnet auquel elle est fixée. Elle est ensuite libérée dans la lumière vasculaire par le dégonflement et le retrait du ballonnet.³⁶

1.1.2.3 Autres techniques

D'autres techniques telles que l'utilisation du laser et du « Rotablator » ont fait leur apparition comme outils adjuvants permettant d'ouvrir et de dilater des lésions plus complexes. Le laser consiste à émettre de courtes pulsations de photons qui pulvérisent la plaque athéromateuse alors que le « Rotablator » est un appareil de traitement qui, au lieu de déplacer et écraser la plaque d'athérome, la supprime à l'aide d'une fraise revêtue de micro-cristaux de diamants tournant à très haute vitesse. Ces deux techniques sont donc une solution complémentaire au ballonnet de l'angioplastie des artères calcifiées ou à l'hyperplasie néointimale plus ou moins égale à l'intérieur d'une endoprothèse.^{37, 38}

1.1.2.4 Les inconvénients

L'utilisation de l'angioplastie et de l'endoprothèse coronarienne provoque des blessures à la paroi déclenchant divers processus de guérison vasculaire. Il peut donc y avoir formation d'une nouvelle masse cellulaire composée principalement de CML et de MEC communément appelée resténose. La resténose qui survient dans 20 à 30% des cas 6 mois après l'intervention demeure la première cause d'échec de l'angioplastie et l'implantation des endoprothèses coronariennes métalliques (Figure 4).³⁹

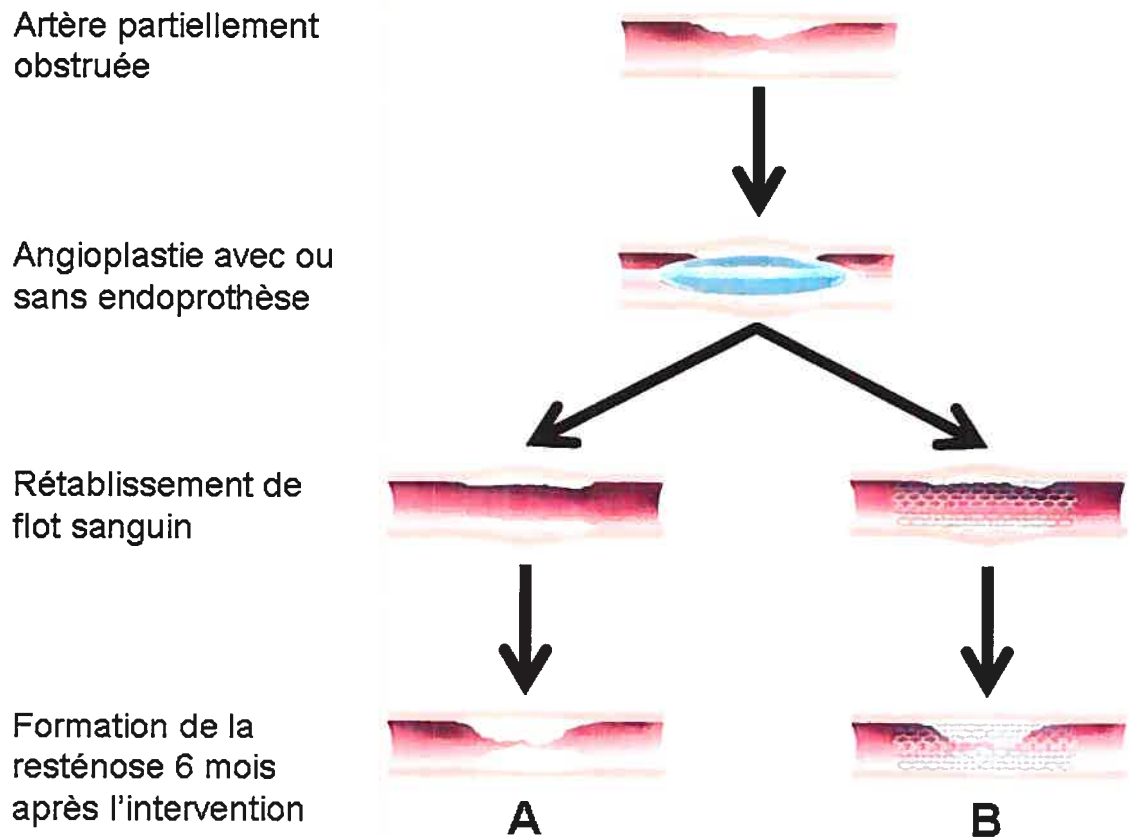


Figure 4: Formation de la resténose à la suite d'une ACTP ou l'implantation d'une endoprothèse vasculaire

1.2 La resténose

La resténose est une réponse d'adaptation à la suite d'une lésion artérielle survenant lors d'une ACTP avec ou sans mise en place d'endoprothèse. La pathogenèse de la resténose est un processus complexe et multifactoriel impliquant une atteinte endothéliale, l'agrégation des plaquettes et des leucocytes, la production de cytokines inflammatoires, la prolifération et la migration des CML, la synthèse de MEC et le remodelage vasculaire.⁴⁰

1.2.1 Dénudation endothéliale

La dénudation endothéliale de la paroi artérielle est considérée comme le premier événement qui survient à la suite d'une angioplastie ou de l'implantation d'une

endoprothèse. La perte d'inhibition de contact produite par la dénudation des CE provoque leur réplication de la partie proximale vers la partie distale du segment affecté. Les CE produisent alors des facteurs de croissance tels que le PDGF, TGF- β et le facteur de croissance des fibroblastes qui permettent aux CML de migrer, de proliférer et de synthétiser de la MEC. Ce processus se perpétue jusqu'à environ 1 mois chez un modèle porcin et 6 mois chez l'humain afin d'obtenir une réendothélialisation complète du segment.⁴¹

1.2.2 Agrégation des plaquettes et formation de thrombus

À la suite de la blessure artérielle, les plaquettes s'activent et adhèrent rapidement au site de lésion. Plusieurs agents anti-plaquettaires ont été utilisés afin de prévenir la formation de la resténose sans que les études cliniques n'aient pu démontrer un bénéfice.⁴²⁻⁴⁴ La formation d'un thrombus se produit par déposition locale de fibrine et de collagène dans les premières heures suivant l'angioplastie ou l'implantation d'une endoprothèse. Leur déposition est proportionnelle à l'étendu de la lésion artérielle. La fibrine et le collagène servent également de plateforme à l'agrégation des plaquettes. Les plaquettes ainsi activées induisent avec grande rapidité la principale intégrine responsable de l'agrégation des plaquettes soit l'intégrine α IIb β 3.³³ La liaison des plaquettes au collagène stimule la relâche de thromboxane A₂ au niveau des complexes de glycoprotéines IIb/IIIa menant ainsi à l'activation et à l'adhésion de plaquettes. Les plaquettes activées libèrent des facteurs de croissance et contribuent à la migration et la prolifération des CML.^{45, 46} D'autres facteurs tels que le PDGF, le TGF- β , l'histamine et la production de molécules proinflammatoires sont générés également par les plaquettes et seront décrit dans les prochaines sections.

1.2.2.1 Le *platelet-derived growth factor* (PDGF)

Le PDGF est un puissant stimulateur de la formation de l'hyperplasie néointimale. Des études animales ont démontré que l'ajout de PDGF favorise la prolifération des CML à la suite d'une lésion endothéliale induite par l'ACTP.⁴⁷ De plus, le PDGF agit comme un

puissant chimioattractant pour les CML en contribuant à leur migration. La thrombine, générée par les plaquettes activées, favorise la libération du PDGF. Des études *in vivo* ont clairement démontré l'importance du PDGF dans la resténose puisque son inhibition par thérapie génique prévient de façon significative l'hyperplasie néointimale dans un modèle de dénudation de la carotide de rat.⁴⁸

1.2.2.2 Le *transforming growth factor-beta* (TGF- β)

Le TGF- β joue un rôle important dans les processus de réparation tissulaire en réponse à un traumatisme. Il exerce de nombreux effets inhibiteurs sur les mécanismes inflammatoires, la croissance et la différenciation des cellules précurseurs hématopoïétiques et sur la prolifération et l'apoptose des cellules immunocompétentes. Le TGF- β , dérivé des plaquettes, stimule la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) chez les CML et des protéines de la MEC confirmant son rôle dans l'hyperplasie néointimale. Son implication a également été démontrée par l'augmentation de l'expression des intégrines αv et $\beta 3$ contribuant ainsi à la migration des CML, monocytes et neutrophiles.⁴⁹ L'utilisation d'anticorps ciblant spécifiquement la protéine TGF- β réduit la formation de la resténose dans les modèles d'animaux de blessures vasculaires.⁵⁰

1.2.2.3 Le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1)

Le PAI-1 est présent dans les granulocytes α des plaquettes et peut être activé par diverses cytokines et facteurs de croissance. Sa principale fonction est de s'opposer à l'activation du plasminogène et au système fibrinolytique jouant un important rôle dans l'homéostasie vasculaire.⁵¹ La fibrinolyse implique donc la dissolution des dépôts fibrineux formés en permanence dans la lumière vasculaire. Le précurseur du plasminogène, activé par le t-PA ou le *urokinase-type plasminogen activator*, est synthétisé et sécrété par les CE qui produisent également le PAI-1. La thrombine et la bradykinine stimulent l'expression du t-PA alors que les médiateurs inflammatoires élèvent le taux de PAI-1. Ce dernier, par liaison au t-PA, forme un complexe inactif diminuant l'activité fibrinolytique.⁵² Toutefois, le PAI-1 ne se limite pas à la simple régulation des processus thrombotiques. En effet, il

module également la dégradation de la MEC, stimule la migration et la prolifération des CML et régule positivement ou négativement l'angiogénèse puisqu'une réduction des tumeur et de l'angiogénèse a été observée chez les souris déficientes pour le gène du PAI-1 alors que sa surexpression favorise la formation de tumeur.^{53, 54} Le PAI-1 est donc impliqué dans les mécanismes thrombogéniques, le remodelage vasculaire et au développement de l'athérosclérose.⁵¹

1.2.2.4 Le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire est une glycoprotéine intramembranaire présente sur la paroi des vaisseaux et des monocytes circulants. Il se lie au facteur VII/VIIa et ainsi initie la cascade de la coagulation. L'activation de cette cascade contribue à la migration et la prolifération des CML.⁵⁵ L'expression du facteur tissulaire est induite par divers facteurs de croissance, des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β et TNF- α et par des endotoxines.⁵⁶ Les concentrations plasmatiques du facteur tissulaire augmentent considérablement 4 heures après l'angioplastie.

1.2.2.5 La glycoprotéine IIb/IIIa

La glycoprotéine IIb/IIIa (CD41/61) est un récepteur pour le fibrinogène, le *von Willebrand factor*, la fibronectine et la vitronectine. Elle participe à l'activation et l'agrégation des plaquettes. Des études ont clairement démontré une augmentation de l'expression du complexe glycoprotéine IIb/IIIa chez les patients ayant développé une resténose 6 mois suivant l'angioplastie ou la procédure interventionnelle.⁵⁷

1.2.2.6 Le facteur d'activation plaquettaire

Le facteur d'activation plaquettaire est un phospholipide rapidement synthétisé par les plaquettes et les CE stimulées par la thrombine ou par une blessure artérielle.⁵⁸ Il est également reconnu pour être un puissant stimulateur d'une multitude de voies métaboliques intercellulaires et intracellulaires.⁵⁹ Il est donc intimement impliqué dans l'hyperplasie néointimale par sa capacité à induire la migration des CE. Le facteur d'activation

plaquettaire se lie à ses récepteurs au niveau des CE et induit une puissante réponse inflammatoire aiguë et chronique produisant l'augmentation du calcium intracellulaire, la contraction du squelette d'actine, le rétrécissement cellulaire et l'hyperperméabilité vasculaire influençant ainsi la pression artérielle.⁶⁰ Le facteur d'activation plaquettaire participe également à l'activation des leucocytes et favorise ainsi leur roulement et adhérence à l'endothélium.⁶¹

1.2.3 La migration et la prolifération des CML et synthèse de MEC

Il est bien connu que les CML de la paroi vasculaire ont deux phénotypes distincts : un phénotype contractile, que l'on retrouve à l'état normal au niveau de la média, et un phénotype sécrétoire qui apparaît dans les lésions athéromateuses. La fonction contractile permet une vasomotricité régulant le tonus artériel. La vasomotricité est réglée par les messagers agissant sur l'endothélium qui vont ensuite sécréter d'autres second messager (ET-1, NO) aux CML. Les CML assurent des fonctions métaboliques, en particulier la sécrétion de MEC. Le changement de phénotype des CML permettant leur migration de la média vers l'intima et leur prolifération se fait sous l'influence de différents facteurs : le PDGF sécrété par les macrophages et les cellules endothéliales, l'IL-1 libéré par les macrophages, l'inactivation du récepteur du TGF- β , la présence de lysophosphatidylcholine dans les LDL oxydées, la lipoprotéine-A, l'ANG II et la thrombine.⁶²⁻⁶⁴ Ces facteurs accroissent la capacité de synthèse protéique des CML afin de produire une grande quantité de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycanes.

1.2.3.1 Implication du cycle cellulaire dans la prolifération des CML

La prolifération cellulaire est un processus biologique fondamental au cours du développement et lors de la réparation tissulaire qui demande donc un contrôle rigoureux, exempt d'erreur et une coordination temporelle et spatiale précise avec d'autres mécanismes.⁶⁵ Lors du processus de réparation vasculaire, les CML sortent de leur phase quiescente G₀ pour entrer dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire peut se schématiser

par une séquence de quatre étapes. L'ensemble des périodes G_1 , S et G_2 séparant deux mitoses est nommé interphase.⁶⁶ En général, les cellules ne progressent pas dans la phase suivante du cycle cellulaire avant d'avoir achevé tous les événements associés à la phase précédente. Pour cela, des mécanismes de surveillance permettent à la cellule de s'assurer de l'exécution complète des événements d'une phase avant d'initier les événements associés à la phase suivante. Ces dernières assurent ainsi une duplication et une transmission fidèle du génome aux cellules filles résultant de la division cellulaire. La machinerie moléculaire du cycle cellulaire est composée de facteurs de régulation qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire. La progression de la cellule au cours des différentes phases du cycle et point de contrôle est régulée par l'activation transitoire de complexes cyclines/kinases dépendantes des cyclines (CDK), de l'état hypo- ou hyperphosphorylé de la protéine rétinoblastome, des phosphatases (Cdc25, cdc2) et de la protéine 53 (Figure 5).⁶⁷⁻⁷²

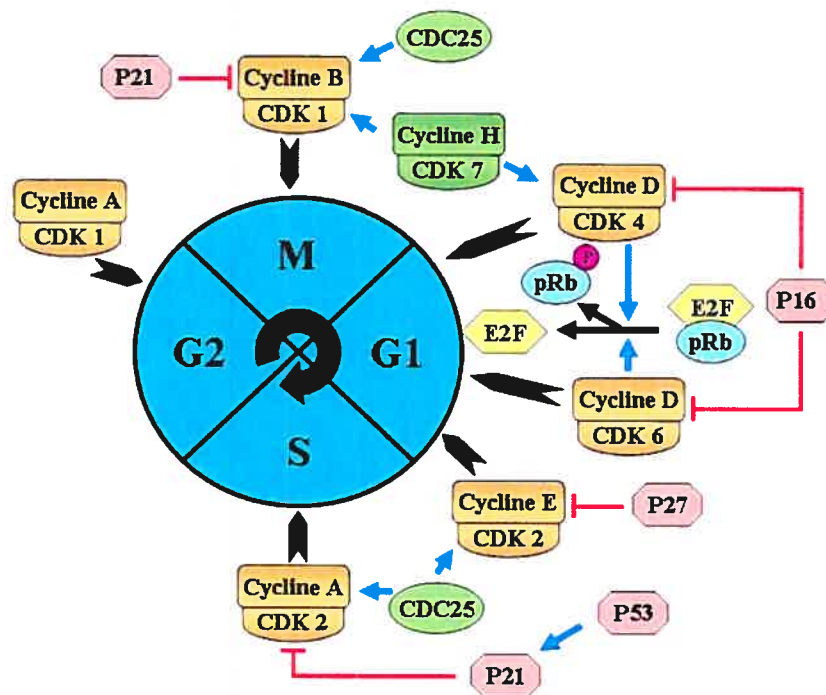


Figure 5: Déroulement du cycle cellulaire

Implication des différentes cyclines, CDK et des inhibiteurs des cyclines/CDK au cours des différentes phases du cycle cellulaire.

1.2.3.2 Les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs)

Les cellules possèdent de multiples cascades de MAPKs régulant plusieurs activités cellulaires telles que l'expression des gènes, la mitose, le métabolisme de survie et d'apoptose et la différenciation. La voie de signalisation des MAPKs a été largement étudiée pour expliquer les effets de divers stimuli.⁷³ La famille des MAPKs est séparée en cinq groupes distincts: les *extracellular signal-regulated kinase* (ERK-1, -2 ou p42/44 MAPK), les *c-Jun N-terminal kinase* (JNK-1, -2 et -3), les isoformes de p38 α , β , γ et δ , ERK-3 et ERK-4 et finalement ERK-5.⁷⁴ Les ERK-1 et -2 sont préférentiellement stimulées par les facteurs de croissance et les esters. Les JNK et p38 MAPK répondent principalement au stress, aux cytokines et aux chocs osmotiques.⁷⁵ Même si chaque membre de la famille des MAPKs possède des caractéristiques uniques, il partage certaines similitudes. En effet, chaque famille est composée d'une cascade de kinases présentée dans la Figure 6.

Cascade des MAPKs

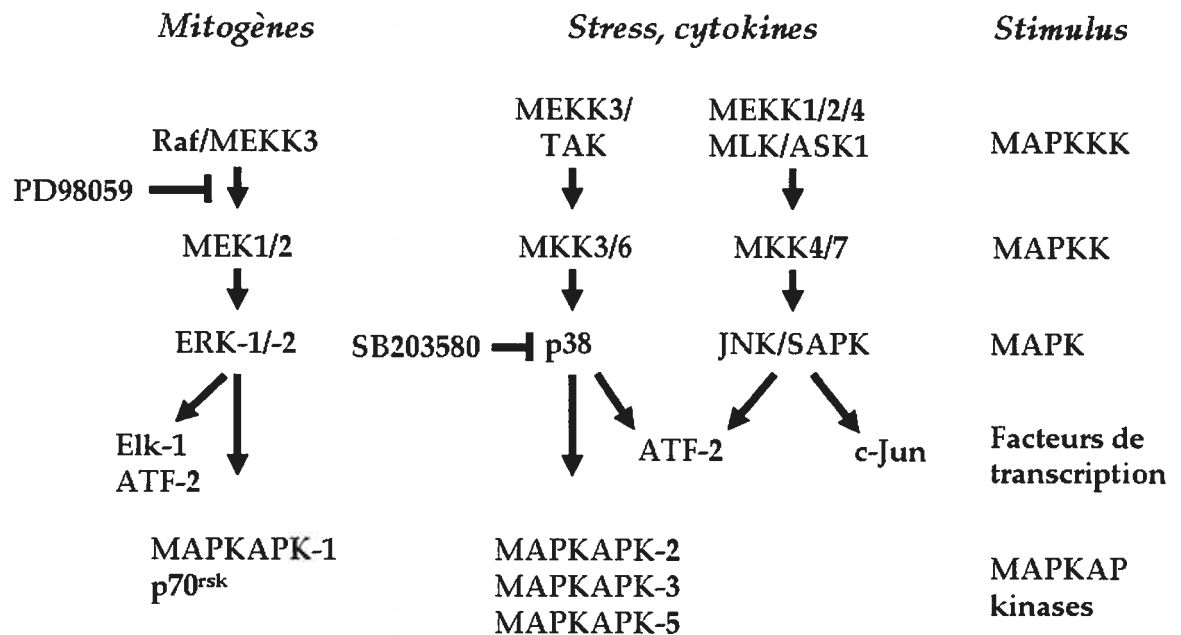


Figure 6: La cascade des MAPKs

Implication des différentes protéines impliquées dans la cascade de signalisation des MAPKs (adapté d'après Pearson G. ⁷⁵).

1.2.3.2.1 ERK-1 et ERK-2

Les protéines ERK-1 et ERK-2 possèdent 83% d'homologie et sont exprimées par une variété de cellules. Leur activation passe généralement par la stimulation d'un récepteur tyrosine kinase couplé à une protéine G présent à la surface des cellules. Lorsque ce récepteur est stimulé, il induit l'activation de la cascade de Raf/MEK/ERK via la petite protéine Ras liant une GTP qui recrute ensuite la protéine SOS. L'activation de Ras, par le changement d'une GDP pour une GTP, permet son interaction avec la kinase Raf. Cette dernière phosphoryle deux autres kinases MEK-1 et MEK-2 qui, à leur tour, activent ERK-1 et -2. Lorsqu'elles sont phosphorylées, ERK-1 et -2 s'accumulent dans le noyau pour induire divers processus dont l'activation de protéines membranaires (CD130a, Syk et calnexin), des substrats nucléaires (SRC-1, Pax-6, NA-AT, ELK-1, MEF-2, c-Fos, c-Myc et STAT3), des protéines cytoplasmiques (paxilline et neurofilaments) et autres protéines kinases appelées protéines kinases activées par les MAPK (MKs). Il existe également un inhibiteur de ERK-1 et -2, le PD98059, qui empêche la phosphorylation de ERK-1 et -2.⁷⁶

77

1.2.3.2.2 p38 MAPK et JNK

L'activation des différents isoformes de p38 est induite par le stress environnant et par des cytokines inflammatoires. La majorité de ces stimuli active également la voie de JNK. La MEK-6 possède la capacité d'induire la phosphorylation de toutes les isoformes de p38 alors que la MEK-3 est sélective pour la p38 α et p38 β . Suite à son activation, la p38 phosphorylée peut se retrouver dans le cytoplasme ou dans le noyau et ainsi agir sur divers substrats tels que la phospholipase cytosolique A₂, la protéine Tau associée aux microtubules et aux facteurs de transcription (ATF-1, ATF-2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), Ets-1 et p53).⁷⁸ L'inhibiteur de la voie de p38 est le SD203580. Tout comme les p38, les JNK sont activées par des cytokines, du stress, des radiations, des agents dommageables pour l'ADN tels que les peroxy-nitrites et certains facteurs de croissance. La stimulation des JNK passe par la phosphorylation de la MEK-4

et MEK-7. Lorsqu'elles sont phosphorylées, les JNK se localisent dans le noyau pour ainsi induire des facteurs de croissance (ATF-2, NF-ATc1, HSF-1 et STAT3).^{74,78}

1.2.4 Le remodelage vasculaire

Il est reconnu que les artères coronaires humaines peuvent changer de taille en réponse à la croissance des plaques d'athérosclérose. Glagov et ses collaborateurs ont montré, par des études morphométriques, que la coronaire gauche augmente son diamètre interne pour compenser la perte de lumière vasculaire par la sténose tant que la plaque n'occupe pas plus de 40% de la surface de la lumière, phénomène correspondant à un remodelage positif.⁷⁹ De manière similaire, Losordo et al. ont montré, en utilisant l'échographie endovasculaire intracoronarienne *in vivo*, que la surface totale du vaisseau (tout le contenu à l'intérieur de la lame élastique externe) est plus grande dans les segments d'artères coronaires sténosées que dans les segments d'artères coronaires normales.⁸⁰ En général, les plaques hémorragiques inflammatoires caractérisées par un large centre lipidique, une infiltration accentuée de macrophages et des dépôts calciques importants ont moins tendance à se remodeler positivement en comparaison aux plaques ne possédant pas toutes ces caractéristiques. Les mécanismes biologiques impliqués dans le remodelage vasculaire ne sont pas très bien connus. Toutefois, la relâche des MMP, particulièrement les MMP-1 et MMP-13, par les macrophages est en partie responsable de la dégradation de MEC permettant le remodelage vasculaire.^{81,82}

1.2.5 Les nouveaux traitements pour prévenir la resténose

1.2.5.1 La brachythérapie

Au cours des dernières années, la brachythérapie endocoronaire a soulevé un réel enthousiasme pour la prévention de la resténose. L'utilisation des radiations ionisantes à faible dose a été proposée dans le but d'inhiber la prolifération néointimale et de prévenir la resténose. De nombreuses études ont démontré une réelle efficacité dans la prévention de la resténose intra-endoprothèse. Toutefois, les premières études cliniques utilisant la brachythérapie ont fait apparaître deux complications majeures: la thrombose tardive et le

phénomène de resténose en bordure de la zone irradiée.^{83, 84} La thrombose tardive se définit lorsqu'elle se produit au-delà de 30 jours voire même au-delà de 6 mois après ce traitement. Ce type de complication est lié à une réendothélialisation retardée et/ou à un mauvais déploiement de l'endoprothèse coronarienne irradiée sur la paroi. La resténose aux extrémités de l'endoprothèse est due à une hyperplasie néointimale plutôt qu'à un remodelage de la paroi artérielle.⁸³

1.2.5.2 La thérapie génique

La thérapie génique vasculaire peut potentiellement contrôler la croissance cellulaire impliquée dans la formation de la resténose en modifiant l'expression de certains gènes.⁸⁵ Les séquences d'antisens d'oligodésoxynucléotides (ODN) se lient par complémentarité au brin d'acide ribonucléique (ARN) messager de la protéine cible, inhibent la synthèse protéique et ainsi bloquent l'expression des gènes impliqués dans la prolifération des CML (Figure 7).⁸⁶ La livraison intramurale des antisens d'ODN contre le gène c-myc a permis de réduire drastiquement la prolifération néointimale dans un modèle porcin.⁸⁷ Toutefois, cette technique ne s'est pas avérée efficace chez l'humain.⁸⁸ La thérapie génique est également utilisée pour le transfert de gènes ayant des propriétés antiprolifératives et/ou favorisant la réendothélialisation telles que le NO et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF).⁸⁹⁻⁹¹ Cependant, l'induction de ces gènes chez l'humain demeure controversée en outre par le potentiel pro-inflammatoire du VEGF à court terme et par l'absence d'effet vasculaire à long terme.

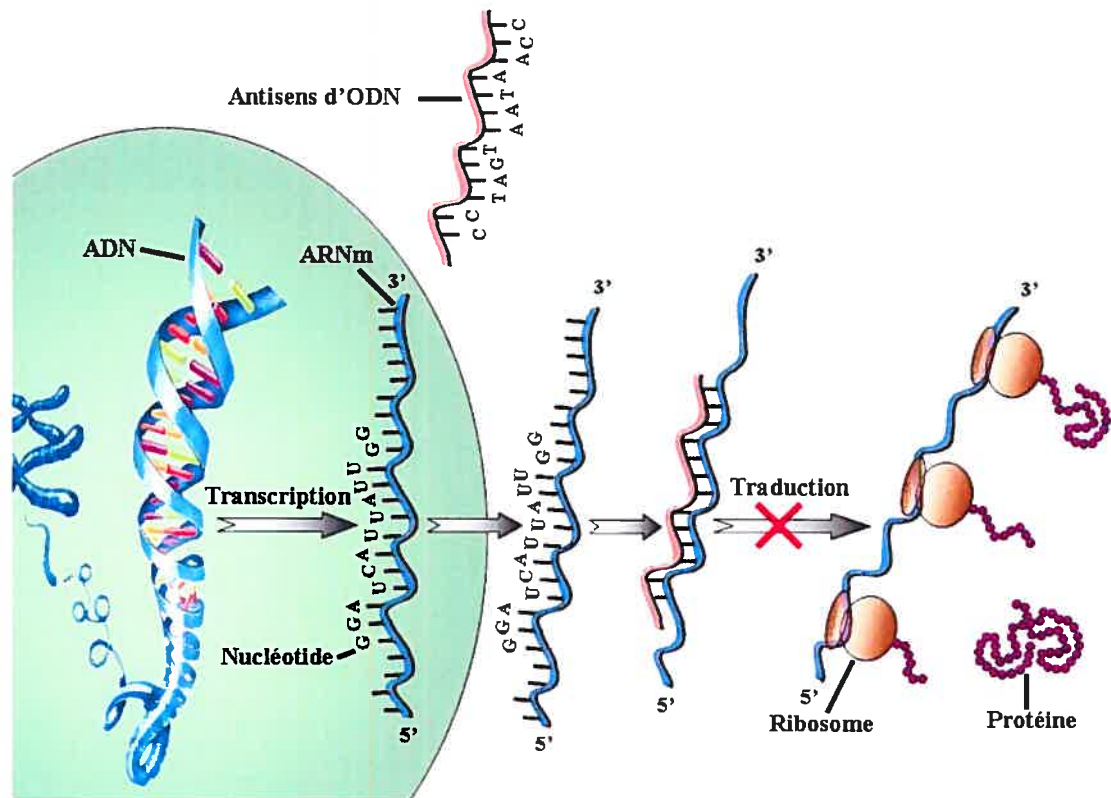


Figure 7: Blocage de la traduction par les antisens

L'introduction d'un antisens ODN engendre sa liaison par complémentarité à l'ARN messager du gène cible et ainsi bloque sa traduction par les ribosomes (adapté d'après Askari F.K. ⁸⁶).

1.2.5.3 Les endoprothèses enduits de médicament (*drug eluting stent*)

Les endoprothèses pharmacologiques sont des endoprothèses vasculaires classiques enrobées d'un médicament anti-prolifératif intégré dans certains cas dans une couche de polymère. Ce polymère permet de fixer le médicament, d'en contrôler la diffusion, d'obtenir un revêtement uniforme et stable mais qui peut poser des difficultés de fabrication et des risques inflammatoires ou allergiques. Contrairement aux endoprothèses à l'héparine destinées à réduire les risques de thrombose, les endoprothèses pharmacoactives utilisent un médicament destiné à réduire le risque de resténose. Les deux principales molécules utilisées à ce jour sont la rapamycine et ses dérivés (sirolimus, tacrolimus, everolimus, rapalog) et le paclitaxel.^{92, 93} Certaines molécules plus toxiques ou inefficaces ont déjà été

abandonnées (actinomycine D) et de nombreuses autres sont encore au stade préclinique. Jusqu'à présent, de très bons résultats ont été obtenus à l'aide de ces endoprothèses pharmacoactives réduisant ainsi de façon considérable le taux de resténose. Cependant, certains s'interrogent sur les effets à moyen et long terme (thrombose tardive) des médicaments anti-prolifératifs qui pourraient retarder le processus de guérison vasculaire et de réendothélialisation.⁹⁴

1.2.5.4 Réendothélialisation

Les chercheurs poursuivent plusieurs stratégies incluant la modulation pharmacologique, le génie tissulaire et la thérapie génique des cellules progénitrices afin de limiter la blessure vasculaire, accélérer la régénération des CE et réduire l'hyperplasie néointimale. La promotion du processus de guérison vasculaire en stimulant la prolifération des CE plutôt que son inhibition demeure une approche logique pouvant prévenir la resténose. Les résultats d'études utilisant des facteurs de croissance tels que le VEGF pour accélérer la réendothélialisation n'ont pas été très concluantes.⁹⁵⁻⁹⁷ Même l'utilisation d'endoprothèse enrobée de VEGF n'a démontré aucune augmentation significative de la réendothélialisation ou diminution de l'hyperplasie néointimale.⁹⁸ D'autres techniques ont également été expérimentées. L'ensemencement de CE pendant et après une intervention coronarienne semblait une avenue attrayante, mais comporte des difficultés majeures: un temps d'ensemencement trop long, un système de livraison non optimal et une adhésion marginale de CE non fonctionnelles au site de lésion vasculaire.⁹⁹⁻¹⁰¹ Il est de plus en plus évident que la régénération endothéliale de la paroi vasculaire dénudée ne se fait pas uniquement par la prolifération des CE adjacentes. Plusieurs études ont démontré le rôle des CE progénitrices issus de la moëlle osseuse circulant dans le sang dans le processus de réendothélialisation et d'inhibition de la resténose.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Ainsi, l'utilisation d'une endoprothèse enrobée d'anticorps anti-CD34, un récepteur présent à la surface des progéniteurs de CE, dans des artères coronaires de porc est présentement sous investigation.¹⁰⁵

1.3 L'inflammation

Les études récentes, associées aux observations anatomo-pathologiques réalisées à partir de plaques d'athérosclérose humaines, permettent d'affirmer que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères.¹⁰⁶ Il est devenu de plus en plus clair que l'inflammation joue un rôle prédominant dans toutes les étapes de la formation de l'athérosclérose: formation des stries lipidiques riches en macrophages spumeux, développement des lésions fibro-musculaires contenant des CML de la chape fibreuse, déstabilisation de la plaque par l'activation des MMP et rupture de la plaque, formation du thrombus occlusif et également la surexpression de marqueurs tels que les molécules d'adhésion, les cytokines, les cellules proinflammatoires et les enzymes apoptotiques et procoagulantes.¹⁰⁷

1.3.1 Les cytokines

Les cytokines synthétisées rapidement suite à un stimulus peuvent être sécrétées sous forme soluble agissant de façon autocrine ou paracrine sur diverses cellules. Les cytokines induisent l'amplification de la réponse immunitaire, l'inflammation, le recrutement cellulaire et participent au développement de l'athérosclérose et de la resténose.¹⁰⁸ Les effets des cytokines se font par l'intermédiaire de leurs récepteurs spécifiques, séparés en cinq familles distinctes: les récepteurs de la famille du TNF qui partagent une homologie de structure du site d'interaction avec le ligand, les récepteurs de l'IFN qui régulent l'activité anti-virale et modulent la réponse immunitaire, les récepteurs de l'IL-1, certains membres de la superfamille des immunoglobulines, les récepteurs des chimiokines à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G et les récepteurs de la famille des hématopoïétines.¹⁰⁸⁻¹¹¹

1.3.1.1 Le facteur de tumeur nécrotique alpha (TNF- α)

Le TNF- α est une protéine trans-membranaire de 17 kDa qui agit sous forme d'homotrimère. Il peut être clivé et relargué sous forme soluble. Le TNF- α possède deux

récepteurs, le p55 TNFR (CD120a) et le p75 TNFR (CD120b). La forme p55 est exprimée de manière ubiquitaire et est en partie responsable de certaines réactions de la réponse immunitaire. Le TNF- α est associé à la mort cellulaire programmée et à d'autres manifestations physiques telles que la fièvre et la perte d'appétit. Le récepteur p75, quant à lui, est principalement exprimé sur les cellules hématopoïétiques. Ses effets semblent plutôt limités puisqu'ils peuvent être induits également par le récepteur p55.¹¹² Les effets du TNF- α peuvent être reproduits par l'IL-1.¹¹⁰ Les effets inflammatoires du TNF- α incluent l'activation de cellules hématopoïétiques, l'activation de la cascade de cytokines ainsi que l'activation des CE. Le TNF- α provoque la réorganisation du cytosquelette d'actine et la modification de la perméabilité des CE activées par un mécanisme impliquant une protéine G et une diminution de l'AMPc.¹¹³⁻¹¹⁵ Le TNF- α possède également une activité transcriptionnelle. En effet, dans les CE, il induit l'expression des molécules d'adhésion telles que la *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), la E-sélectine et la P-sélectine.^{116, 117} La liaison du TNF- α à son récepteur active cinq différentes voies de signalisation : 1- les voies d'induction de l'apoptose, 2- la voie de signalisation des lipides, 3- la cascade des MAPKs, 4- le facteur de transcription NF- κ B, et 5- les autres cibles potentielles telles que la protéine kinase C et la cascade de signalisation des *Janus Kinases/Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT).¹¹⁸

1.3.1.2 L'interféron (IFN)

L'IFN est une famille de cytokines composée de deux sous-classes distinctes qui interagissent chacune avec un récepteur spécifique de type I et de type II.¹¹⁹ Tous les types de cellules possèdent la capacité de produire l'IFN de type I (IFN- α , IFN- β) en réponse à un stimulus inflammatoire. Par contre, l'IFN de type II (IFN- γ) est exclusivement produit par les lymphocytes T et les cellules *natural killer*. Possédant des propriétés anti-virales, leur rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans la régulation du système immunitaire est maintenant clairement établi.¹²⁰

1.3.1.2.1 Les récepteurs de l'IFN

Les récepteurs aux IFN (RIFN) sont des glycoprotéines transmembranaires faisant partie de la famille des récepteurs aux cytokines. Les RIFN possèdent deux sous-unités responsables de la liaison à l'IFN et une autre responsable en partie de la transmission du signal.^{121, 122} Comme tous les récepteurs aux cytokines, les RIFN ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque. C'est l'association avec les protéines tyrosine kinase cytoplasmiques de la famille des *Janus kinase* (JAK) qui leur permet de transmettre ses signaux.¹²³ Suite à l'activation des récepteurs par leur ligand, les différentes sous-unités s'associent et induisent la phosphorylation des protéines JAK.¹²⁴ La phosphorylation des résidus tyrosine intracytoplasmique des récepteurs permet le recrutement des *signal transducer and activator of transcription* (STAT) par l'intermédiaire de leur domaine d'homologie SH2. La réponse primaire des IFN engendre donc l'expression de certains gènes à la suite de cette cascade de phosphorylation entre les JAKs et les STATs (Figure 8).¹²⁵

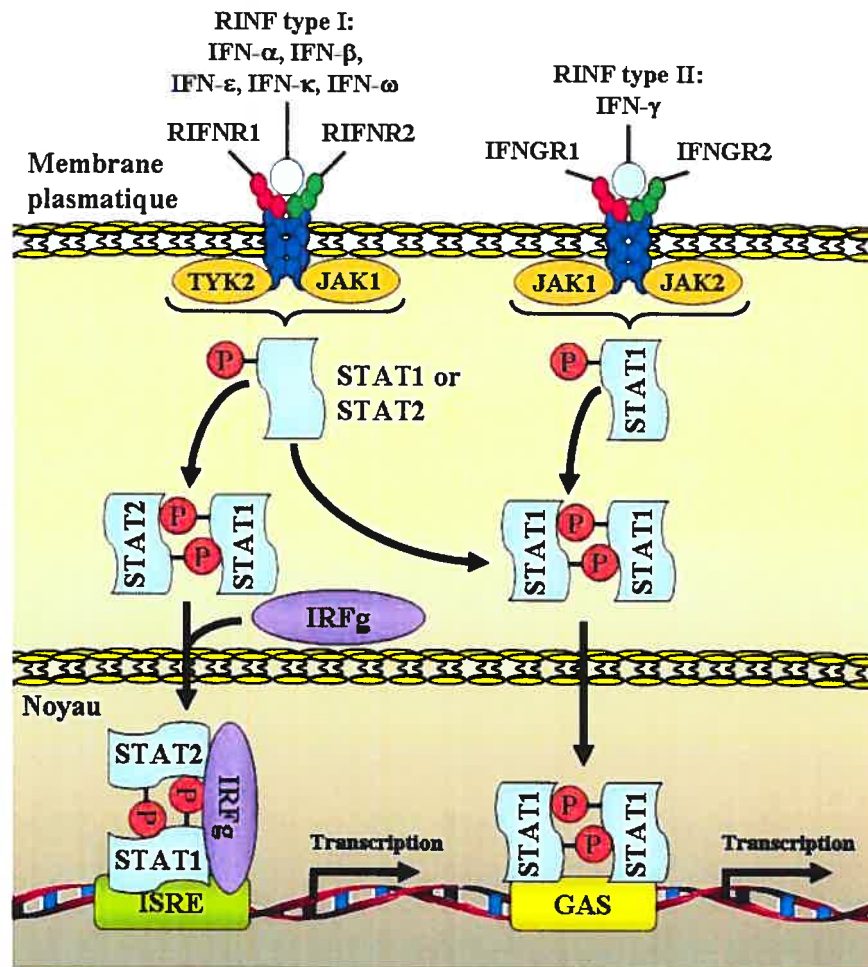


Figure 8: Récepteurs à l'IFN et activation classique des protéines JAK/STAT

La liaison des IFN aux RINF de type I et II engendre l'activation des JAK pour ensuite phosphoryler les protéines STATs afin d'initier la transcription des gènes cibles (adapté d'après ¹²⁰).

1.3.1.2.2 La voie de signalisation de JAK/STAT

1.3.1.2.2.1 Les protéines JAK

La famille des protéines cytoplasmiques JAK comportent quatre membres (Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2) qui possèdent des poids moléculaires variant de 120 à 140 kDa.^{126, 127} Elles sont exprimées de façon ubiquitaire, à l'exception de Jak3 qui est exprimée principalement dans les cellules d'origine hématopoïétique. Les JAK renferment une structure à sept domaines d'homologie. En absence de stimulation, les JAK demeurent de

manière latente et inactive associées à la partie intracytoplasmique des récepteurs de l'IFN. La dimérisation du récepteur après la fixation de son ligand spécifique déclenche le processus signalétique d'autophosphorylation et de transphosphorylation. L'activation de ces différentes kinases transmet ensuite l'information aux facteurs de transcription intermédiaires STAT pour se rendre au noyau des cellules.¹²⁸

1.3.1.2.2 Les facteurs de transcription STAT

Les protéines STAT sont des facteurs de transcription qui ont la capacité d'être activées au niveau de récepteurs membranaires. La famille STAT comprend aujourd'hui sept membres (Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b et Stat6).¹²⁷ Ces protéines possèdent une structure identique composée de cinq domaines.¹²⁹ En condition latente dans la cellule, les STAT s'expriment sous forme de monomères. Leur activation par phosphorylation sur un résidu tyrosine unique conduit à leur translocation au niveau du noyau sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères.

1.3.1.3 Le CD40/CD40L

Le CD40 et son ligand, le CD40L (CD154), initialement caractérisés au niveau des lymphocytes B et T, jouent un rôle dans la différenciation des cellules au cours de la réponse immunitaire.¹³⁰⁻¹³⁴ Des études ont permis d'établir que les protéines CD40 et CD40L sont également présentes chez une variété de cellules telles que les leucocytes, les macrophages, les CML et les CE.^{16, 135} Plus récemment, les plaquettes ont été identifiées comme étant une source de CD40L dont la relâche s'effectue lorsque les plaquettes sont activées suggérant l'implication de CD40L dans la formation de thrombus.¹³⁶ Le CD40 est une protéine transmembranaire de 48 kDa, constitutivement exprimée au niveau des cellules et qui fait partie de la famille des récepteurs du TNF- α . La transcription du gène de CD40 passe par la liaison du NF- κ B et de STAT à son promoteur.¹³⁷ La stimulation de diverses cytokines telles que l'IL-1, l'IL-3, le TNF- α , et particulièrement l'IFN- γ induit l'expression de CD40. Le CD40L, de 39 kDa, est une protéine, également membre de la famille du TNF- α , qui n'est pas constitutivement exprimée à la surface des cellules. Les

cytokines proinflammatoires et l'utilisation prolongée ou à forte dose de glucocorticoïdes augmentent l'expression de CD40L qui peut être clivée et présente sous forme soluble dans le sang.¹³⁸

1.3.1.3.1 La signalisation de CD40

La signalisation intracellulaire induite par l'interaction du CD40 avec son ligand (complexe CD40/CD40L) diffère significativement en fonction du type de cellules et de son stade d'activation et de différenciation. Originellement, il a été suggéré que la trimérisation du récepteur CD40 était nécessaire à son activation par le CD40L. Plus récemment, il a été démontré que la mono- et la dimérisation induisent également des signaux intracellulaires. Toutefois, ces signaux sont de moins grande amplitude que ceux produits par la trimérisation.¹³⁹ La région cytoplasmique du CD40 contient deux domaines de signalisation.¹⁴⁰ Plusieurs évidences démontrent que ces deux domaines peuvent, seuls ou combinés, se lier aux TRAF-1 à -6 qui semblent être impliqués dans l'activation de CD40.¹³⁴ La surexpression de TRAF-2 active les protéines kinases activées par le stress et le NF- κ B. La liaison de TRAF-6 a également la capacité de stimuler les voies de signalisation d'ERK-1/-2, de JNK, de p38 MAPK et de la *phosphoinositide-3 kinase* (PI3K) favorisant le recrutement de protéines kinases induisant le NF- κ B. Au niveau de CE, la liaison de CD40 favorise l'activation du facteur régulateur de l'IFN-1 (Figure 9).¹⁴¹

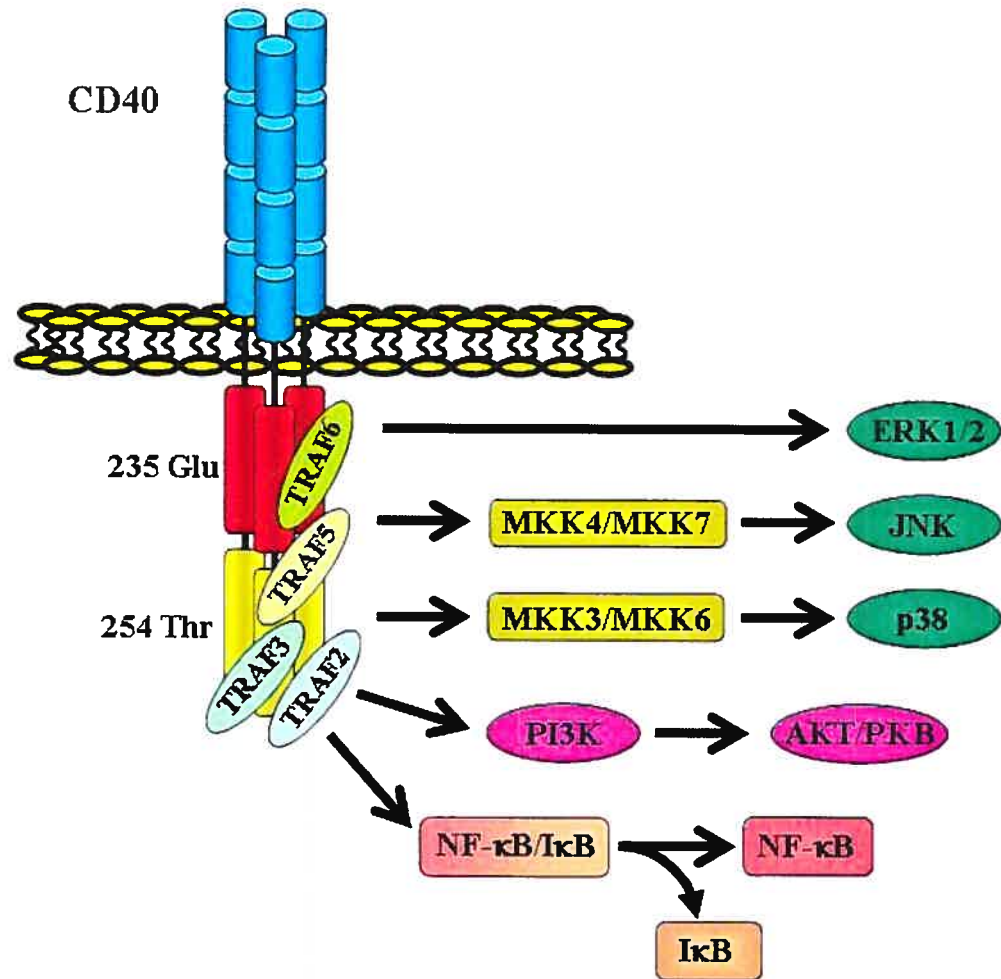


Figure 9: Forme trimérique du récepteur CD40 et ses voies de signalisation

La liaison de CD40L à la forme trimérique du récepteur CD40 recrute des protéines activatrices (TRAF) et active plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription.

1.3.1.3.2 Le rôle de CD40/CD40L dans l'athérosclérose et la resténose

L'implication du complexe CD40/CD40L dans la maladie athérosclérotique a clairement été démontrée dans un modèle de souris où l'utilisation d'anticorps anti-CD40L réduit la formation de la plaque athéromateuse.¹⁴² Le complexe CD40/CD40L est ainsi capable d'induire l'expression des molécules d'adhésion et d'initier l'adhésion des cellules immunocompétentes à la surface de l'endothélium. L'interaction de CD40/CD40L semble également participer à la réponse immune en favorisant l'induction de la réponse TH1 et la

suppression de la réponse TH2.¹⁴³ Ainsi, le CD40/CD40L régule la production de plusieurs cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-10, l'IL-12 et l'IL-15.¹⁴⁴⁻¹⁴⁹ Le complexe CD40/CD40L module l'expression et/ou la relâche de molécules chimioattractantes telles que l'IL-8, la protéine inflammatoire des macrophages, le MCP-1, les *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted* et le facteur dérivé des cellules stromales-1. Ceci confère au CD40/CD40L la capacité d'attirer les lymphocytes et leucocytes au foyer d'inflammation.¹⁵⁰ De plus, le complexe CD40/CD40L stimule positivement ou négativement l'expression d'une multitude de protéines impliquées dans les mécanismes menant à la formation de l'athérosclérose telle que les chimiokines, les facteurs de croissance, les MMPs, les protéines de coagulation et autres molécules. Il est donc clair que l'interaction de CD40/CD40L régule plusieurs processus cruciaux dans plusieurs étapes de la formation et de la progression de la plaque athéromateuse.

1.3.2 Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion se définissent comme des molécules exprimées à la surface des cellules permettant leur adhésion à d'autres cellules ou à une matrice extracellulaire. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'interaction des cellules avec leur environnement. Elles sont donc responsables de la structure tridimensionnelle des tissus, de la morphogenèse et de la production de signaux complexes. Les molécules d'adhésion se divisent en quatre familles de récepteurs distincts: les sélectines, la superfamille des immunoglobulines ou *cell adhesion molecule* (CAM), les intégrines et les cadhérines. Les mécanismes impliqués dans le roulement, l'adhérence et la transmigration d'une cellule sont intimement liés aux signalisations intracellulaires (Figure 10).¹⁵¹

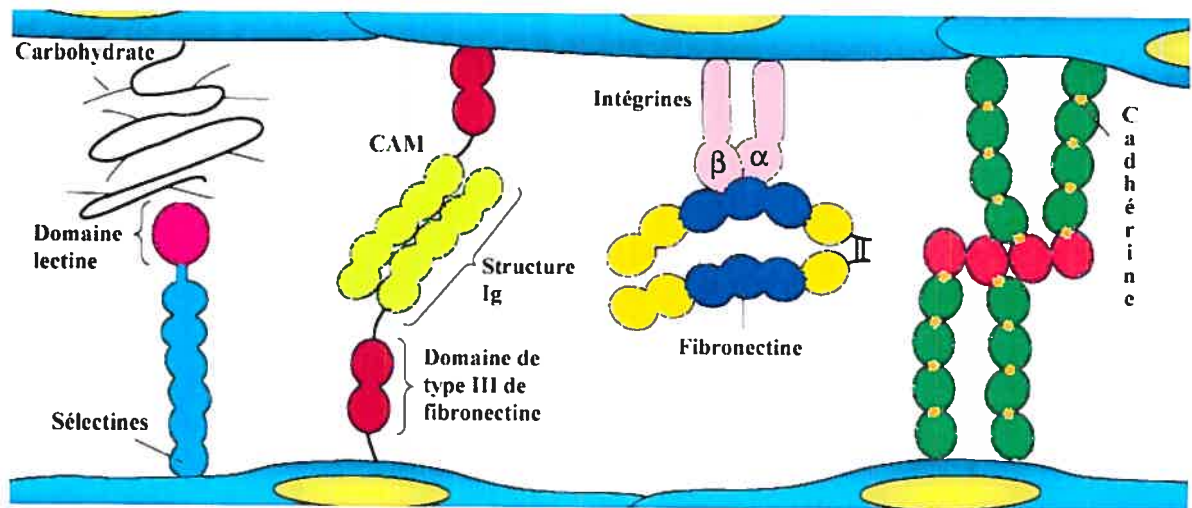


Figure 10: Famille des molécules d'adhésion

Structure de la famille des sélectines, des immunoglobulines, des intégrines et des cadhérines au niveau de l'endothélium (adapté d'après Aplin A.E. ¹⁵²).

1.3.2.1 Les sélectines

Les sélectines (CD62), une famille de trois différentes glycoprotéines (L -, E- et P-sélectine) dépendantes du calcium, possèdent certaines structures similaires. La partie extracellulaire de chaque sélectine dispose de trois domaines différents : un domaine lectine de type C de 120 acides aminés en amino-terminal, un domaine de type *epidermal growth factor* de 35 à 40 acides aminés et de deux à neuf courtes répétitions consensus (~60 acides aminés) de protéines régulatrices du complément. Chez l'humain, on retrouve deux répétitions de protéines régulatrices du complément sur la L-sélectine, six sur la E-sélectine et neuf sur la P-sélectine. ¹⁵² La L-sélectine est exprimée constitutivement par les leucocytes, la E-sélectine est exprimée exclusivement par les cellules endothéliales activées et la P-sélectine se retrouve dans les granules α des plaquettes et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Les mécanismes par lesquels ces molécules d'adhésion sont régulées négativement après leur activation sont un processus déterminant puisqu'ils limitent le processus inflammatoire. Une surexpression ou le maintien de l'expression de ces molécules a des conséquences sur

les processus inflammatoires et sur l'intégrité de la paroi vasculaire. Après activation, les sélectines disparaissent rapidement de la surface des cellules par des mécanismes d'internalisation ou de destruction par les lysosomes (P- et E-sélectine) ou par un mécanisme de clivage protéolytique. Il est donc possible de mesurer dans le sang les isoformes solubles des sélectines. Les formes solubles peuvent être dégradées, mais possèdent également d'autres fonctions. En effet, elles se lient à leurs récepteurs respectifs et ainsi agissent en inhibiteur ou en activateur au recrutement cellulaire. La signalisation impliquant les sélectines est bidirectionnelle et provient de la queue cytoplasmique des sélectines, mais aussi de leurs ligands ou de leurs contre-récepteurs adjacents activés. Les sélectines favorisent donc le roulement et l'adhésion des leucocytes. Toutefois, il a été démontré que l'adhérence par les sélectines est inversement proportionnelle aux forces de cisaillement et que celles-ci doivent atteindre un seuil minimal.¹⁵³ Les sélectines se lient à des hydrates de carbone complexes, fucosylés et/ou sialylés tels que le sialyl Lewis X, mais aussi avec grande affinité à des glycoprotéines ressemblant à la famille des mucines.¹⁵⁴

1.3.2.1.1 La L-sélectine

Dans la réponse immune, la L-sélectine (CD62L, LECAM-1, LAM-1, gp90^{MEL-14}) de 74kD (lymphocyte) à 90-100 kD (neutrophile) est exprimée par les leucocytes, mais également par les lymphocytes T, et interagit avec l'endothélium. L'activation des leucocytes par la libération de la L-sélectine induit une surexpression rapide de l'intégrine $\alpha M\beta 2$ (CD11b/CD18 ou Mac-1) des granules d'entreposage, une intégrine qui se lie à ICAM-1 sur les CE.¹⁵⁵ L'induction de la L-sélectine à la surface se fait très rapidement et à la suite d'une stimulation par un facteur de croissance, d'une diminution du nombre de neutrophiles ou par exposition au peroxyde et aux ions superoxydes. Les facteurs de croissance activent donc la cascade de signalisation des MAPKs régulant l'expression de la L-sélectine. Ce processus permet l'activation des intégrines et la relâche de granules sécrétoires par les neutrophiles.¹⁵⁶ La relâche endoprotéolytique de la L-sélectine par les neutrophiles est le résultat d'un changement de conformation de la protéine lorsque les neutrophiles sont activés.¹⁵⁷

1.3.2.1.2 La E-sélectine

La E-sélectine (CD62E, ELAM), de 95 à 115 kD, n'est pas constitutivement présente dans les CE non activées. Cependant, elle est rapidement exprimée suite à une stimulation par diverses molécules proinflammatoires telles que la lipopolysaccharide (LPS), le TNF, l'IL-1 β et la thrombine.¹⁵⁵ Le ligand de la E-sélectine, la glycoprotéine ESL-1, est présent sur les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Elle est également située sur les microvillis (interfaces destinées au contact cellule-cellule) des leucocytes.¹⁵⁸ L'expression de la E-sélectine est habituellement transitoire avec une induction maximale à 4 heures après stimulation pour retourner à un niveau basal en 16 à 24 heures. L'induction du promoteur du gène de la E-sélectine par le TNF- α se fait via l'activation du NF- κ B et de la voie JNK et p38 MAPK impliquant la phosphorylation des facteurs de transcription c-Jun et ATF2.¹⁵⁹ Les modifications morphologiques des CE stimulent l'expression de la E-sélectine à la surface membranaire.¹⁶⁰ Les neutrophiles roulent sur la E-sélectine et génèrent un signal pour activer l'intégrine β 2 via la cascade de la ERK1/2 et p38 MAPK.¹⁶¹

1.3.2.1.3 La P-sélectine

La P-sélectine (CD62P, GMP-140, PADGEM) de 140 kD possède deux mécanismes de régulation. Dans un premier temps, il y a la translocation en surface de la P-sélectine, entreposée dans les corps de Weibel-Pallade des CE et dans les granules α des plaquettes. Dans un deuxième temps, il y a une activation transcriptionnelle du gène. Suite à un traitement à l'histamine, à la thrombine ou à certains agents pharmacologiques, la P-sélectine est exprimée en quelques minutes à la surface de l'endothélium, voire quelques secondes pour les plaquettes. Toutefois, cette expression à la surface est transitoire, puisque la P-sélectine est internalisée 30 à 60 minutes après stimulation par endocytose ou est clivée sous sa forme soluble.¹⁵⁵ Le traitement au LPS ou au TNF amène quant à lui une synthèse de P-sélectine.¹¹⁶ Des études chez des souris déficientes pour le gène de la P-sélectine ont démontré une diminution importante de l'adhérence des neutrophiles et une réduction significative de la plaque athérosclérotique.^{162, 163} Cependant, une réponse inflammatoire induite par le TNF permet tout de même le roulement et le recrutement des leucocytes chez

des souris déficientes pour la E- et P-sélectine suggérant un mécanisme indépendant des sélectines.¹⁶⁴ La P-sélectine est également impliquée dans différentes voies de signalisation et est rapidement phosphorylée puis déphosphorylée à la suite d'un stimulus.¹⁵²

1.3.2.2 La superfamille des immunoglobulines – CAM

Cette famille possède une grande variété de récepteurs cellulaires. Ces récepteurs possèdent une portion transmembranaire unique, une ou plusieurs copies d'une structure Ig, une structure compacte avec deux cystéines séparées par 55 à 75 acides aminés arrangés en deux feuillets β anti-parallèles et une portion cytoplasmique. Ces protéines présentent également plusieurs copies du domaine de type III de répétition de fibronectine.¹⁵²

1.3.2.2.1 La molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM)

Il existe cinq membres de la famille des ICAM (ICAM-1 à -5). Les CE et les leucocytes expriment principalement ICAM-1. ICAM-1 lie l'intégrine α L β 2 (LFA-1 ou CD11a/CD18) ainsi que α M β 2 (Mac-1 ou CD11b/CD18).¹⁶⁵ Diverses cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1 β , le TNF- α et le LPS ainsi que le VEGF possèdent la propriété d'augmenter l'expression d'ICAM-1.^{117, 166} ICAM-1 est impliquée dans l'adhésion des lymphocytes et des neutrophiles à la paroi de l'endothélium favorisant leur migration à travers les CE.¹⁶⁷

1.3.2.2.2 La molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM)

La protéine VCAM-1 (CD106) est, tout comme ICAM-1, exprimée au niveau de l'endothélium vasculaire activé par le TNF- α , le LPS ou l'IL-1. Elle induit l'adhérence des monocytes, lymphocytes, basophiles et éosinophiles à l'endothélium. Les neutrophiles peuvent se lier, à l'aide de son ligand l'intégrine α 4 β 1 (VLA-4 ou CD49d/CD29), à VCAM-1 présente sur les CE.¹¹⁷ La VCAM-1 est libérée sous forme soluble par les CE et sert de marqueur inflammatoire de l'athérosclérose. L'activation de la VCAM-1 permet de moduler l'activité de certains signaux intracellulaires et ainsi réguler les interactions endothéliales cellule-cellule et permettre une migration transendothéliale des leucocytes.¹⁶⁸

1.3.2.3 Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires composées de deux sous-unités, α et β , liées de manière noncovalente. Il existe au moins huit sous-unités β et 18 sous-unités α . La spécificité de l'intégrine pour son substrat est définie par les différentes combinaisons spécifiques des sous-unités α et β .¹⁶⁹ Les intégrines servent de récepteurs à la matrice extracellulaire ainsi qu'à d'autres récepteurs sur une cellule adjacente. Des études chez des souris déficientes en différentes sous-unités ont permis de définir la spécificité de chaque sous-unité.¹⁷⁰ Les intégrines ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque. La liaison de l'intégrine à son ligand permet le recrutement de différents adaptateurs et kinases cytoplasmiques. Ce type d'interaction provoque une signalisation spécifique pour les protéines recrutées et l'intégrine impliquée.¹⁷¹ La force d'adhérence entre l'intégrine et la cellule induit également différents signaux intracellulaires provoquant la liaison de différentes protéines au domaine cytoplasmique ainsi qu'un changement de conformation de l'intégrine.¹⁶⁹ Des études sur la structure tridimensionnelle des intégrines suggèrent qu'à l'état de repos, la portion extracellulaire de l'intégrine est repliée près de la membrane de la cellule et que l'activation de celle-ci permet le déplacement des portions juxta-membranaires des sous-unités et l'exposition des épitopes de la partie extracellulaire de l'intégrine.¹⁷²

1.3.2.4 Les cadhérines

Les cadhérines sont une famille de protéines transmembranaires possédant un domaine extracellulaire composé de cinq répétitions en tandem, un segment transmembranaire et une portion cytoplasmique d'environ 150 acides aminés.¹⁵² La portion extracellulaire d'une cadhérine interagit avec la portion extracellulaire d'une autre cadhérine sur la cellule adjacente. Cette interaction se fait en présence de calcium. La portion cytoplasmique se lie au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines. La cadhérine spécifique de l'endothélium vasculaire est impliquée dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire. L'activation des CE permet de briser les complexes

de la cadhérine spécifique de l'endothélium vasculaire situés en bordure latérale des CE et ainsi induire la migration transendothéliale des monocytes.¹⁷³

2 Les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes ont un rôle important de régulation dans une variété de processus biologiques incluant la reproduction, la différenciation, le développement, la prolifération cellulaire, l'inflammation, l'apoptose et le métabolisme. Elles agissent également dans l'homéostasie de divers tissus dont le cerveau, les seins, les os, l'utérus, les testicules et le système cardiovasculaire. Il est bien reconnu que l'incidence de MCV diffère significativement entre les hommes et les femmes. Cette différence n'est toutefois observable que chez les femmes pré-ménopausées en comparaison aux hommes du même groupe d'âge. Le risque de MCV chez les femmes augmente après la ménopause. Au Canada, les MCV sont responsables de presque 38% de tous les décès chez les femmes.¹ Ce nombre excède largement le total des décès attribuables à toutes les formes de cancer combinées. L'augmentation du taux de mortalité chez les femmes ménopausées (FM) suggère que l'environnement hormonal joue un rôle important dans la protection contre les MCV.

2.1 Le type d'hormone

La ménopause est un processus naturel qui survient progressivement vers l'âge de 51 ans. Elle se manifeste lorsque les ovaires ont épuisé leur réserve d'ovules qui peuvent être fécondées. L'organisme sécrète une quantité de plus en plus faible et inconstante d'hormones. La ménopause chirurgicale se produit lorsque les femmes de tout âge doivent subir l'ablation des deux ovaires. Ces changements hormonaux entraînent des symptômes physiques tels que les bouffées de chaleur, les sueurs nocturnes, l'atrophie vaginale, l'incontinence urinaire, les réactions sexuelles variables, la fatigue, la lassitude et des symptômes psychologiques tels que des problèmes d'humeur, de mémoire, de dépression, d'anxiété et de nervosité.¹⁷⁴ Afin de pallier à cette baisse du taux d'hormones, les FM ont recours à la thérapie de remplacement hormonal (TRH). Les principales hormones

féminines sont les estrogènes et la progestérone dont les taux, avant la ménopause, varient au cours du cycle menstruel (Figure 11).

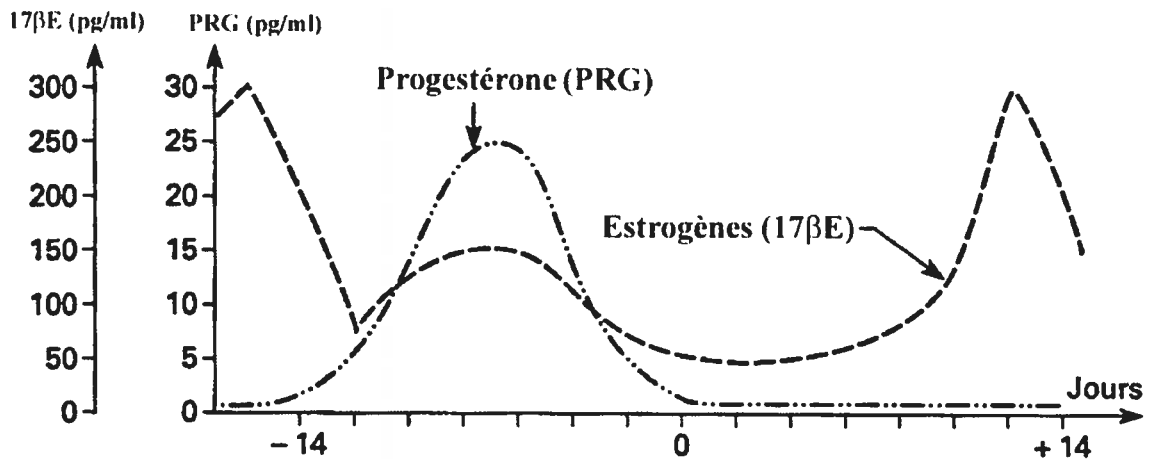


Figure 11: Concentrations plasmatiques des hormones ovariennes

Représentation graphique des niveaux sanguins d'estrogènes et de progestérone au cours du cycle menstruel chez la femme.

2.1.1 Les estrogènes

Les trois principaux estrogènes, le 17-bêta-estradiol (17βE), l'estriol et l'estrone sont des dérivés du noyau estrane comportant un cycle aromatique. La structure d'estrane n'est pas indispensable à l'activité estrogénique puisque diverses autres substances ne comportant qu'un noyau phénolique (les dérivés flavone) peuvent avoir une activité estrogénique. La biosynthèse des estrogènes s'effectue essentiellement dans les ovaires sous l'effet de l'hormone lutéo-stimulante mais d'autres organes, tels que le testicule, le tissu adipeux, l'hypothalamus et le cerveau peuvent aussi les synthétiser. Les estrogènes, comme tous les stéroïdes, dérivent du cholestérol et de la prégnénone. Ces derniers sont transformés en androstènedione et testostérone, précurseurs directs des estrogènes. La principale réaction enzymatique impliquée est la transformation de la testostérone et de l'androstènedione en estradiol et estrone sous l'influence d'une aromatasé constituée d'un cytochrome P-450 et d'un cytochrome réductase utilisant le *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced* (NADPH) comme réducteur. Chez la femme, la

concentration sanguine d'estrogènes varie au cours du cycle menstruel avec un pic préovulatoire élevé et un pic postovulatoire plus faible.¹⁷⁵

2.1.2 La progestérone

La progestérone (PRG) joue un rôle régulateur dans la gestation chez la femelle et induit la formation de la dentelle utérine à l'endomètre préalablement soumis à l'influence des estrogènes. La PRG est synthétisée essentiellement par les ovaires et, à un moindre degré, par les testicules, les glandes surrénales et le placenta au cours de la deuxième partie de la grossesse.¹⁷⁶ La synthèse se fait à partir du cholestérol sous l'influence d'une desmolase. Le cholestérol est transformé en prégnénolone qui, sous l'influence d'une déshydrogénase et d'une isomérase, donne la PRG. Sa sécrétion n'est pas constante au cours du cycle menstruel. Elle est déclenchée par l'hormone lutéo-stimulante apparaissant juste avant l'ovulation et se poursuit au cours de la deuxième partie du cycle. Le niveau de PRG chute à la fin du cycle et ainsi participe au déclenchement de la menstruation. Il existe plusieurs progestatifs synthétiques tels que l'acétate de médroxyprogestérone (MPA) dont les propriétés ne se superposent pas complètement à celles de la PRG et qui sont utilisés surtout en association avec le conjugué d'éthinylestradiol (CEE) comme contraceptifs hormonaux.¹⁷⁴

2.1.3 L'hormonothérapie

Depuis les années 70, de nombreuses études observationnelles (rétrospectives ou cas/témoin) ont rapporté que les FM qui avaient recours à l'hormonothérapie présentaient une réduction significative du risque de MCV.¹⁷⁷⁻¹⁸¹ Cependant, ces études d'observation sont soumises à de nombreux biais méthodologiques principalement liés aux critères de recrutement des sujets et aux caractéristiques des femmes bénéficiant de la TRH. Par conséquent, l'ensemble de leurs conclusions a été remis en cause au cours des dernières années par la publication récente de plusieurs études cliniques randomisées. Le tableau 1 présente l'ensemble des études cliniques menées sur le sujet au cours des dernières années.

Tableau I: Résumé des études observationnelles et randomisées en prévention primaire et secondaire sur les effets de la thérapie de remplacement hormonale.

Nom de l'étude	Taille de l'échantillon	Traitement	Durée (ans)	Conclusions
Études d'observation				
<i>Nurse Health Study</i> ¹⁸²	59337	CEE seule ou CEE+MPA	20	↓ de 40% de mortalité ↑ de 25% risque MCV la première année
Méta-analyse ^{179, 180, 183}	-	CEE+MPA	-	↓ de 30 à 50% du risque de MCV
Études cliniques randomisées –				
Prévention secondaire				
<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)</i> ¹⁸⁴	2763	CEE+MPA ou placebo	4,1	↓ de 14% des LDL ↑ de 8% des HDL ↑ du risque MCV la première année
<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study II (HERS II)</i> ¹⁸⁵	2321	CEE+MPA ou placebo	6,8	Aucune différence versus le groupe témoin
<i>Estrogen Replacement and Atherosclerosis (ERA)</i> ¹⁸⁶	309	CEE seule ou CEE+MPA ou placebo	3,2	Aucune différence dans la progression de l'athérosclérose

<i>Women's Estrogen and Stroke Trial (WEST)</i> ¹⁸⁷	664	17βE (1 mg)	2,8	2,9 fois plus d'accidents vasculaires cérébraux
<i>Women's Estrogen-Progestin Lipid-Lowering Hormone Atherosclerosis Regression Trial (WELL-HART)</i> ¹⁸⁸	226	17βE (1 mg) ou 17βE+MPA (5 mg) ou placebo	3,3	Aucune réduction du pourcentage de sténose
<i>Postmenopausal Hormone Replacement against Atherosclerosis (PHOREA)</i> ¹⁸⁹	321	17βE (1 mg)+gestodène cyclique (0,025 mg)/12 jrs par mois, ou 17βE (1mg)+gestodène cyclique (0,025 mg)/12 jrs par 3 mois, ou placebo	2	Aucune différence sur ratio intima/média
<i>Women's Angiographic Vitamin and Estrogen (WAVE)</i> ¹⁹⁰	423	Vitamine C et E ± CEE seule ou CEE+MPA ou placebo	2,8	↑ de 52% du risque d'infarctus du myocarde la première année dans les groupes traités
<i>Papworth Hormone-Replacement-Therapy Atherosclerosis Survival Enquiry (PHASE)</i> ¹⁹¹	255	Voie transdermale de 17βE (2,5 mg) seul ou 17βE+norethindrone cyclique ou placebo	4	↑ de 29% d'angine instable, d'infarctus du myocarde ou de décès dans les groupes traités

<i>Estrogen in the Prevention of ReInfarction Trial (ESPRIT)</i> ¹⁹²	1017	Valerate estradiol (2 mg) ou placebo	2	Aucune différence dans l'incidence de nouvel infarctus
Études cliniques randomisées – Prévention primaire				
<i>Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI)</i> ¹⁹³	875	CEE seule ou CEE+MPA ou CEE+PRG ou placebo	3	↓ des LDL ↑ des HDL ↑ des triglycérides
<i>Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial (EPAT)</i> ¹⁹⁴	222	17βE (1 mg/jour)	2	↓ de 0,0013 mm/année dans le groupe traité
<i>Women Health Initiative</i> ¹⁹⁵ – non hystérectomisées	16608	CEE+MPA ou placebo	5	↑ de 29% du risque d'infarctus ↑ de 41% des arrêts cardiaques ↑ de 26% de cancer du sein ↓ du risque de cancer du côlon et de fracture de la hanche
<i>Women Health Initiative</i> ¹⁹⁶ – hystérectomisées	10739	CEE seule ou placebo	6,8	Indice global neutre, ↑ du risque d'AVC ↓ du risque de fracture de la hanche

2.1.4 Les alternatives

À la lumière des résultats de l'étude *Women Health Initiative*, l'*American Heart Association* ne recommandait plus l'utilisation du TRH dans le but de prévenir les MCV. Toutefois, plusieurs observateurs déplorent certaines faiblesses de l'étude WHI dont l'arrêt de la médication, la levée de l'insu, l'âge moyen élevé et la présence de facteurs de risque chez certaines femmes participantes. La publication des récents résultats du second bras de l'étude WHI (hystérectomisées) a ravivé la polémique concernant les effets potentiellement délétères des progestatifs, en particulier du MPA, utilisé dans les principaux essais cliniques contrôlés. En effet, l'utilisation du MPA semble augmenter les MCV alors que le risque est nul dans le second bras de l'étude. Ces discordances dépassent le domaine des pathologies vasculaires artérielles puisque le risque de maladie thrombo-embolique et le risque d'hyperplasie mammaire était moindre en l'absence de progestatif. Il est de plus en plus évident que le type de progestatif utilisé peut jouer un rôle déterminant sur les effets vasculaires, métaboliques et prothrombotiques des estrogènes.^{197, 198} Le type d'estrogènes utilisés dans les principales études d'intervention (conjugué d'éthinylestradiol extrait de l'urine de jument gestante) et surtout son mode d'administration ont été mis en cause par certains experts. En effet, il semble que l'effet de premier passage hépatique lié à l'administration orale d'estrogènes soit responsable des actions systémiques néfastes, en particulier proinflammatoires et prothrombotiques.¹⁹⁹ Le mode d'administration par voie transdermale pourrait réduire l'effet de premier passage hépatique, et semble limiter ces effets inflammatoires dommageables au niveau systémique. Toutefois, l'étude *Papworth Hormone-Replacement-Therapy Atherosclerosis Survival Enquiry* (PHASE) a malheureusement été interrompue en raison de l'absence d'effets bénéfiques envers l'augmentation du risque d'événements coronariens relié à la voie transdermale.¹⁹¹

2.2 Le rôle des estrogènes et de leurs récepteurs

La majorité des effets biologiques des estrogènes sont induits à la suite de leur liaison à deux récepteurs aux estrogènes (RE) structurellement et fonctionnellement différents : RE alpha (RE α) et RE bêta (RE β).^{200, 201} Les RE α et RE β sont produits par des

gènes distincts sur différents chromosomes. Le RE α est localisé sur le chromosome 6 alors que le RE β est situé sur le chromosome 14. Le RE α est une protéine de 595 acides aminés de 66 kDa alors que le RE β est une protéine de 530 acides aminés de 54 kDa. Les deux protéines sont membres de la superfamille des récepteurs nucléaires agissant comme facteurs de transcription dépendant de la fonction de l'hormone.¹⁷⁶ Les RE sont localisés au niveau du noyau et du cytoplasme. En condition d'inactivité, les RE sont associés à une protéine à choc thermique (HSP) qui se dissocie lorsque les estrogènes ou autres ligands se lient aux RE. Le complexe RE-ligand interagit avec son domaine de liaison à l'ADN et ainsi régule positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle de certains gènes. Les deux RE sont constitués de six domaines partageant les mêmes structures que celles des récepteurs nucléaires stéroïdiens.²⁰²

2.2.1 La structure des RE

Les deux RE présentent la même structure générale, comprenant différents domaines fonctionnels notés de A à F représentés sur la Figure 12A. La région N-terminal (domaine A/B) est la plus variable en termes de taille et de séquence protéique (17% d'homologie). Il existe une forte homologie de séquence dans les domaines de liaison à l'ADN (domaine C/D) (97%) et de liaison au ligand (domaine E) (60%). Finalement, les RE possèdent une partie C-terminale (domaine F) peu conservée entre les deux RE (18% d'homologie).^{203, 204} Il existe également des fonctions d'activations (AF) en N-terminale (AF-1) et en C-terminale (AF-2) possédant respectivement une activité transcriptionnelle indépendante et dépendante de la liaison de son ligand. Des séquences d'acides aminés localisées dans les domaines C et E/F permettent la dimérisation des récepteurs, indispensable à l'activité transcriptionnelle. Le domaine de liaison à l'ADN des RE est la région où l'homologie de séquence est la plus importante entre le RE α et le RE β . Il est composé de 66 à 68 acides aminés dont neuf résidus cystéine parfaitement conservés. Ce domaine contient deux séquences riches en acides aminés cystéine, lysine et arginine formant une structure en forme de doigt contenant un ion zinc. Ce motif en doigt de zinc, retrouvé dans d'autres facteurs de transcription, permet au récepteur de se fixer sur la double hélice d'ADN (Figure 12B). La séquence d'acides aminés de la « *P-box* » détermine

la spécificité de reconnaissance de la séquence d'ADN. Les acides aminés entourés d'un carré sont impliqués dans la dimérisation du récepteur.²⁰⁵ Les RE se lient sous forme d'homo- ou d'hétérodimères à des séquences spécifiques d'ADN, l'élément de réponse aux estrogènes. Les éléments de réponse aux estrogènes sont localisés en 5' des gènes cibles, le plus souvent à quelques centaines de paires de base du site d'initiation de la transcription. Ces séquences sont de courtes séquences nucléotidiques répétées directement ou sous forme inversée (palindromes).

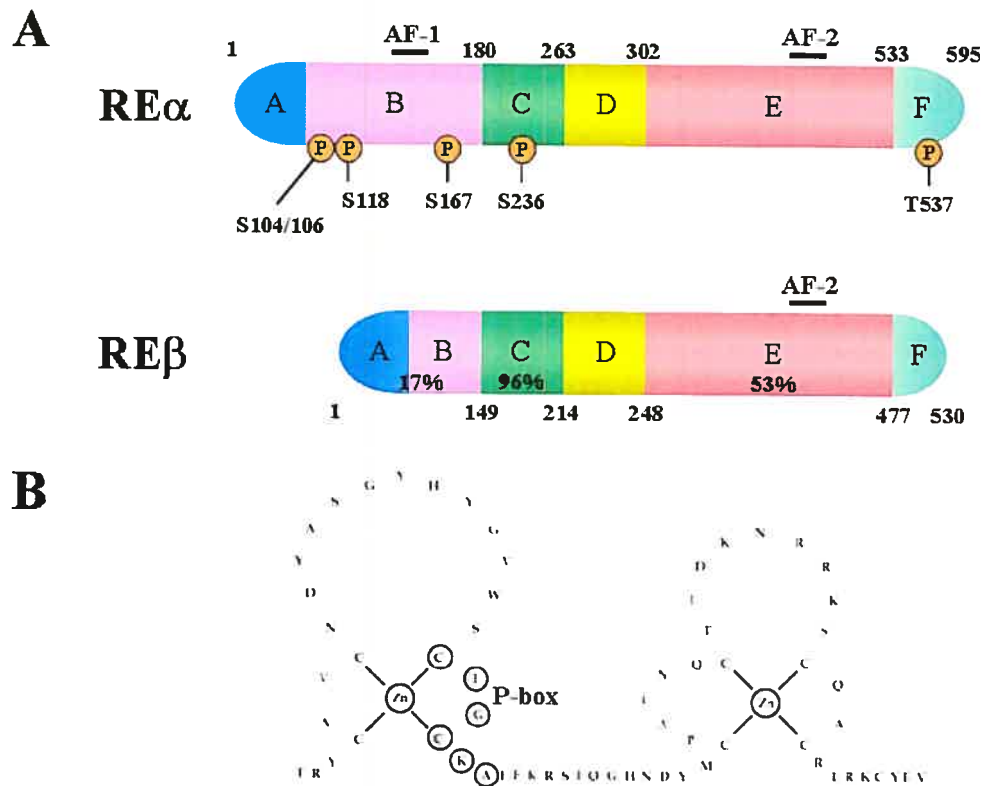


Figure 12: Structure des récepteurs aux estrogènes alpha et bêta

A) Représentation des différents domaines structurels des RE α et RE β avec un domaine A/B contenant le facteur AF-1, un domaine de liaison à l'ADN (domaine C/D), un domaine de liaison au ligand contenant le facteur AF-2 (domaine E) et une partie C-terminale (domaine F). B) Organisation du motif en doigt de zinc des RE humains (adapté d'après^{202, 205, 206}).

Les AF-1 et AF-2 induisent leurs fonctions transcriptionnelles de façon séparée et non mutuelle. Il existe également une différence dans l'activité d'AF-1. Au niveau des RE α , l'AF-1 joue un rôle très actif alors que son rôle est plutôt minime au niveau des RE β suite à la réponse aux estrogènes. L'activité des AF-2, dépendante de la liaison d'un ligand, permet de recruter des coactivateurs ou des corépresseurs. Des études de cristallographie ont démontré que le site d'interaction des AF-2, semblable pour les deux RE, est composé d'acides aminés en forme d'hélice, les hélices 3, 4, 5 et 12. Lors de la liaison d'un agoniste tel que le 17 β E, le changement conformationnel du récepteur permet à l'hélice 12 de se replier, formant ainsi une poche et favorise le recrutement de coactivateurs. Les coactivateurs interagissent avec une courte région riche en leucine (LxxLL) des AF-2 permettant la transmission des signaux transcriptionnels. En comparaison, lorsqu'un antagoniste se lie au RE, le changement conformationnel favorise la réorganisation des hélices 3, 4 et 5 et empêche l'interaction des coactivateurs avec l'hélice 12.²⁰⁷

2.2.2 Les isoformes des RE α et RE β

Il existe également certaines variantes des RE α (RE α A, RE α C, RE α E et RE α F) et des RE β (RE β 1, RE β 2, RE β 4 et RE β 5) dont les fonctions biologiques ne sont pas clairement définies.^{208, 209} Un autre isoforme du RE α , plus court, de 46 kDa, a également été caractérisé.²¹⁰ Cet isoforme est marqué par l'absence de l'exon 1 et par conséquent, ne possède plus le AF-1 dans sa partie N-terminale. Cet isoforme a principalement été retrouvé dans les CE, les cellules cancéreuses mammaires et les ostéoblastes et est capable de se dimériser avec le RE α natif.²¹¹ Bien que cet isoforme soit distribué partout à l'intérieur de la cellule, il semble être préférentiellement localisé au niveau de la membrane cellulaire et être impliqué dans la prolifération cellulaire.²¹² Toutefois, son rôle précis dans la modulation des effets des estrogènes reste à déterminer. Il existe des différences au niveau des isoformes de RE β . Contrairement à la forme native de RE β , l'isoforme ER β 1 n'exerce pas d'activité agoniste partielle en réponse à certains modulateurs sélectifs.²¹³

Les fonctions de chaque RE *in vivo* ont été évaluées par l'utilisation des modèles de souris déficientes pour chaque RE. Ainsi, les souris déficientes pour le gène du RE α sont

viables, mais non fertiles. Ces souris ne démontrent pas de différences phénotypiques durant les périodes de développement pré- et néonatales des tissus de reproduction. Toutefois, la fonctionnalité des tissus de reproduction demeure affectée, démontrée par son insensibilité aux estrogènes, par une absence d'ovulation, par un blocage de la maturation des glandes mammaires et par une légère hyperplasie de l'utérus.^{214, 215} Des changements de comportement ont également été observés tels que l'augmentation de l'agressivité des femelles. En comparaison, les souris déficientes pour le gène du RE β sont viables et sous-fertiles, démontrées avec une ovulation réduite et une maturation folliculaire dysfonctionnelle. Des phénotypes différents au niveau du système neuroendocrinien, des glandes mammaires, du système cardiovasculaire et osseux ont été détectés chez les souris déficientes pour le gène du RE β en comparaison aux souris de type sauvage.²¹⁶ Il est intéressant de noter que les deux RE ne sont pas nécessaires à la survie des souris.

La majorité des efforts pour mieux comprendre les effets des estrogènes sur les maladies cardiovasculaires s'est concentrée aux domaines fonctionnels et aux interactions protéines-protéines. Depuis les dernières années, certaines études ont également investigué la possible association entre les polymorphismes des RE et la maladie coronarienne. Les altérations polymorphiques du RE α peuvent être reliées au cancer du sein, à des variations du profil lipidique, à une hypertension artérielle et à l'athérosclérose coronarienne.²¹⁷⁻²²⁰ Également, le polymorphisme du RE β semble être associé à une dysfonction ovulatoire, à une densité minérale osseuse, à des changements des niveaux plasmatiques de certaines hormones sexuelles telles que les estrogènes et la progestérone et à la maladie coronarienne.^{221, 222}

2.2.3 La régulation des RE

Le niveau d'expression des RE α et RE β varie au cours du développement de certaines pathologies telles que l'athérosclérose et le cancer du sein. Le RE β semble agir comme régulateur négatif dans la signalisation des estrogènes. Lorsqu'il est coexprimé avec le RE α , le RE β en diminue l'expression.^{223, 224} Plusieurs groupes ont démontré qu'une exposition aux estrogènes module l'expression de ses récepteurs.^{225, 226} Toutefois, les

mécanismes moléculaires et l'importance biologique de cette autorégulation demeurent méconnus. Ainsi, une stimulation au $17\beta\text{E}$ induit une augmentation de l'activité du promoteur des deux RE au niveau des cellules mammaires. Or, au niveau des CE, une exposition prolongée au $17\beta\text{E}$ amplifie l'expression de $\text{RE}\alpha$ et diminue l'expression de $\text{RE}\beta$.²²⁷ Il a été démontré qu'une réduction de l'expression de $\text{RE}\alpha$ accentue la formation de la plaque athérosclérotique.²²⁸ Toutefois, le $\text{RE}\beta$ semble également impliqué dans la réduction de l'ischémie de reperfusion (mort tissulaire suite au rétablissement du flot sanguin oxygéné générant des radicaux libres très réactifs) et de l'athérosclérose coronarienne.²²⁹²³⁰ L'expression des RE peut être altérée selon son niveau de méthylation. En effet, l'hyperméthylation du promoteur du $\text{RE}\alpha$ est associée à une réduction marquée de son expression et de sa fonctionnalité. Des niveaux importants du $\text{RE}\alpha$ hyperméthylé ont été retrouvés dans les plaques athéromateuses.²³¹ Tout comme le $\text{RE}\alpha$, les promoteurs des $\text{RE}\beta$ sont également sujets à l'hyperméthylation jouant ainsi un rôle dans les mécanismes de régulation de l'expression des RE.²³²

2.2.4 La phosphorylation des RE

Suite à la liaison de son ligand, les RE peuvent être phosphorylés et permettre leur association avec plusieurs coactivateurs. En effet, le $17\beta\text{E}$ induit la phosphorylation de plusieurs résidus sérine principalement situés dans le domaine AF-1 du $\text{RE}\alpha$.²⁰⁶ Il n'est pas clairement défini si le $17\beta\text{E}$ est également capable d'induire la phosphorylation de $\text{RE}\beta$. Toutefois, la phosphorylation de ce dernier a déjà été observée par l'action de second messenger tel que les MAPKs. Les $\text{RE}\alpha$ peuvent être phosphorylés sur un résidu tyrosine (T-537) présent au niveau du domaine de liaison du ligand. La phosphorylation de ce résidu semble jouer un rôle critique dans la capacité des $\text{RE}\alpha$ à interagir avec des kinases possédant un domaine SH2.²³³

2.2.5 Les mécanismes d'action des RE

Plusieurs évidences suggèrent qu'il existe au moins quatre voies d'activation par lesquelles les estrogènes induisent leurs effets biologiques (Tableau 2).²³⁴

Tableau II: Les différentes voies d'activation des RE.

Voie classique	Voie non classique	Voie non génomique	Voie indépendante des RE
Dépendant des RE	Dépendant des RE	Dépendant des RE	Indépendant des RE
Agit sur son élément de réponse aux estrogènes dans la transcription des gènes	Agit sur l'AP-1 et SP-1 dans la transcription des gènes	Agit sur les voies intracellulaires (MAPKs, PI3K, STAT)	Agit sur les canaux ioniques

2.2.5.1 Les coactivateurs et corépresseurs

Les cofacteurs transcriptionnels ou facteurs de transcription intermédiaires interagissent avec les RE pour relayer leur activité transactivatrice ou transrépressive. Il existe plusieurs familles de cofacteurs classés en fonction de leur capacité à interagir avec les RE en présence d'hormone et selon leur action, positive ou négative, sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Certains cofacteurs peuvent s'associer au domaine AF-1 en absence d'hormone.²³⁵ Les coactivateurs (SCR/p106, CBP/p300, TRAP/DRIP, PGC-1) se fixent, en présence de ligands agonistes, sur un ou plusieurs motifs riches en leucines (LxxLL) présents dans le domaine AF-2 et potentialisent les fonctions transactivatrices des RE. La formation stable du complexe RE/coactivateurs est nécessaire à l'association d'autres protéines de la machinerie de transcription afin de stimuler l'expression des gènes.^{235, 236} Les corépresseurs, tels que le corépresseur des récepteurs nucléaires, les médiateurs silencieux RAR et TR et les répresseurs de l'activité des RE sont capables de bloquer activement la transcription et interagissent avec les RE en l'absence de ligand ou en présence d'antagonistes. Les différents cofacteurs sont organisés en complexes multiprotéiques qui interagissent avec d'autres facteurs de transcription qui sont communs à différentes voies de transduction intracellulaire des facteurs de croissance. Il a été démontré que de nombreux cofacteurs présentaient des activités enzymatiques telles que l'acétylase, la désacétylase, l'ATPase, et la méthylase jouant un rôle potentiel dans la réponse biologique.²³⁷

2.2.5.2 Les mécanismes régulateurs des estrogènes et des RE

Il est devenu de plus en plus évident au fil des années que les effets physiologiques des estrogènes ne nécessitent pas obligatoirement la transcription des gènes. Les différentes voies de signalisation dépendantes des estrogènes se caractérisent selon diverses variables (Figure 13).

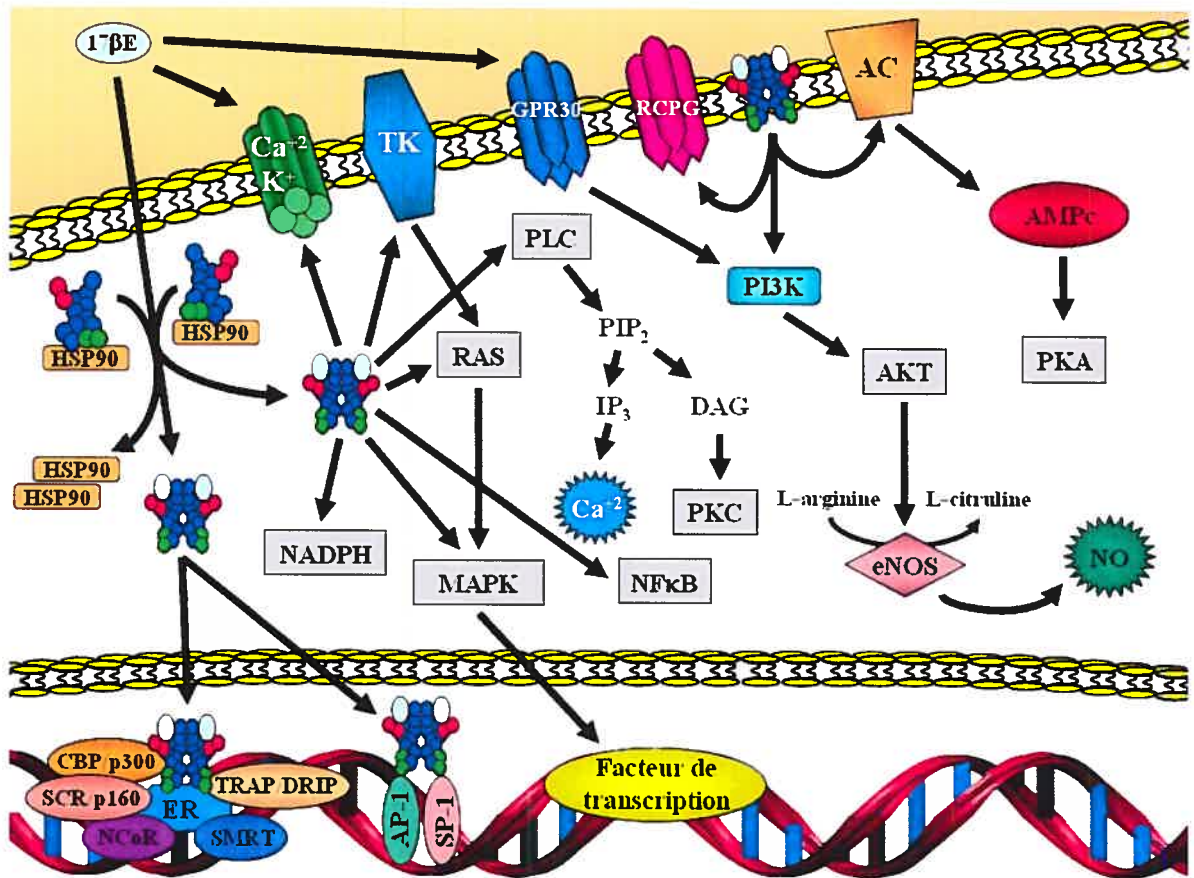


Figure 13: Représentation des voies de signalisation et d'activation des estrogènes

Mécanismes d'action des RE dans les différentes voies de signalisation classiques, non classiques, non génomiques et indépendantes des RE.

2.2.5.2.1 Les canaux ioniques

Plusieurs effets dépendants des estrogènes sont induits par le changement de l'influx ionique au niveau des canaux calciques ou les canaux potassiques dépendant du calcium (Ca²⁺). Il a été démontré que le 17βE est capable d'induire rapidement l'entrée de Ca²⁺ par

la stimulation des canaux calciques, un mécanisme dépendant de la phospholipase C et de l'activation de la protéine kinase C.^{238, 239} Ces effets sont spécifiques puisqu'ils ne semblent pas être influencés par la progestérone ou autres hormones sexuelles. L'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} par les estrogènes peut également se faire à la suite de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants de type L et ainsi mener à la stimulation rapide de la protéine kinase dépendant de l'AMP cyclique. Les estrogènes induisent une vasorelaxation d'anneaux d'artères coronaires porcines et ce, même en présence de cycloheximide (un inhibiteur de la synthèse protéique) ou de l'actinomycine D (un inhibiteur de la synthèse d'ADN) suggérant que les effets des estrogènes sont indépendants de la transcription des gènes impliquant l'AMP cyclique.²⁴⁰ Le $17\beta\text{E}$ stimule l'ouverture des larges canaux potassiques (maxi K^+) activés par le Ca^{2+} possiblement via la relâche de NO et de GMP cyclique.²⁴¹ Finalement, la vasodilatation des CML coronaires par le $17\beta\text{E}$ est le résultat d'une régulation des canaux Ca^{2+} de type L et K^+ .²⁴² Des études de *patch-clamp* ont également démontré que les estrogènes stimulent l'activité de larges canaux potassiques calcium- et voltage-dépendants (BK_{ca}).^{243, 244} L'importance des canaux BK_{ca} dans les actions anti-ischémiques et cardioprotecteurs des estrogènes a été observée *in vivo* par l'utilisation de la nifédipine, un inhibiteurs pharmacologique des canaux BK_{ca} , réduisant les concentrations de Ca^{+2} intracellulaires dans les artères coronaires.²⁴⁵

2.2.5.2.2 Les MAPKs

La cascade des MAPKs représente une autre voie d'activation non génomique des estrogènes. Cette voie est responsable des effets des estrogènes sur l'angiogénèse, la réorganisation des fibres de stress, la migration et la prolifération des cellules vasculaires, la formation de tubes vasculaires, la neuroprotection et la régulation du cycle cellulaire. Il est clair que chaque RE est impliqué dans la transmission du signal de la phosphorylation sélective des membres de la famille des MAPKs. Toutefois, il semble que les $\text{RE}\alpha$ et $\text{RE}\beta$ n'agissent pas au même moment et diffèrent dans l'activité cinétique des MAPKs. Il a été démontré dans des cellules CHO-K1 que les $\text{RE}\alpha$ interagissent préalablement avec la voie ERK alors que les $\text{RE}\beta$ se lient à la voie JNK/SAPK.²⁴⁶ De plus, les $\text{RE}\alpha$ sont sensibles à l'antagoniste pur des RE, l'ICI182780. Celui-ci active la voie des MAPKs de façon

maximale en 15 minutes, alors que les RE β y sont insensibles.²⁴⁷ Dans la majorité des cas, en réponse à un stimulus, les MAPKs activées sont translocalisées au niveau du noyau facilitant l'activation des facteurs de transcription, d'enzymes gouvernant la synthèse d'ADN et la progression du cycle cellulaire.^{248, 249} Bien que le 17 β E stimule la prolifération de cellules mammaires probablement via la voie des MAPKs, l'identification physiologique des protéines cibles et initiatrices impliquées dans les effets des estrogènes demeure mal comprise. Toutefois, il a été observé que les estrogènes induisent la phosphorylation de raf-1, un précurseur signalétique de la voie des MAPKs permettant l'activation d'ERK-1 et -2 sur le résidu tyrosine 249 ou sur un motif X d'un consensus tripeptide Thr-X-Thr.²⁵⁰ Fait intéressant, les MAPKs ont la capacité de phosphoryler le résidu sérine 118 des RE α et ainsi stimule l'activité transcriptionnelle du domaine AF-1 des RE α . Bien que les effets des MAPKs sur le résidu sérine 118 des RE α soient rapides, ils ne régulent aucun événement à l'extérieur du noyau.²⁵¹ Les effets des estrogènes utilisant la voie des MAPKs peuvent donc être rapides ou chroniques impliquant la régulation de plusieurs protéines de cette cascade de signalisation. De plus, il est possible que les MAPKs interagissent avec d'autres voies de signalisation telles que la *phosphoinositide-3 kinase* (PI3K). Toutefois, le rôle des estrogènes dans les réactions croisées des voies de signalisation demeure non défini.

2.2.5.2.3 La phosphoinositide-3 kinase

Cette kinase comprend une famille d'enzymes lipidiques signalétiques stimulée par des agonistes et constituée par une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110. La liaison de la p85 directement à un récepteur tyrosine kinase permet le recrutement de la p110 afin de produire le phosphatidylinositol 3,4-biphosphate (PIP2) et le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate.²⁵² AKT, une importante protéine cible de la PI3K, agit au niveau du cytoplasme comme protéine kinase sérine/thréonine. Suite à l'activation de la PI3K, la protéine kinase AKT est recrutée au niveau de la membrane plasmatique afin d'interagir avec le phosphatidylinositol 3,4-bi et 3,4,5-triphosphate via leur domaine homologue. La phosphorylation de AKT lui confère son activité catalytique. Elle s'associe à une molécule chaperonne, la HSP90, empêchant ainsi sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A responsable de sa désactivation.²⁵³ Il a été démontré qu'en réponse

à un stimulus tel que le VEGF et les forces de cisaillement, AKT potentialise l'activité de l'eNOS. Au niveau des CE vasculaires, les estrogènes augmentent rapidement l'association entre la sous-unité p85 et le RE α permettant la phosphorylation de AKT et l'activation de la eNOS *in vivo*.²⁵⁴ La phosphorylation de l'eNOS, une enzyme dépendante du Ca²⁺, génère la libération du NO. Les estrogènes, via l'activation de son RE α et non de RE β , stimulent la phosphorylation de la PI3K et de AKT, activent la eNOS et permettent la libération rapide du NO.²⁵⁵

2.2.5.2.4 Les récepteurs couplés aux protéines G

Il a été longtemps suspecté que les RE pouvaient agir avec les récepteurs couplés à une protéine G présents à la membrane des cellules.²⁵⁶ Cependant, la structure et la topographie de cette association membranaire demeurent non résolues. Des études ont démontré que les RE α localisés au niveau de la membrane se lient avec les sous-unités G α_q et G α_s stimulant l'activité de la guanylate cyclase.²⁴⁶ Des résultats sur les CE suggèrent que le traitement au 17 β E favorise l'association de RE α à eNOS via une G α_i au niveau des calvéoles.

2.2.5.2.5 Les autres récepteurs membranaires

Il est maintenant bien reconnu que les estrogènes exercent des effets rapides, en plus de ses mécanismes classiques au niveau génomique, suggérant une action directe sur des récepteurs membranaires à la surface des cellules. Bien que plusieurs études ont été faites afin d'identifier ses récepteurs membranaires, la nature exacte de ses récepteurs n'est pas totalement connu et demeure encore très controversée. Les recherches conduits au niveau des CE et neuronales suggèrent que les RE classiques (RE α et RE β) sont les candidats potentiels aux effets non-génomiques des estrogènes.^{257, 258} Par contre, une nouvelle classe de RE membranaires, indépendant des RE classique, ayant les mêmes propriétés que les récepteurs couplés aux protéines G, pourrait également être impliquée.²⁵⁹ Ainsi, des récentes études ont pu identifier un récepteur protéine G 30, présent dans une variété d'organes tels que les ovaires, la prostate, le cœur, les neurones et les cellules hépatiques, et qui serait responsable de la transactivation du récepteur aux facteurs de croissance de

l'épiderme et de l'activité de l'adhénylate cyclase par les estrogènes au niveau des cellules cancéreuses déficientes pour les RE classiques (SKBR3).²⁶⁰ Toutefois, d'autres études ont démontré aucun effet des estrogènes dans l'activation d'une multitude de mécanismes (prolifération cellulaire, phosphorylation de AKT et apoptose) en absence des RE classique et ce même si le récepteur aux protéines G 30 était présent.²⁶¹ Le rôle du récepteur protéine G 30 demeure donc à déterminer afin de savoir s'il agit indépendamment des RE dans la signalisation rapide des estrogènes.

2.2.5.3 Les effets des estrogènes sur la paroi vasculaire artérielle

L'exploration des mécanismes de régulation des estrogènes au niveau physiologique s'est grandement accentuée au fil des années. Entre les années 1900 et 1975, environ 100 articles ont été publiés évoquant les impacts cardiovasculaires des estrogènes. En comparaison, au cours des 25 dernières années, pas moins de 4000 articles ont porté sur ce sujet dont 1000 publications uniquement pendant les années 2000 et 2001. Il est clair que les effets des estrogènes sur la fonction vasculaire demeurent un domaine important en recherche cardiovasculaire.

2.2.5.3.1 Le profil lipidique

Plusieurs études ont démontré que les estrogènes influencent l'expression des gènes apoprotéines hépatiques et diminuent les niveaux plasmatiques de cholestérol et de LDL tout en augmentant le taux des lipoprotéines de hautes densités (HDL) et des triglycérides.²⁰² Il a longtemps été pensé que les effets protecteurs des estrogènes étaient uniquement secondaire à l'amélioration du profil lipidique. Or, des études expérimentales ont montré que les effets des estrogènes sur les niveaux de LDL et HDL ne représentent qu'une portion de ses actions bénéfiques. Plus récemment, il a été découvert que les estrogènes peuvent protéger la surface des vaisseaux sanguins par l'inhibition de la peroxydation des LDL *in vitro* et *in vivo* chez les femmes ménopausées.²⁶² De plus, les estrogènes se lient préférentiellement au HDL devenant estérifiés et réduisent ainsi l'oxydation des LDL.

2.2.5.3.2 La fonction vasculaire

Plus de 100 ans se sont écoulés depuis que Mackenzie (1884) a suggéré que les estrogènes exercent une influence vasodilatatrice.²⁶³ Ainsi, des changements hémodynamiques ont été observés lors des grossesses. Au cours de la gestation, le volume sanguin, le rythme et le débit cardiaque augmentent alors que la pression sanguine systémique, principalement la pression diastolique, diminue et ce, jusqu'aux dernières semaines avant terme. Des études ont clairement démontré que les estrogènes accentuent le flot sanguin au niveau de l'appareil reproducteur et possèdent des actions vasodilatatrices sur une variété de tissus.²⁶⁴ Il est maintenant évident que les estrogènes peuvent moduler le tonus vasculaire en augmentant le flot sanguin de certains organes et en agissant au niveau des CE et des CML. En condition normale, les estrogènes induisent une première action vasodilatatrice indirecte impliquant la relâche de substances vasodilatatrices par les CE. Toutefois, puisque les hormones sont lipophiles, ils pénètrent au travers de la paroi vasculaire afin d'agir au niveau des CML. Bien que les estrogènes provoquent une relaxation dépendante de l'endothélium au niveau des artères fémorales, coronaires et cérébrales, elles peuvent également induire des effets vasodilatateurs indépendants de l'endothélium tant *in vitro* que *in vivo*.^{243, 265-268}

2.2.5.3.3 Les effets dépendants de l'endothélium

La majorité des résultats expérimentaux indique que les actions importantes du $17\beta\text{E}$ au niveau vasculaire sont régulées par le NO. En effet, l'augmentation de la production de NO au cours de la grossesse suggère que les estrogènes jouent un rôle important dans ce mécanisme.²⁶⁹ Les estrogènes stimulent donc la production de NO et de ses métabolites par les cellules vasculaires selon des mécanismes dépendants et indépendants de la transcription des gènes.²⁷⁰ L'isoforme eNOS est la principale source de NO de la paroi vasculaire. Elle permet la synthèse de NO par la transformation de la L-arginine en L-citrulline.

2.2.5.3.3.1 Les mécanismes génomiques des estrogènes sur le NO

Les mécanismes par lesquels une stimulation à long terme aux estrogènes accentue l'abondance d'eNOS ont été étudiés au niveau des CE. Ainsi, une exposition de plus de 8 heures favorise la production maximale de NO par l'endothélium en augmentant les niveaux protéiques d'eNOS.²⁷¹ Des travaux sur des CE humaines ont démontré que les estrogènes augmentent les niveaux d'ARN messager et protéiques de l'eNOS suggérant une élévation de la transcription de son gène.²⁷² D'autres études ont constaté que les effets à long terme des estrogènes sur l'eNOS sont réduits par l'utilisation des antagonistes des RE impliquant une action via ses récepteurs. Il semble que les deux types de RE aient la capacité de moduler l'expression d'eNOS puisque l'utilisation d'un antagoniste sélectif pour les RE β (Tetrahydrochrysen; THC) prévient l'induction d'eNOS par les estrogènes.²⁷³ D'autres protéines sont impliquées dans les actions à long terme des estrogènes. En effet, le 17 β E augmente l'expression de la calvéoline, une protéine associée aux multiples mécanismes de régulation de l'eNOS localisée au niveau des calvéoles de la membrane des CE.²⁷⁴ Bien que l'activité de la calvéoline semble avoir un impact important dans la fonction d'eNOS, plusieurs facteurs tels que le moment précis et le temps d'exposition à l'hormone, le type de CE ciblées et le contexte cellulaire et tissulaire jouent un rôle important dans sa régulation. En plus de la modulation de l'activité d'eNOS, la biodisponibilité du NO est également régulée par le degré d'élimination des espèces réactives d'oxygène telles que les superoxydes. La production de radicaux libres par la NADPH oxydée et sa dégradation par le superoxyde dismutase dictent les niveaux de superoxyde dans les CE. Des études *in vitro* ont démontré que le 17 β E réduit l'expression protéique et de l'ARN messager du complexe NADPH oxydé.²⁷⁵ Ainsi, la régulation positive d'eNOS et la réduction de l'expression du NADPH oxydé agissent de concert pour favoriser la biodisponibilité du NO.

2.2.5.3.3.2 Les mécanismes nongénomiques des estrogènes sur le NO

Les effets rapides des estrogènes sur la fonction d'eNOS ont été élucidés sur des CE en culture. Une augmentation de l'activité d'eNOS est décelée 5 à 10 minutes à la suite d'une stimulation au 17 β E.²⁷⁶ Les mécanismes de transduction du signal par lesquels les estrogènes activent l'eNOS ont été très bien caractérisés. Des données suggèrent que

l'activation d'une protéine tyrosine kinase menant à la stimulation des MAPKs par le 17 β E augmente l'activité d'eNOS via ses RE α .²⁵⁷ Les estrogènes sont également capables de stimuler rapidement l'activité d'eNOS via ses RE β .²⁷⁷ Plusieurs évidences évoquent également le recrutement de la PI3K/AKT dans les mécanismes intracellulaires des estrogènes sur l'eNOS. Ainsi, des études ont rapporté que le 17 β E stimule l'activité d'AKT, mécanisme dépendant des RE.²⁷⁸ De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la PI3K ou d'un dominant négatif pour AKT réduit l'activation de l'eNOS et la production de NO par les estrogènes.

2.2.5.3.4 Les effets indépendants de l'endothélium

Les mécanismes d'action responsables des effets des estrogènes indépendants de l'endothélium ont fait l'objet d'intenses investigations. Il est bien reconnu maintenant que les estrogènes agissent au niveau des concentrations de Ca²⁺ chez les CML.²⁷⁹ Même si une seule étude a démontré que les estrogènes empêchent la relâche de Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique, la majorité des études n'attribue pas les effets des estrogènes à une relâche de Ca²⁺ intracellulaire ou à une réduction de la sensibilité au Ca²⁺ de l'appareil de contraction.^{245, 280} En fait, les estrogènes semblent plutôt empêcher l'entrée de calcium et/ou augmenter sa sortie au niveau des CML.²⁴⁵

2.2.5.3.5 Les effets des estrogènes sur le système de coagulation

Depuis la publication des premières données des études cliniques, plusieurs recherches ont tenté d'expliquer le rôle des estrogènes sur le système de coagulation. Puisque les estrogènes possèdent à la fois des actions pro- et anti-thrombotiques, il est difficile d'en évaluer leurs effets globaux. La relation entre la thrombose, les estrogènes et la dysfonction endothéliale est supportée par le fait que la thrombomoduline soluble, un régulateur clé de la thrombine activée, et le t-PA, un inducteur de la fibrinolyse, sont considérés comme des marqueurs de dommage endothéliaux chez les FM.²⁸¹ Par contre, la TRH administrée pendant 6 semaines conduit à une réduction significative de la t-PA, de la thrombomoduline soluble et du facteur von Willebrand suggérant un effet bénéfique des estrogènes au niveau thrombotique. Il a également été démontré que les estrogènes exercent

des effets anticoagulants en réduisant l'agrégation plaquettaire.²⁸² Une prostaglandine, la thromboxane A₂, agit comme agent vasoconstricteur et permet aux plaquettes d'adhérer. Des études ont montré que la TRH orale ou transdermale réduit la réactivité des plaquettes en abaissant les niveaux de thromboxane B₂, le produit de dégradation de la thromboxane A₂.²⁸³ Cette même étude cite également une diminution de niveau d'expression du facteur tissulaire en réponse à la TRH. Les estrogènes influencent également l'activité de plusieurs composantes fibrinolytiques telles que le facteur VII, la protéine C, le niveau de fibrinogène, l'antithrombine III, le PAI-1 et le t-PA. Ainsi, les estrogènes réduisent les niveaux du facteur VII, de fibrinogène, de PAI-1 alors qu'ils augmentent les niveaux de la protéine C et du D-dimère (un produit de la fibrinolyse).²⁸⁴ Sobel et ses collaborateurs ont rapporté que le 17βE agit de façon biphasique au niveau du t-PA.²⁸⁵ En effet, l'élévation de la sécrétion de t-PA par les CE a été observée suite à l'utilisation d'une ou même plusieurs doses physiologiques de 17βE alors que l'utilisation de doses pharmacologiques diminue le niveau de t-PA. Les mêmes effets ont été rapportés sur les niveaux de PAI-1. Des études récentes ont montré que le REα en se liant à son ERE stimule le promoteur du PAI-1 alors que le REβ supprime cette activité.²⁸⁶ Puisque que la fibrinolyse est un processus équilibré entre l'activité du PAI-1 et du t-PA, il est possible d'affirmer qu'à une dose physiologique, les estrogènes semblent avoir des effets bénéfiques sur la fibrinolyse au niveau des CE. Toutefois, d'autres études démontrent que les estrogènes semblent potentialiser le système de coagulation.²⁸⁷ Ainsi, des données sur des FM en santé traitées au conjuguée d'éthinylestradiol rapportent une augmentation dose-dépendante de la production de thrombine et du fibropeptide A en plus d'une diminution de l'antithrombine et de la protéine S, un inhibiteur de l'activation et de la formation de la thrombine.²⁸⁸ De plus, Scarabin et ses collaborateurs ont démontré qu'un traitement de 2 mg de 17βE et progestérone cyclique augmente le niveau des fragments prothrombotiques 1 et 2. Les effets des estrogènes sur l'activité du système fibrinolyse fait également l'objet de plusieurs controverses. Bien que la TRH diminue l'activité du PAI-1 et augmente celle du t-PA, le ratio t-PA:PAI-1, qui représente un meilleur indicateur fibrinolytique que la mesure individuelle de chacun, est augmenté d'environ cinq fois.²⁸⁹ Il est donc évident que les estrogènes régulent plusieurs protéines pro- et anticoagulantes dont les effets globaux

semblent promouvoir le système de coagulation pouvant engendrer des thromboses veineuses tardives tels que rencontrées lors les premières années de traitements à la TRH (étude HERS et ERA).²⁹⁰

2.2.5.3.6 Les estrogènes et les marqueurs inflammatoires

La déficience en estrogènes chez les FM se traduit par une augmentation de l'activité de cytokines proinflammatoires. Il est donc possible de penser que les estrogènes régulent l'activité des cytokines. En fait, il est maintenant bien établi que les estrogènes possèdent à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires.

2.2.5.3.6.1 Le NFκB

Le NFκB joue un rôle clé dans la coordination des éléments de la réponse à diverses situations de stress, d'infection ou d'inflammation. Il est présent sous forme inactive couplée à son inhibiteur, le IκB, dans le cytoplasme. À la suite d'un signal approprié, le NFκB se détache du IκB et translocalise au niveau du noyau afin d'interagir avec des promoteurs spécifiques qui induisent l'expression de certains gènes tels que l'IL-6, l'IL-1, le TNF-α, le CD40/CD40L, les CAM et le MCP-1.²⁹¹ Le NFκB peut être régulé par certaines cytokines qu'il induit. Les estrogènes semblent interagir avec le NFκB. En effet, le 17βE bloque la capacité du NFκB à se lier aux séquences régulatrices des gènes dans plusieurs types cellulaires tels que les macrophages, les ostéoblastes et les myocytes cardiaques.²⁹²⁻²⁹⁴ Plusieurs évidences suggèrent que la sous-unité p65 du NFκB interfère avec les RE et que le domaine AF-1 est essentiel dans la prévention de l'induction des gènes par le NFκB.²⁹⁵ Les estrogènes peuvent également agir sur certains cofacteurs tels que le p300 qui sont recrutés pour stimuler l'activité du NFκB. De plus, dans divers types cellulaires, les estrogènes peuvent moduler l'expression de facteurs qui affectent la translocation du NFκB au noyau. Sun et ses collaborateurs ont démontré que le 17βE bloque la dégradation du IκBα et ainsi empêche sa dissociation au NFκB.²⁹⁶

2.2.5.3.6.2 Les CAM

Les concentrations plasmatiques des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1 et les sélectines) sont plus élevées chez les patients ayant une maladie coronarienne que chez les donneurs sains.^{297, 298} La transcription des gènes des molécules d'adhésion incluant ICAM-1, VCAM-1 et les sélectines est régulée par le NFκB. Des études cliniques ont montré que la TRH orale ou transdermale réduit de façon significative l'expression des CAM solubles.²⁹⁹ Des expériences *in vitro* ont également démontré qu'un pré-traitement de 48 heures au 17βE inhibe l'induction des CAM par l'IL-1 au niveau des CE.³⁰⁰ Cependant, d'autres données contradictoires indiquent que les estrogènes augmentent l'expression des CAM à la surface des CE en culture lorsque celles-ci sont costimulées avec le TNF-α.³⁰¹

2.2.5.3.6.3 *Le TNF-α*

Le TNF-α est surexprimé dans le myocarde à la suite d'une ischémie et de la reperfusion. Son expression persistante au niveau du myocarde suite à l'ischémie représente un marqueur du risque potentiel de récurrence d'un événement cardiaque.³⁰² Des expériences ont démontré que les estrogènes bloquent la production du TNF-α par les macrophages et les monocytes par l'inhibition de l'activité de la voie de JNK.³⁰³ Les résultats d'études cliniques ont également noté une réduction du niveau plasmatique de TNF-α par la TRH chez les FM et obèses.³⁰⁴ De plus, les estrogènes empêchent l'induction du TNF-α en inhibant l'activité de la protéine AP-1 par le domaine AF-2 des RE.³⁰⁵

2.2.5.3.6.4 *Le MCP-1*

Les patients qui développent une resténose significative ont un niveau élevé de MCP-1 en comparaison aux patients ne présentant pas de resténose après une ACTP. De plus, l'élévation du taux de MCP-1 semble corrélérer avec une augmentation de l'activité de monocytes par la génération accrue de radicaux libres.³⁰⁶ Certaines études *in vitro* et animales ont démontré que les estrogènes inhibent l'expression protéique et de l'ARN messager du MCP-1.³⁰⁷ D'autres données montrent également que l'hormonothérapie diminue le niveau basal du MCP-1 chez les FM.²⁹⁹

2.2.5.3.6.5 *L'IL-1, l'IL-6 et le TGF- β*

Jusqu'à présent, aucun mécanisme moléculaire n'a pu être démontré pour expliquer un lien direct entre la suppression de la transcription de l'IL-1 et les estrogènes. Plusieurs études ont suggéré que les estrogènes réduisent l'expression et/ou la relâche d'IL-1.³⁰⁸ Bien que le NF κ B est un stimulateur potentiel de l'activation de la transcription de l'IL-1, il est possible de spéculer que le 17 β E prévient l'induction de l'IL-1 en inhibant l'activité transcriptionnelle du NF κ B. Cependant, il est probable que l'augmentation de l'activité de l'IL-1 par une déficience en estrogènes soit secondaire à l'élévation du TNF- α chez les FM. Les estrogènes inhibent la relâche de l'IL-6 par divers types cellulaires tels que les macrophages et les CE.³⁰⁹ Sukovich et ses collaborateurs ont démontré que le traitement au 17 β E réduit de 50% l'expression de l'ARN messenger et la protéine de l'IL-6 dans les plaques athérosclérotiques des souris déficientes pour le gène apoE.³⁰⁵ Par contre, les données des études cliniques sur les effets de la thérapie hormonale substitutive sur les niveaux d'IL-6 soluble sont contradictoires. Effectivement, certaines études rapportent une augmentation alors que d'autres notent une diminution ou l'absence de changement.³¹⁰⁻³¹² Les effets des estrogènes dans la régulation fonctionnelle du TGF- β sont homogènes dans une variété de tissus. Ainsi, les estrogènes stimulent l'expression et la production du TGF- β chez les fibroblastes et les CML.³¹³ De plus, les résultats cliniques démontrent que la TRH augmente le taux plasmatique de TGF- β .³¹⁴

2.2.5.3.6.6 *La protéine réactive C (CRP)*

Certaines cytokines relâchées dans la circulation sanguine par les macrophages et autres cellules durant la réponse inflammatoire ont pour effet d'induire l'expression spécifique de gène tel que la CRP, un marqueur inflammatoire. La CRP favorise la synthèse des cytokines, des CAMs et du facteur tissulaire au niveau des monocytes et CE.³¹⁵ De plus, il a été noté que la CRP contribue à l'athérosclérose en facilitant l'absorption des LDL oxydées par les macrophages et la formation des cellules spumeuses. Ridker et ses collaborateurs ont établi que le niveau de la CRP circulante peut prédire le risque futur d'événements cardiaques. En effet, cette étude a démontré que les femmes en bonne santé ayant un niveau basal de CRP élevé développaient plus d'événements cardiaques en

comparaison au groupe témoin.³¹⁶ Plusieurs études ont rapporté que le niveau moyen de CRP était beaucoup plus élevé chez les FM traitées par hormonothérapie orale que celles non traitées.³¹⁷ Il a donc été proposé que les effets néfastes de la TRH orale au cours des premières années soient en partie liés à l'élévation de la CRP. En comparaison, l'administration transdermale d'estrogènes n'affecte pas ou diminue les niveaux de CRP chez les FM.³¹⁸

2.2.5.3.7 Les estrogènes et l'hypertension artérielle systémique

Les dimorphismes sexuelles de la pression artérielle apparaissent dès l'adolescence et persistent durant la vie adulte. Toutefois, cette disparité dans la prévalence de l'hypertension disparaît au moment où les femmes entrent en ménopause conférant aux estrogènes un rôle dans la régulation de la pression artérielle systémique.

2.2.5.3.7.1 Le caractère hémodynamique

Des études ont démontré que l'incidence d'hypertension était quatre fois plus élevée chez les FM, avec une pression systolique plus haute, en comparaison aux femmes pré-ménopausées.³¹⁹ Les données observées au cours du cycle menstruel indiquent une diminution de la pression durant la phase lutéale où le niveau d'estrogènes atteint son maximum. Il est possible que si les estrogènes endogènes favorisaient une réduction de la pression artérielle, l'administration d'estrogènes aux FM pourrait conduire au même effet. Cependant, les résultats des actions d'une préparation estrogénique sur la pression sanguine demeurent obscurs.³²⁰ Plusieurs études rapportent une diminution de la pression systolique et diastolique chez les FM traitées par voie orale ou transdermale au 17 β E alors que d'autres résultats démontrent que la prise d'hormones augmente la pression artérielle.^{321, 322} Ces données contradictoires reposent sur trois facteurs : le type de préparation estrogénique utilisé, la dose d'estrogènes employée et la méthode de mesure de la pression artérielle. Pines et ses collaborateurs ont trouvé que les femmes pré-ménopausées avaient un plus haut ratio pression-volume et une meilleure fraction d'éjection lorsque comparées aux FM. En plus d'une fonction cardiaque globale supérieure, les femmes pré-ménopausées possèdent une meilleure compliance des artères que les hommes de même âge et la thérapie

hormonale substitutive augmente cette distensibilité artérielle systémique en comparaison au groupe non traité. Des résultats obtenus chez les rates hypertendues ont démontré que les estrogènes réduisent la rigidité et le contenu en collagène des artères.³²³

2.2.5.3.7.2 *Les influences sur l'hypertrophie cardiaque*

L'hypertrophie cardiaque surgit en réponse à une surcharge de pression ou de volume. Afin de compenser ce stress hémodynamique, les myocytes cardiaques s'élargissent pour normaliser le stress causé à la paroi artérielle. La phase terminale de l'hypertrophie se caractérise par la défaillance cardiaque avec plusieurs conséquences néfastes pouvant résulter à l'impossibilité de poursuivre une activité physique. Les données expérimentales chez les animaux et les humains suggèrent que les estrogènes modulent l'hypertrophie cardiaque. En effet, la TRH atténue le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche et droite chez les rongeurs diminuant l'hypertrophie des myocytes.³²⁴ Il a été observé que le 17 β E augmente l'expression du facteur atrial natriurétique qui possède des effets anti-hypertrophiques.³²⁵

2.2.5.3.7.3 *Les influences sur les facteurs circulants (ANG II, ET-1 et AMP cyclique)*

Le 17 β E module l'expression de plusieurs facteurs influençant la structure et le tonus vasculaire. Les estrogènes accentuent les niveaux de bradykinine, un vasodilatateur, diminuant ainsi la pression artérielle.³²⁶ Ils régulent négativement l'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le plasma et au niveau des vaisseaux.³²⁷ De plus, ils réduisent la formation d'ANG II et la relâche de la rénine ayant un impact direct sur le système rénine-angiotensine, mécanisme intimement lié à l'hypertension. Le 17 β E prévient également les effets induits par l'ANG II sur la prolifération des CML en réduisant l'expression des récepteurs de type 1 de l'ANG II.³²⁸ L'homocystéine contribue aux maladies vasculaires par ses effets prolifératifs sur les CML et ses dommages à l'endothélium. Les résultats d'études cliniques ont démontré que les estrogènes réduisent les niveaux circulants d'homocystéine chez les FM.³²⁹ L'ET-1, un vasoconstricteur et un peptide mitogénique pour les CML, joue un rôle dans la pathogénèse de diverses formes de maladies vasculaires. Le 17 β E inhibe la synthèse d'ET-1 au niveau des CE selon un

mécanisme dépendant de ses RE.³³⁰ Des données cliniques chez les FM ont également noté que la TRH diminue les niveaux sanguins d'ET-1.³²⁹ Le 17 β E stimule l'activité de l'adénylate cyclase augmentant la synthèse d'un second messager vasodilatateur, l'AMP cyclique, et favorise la production d'adénosine par les CML par la voie de l'AMP cyclique/adénosine.³³¹ Les estrogènes augmentent la synthèse de la prostacycline, jouant un rôle sur la vasorelaxation des vaisseaux, en induisant l'expression de la cyclooxygénase et la prostacycline synthase et préviennent la production de catécholamines.^{332, 333}

2.2.5.3.8 Les estrogènes et la croissance cellulaire, le remodelage vasculaire et l'ischémie

L'élévation de la résistance périphérique caractéristique de l'hypertension est en partie liée à la croissance des CML. Une prolifération anormale de CML est le processus final menant à la résistance vasculaire. Des études *in vivo* effectuées chez divers modèles animaux ont montré que le 17 β E prévient la croissance des CML réduisant ainsi la résistance vasculaire.²⁰² Les études de population ont révélé que l'augmentation de la masse cardiaque avec l'âge est plus importante chez la femme que chez l'homme et que cette différence est encore plus évidente à la ménopause.³³⁴ Plusieurs études ont rapporté que les femmes qui reçoivent la TRH présentent une masse plus petite en comparaison aux femmes non traitées.³³⁵ Ces données indiquent donc que les estrogènes modulent le remodelage cardiaque. Toutefois, les mécanismes de régulation des estrogènes ne sont pas complètement élucidés. Les estrogènes réduisent l'expression des récepteurs de l'angiotensine de type 1, l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et la croissance des cardiomyocytes.^{328, 336, 337} Les estrogènes agissent également sur la synthèse des MMP qui contribuent au processus de rupture de la plaque athéromateuse. En fait, ils augmentent l'expression de la MMP-2 au niveau du cœur et des CML, alors qu'ils réduisent l'expression de la MMP-1, MMP-9 et MMP-13.³³⁸⁻³⁴⁰ L'ischémie, selon sa durée, mène à une altération cardiaque allant de la dysfonction contractile réversible à une perte totale et irréversible de fonction suite à une nécrose cellulaire et à un infarctus. L'administration intracoronarienne rapide d'estrogènes prévient l'ischémie, l'ischémie de reperfusion, l'arythmie et la taille de l'infarctus en augmentant le flot coronarien.³⁴¹ Les

estrogènes agissent à plusieurs niveaux afin de préserver les effets de la dilatation des artères coronariennes et réduisent la taille de l'infarctus dans des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion.³⁴² Ils augmentent la synthèse de NO en augmentant l'activité de la eNOS, module l'activité du TNF- α , des CAM, de l'ET-1 et des récepteurs de l'ET-1, et active les canaux ioniques. Les estrogènes peuvent parallèlement prévenir l'apoptose des myocytes cardiaques en favorisant l'expression du facteur de choc thermique-1 en réduisant le stress oxydatif et l'activité des cytokines proinflammatoires.^{343, 344} Cependant, les récents résultats des études cliniques randomisées ont apporté un doute sur cette perception cardioprotectrice des estrogènes à l'égard des infarctus du myocarde. En effet, les études CARS (« Coumadin Aspirin Reinfarction Study ») et WHI ont démontré que la TRH favorise l'incidence d'angine instable et le risque d'infarctus du myocarde chez les FM.^{195, 345}

2.2.5.3.9 Les estrogènes et l'angiogénèse

L'angiogénèse qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants est impliquée dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques.³⁴⁶ Elle joue un rôle crucial dans la guérison vasculaire, la progression tumorale et la perpétuation des maladies inflammatoires chroniques. L'angiogénèse survient selon une séquence logique d'événements. Une blessure ou une rupture de la paroi artérielle provoque l'activation des CE qui sécrètent des protéases de la MEC leur permettant de migrer vers le stroma et de s'attacher à d'autres molécules de la matrice. La prolifération et la différenciation en structure tubulaire permettent la sécrétion et le remodelage du support membranaire, l'attachement des péricytes et la formation d'un capillaire mature.³⁴⁷ Les estrogènes stimulent la formation de nouveaux vaisseaux *in vitro* et *in vivo*. Des études à l'aide de matrigel, un support de matrice membranaire, ont rapporté que les CE s'attachent, migrent et forment des structures tubulaires à la suite d'un traitement au 17 β E.³⁴⁸ Les effets proangiogéniques des estrogènes ont également été montrés par la formation de vaisseaux collatéraux dans un modèle animal de lapin d'ischémie chronique traité aux estrogènes.³⁴⁹ Les mécanismes d'action des estrogènes dans l'angiogénèse sont multiples. Les estrogènes stimulent la production de VEGF et la

surexpression des récepteurs au VEGF chez les animaux et l'homme.³⁵⁰ Il est bien connu que les intégrines jouent un rôle dans l'induction de l'attachement, la migration, la prolifération et la différenciation des CE. L'expression des intégrines $\beta 1$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ à la surface des CE est régulée par le $17\beta E$ et l'élévation de l'expression et de la fonction des intégrines est un mécanisme important par lequel les estrogènes induisent l'angiogénèse.³⁵¹

2.2.6 Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERMs)

Il est bien connu que le traitement hormonal à la ménopause est associé à un risque accru de cancer du sein et d'hyperplasie de l'endomètre. Les recherches ont alors eu pour objectif de trouver un composé possédant les avantages des estrogènes sans ses effets indésirables. La molécule idéale permettrait une modulation sur les RE limitée à une action agoniste bénéfique sur certains tissus cibles (os, cardiovasculaire et le cerveau) et une action antagoniste sur les tissus où la stimulation estrogénique a des effets délétères (sein et utérus). Les SERMs sont des dérivés non stéroïdiens qui se lient aux RE et possèdent des effets mixtes agonistes et antagonistes sur différents tissus. La spécificité des SERMs à l'égard de certains tissus s'explique selon trois facteurs: la nature et la structure du ligand, le type de récepteurs impliqués ($RE\alpha$ ou $RE\beta$) et l'interaction du complexe ligand-récepteur avec d'autres co-activateurs ou co-répresseurs influençant l'activité transcriptionnelle.³⁵² Les SERMs sont classés en différentes catégories selon leur structure. La première classe de molécules (ICI 164384 et ICI 182780) sont dépourvus d'effet agoniste et ont été caractérisées comme de purs antagonistes aux RE.³⁵³ Ensuite, on retrouve la classe des triphényléthylènes dont la première génération (clomiphène) fut remplacée par la seconde génération comportant le tamoxifène, le toremifène, le droloxifène et l'indoxifène. Finalement, il existe également la classe des benzothiophènes, considéré comme étant la troisième génération de SERMs, possèdent une structure différents de celles des triphényléthylènes tout en conservant les mêmes composés nécessaires à la liaison aux RE. Cette classe comporte plusieurs composés dont le principal est le raloxifène.³⁵³ Le tamoxifène fut le premier composé anti-estrogénique à avoir été utilisé à long terme principalement comme traitement anti-cancéreux au niveau du sein.³⁵⁴

Découvert en 1962, le tamoxifène possède toutefois une affinité moindre pour les RE (20 fois inférieure à celui du $17\beta\text{E}$). Il a été démontré que le tamoxifène inhibe la croissance de cellules cancéreuses (MCF7) ainsi que des carcinomes de tissu mammaire.³⁵⁵ Le tamoxifène régule également le métabolisme des lipides en réduisant les niveaux de cholestérol plasmatique tout en augmentant les niveaux de triglycérides et diminue la perte de masse osseuse. Par contre, le tamoxifène possède des effets agonistes sur l'endomètre augmentant de 3 à 4 fois le risque de cancer de l'endomètre.³⁵⁶ Malheureusement, un traitement prolongé au tamoxifène accentue le phénomène de résistance au tamoxifène en plus d'augmenter le risque de cancer.

Le raloxifène, un des plus étudiés jusqu'à présent, n'a pas d'effet délétère sur l'utérus et semble avoir des effets anti-prolifératifs sur les cellules mammaires selon les données de l'étude MORE (*Multiple Outcomes of Raloxifene*).³⁵⁷ L'étude MORE, une étude prospective, a démontré que le raloxifène diminue de 76% le risque de fractures osseuses et de cancer du sein. Toutefois, cette étude a aussi mis en évidence une augmentation non négligeable du risque de maladies thromboemboliques veineuses.³⁵⁷ Les éventuels effets cardiovasculaires du raloxifène chez la femme ont été récemment évalués dans l'étude RUTH (*Raloxifene Use for The Heart*).³⁵⁸ Les données de cette étude concluent qu'un traitement au raloxifène durant 5.6 ans n'affecte pas de façon significative le risque d'événements coronariens. Le raloxifène diminue toutefois le risque de cancer du sein invasif et les fractures vertébrales, mais augmente le risque d'événements thrombotiques veineux et d'accident vasculaires cérébraux.³⁵⁸ De plus, une augmentation des bouffées de chaleur et de crampes au niveau des jambes ont été rapportées chez les sujets traités au raloxifène. D'autres études préliminaires chez la rate ovariectomisée sous régime hypercholestérolémiant ont démontré que le raloxifène réduit l'accumulation de cholestérol au niveau de l'aorte suggérant une réduction de la plaque athéromateuse.³⁵⁹ Toutefois, les effets observés avec le raloxifène étaient moindres en comparaison des résultats obtenus par le traitement au $17\beta\text{E}$. De plus, d'autres études réalisées sur les singes n'ont pu démontrer un effet bénéfique du raloxifène et ce quelle que soit la dose.³⁶⁰ Le raloxifène, tout comme les estrogènes, jouent un rôle au niveau du métabolisme lipidique en diminuant les LDL.³⁶¹ La baisse des LDL s'explique aussi par l'augmentation du nombre de récepteurs aux LDL

permettant une accélération de leur catabolisme hépatique. Une étude randomisée, en double aveugle chez les FM a rapporté que la baisse des LDL est similaire sous traitement estrogénique et raloxifène, mais que l'augmentation des HDL et des triglycérides n'est présente que sous traitement estrogénique.³⁶² Les effets favorables des estrogènes sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium sont bien documentés et s'accompagnent d'une augmentation de la production de NO. Des études *in vitro* utilisant le raloxifène ont montré un effet vasodilatateur comparable à celui du 17 β E. En effet, un traitement au raloxifène sur des CE en culture provoque une augmentation rapide et dose-dépendante de la production de NO via une activation de la eNOS.³⁶³ Cet effet est dépendant des RE puisque les effets du raloxifène sont abolis par l'ajout d'un antagoniste des RE. Le raloxifène diminue le fibrinogène dans les mêmes proportions que les estrogènes³⁶² Le raloxifène exerce également un effet anti-prolifératif au niveau des CML traitées au PDGF d'une part en agissant directement sur l'inhibition de l'expression de certains gènes (cycline D1) et sur la déphosphorylation de la protéine rétinoblastome, et d'une autre part en agissant de manière non-génomique sur l'apoptose des CML par l'induction de la p38 MAPK.^{364, 365} Cependant, il n'existe pas d'effet connu des SERMs sur les marqueurs de la coagulation. De plus, les SERMs ne semblent pas modifier significativement le t-PA et le PAI-1. La CRP, un marqueur de l'inflammation et un facteur prédictif d'événements cardiovasculaires, augmente de façon transitoire sous l'action des hormones alors qu'elle reste stable avec traitement au raloxifène.^{366, 367} En résumé, les SERMs améliorent le profil de risque cardiovasculaire par leurs effets bénéfiques sur la baisse des LDL, du fibrinogène et de la lipoprotéine A sans modifier l'expression de la CRP. Cependant, les SERMs n'affectent pas les niveaux de HDL et du PAI-1.

3 Problématique

L'implantation d'endoprothèses lors des interventions coronariennes a clairement prouvé leur efficacité dans le traitement des des sténoses coronariennes en comparaison de l'ACTP.³⁶⁸ Cependant, 20 à 30% des patients présentent une resténose sévère 6 mois après l'intervention. L'utilisation d'endoprothèses enrobées d'agents anti-prolifératifs ont permis de réduire de beaucoup cette incidence de resténose à moins de 3% de subir une événement cardiaque majeur.⁹³ Par contre, comme ce fut le cas pour la brachythérapie, des préoccupations persistent sur les effets à long terme de ces agents inhibiteurs du cycle cellulaire pouvant ainsi retarder la guérison vasculaire. Les recherches se concentrent maintenant sur un composé pouvant inhiber l'hyperplasie néointimale tout en favorisant la guérison du vaisseau.

Les estrogènes agissent au niveau de plusieurs mécanismes impliqués dans la resténose au niveau moléculaire et cellulaire. Spécifiquement, le 17 β E protège l'endothélium des dommages causés par la procédure (ACTP ou endoprothèse), réduit l'expression des CAM bloquant le recrutement et l'adhésion des cellules inflammatoires telles que les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles et les plaquettes au site de blessure. Les estrogènes inhibent la production de cytokines proinflammatoires et de facteurs de croissance. Elles sont impliquées dans la diminution de la prolifération et la migration des CML en inhibant la production d'agents mitogéniques responsables des cascades d'événements biologiques qui stimulent l'hyperplasie néointimale. Les estrogènes favorisent également la réendothélialisation principalement par la libération de NO. Des études dans le laboratoire du Dr Tanguay ont démontré que la livraison locale de 17 β E dans les artères coronaires de porc réduit de 50% la formation de la resténose suite à une ACTP.³⁶⁹ Ces effets inhibiteurs sur la resténose s'expliquent par la capacité du 17 β E à promouvoir la réendothélialisation et l'expression d'eNOS favorisant la guérison vasculaire. De plus, la livraison locale de 17 β E prévient la vasoconstriction suite à l'infusion d'acétylcholine 28 jours après une ACTP, un mécanisme dépendant de l'endothélium.³⁷⁰ Les effets de la livraison locale ont également été vérifiés après l'implantation d'une endoprothèse coronarienne. Les résultats qui seront prochainement

publiés démontrent que la livraison de $17\beta\text{E}$ réduit de 25% la resténose intra-endoprothèse. Cette étude a également montré que la capacité des estrogènes à prévenir l'hyperplasie néointimale survient lors de blessures artérielles modérées et sévères en réduisant le nombre de cellules inflammatoires près des tiges métalliques de l'endoprothèse. Par contre, la régulation par les estrogènes des divers mécanismes de formation de resténose n'est pas encore très bien définie. De plus, le rôle spécifique des RE dans ces mécanismes demeure peu connu. Suite aux résultats décevants des études cliniques randomisées, il est devenu impératif d'avoir une meilleure compréhension des actions des RE afin de favoriser les effets bénéfiques sans les effets délétères.

3.1 But du projet de thèse

Pour mieux comprendre les mécanismes intracellulaires par lesquels le $17\beta\text{E}$ inhibe l'hyperplasie néointimale suite à une intervention coronarienne, le but de ma thèse était de caractériser le rôle du $17\beta\text{E}$ dans la voie de signalisation de ERK-1/-2 et p38 MAPK, protéines impliquées dans la prolifération et la migration des CML et CE. Également, à l'aide de la thérapie génique par antisens, nous avons caractérisé le rôle spécifique de chaque RE dans la cascade de signalisation des MAPKs. Finalement, puisque les estrogènes possèdent à la fois des effets pro- et anti-inflammatoires, nous avons évalué les effets des estrogènes sur l'expression de CD40 et CD40L, protéines impliquées dans le développement de la plaque athéromateuse et de l'adhésion de leucocytes à la paroi artérielle. Nous avons caractérisé le rôle du $17\beta\text{E}$ et des RE dans la régulation de CD40 et CD40L au niveau des CE en condition proinflammatoire. Nous avons également évalué l'implication de CD40/CD40L dans l'adhésion des neutrophiles et les effets du $17\beta\text{E}$ et des RE dans l'interaction CE-neutrophiles. Au cours de ces travaux, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans la resténose à l'aide d'un modèle porcine qui offre plusieurs avantages. En effet, la resténose coronarienne peut y être facilement induite par une lésion artérielle mineure. De plus, tout comme l'humain, le porc est sujet à la formation de thrombus à la suite d'une lésion vasculaire et est un modèle reconnu pour le développement de nouvelles thérapies vasculaires.

4 Article #1

The MAPKs Activity Regulation of Endothelial and Smooth Muscle Cell by Estrogen are Estrogen Receptor Dependent

Pedro Geraldes, Martin G. Sirois, Pascal N. Bernatchez, Jean-François Tanguay

Short title: Regulation of MAPK by 17-Beta-estradiol

Word count of body: 4,774

Word count of abstract: 200

Total number of figures: 6

From the Department of Medicine (P.G., J.F.T.), Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada and the Department of Pharmacology (M.G.S., P.N.B.), University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Jean-François Tanguay, M.D., Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St East, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3022; Fax: (514) 593-2596; E-mail: [REDACTED]

4.1 Abstract

Objective – Restenosis is a major limitation of percutaneous coronary intervention. Migration and proliferation of vascular cells remain a cornerstone in neointimal formation. The cardioprotection of estrogen are well recognized but the intracellular mechanisms related to these beneficial effects are not completely understood.

Methods and results – We investigated the effects of 17-beta-estradiol (17 β E) on mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity, migration and proliferation of porcine aortic endothelial cells (PAEC) and smooth muscle cells (PSMC). Treatment with 17 β E (10⁻⁸ mol/L) abrogated p38 and p42/44 MAPK phosphorylation mediated by platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) as well as migration and proliferation of PSMC. In contrast, treatment with 17 β E (10⁻⁸ mol/L) induced the phosphorylation of p38 and p42/44 MAPK, the migration and proliferation of PAEC. Interestingly, the effects of 17 β E on PSMC and PAEC were reversed by selective estrogen receptor antagonists (Tamoxifen, 4-OH-Tamoxifen and Raloxifen). These results suggest that in PSMC, 17 β E inhibits chemotactic and mitogenic effects of PDGF-BB as well as p38 and p42/44 MAPK phosphorylation. In contrast, 17 β E promotes in PAEC the phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK as well as the migration and proliferation of these cells.

Conclusion – 17 β E has a dual beneficial effect to improve vascular healing and prevent restenosis after angioplasty.

Keywords: 17-beta-estradiol - smooth muscle - endothelium - MAPK

4.1.1 Condensed abstract

Several studies observed that estrogen has the potential to prevent cardiovascular diseases. In this present study, we showed that a treatment with 17 β E prevents the p38 and p42/44 MAPK phosphorylation, the migration and the proliferation of PSMC induced by PDGF-BB stimulation and promotes proliferation, migration and MAPK activity on PAEC.

4.2 Introduction

Restenosis is currently the primary limitation of percutaneous transluminal coronary angioplasty occurring in 20% to 40% of patients.¹ Estrogens play an important role in bone maintenance, in the cardiovascular system, in the growth, differentiation and biological activity of various tissues.² Moreover, numerous *in vivo* studies in various animal models have demonstrated that the neointimal formation induced after balloon injury is increased in the absence of estrogen but decreased in its presence.³ The protective effects of 17-beta-estradiol (17 β E) are related to favourable changes in plasma lipid profile,⁴ to inhibition of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation⁵ and migration,⁶ to relaxation of coronary vessels through endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity,⁷ to reduction of platelets and monocytes aggregation,⁸ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) release⁹ and extracellular matrix synthesis.¹⁰ We have shown that local delivery of 17 β E reduces neointimal thickness upon coronary balloon injury in a porcine model.¹¹

Estrogen can bind 2 estrogen receptors (ER) alpha (ER α) and beta (ER β) which are expressed in all vascular cell types.¹² The classical genomic mechanism, or long-term effect of estrogen on vascular tissues, is dependent on change in gene expression. Most recently, a second mechanism with direct effect of estrogen has been identified.¹³ Several studies have demonstrated that 17 β E can activate many intracellular signalling responses.¹⁴ The mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade is a central role in the cellular signal transduction pathway in response to vascular stimuli.¹⁵ Well characterized subfamilies of the MAPKs, the ERK and p38 MAPK pathway are involved in chemotactic and mitogenic activity in a variety of cell types.¹⁶ These MAPKs are stimulated after arterial injury.¹⁷ We therefore hypothesized that an acute administration of 17 β E may influence these MAPKs activity in vascular cells. Estrogens can modulate intracellular events through other ligand receptors¹⁸ and reduce neointimal formation after injury in ER $\alpha\beta$ knockout mice.¹⁹ These results suggested that estrogen may provide a protection against endothelial injury in the absence of ER $\alpha\beta$.

In the present study, we evaluated the activity of $17\beta\text{E}$ on endothelial and smooth muscle cell proliferation, migration and p42/44 and p38 MAPK phosphorylation. Furthermore, we examined if the action of $17\beta\text{E}$ on p42/44 and p38 MAPK signal transduction pathways are ER dependent

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Cell Culture

Porcine aortic endothelial cells (PAEC) and porcine smooth muscle cells (PSMC) expressing both $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$ were isolated from freshly harvested aortas, cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) containing 5% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT), and antibiotics (penicillin and streptomycin, Sigma, St-Louis, MO). PAEC were characterized by their cobblestone monolayer morphology. PSMC were characterized by anti-smooth muscle α -actin monoclonal antibodies and by specific morphology for smooth muscle cells (SMCs). PAEC and PSMC between the 3rd and 8th passage were used.

4.3.2 Mitogenic Assay

Confluent PAEC and PSMC were rinsed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in 10 mL of DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained with a Coulter Counter Z1 (Coulter Electronics, Luton, UK). PAEC and PSMC were initially seeded at 1.5×10^4 cells/well of 24-well tissue culture plates (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) stimulated for 24 hours in DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and starved for 48 hours in DMEM, 0.1% FBS, and antibiotics. Initial cell number for growth was determined using a Coulter counter. The cells were stimulated for 72 hours in DMEM, 1% or 5% FBS, antibiotics, and with or without different concentrations of $17\beta\text{E}$ (Sigma), Tamoxifen (Tam) (Sigma), 4OH-Tamoxifen (4-OHT) (Sigma), Raloxifen (Ral) (Eli Lilly, Indianapolis, IN). After trypsinization, cell number was determined by using a Coulter counter.

4.3.3 Chemotactic Assay

Cell migration was evaluated using a modified Boyden 48-well microchamber kit (NeuroProbe, Cabin John, MD). Near confluent PAEC and PSMC were rinsed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained. PAEC and PSMC were seeded at 2.5×10^5 cells/well of 6-well tissue culture plates; stimulated for 24 hours in DMEM, 5% FBS, and antibiotics and starved for 48 hours in DMEM, 0.1% FBS, and antibiotics with or without $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L), Tam (10^{-7} mol/L), 4OH-Tam (10^{-7} mol/L), Ral (10^{-7} mol/L). ER antagonists were added 5 minutes before $17\beta\text{E}$. Cells were harvested by trypsinization and resuspended in DMEM, 1% FBS, and antibiotics at a concentration of 5×10^5 cells/mL. Fifty μL of this cell suspension treated with or without $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L), Tam (10^{-7} mol/L), 4-OHT (10^{-7} mol/L), Ral (10^{-7} mol/L) was added in the higher chamber of the modified Boyden chamber apparatus, and the lower chamber was filled with DMEM, 1% FBS, antibiotics plus the desired concentration of agonist either basic fibroblast growth factor (bFGF) or platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). The 2 sections of the system were separated by a porous polycarbonate filter ($5\text{-}\mu\text{m}$ pores size), pretreated with a gelatine solution (1.5 mg/mL), and assembled. Five hours postincubation at 37°C , the nonmigrated cells were scraped with a plastic policeman, and the migrated cells were stained using a Quick-Diff solution. The filter was then mounted on a glass slide, and migrated cells were counted using a microscope adapted to a video camera to obtain a computer-digitized image.

4.3.4 Western Blot Analysis of p38 and p42/44 MAPK Phosphorylation

Confluent PAEC and PSMC were starved for 7 hours in DMEM and antibiotics. Culture medium was removed, and cells were rinsed twice with ice-cold DMEM. PSMC were incubated on ice in DMEM with or without $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) for 30 minutes, incubated at 37°C for 5, 10, 15 and 30 minutes, then brought back on ice. Cells were then rinsed with cold DMEM, incubated on ice in DMEM, bovine serum albumin (1 mg/mL),

PDGF-BB (10 ng/mL) for 30 minutes, incubated at 37°C for 5 minutes, and then brought back on ice. PAEC were incubated on ice in DMEM with or without 17βE (10⁻⁸ mol/L) for 30 minutes, then incubated at 37°C for 5, 10, 15 and 30 minutes and brought back on ice. For all the experiments on PSMC and PAEC, Tam (10⁻⁷ mol/L), 4OH-Tam (10⁻⁷ mol/L), or Ral (10⁻⁷ mol/L) were added 5 minutes prior to 17βE treatment. Total proteins were prepared by the addition of 500 μL of lysis buffer containing phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mmol/L, leupeptin 10 μg/mL, aprotinin 30 μg/mL, and NaVO₃ 1 mmol/L (Sigma). Plates were incubated at 4°C for 30 minutes and scraped, and the protein concentration was determined with a Bio-Rad protein kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Same protein quantity for each cell type and condition was dissolved in Laemmli's buffer, boiled for 5 minutes in reducing conditions, separated by a 10% gradient SDS-PAGE (Protean II kit; Bio-Rad), and transblotted onto a 0.45-μm polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp., Bedford, MA). The membranes were blocked in 5% Blotto-TTBS (5% nonfat dry milk; Bio-Rad), 0.05% Tween 20, 0.15 mol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) for 1 hour at room temperature with gentle agitation and incubated overnight at 4°C in 0.5% Blotto-TTBS with the addition of an antiphospho p42/44 MAPK or an antiphospho p38 MAPK rabbit polyclonal antisera (α-pp42/44; dilution of 1:10 000, and α-pp38; dilution 1:5 000, New England BioLabs, Beverly, MA). Membranes were washed with TTBS, and incubated at room temperature with an anti-rabbit IgG antibody coupled to horseradish peroxidase (dilution 1:10 000-1:20 000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in 0.5% Blotto-TTBS for 30 minutes. Membranes were washed with TTBS, and horseradish peroxidase bound to secondary antibody was revealed by chemiluminescence (Renaissance kit, NEN Life Science Products, Boston, MA). Kaleidoscope molecular weight and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis broad range marker proteins (Bio-Rad) were used as standards for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Digital image densitometry (PDI Bioscience, Aurora, ON) was performed on X-ray film to determine relative phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK. All western blot analysis was performed in triplicate and results of image densitometry are representative of these experiments.

4.3.5 Statistical Analysis

Data are mean±SEM. Statistical comparisons were performed using ANOVA followed by an unpaired Student *t* test. A *P* value <0.05 was considered as significant.

4.4 Results

4.4.1 Effects of 17βE on PSMC Proliferation

First, we evaluated the effect of 17βE on PSMC proliferation. Stimulation of quiescent PSMC with DMEM 1% and 5% FBS increased significantly their proliferation from 9 894±714 cells/well to 16 258±1 441 and 42 500±2 889 cells/well, respectively. Treatment with 17βE (10⁻⁸ mol/L) abrogated by 88% and 90% the PSMC proliferation mediated by FBS 1% and 5%, respectively (data not shown). Then, we investigated how different estrogen antagonists may interfere with 17βE activity. Treatment of quiescent PSMC with DMEM 1% FBS increased the PSMC cell count from 10 213±734 to 16 100±1 142 (Figure 1). A treatment with 17βE (10⁻⁸ mol/L) inhibited completely the FBS 1% mitogenic activity (Figure 1). The antimitogenic activity of 17βE on PSMC was reversed by Tam (10⁻⁷ mol/L) and 4-OHT (10⁻⁸ mol/L and 10⁻⁷ mol/L), and Ral (10⁻⁷ mol/L) by 75%, 81% and 100%, respectively (Figure 1). In absence of 17βE, a treatment of PSMC with these ER antagonists did not alter the mitogenic activity of FBS 1% (data not shown).

4.4.2 Effects of 17βE on PSMC Migration

Using a modified Boyden chamber assay, PDGF-BB (1, 5, 10 ng/mL) induced dose-dependently and significantly the migration of PSMC by 96%, 137%, 202% as compared to DMEM 1%, 5 hours post-treatment (data not shown). A treatment with 17βE (10⁻⁸ mol/L) inhibited completely the chemotactic effect of PDGF-BB (10 ng/mL) (Figure 2). In order to evaluate the interaction of ER antagonists with 17βE on PSMC chemotactic activity, PSMC were pretreated with Tam, 4-OHT and Ral (10⁻⁹ to 10⁻⁷ mol/L) before adding 17βE (10⁻⁸ mol/L). The antichemotactic effect of 17βE was reversed completely by Tam, 4-OHT

and Ral (10^{-7} mol/L) (Figure 2). A treatment with these ER antagonists in absence of 17β E did not modify the effect of PDGF-BB on PSMC migration (data not shown).

4.4.3 Effects of 17β E on PSMC p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation

Since PDGF-BB can induce SMC p42/44 and p38 MAPK phosphorylation, we investigated if a treatment with 17β E might influence the phosphorylation of these MAPK mediated by PDGF-BB. A treatment of PSMC with PDGF-BB induced a rapid and transient phosphorylation of p42/44 MAPK within 5 minutes, which decreased below the basal level within 15 minutes (Data not shown). Pretreatment with 17β E (10^{-8} mol/L) inhibited time-dependently, with maximum inhibition at 30 minutes, the phosphorylation of p42/44 MAPK induced by 5 minutes stimulation of PDGF-BB (Figure 3). Pretreatment with Tam, 4-OHT or RAL (10^{-7} mol/L) 5 minutes prior to the stimulation with 17β E (30 minutes) reversed by 54%, 79% ($P<0.05$) and 100% ($P<0.05$), respectively the inhibitory effect of 17β E on PDGF-BB mediated p42/44 MAPK phosphorylation (Figure 3).

The same series of experiment was performed on p38 MAPK phosphorylation induced by PDGF-BB. A stimulation of PSMC with PDGF-BB (10 ng/mL) induced the phosphorylation of p38 MAPK which was maximal within 30 minutes as compared to PBS (Data not shown). A treatment of PSMC with 17β E (10^{-8} mol/L) prior to stimulation with PDGF-BB (30 minutes) decreased the phosphorylation of p38 MAPK in a time-dependent manner and up to 85% of inhibition at 30 minutes post-PDGF-BB treatment (Figure 3). A pretreatment with Tam, 4-OHT and Ral (10^{-7} mol/L) reversed by 51%, 53% and 32%, respectively the effect of 17β E (10^{-8} mol/L) on p38 MAPK induced by 30 minutes stimulation of PDGF-BB (Figure 3). In absence of PDGF-BB stimulation, a treatment with 17β E alone or with ER antagonists alone did not alter the basal phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK on PSMC (data not shown).

4.4.4 Effects of 17 β E on PAEC Proliferation

Quiescent PAEC were stimulated with DMEM 1% FBS which raised basal cell count from 13 328 \pm 560 to 24 244 \pm 843 cells/well. The addition of 17 β E (10^{-10} to 10^{-7} mol/L) induced a dose-dependent proliferation of PAEC with a maximum induction at 10^{-8} mol/L (data not shown). To investigate how ER antagonists may interfere with the positive effect of 17 β E on endothelial cells proliferation, quiescent PAEC were stimulated with DMEM 1% FBS which raised the cell count from 10 512 \pm 832 to 29 138 \pm 870 cells/well in 72 hours. A treatment of PAEC with 17 β E (10^{-8} mol/L) induced the proliferation of PAEC by 37% over FBS 1% treatment (Figure 4). A pretreatment with Tam, 4-OHT and Ral (10^{-7} mol/L) inhibited completely the 17 β E mitogenic activity in PAEC (Figure 4). A treatment of these cells with ER antagonists in absence of 17 β E did not affect the mitogenic effect of FBS (1%) (data not shown).

4.4.5 Effects of 17 β E on PAEC Migration

A treatment with bFGF (1, 5, 10 ng/mL) induced dose-dependently the migration of PAEC by 46%, 124% and 114% in 5 hours as compared to DMEM 1% ($P < 0.05$) (data not shown). In another series of experiment, a combined treatment with 17 β E (10^{-8} mol/L) stimulated significantly by 121% the PAEC migration as compared to bFGF (10 ng/mL) alone (Figure 5). Pretreatment of PAEC with ER antagonists (10^{-7} mol/L) 5 minutes prior to 17 β E addition prevented completely the chemotactic activity of 17 β E (10^{-8} mol/L) on PAEC (Figure 5). We also investigated if the ER antagonists in absence of 17 β E had an effect on bFGF chemotactic activity, and the ER antagonists did not alter the chemotactic activity of bFGF (10 ng/mL) on PAEC (data not shown).

4.4.6 Effects of 17 β E on PAEC p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation

Considering that 17 β E can stimulate the proliferation and the migration of PAEC, we evaluated the effect of 17 β E on phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK of PAEC.

Control PAEC (PBS-treated) showed a basal phosphorylation of p42/44 MAPK. Stimulation with $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) increased time-dependently at 5, 10, 15 and 30 minutes the phosphorylation of p42/44 MAPK by 1122%, 1074%, 1420% and 1835%, respectively (Data not shown). A pretreatment with Tam, 4-OHT or Ral (10^{-7} mol/L) 5 minutes prior to the addition of $17\beta\text{E}$ decreased by 36% ($P<0.05$), 44% ($P<0.05$) and 66% ($P<0.05$) the phosphorylation of p42/44 MAPK mediated by a 5-minute treatment with $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) (Figure 6). As for p42/44 MAPK, a treatment of PAEC with $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) induced a time-dependent phosphorylation of p38 MAPK with a maximum stimulation at 30 minutes compared to unstimulated PAEC (PBS) (Data not shown). A pretreatment with ER antagonists (10^{-7} mol/L) 5 minutes prior to the addition of $17\beta\text{E}$ inhibited by 84%, 81% ($P<0.05$) and 98% ($P<0.05$) the phosphorylation of p38 MAPK induced by a 30-minute treatment with $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) (Figure 6). In absence of $17\beta\text{E}$ stimulation, a treatment with the ER antagonists did not alter the basal phosphorylation of PAEC p42/44 and p38 MAPK (data not shown).

4.5 Discussion

Several studies have shown that estrogen treatment may have beneficial effects on the cardiovascular system by reducing post injury neointimal formation in animal carotid arteries²⁰ and by improving some aspects of endothelial function in postmenopausal women.²¹ We have previously demonstrated that a local delivery of $17\beta\text{E}$ upon a porcine coronary angioplasty reduces the degree of restenosis by up to 50% and improves the reendothelialization, eNOS expression and vascular healing.^{11,22} In the present study, we observed that a treatment with $17\beta\text{E}$ stimulates PAEC but reverses PSMC phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK. Our results also suggest that these effects of $17\beta\text{E}$ are at least partially ER dependent.

4.5.1 Anti-mitogenic and Anti-chemotactic Effects of 17 β E in PSMC

VSMC contribute to pathological formation of restenosis by migrating from media to the intima, proliferating, and depositing extracellular matrix proteins. PDGF, which is secreted from platelets and macrophages recruited at the early inflammatory lesion, has been described to play an important role in restenosis. In animal experiments, PDGF-BB has been associated with SMC proliferation and migration.¹ In the present study, a treatment with 17 β E (10^{-8} mol/L) inhibited the proliferation and the migration of PSMC stimulated by PDGF-BB. Our results are consistent with other authors who were able to demonstrate that estrogen can inhibit VSMC proliferation⁵ and migration⁶ in *in vitro* and *in vivo* experiments. It is also well established that PDGF-BB activates extracellular signal-regulated kinase such as MAPKs.¹⁶ We have demonstrated that PDGF-BB can induce the phosphorylation of p42/44 MAPK and p38 MAPK within 5 and 30 minutes respectively in PSMC. To better understand the nongenomic effects of estrogen, we have shown that a treatment of PSMC with 17 β E for a short period of time reduced the phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK mediated by PDGF-BB by 100% and 85%, respectively. Previous study have also observed that estrogens mediate their inhibition effects on SMCs by reducing p42/44 MAPK activity.²³ To evaluate if the antimitogenic and antichemotactic effects of 17 β E of PSMC are ER dependent or independent, we pretreated these cells with ER antagonists prior treatment with 17 β E. We showed that a pretreatment of PSMC with ER antagonists reversed the effects of 17 β E to prevent the phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK induced by PDGF-BB. These ER antagonists are also called selective ER modulators and may have a potential positive effects on cardiovascular diseases.²⁴ In contrast, we have not observed any beneficial effect with Tamoxifen, 4-OH-Tamoxifen or Raloxifen alone to prevent PSMC proliferation, migration and MAPK activity mediated by PDGF-BB.

4.5.2 17 β E Promotes Reendothelialization by Increasing the Proliferation and the Migration of PAEC

Reendothelialization plays a critical role in restenosis. The improvement of endothelium regeneration will accelerate the vascular healing after balloon injury and will reduce the neointimal formation. Previous study have noted that administration of estrogen in healthy young men is associated with enhanced arterial endothelial function.²⁵ We have shown that local delivery of 17 β E improves reendothelialization and eNOS expression after angioplasty.¹¹ In the present paper, we propose that 17 β E increases reendothelialization by increasing the proliferation and the migration of PAEC. Previous studies have demonstrated that estrogen can induce rapidly the activation of various pathways.²⁶ To examine the nongenomic effects of 17 β E on PAEC proliferation and migration, we evaluated the MAPK activity of these cells following a short administration of 17 β E. Our results demonstrated that a treatment of PAEC with 17 β E increased p42/44 and p38 MAPK phosphorylation within 5 and 30 minutes stimulation, respectively. These results support other studies which have observed that estrogen can preserve the actin cytoarchitecture during metabolic stress, can induce the migration of endothelial cells by stimulation of the p38 MAPK pathway²⁷ and can stimulate p42/44 MAPK of human endothelial cells.²⁸ In order to evaluate if these rapid activations of p42/44 and p38 MAPK by 17 β E are ER dependent or independent, PAEC were pretreated with Tamoxifen, 4-OH-Tamoxifen and Raloxifen. Our results suggested that a pretreatment of PAEC with ER antagonists reversed the phosphorylation of p42/44 and p38 MAPK mediated by 17 β E. Interestingly, a treatment of PAEC with ER antagonists alone did not affect the proliferation, the migration or the MAPKs activity of these cells.

In conclusion, an acute administration of 17 β E activates p42/44 and p38 MAPK to promote proliferation and migration of PAEC, and at the opposite, inhibits these events in PSMC. Our results suggest that the beneficial effects of a treatment with 17 β E on restenosis may be explained by a reduction of PSMC migration and proliferation combined to a positive endothelial cell migrating and proliferating activity. These effects of 17 β E appear to be at least partially ER dependent.

4.6 References

1. Chandrasekar B, Tanguay JF. Platelets and restenosis. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:555-562.
2. Cignarella A, Paoletti R, Puglisi L. Direct effects of estrogen on the vessel wall. *Med Res Rev.* 2001;21:171-184.
3. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:964-972.
4. Song J, Wan Y, Rolfe BE, Campbell JH, Campbell GR. Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype. *Atherosclerosis.* 1998;140:97-104.
5. Lavigne MC, Ramwell PW, Clarke R. Inhibition of estrogen receptor function promotes porcine coronary artery smooth muscle cell proliferation. *Steroids.* 1999;64:472-480.
6. Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, Carlson GC, Farb A, Verma A, Virmani R. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol.* 1996;148:969-976.
7. Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1997;273:L119-L126.
8. Herrington D. Role of estrogens, selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens in cardiovascular protection. *Can J Cardiol.* 2000;16(suppl E):5E-9E.
9. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J, Pacifici R. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest.* 2000;106:1229-1237.
10. Silbiger S, Lei J, Ziyadeh FN, Neugarten J. Estradiol reverses TGF-beta1-stimulated type IV collagen gene transcription in murine mesangial cells. *Am J Physiol.* 1998;274:F1113-F1118.

11. Chandrasekar B, Tanguay JF. Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1972-1978.
12. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340:1801-1811.
13. Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K. Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1999;145:727-740.
14. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276:36869-72.
15. Chevalier D, Thorin E, Allen BG. Simultaneous measurement of ERK, p38, and JNK MAP kinase cascades in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44:429-39.
16. Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, Takemoto M, Ueno H, Saito Y, Mori S. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem.* 1999;274:13954-60.
17. Simoncini T, Genazzani AR. Direct vascular effects of estrogens and selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2000;12:181-187.
18. Nadal A, Diaz M, Valverde MA. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci.* 2001;16:251-5.
19. Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res.* 2001;89:534-9.
20. Finking G, Krauss N, Romer S, Eckert S, Lenz C, Kamenz J, Menke A, Brehme U, Hombach V, Hanke H. 17beta-estradiol, gender independently, reduces atheroma development but not neointimal proliferation after balloon injury in the rabbit aorta. *Atherosclerosis.* 2001;154:39-49.
21. van Baal WM, Kenemans P, Emeis JJ, Schalkwijk CG, Mijatovic V, van der Mooren MJ, Vischer UM, Stehouwer CD. Long-term effects of combined hormone replacement

- therapy on markers of endothelial function and inflammatory activity in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril*. 1999;71:663-670.
22. Chandrasekar B, Nattel S, Tanguay JF. Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1570-1576.
23. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:964-72.
24. Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, Kirschenlohr HL. Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation*. 2001;103:1497-1502.
25. Sader MA, McCredie RJ, Griffiths KA, Wishart SM, Handelsman DJ, Celermajer DS. Oestradiol improves arterial endothelial function in healthy men receiving testosterone. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;54:175-181.
26. Shaul PW. Novel role of estrogen receptors in vascular endothelium. *Semin Perinatol*. 2000;24:70-74.
27. Razandi M, Pedram A, Levin ER. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem*. 2000;275:38540-38546.
28. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:5930-5.

4.7 Figure Legends

Figure 1: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC proliferation

PSMC were seeded at 1.5×10^4 cells/well and stimulated as described in methods. The cells were then stimulated with 17 β E and combine treated with Tam, 4-OHT or Ral. The values are means of cell count obtained from 6 wells for each treatment. The values are means of migrating cells/mm² from 6 chambers for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to day 0; †, $P < 0.05$ as compared to control; ‡, $P < 0.05$ as compared to 17 β E (10^{-8} mol/L).

Figure 2: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC migration

PSMC combine treated with Tam, 4-OHT and Ral, then treated with 17 β E (10^{-8} mol/L) were added in the higher chamber of the modified Boyden chamber apparatus, the lower chamber was filled with DMEM, 1% FBS with PDGF-BB. The values are means of migrating cells/mm² from 6 chambers for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to day 0; †, $P < 0.05$ as compared to control; ‡, $P < 0.05$ as compared to 17 β E (10^{-8} mol/L).

Figure 3: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC p42/44 and p38 MAPK activity

PSMC were rinsed and pretreated 5 minutes with Tam, 4-OHT and Ral (10^{-7} mol/L) and then treated with 17 β E (10^{-8} mol/L) for 30 minutes and stimulated with PDGF-BB for 5 minutes for p42/44 MAPK and 30 minutes for p38 MAPK. Proteins were detected by Western Blot analysis. Image densitometry results are given as relative expression (%) as compared with PBS-treated cells.

Figure 4: Effects of 17 β E and ER antagonists on PAEC proliferation

PAEC were seeded at 1.5×10^4 cells/well and stimulated as described in the methods. The cells were combine treated with 17 β E and Tam, 4-OHT or Ral in DMEM, 1% FBS. The values are means of cell count obtained from 6 wells for each treatment. The values are

means of migrating cells/mm² from 6 chambers for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to PBS; †, $P < 0.05$ as compared to bFGF (10 ng/mL); ‡, $P < 0.05$ as compared to 17βE (10⁻⁸ mol/L)..

Figure 5: Effects of 17βE and ER antagonists on PAEC migration

PAEC combine treated with 17βE and Tam, 4-OHT or Ral were added in the higher chamber of the modified Boyden chamber apparatus, and the lower chamber was filled with DMEM, 1% FBS, with bFGF. The values are means of migrating cells/mm² from 6 chambers for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to PBS; †, $P < 0.05$ as compared to bFGF (10 ng/mL); ‡, $P < 0.05$ as compared to 17βE (10⁻⁸ mol/L).

Figure 6: Effects of 17βE and ER antagonists on PAEC p42/44 and p38 MAPK activity

PAEC were rinsed and pretreated 5 minutes with Tam, 4-OHT and Ral and then stimulated with 17βE for 5 minutes for p42/44 MAPK and for 30 minutes for p38 MAPK. Proteins were detected by Western Blot analysis. Image densitometry results are given as relative expression (%) as compared with PBS-treated cells.

Figure 1: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC proliferation

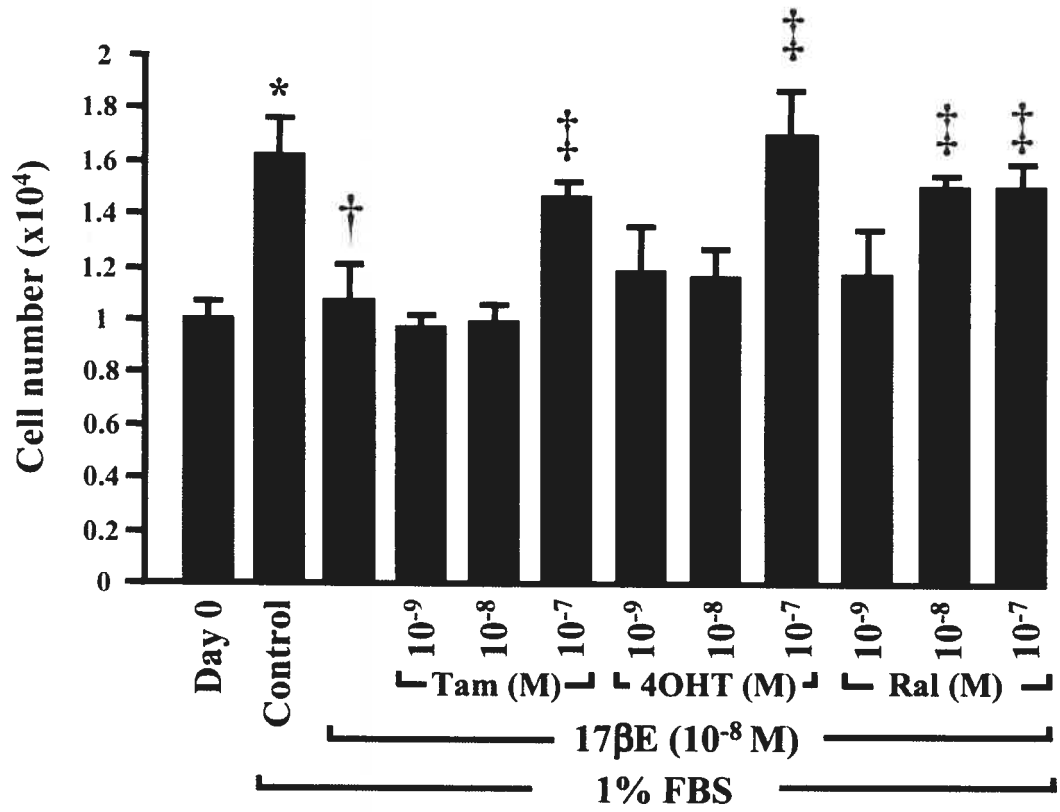


Figure 2: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC migration

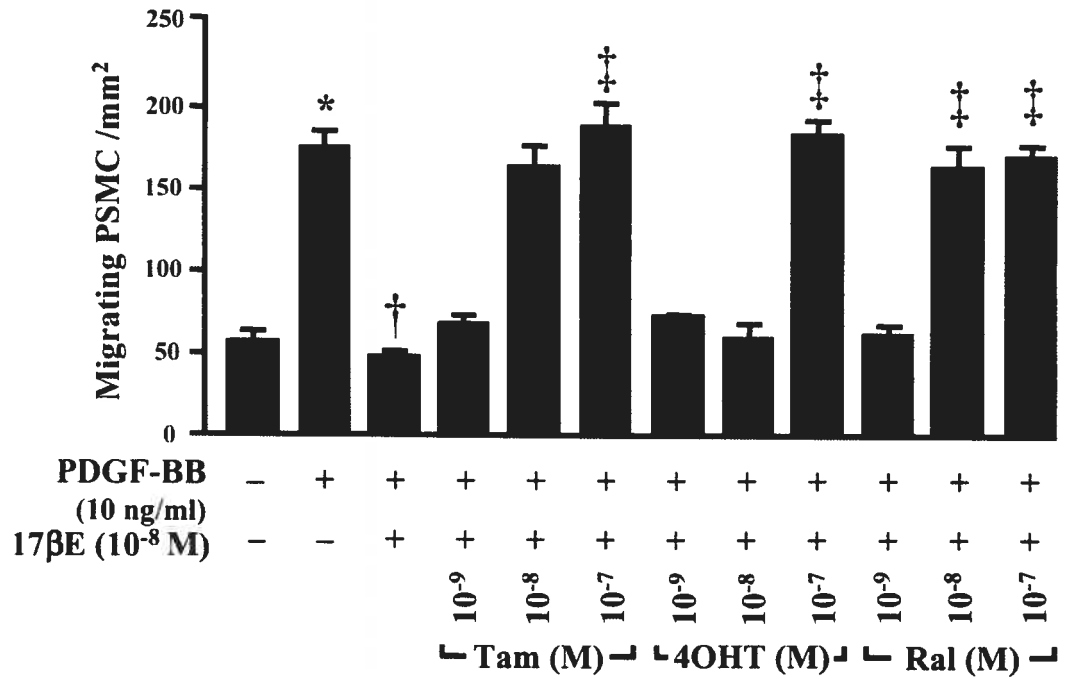


Figure 3: Effects of 17 β E and ER antagonists on PSMC p42/44 and p38 MAPK activity

p-p44 MAPK- p-p42 MAPK-						
Expression (%)	100	702	209	457	598	793
Mean \pm SEM (n=3)		± 89	± 45	± 43	± 57	± 105
p-p38 MAPK-						
Expression (%)	100	235	119	176	180	156
Mean \pm SEM (n=3)		± 29	± 27	± 34	± 31	± 23
PDGF-BB (10ng/ml; 5 min)	-	+	+	+	+	+
17βE (10⁻⁸ M)	-	-	+	+	+	+
Tam (10⁻⁷M)	-	-	-	+	-	-
4OHT (10⁻⁷M)	-	-	-	-	+	-
Ral (10⁻⁷M)	-	-	-	-	-	+

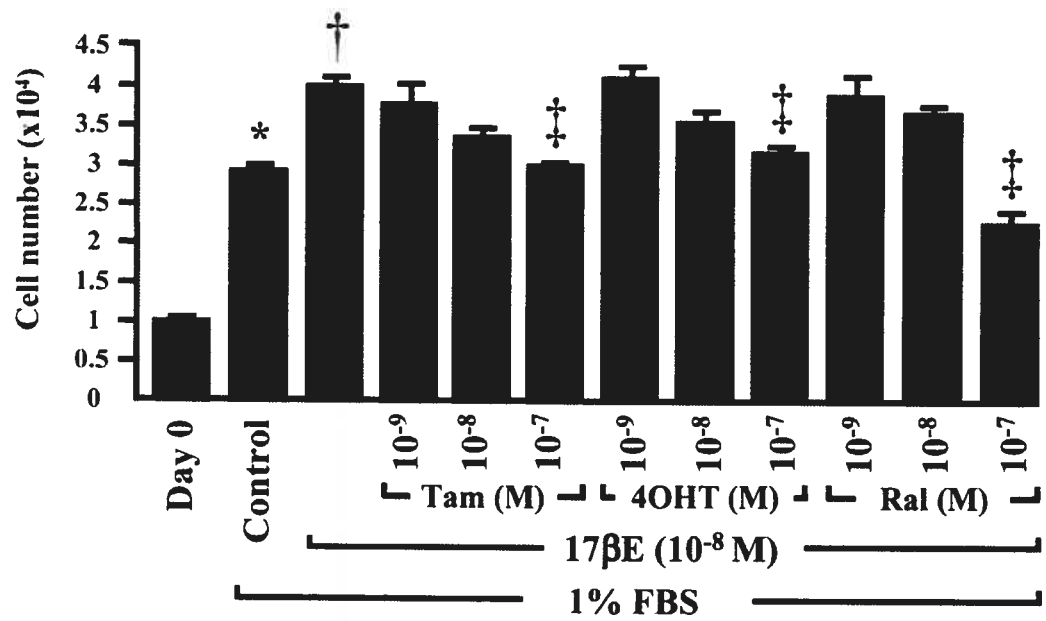
Figure 4: Effects of $17\beta\text{E}$ and ER antagonists on PAEC proliferation

Figure 5: Effects of $17\beta\text{E}$ and ER antagonists on PAEC migration

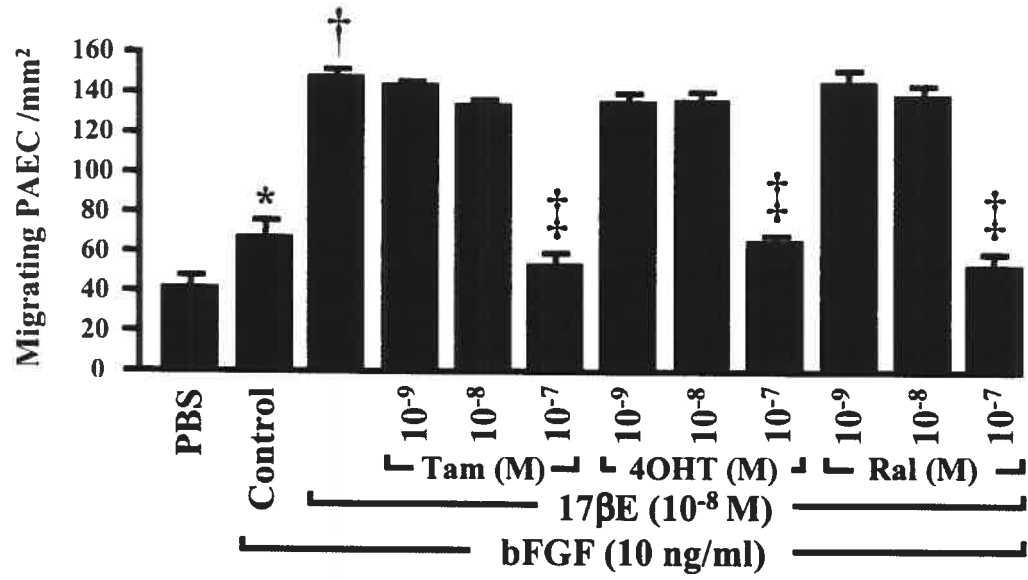














Figure 6: Effects of 17 β E and ER antagonists on PAEC p42/44 and p38 MAPK activity

					
					
p-p44 MAPK- p-p42 MAPK-					
Expression (%)	100	630	437	396	281
Mean \pm SEM (n=3)		± 47	± 58	± 66	± 70
					
p-p38 MAPK-					
Expression (%)	100	208	117	121	102
Mean \pm SEM (n=3)		± 37	± 22	± 11	± 19
17βE (10⁻⁸ M)	-	+	+	+	+
Tam (10⁻⁷M)	-	-	+	-	-
4OHT (10⁻⁷M)	-	-	-	+	-
Ral (10⁻⁷M)	-	-	-	-	+

5 Article #2

Specific Contribution of Estrogen Receptors on MAPK Pathways and Vascular Cell Activation

Pedro Geraldes, Martin G. Sirois, Jean-François Tanguay

Short title: Role of Estrogen Receptors on MAPKs Regulation

Word count of body: 5,391

Word count of abstract: 249

Total number of figures: 7

Subject words: Restenosis - cell signalling/signal transduction – receptor pharmacology – endothelium/vascular type/nitric oxide – smooth muscle proliferation and differentiation

From the Research Center (P.G., M.G.S., J.F.T.), Montreal Heart Institute, and Departments of Medicine (P.G., J.F.T.) and Pharmacology (M.G.S.), University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Dr Jean-François Tanguay, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3375; Fax: (514) 593-2596; E-mail: [REDACTED]

5.1 Abstract

Randomized clinical trials have not provided conclusive data that hormonal replacement therapy confers cardioprotection for coronary artery disease in postmenopausal women. However, other studies have shown that estrogens can induce beneficial effects on the vasculature. Nevertheless, the specific contribution of estrogen receptors α and β (ER α and ER β) on vascular cells is not well characterized. Therefore, we used an antisense gene therapy approach to investigate the contribution of ER α and ER β on p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation and on vascular cell responsiveness. Treatment of porcine smooth muscle cells (PSMC) with platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) induced p38 and p42/44 MAPK activation and their migration and proliferation. These effects were prevented by a pretreatment with 17-beta-estradiol (17 β E). The inhibitory effects of 17 β E on PSMC were abrogated by the downregulation of ER β protein expression with selective ER β mRNA antisense oligomers, whereas the downregulation of ER α had no effect. At the opposite, treatment of porcine aortic endothelial cells (PAEC) with 17 β E promoted p38 and p42/44 MAPK phosphorylation and their migration and proliferation. These effects were ER α -dependent as defined by antisense gene therapy. These results suggest that, in PSMC, 17 β E reduces p42/44 and p38 MAPK activity through ER β stimulation, whereas in contrast, in PAEC, 17 β E induces p42/44 and p38 MAPK through ER α activation. 17 β E may contribute to the vascular healing process and to the prevention of restenosis by improving the reendothelialization through ER α activation and by decreasing SMC migration and proliferation through ER β stimulation.

Keywords: 17-beta-estradiol – estrogen receptors – vascular cells – MAPK

5.2 Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of mortality for postmenopausal women in industrialized countries, accounting for more than 30% of deaths.¹ Epidemiological studies over the past years suggested a protective effect of hormonal replacement therapy (HRT).² Beneficial effects of estrogens were initially attributed to a decreased level of low-density lipoprotein cholesterol and to an increased level of high-density lipoprotein cholesterol. However, the positive effects of estrogens on lipid profile account about for only one-third of the observed reduction on the risk of mortality from CVD among HRT users.³ Other studies demonstrated that estrogens have direct actions on the blood vessel wall.⁴ Physiological concentrations of estrogens can inhibit platelet and monocyte aggregations, stimulate nitric oxide (NO) production and reendothelialization.⁵ Despite beneficial effects of estrogens, randomized double-blind studies reported no overall benefit from HRT.^{6,7} A better understanding of estrogen effects on vascular cells might contribute to optimize the vascular healing process.

Estrogen receptors (ER α and ER β) are members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors.⁸ Estrogen receptors contain DNA and ligand binding domains which are critically involved in regulating vascular structures and functions.⁹ Receptor-ligand interactions trigger a cascade of events including dissociation from heat shock proteins, receptor dimerization, phosphorylation and the association of the hormone activated receptor with specific regulatory elements in target genes.⁹ ER α and ER β are expressed in vascular endothelial (EC) and smooth muscle cells (SMC) and their activation may lead to distinct biological activities even though they share many functional characteristics.¹⁰ In a previous study, Pare et al¹¹ showed in ER α and ER β knockout mice that the protective effects of estrogens to vascular injury are ER α -dependent. However, the exact contribution played by ER β remains to be clarified. Previous experiments showed that ER β -deficient mice exhibit higher vasoconstriction and blood pressure as compared to wild-type mice.¹² However, several limitations exist when using knock-out animal preparation whereas a disruption of a gene may influence the response of estrogens.

Recently, we reported that a local delivery of 17-beta-estradiol (17 β E) following a coronary angioplasty in pigs promoted the vascular healing process by reducing neointimal formation, and by improving the reendothelialization process, and the endothelial NO synthase (eNOS) expression.^{13,14} Classically, ER act as transcriptional factor by regulating the gene expression. However, other specific effects of estrogens may induce nongenomic signalling pathways and may interact with intracellular second messengers such as mitogen-activated protein kinase (MAPK).¹⁵ Under in vitro conditions, we showed that 17 β E prevents SMC proliferation and migration by inhibiting p42/44 and p38 MAPK activation whereas it promotes these events in EC.¹⁶ However, the specific contribution of ER α and ER β on these events remains unknown. We used an antisense gene therapy approach to regulate the protein expression of ER α and ER β and to better understand their specific contribution of each ER. Herein, we report that 17 β E promotes p42/44 and p38 MAPK phosphorylation through ER α stimulation on EC, whereas on SMC the inhibitory effects of 17 β E on p42/44 and p38 MAPK phosphorylation are mediated by ER β activation.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Cell Culture

Porcine aortic endothelial cells (PAEC) and porcine smooth muscle cells (PSMC) were isolated from freshly harvested aortas, cultured and characterized as described previously.¹⁶ PAEC and PSMC were used between passages 3 and 8.

5.3.2 Antisense Oligonucleotide Gene Therapy

To distinguish the role played by ER α and ER β on the migration and proliferation of PSMC and PAEC as well as on the activation of p38 and p42/44 MAPKs, we treated the cells with antisense oligonucleotide sequences complementary to porcine ER α and ER β mRNA (GeneBank accession numbers Z37167 and AF164957, respectively). A total of 4 different antisense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate sequences were used, 2

targeting the porcine ER α mRNA (antisense 1, AS1-ER α : 5'-CTC GTT GGC TTG GAT CTG-3'; antisense 2: AS2-ER α : 5'-GAC GCT TTG GTG TGT AGG-3'), and 2 targeting the porcine ER β mRNA (antisense 1, AS1-ER β : 5'-GTA GGA GAC AGG AGA GTT-3'; antisense 2: AS2-ER β : 5'-GCT AAA GGA GAG AGG TGT-3'). Two scrambled oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate sequences (scrambled ER α , SCR-ER α : 5'-TGT AGC TCG GTT CTG TCG-3'; scrambled ER β , SCR-ER β : 5'-GAG TGG ACG TGA AGA AGT-3') were also used as negative controls. These sequences were selected as they had no more than 3 consecutive guanosines, and with no or minimal capacity to dimerize together and to form hairpins. All sequences were synthesized at the Armand Frappier Institute (Laval, QC, Canada). Upon synthesis, the oligonucleotides were dried, resuspended in sterile water, and quantified by spectrophotometry.

5.3.3 Western Blot Analyses of ER α and ER β Expression, p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation

The efficiency and specificity of our antisense oligomers to prevent the expression of targeted proteins were evaluated by Western blot analyses. Culture medium of confluent PAEC and PSMC (100-mm tissue culture plate) was removed, the cells were rinsed with Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Life Technologies Inc., Carlsbad, CA) and trypsinized (trypsin-EDTA; Life Technologies). Cells were resuspended in DMEM containing 5% of fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and antibiotics (penicillin and streptomycin, Sigma, St-Louis, MO), and a cell count was obtained with a Coulter counter Z1 (Coulter Electronics, Luton, UK). Cells were seeded at 1×10^6 cells/100-mm tissue culture plate (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ), stimulated for 24 hours in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} mol/L). LipofectAmine (5 μ g/mL, Life Technology Inc.) was used to improve the cellular uptake of antisense oligomers in PSMC. Go synchronization was achieved by starving the cells for 48 hours in DMEM, 0.1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} mol/L) added daily. The cells were then grown to confluence for 16 or 72 hours in DMEM, 1% FBS, and antibiotics with or without antisense

oligomers (10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} mol/L) added daily and starved for 7 hours in DMEM, 0.1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-7} , 5×10^{-7} , 10^{-6} mol/L) to induce an upregulation of the estrogen receptor expression. Culture media was removed, and the cells were rinsed. PSMC and PAEC were then stimulated with or without $17\beta\text{E}$ as previously described.¹⁶ Briefly, PSMC were incubated on ice in DMEM with or without $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) for 30 minutes and incubated at 37°C for 30 minutes. Cells were then rinsed, incubated in DMEM with PDGF-BB (10 ng/mL) for 30 minutes on ice, incubated at 37°C for 5 or 30 minutes. PAEC were incubated on ice in DMEM with or without $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) for 30 minutes, then incubated at 37°C for 5 or 30 minutes. Total proteins were isolated by the addition of 500 μL of lysis buffer containing leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma), phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mmol/L (Sigma), aprotinin 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma), and NaVO_3 1 mmol/L (Sigma). Plates were incubated at 4°C for 30 minutes and scraped, and the protein concentration was determined with a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins (100 μg) were separated by a 10% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Protean II kit; Bio-Rad), and transblotted onto a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp., Bedford, MA). The membranes were blocked in 5% Blotto-TTBS (5% nonfat dry milk (Bio-Rad), 0.05% Tween 20, 0.15 mol/L NaCl, 25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4) for 1 hour at room temperature with gentle agitation and incubated overnight in 0.5% Blotto-TTBS containing the desired antibody (rabbit polyclonal anti-human-ER α or anti-human-ER β ; 1:5 000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; or rabbit polyclonal anti-phospho-p42/44 MAPK; 1:10 000 dilution, or anti-phospho-p38 MAPK; 1:5 000 dilution, New England BioLabs, Beverly, MA). Membranes were washed 3 times with TTBS, and incubated with a horseradish peroxidase goat anti-rabbit IgG antibody (1:10 000 dilution, Santa Cruz Biotechnology) in 0.5% Blotto-TTBS for 30 minutes. Membranes were washed with TTBS, and horseradish peroxidase bound to secondary antibody was revealed by chemiluminescence (Renaissance kit, NEN Life Science Products, Boston, MA). Kaleidoscope molecular weight and SDS-PAGE broad range marker proteins (Bio-Rad) were used as standards. Membranes were stripped with Re-Blot Plus (Chemicon International Inc, Temecula, CA) and total p42/44 and p38 MAPK expression were

performed using the desired antibody (rabbit polyclonal anti-p42/44 MAPK; 1:5 000 dilution, or anti-p38 MAPK; 1:5 000 dilution, New England BioLabs). Digital image densitometry (PDI Bioscience, Aurora, ON) was performed to determine the relative expression of ER α and ER β proteins. Western blot analyses were performed in triplicate and results of image densitometry are representative of these experiments.

5.3.4 Mitogenic Assay

Confluent PAEC and PSMC were rinsed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in 10 mL of DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained by using a Coulter counter Z1. PAEC and PSMC were initially seeded at 1×10^4 cells/well of 24-well tissue culture plates stimulated for 24 hours in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-6} mol/L), and starved for 48 hours in DMEM, 0.1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-6} mol/L daily) for Go synchronization. The cells were stimulated for 72 hours in DMEM, 1% FBS, antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-6} mol/L daily) and with or without of 17 β E (10^{-8} mol/L). After trypsinization, cell number was determined by using a Coulter counter Z1.

5.3.5 Chemotactic Assay

Cell migration was evaluated using a modified Boyden 48-well microchamber kit (NeuroProbe, Cabin John, MD). Near confluent PAEC and PSMC were rinsed with DMEM and trypsinized. Cells were resuspended in DMEM, 5% FBS, and antibiotics, and a cell count was obtained. PAEC and PSMC were seeded at 2.5×10^5 cells/well of 6-well tissue culture plates; stimulated for 24 hours in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-6} mol/L) and starved for 48 hours in DMEM, 0.1% FBS, and antibiotics with or without antisense oligomers (10^{-6} mol/L daily) with or without 17 β E (10^{-8} mol/L). Cells were harvested by trypsinization and resuspended in DMEM, 1% FBS, and antibiotics at a concentration of 2.5×10^4 cells/mL. Fifty μ L of this cell suspension with or without antisense oligomers (10^{-6} mol/L) treated with or without 17 β E (10^{-8} mol/L) was added in the higher chamber of the modified Boyden chamber apparatus, and the lower

chamber was filled with DMEM, 1% FBS, antibiotics plus the desired concentration of agonist either $17\beta\text{E}$ (10^{-8} mol/L) or platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). The 2 sections of the system were separated by a porous polycarbonate filter (5- μm pores size), pretreated with a gelatine solution (1.5 mg/mL), and assembled. Five hours postincubation at 37°C , the nonmigrated cells were scraped with a plastic policeman, and the migrated cells were stained using a Quick-Diff solution (Shandon Inc, Pittsburgh, PA). The filter was then mounted on a glass slide, and migrated cells were counted using a microscope adapted to a video camera to obtain a computer-digitized image. Because of slight variation of basal cell migration between experiments, data were reported as relative mean migrating cells compared to baseline.

5.3.6 Statistical Analysis

Data are mean \pm SEM. Statistical comparisons were determined by ANOVA followed by an unpaired Student's *t* test with Bonferroni's correction for multiple comparisons. A *P* value <0.05 was considered as significant.

5.4 Results

5.4.1 Modulation of ER α and ER β Protein Expression by Antisense Oligonucleotide Gene Therapy

In order to evaluate the potency of antisense oligonucleotides to prevent the expression of targeted proteins, PSMC and PAEC were treated either with antisense or scrambled oligomers (as described in materials and methods) after 72 hours of stimulation with 1% FBS, and the expression of each receptor determined by Western blot analyses. In PSMC, we observed a basal ER α protein expression (Ctrl) which was inhibited by a treatment with antisense oligomers (10^{-6} mol/L) targeting porcine ER α mRNA. The antisense oligomers AS1-ER α and AS2-ER α suppressed ER α protein expression by 88 and 89% in PSMC, respectively (Figure 1A). Similar treatment with antisense oligomers (AS1-

ER β and AS2-ER β ; 10^{-6} mol/L) directed against ER β mRNA reduced also the basal ER β protein expression in PSMC by 84 and 92%, respectively (Figure 1A). The same series of experiments was conducted in PAEC. The antisense oligomers AS1-ER α and AS2-ER α (10^{-6} mol/L) suppressed PAEC ER α protein expression by 94 and 95%, respectively (Figure 1C) and AS1-ER β and AS2-ER β (10^{-6} mol/L) downregulated ER β protein expression by 90 and 97%, respectively (Figure 1C). Treatment with scrambled oligomers (SCR-ER α and SCR-ER β ; 10^{-6} mol/L) had no significant effect on basal ER α and ER β protein expression (Figures 1A and 1C). We also performed a new set of experiments in which we show that a treatment with PDGF-BB (for 5 hours) is not altering the protein expression of ER α and ER β . (data not shown).

To ensure that the antisense oligomers designed to downregulate the expression of ER α would not affect ER β expression and *vice versa*, we performed additional Western blot analyses to evaluate the specificity of our antisense oligomers. Treatment with antisense oligomers targeting ER α mRNA (10^{-6} mol/L) did not affect ER β basal protein expression while the antisense oligomers directed against ER β mRNA (10^{-6} mol/L) did not alter the basal protein expression of ER α on PSMC and PAEC (Figure 1B and 1D).

5.4.2 Contribution of ER α and ER β on PSMC Proliferation

As the expressions of ER α and ER β were specifically blocked by antisense oligomers, we investigated the contribution of both receptors on PSMC proliferation. Stimulation of quiescent PSMC with DMEM 1% FBS for 72 hours increased PSMC proliferation by 88% from 5432 ± 680 cells/well to 10216 ± 546 cells/well (Figure 2). Treatment with 17 β E (10^{-8} mol/L) prevented by 95% the PSMC proliferation mediated by FBS 1%. Treatment of PSMC with AS1-ER β and AS2-ER β prevented the inhibitory effects of 17 β E on PSMC proliferation ($P < 0.05$), while the antisense oligomers directed against ER α mRNA did not influence 17 β E activity (Figure 2). Treatment with scrambled oligomers did not affect the inhibitory activity of 17 β E on PSMC proliferation (Figure 2).

5.4.3 Anti-Chemotactic Effect of 17 β E on PSMC: Role of ER α and ER β

By using a modified Boyden chamber assay, we observed that a treatment with PDGF-BB (10 ng/mL) for 5 hours increased the basal migration of PSMC by 141% as compared to cells treated with FBS 1% (Figure 3). Treatment with 17 β E (10^{-8} mol/L) inhibited completely the chemotactic effect of PDGF-BB (10 ng/mL) (Figure 3). In order to evaluate the contribution of each ER subtype on 17 β E anti-chemotactic effect on PSMC, the cells were treated with antisense oligomers targeting either ER α or ER β mRNA. Treatment with antisense against ER α mRNA (10^{-6} mol/L) did not alter the effect of 17 β E on PSMC migration induced by PDGF-BB. However, a treatment with AS1-ER β and AS2-ER β directed against ER β mRNA abolished the anti-chemotactic effect of 17 β E on PSMC ($P<0.05$). Treatment with scrambled oligomers did not influence the 17 β E anti-chemotactic activity on PSMC (Figure 3).

5.4.4 Role of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation in PSMC

As 17 β E can influence p42/44 and p38 MAPK phosphorylation in PSMC, we evaluated the specific contribution of ER α and ER β in this regard. Treatment of PSMC with PDGF-BB increased p42/44 (Figure 4A) and p38 MAPK phosphorylation (Figure 4B) which was reversed by a 30-minute pretreatment with 17 β E (10^{-8} mol/L). Treatment of PSMC with antisense oligomers targeting ER α mRNA did not affect the inhibitory effect of 17 β E at preventing p42/44 and p38 MAPK phosphorylation induced by PDGF-BB. In contrast, a treatment with antisense oligomers directed against ER β mRNA blocked significantly the effects of 17 β E on p42/44 and p38 MAPK phosphorylation ($P<0.05$) (Figures 4A and 4B). In the same series of experiments, scrambled oligomers did not alter 17 β E activity on these MAPKs (Figures 4A and 4B).

5.4.5 Contribution of ER α and ER β on PAEC Proliferation

Stimulation of PAEC with DMEM 1% FBS increased their proliferation by 83% from 7427 ± 423 to 13566 ± 1931 cells/well within 3 days. The addition of 17 β E (10^{-8} mol/L) enhanced the proliferation of PAEC by 123% as compared to the cells treated with FBS 1% (Figure 5). To investigate the selective contribution of ER α and ER β on the positive mitogenic effect of 17 β E on endothelial cells, PAEC were treated with antisense oligomers targeting ER α or ER β mRNA. AS1-ER α and AS2-ER α reduced significantly the mitogenic effects of 17 β E by 80 and 100%, respectively ($P < 0.05$). Treatment with antisense oligomers directed against ER β mRNA failed to alter the mitogenic activity of 17 β E on PAEC. Again, PAEC proliferation induced by 17 β E was not influenced by treatments with scrambled antisense oligomers (Figure 5).

5.4.6 Anti-Chemotactic Effects of 17 β E on PAEC: Role of ER α and ER β mRNA

Treatment of PAEC with 17 β E (10^{-8} mol/L) for 5 hours promoted their migration by 363% as compared to cells treated with FBS 1% ($P < 0.05$) (Figure 6). Treatment with antisense oligomers (10^{-6} mol/L) directed against ER α mRNA prevented the chemotactic activity of 17 β E (10^{-8} mol/L) on PAEC by 75 and 76%, respectively ($P < 0.05$) (Figure 6), whereas the inhibition of ER β protein expression did not prevent the 17 β E activity on PAEC (Figure 6). Treatment with scrambled oligomers did not alter the chemotactic activity of 17 β E (Figure 6).

5.4.7 Role of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK Phosphorylation in PAEC

We have previously demonstrated that 17 β E induces a marked increase of p42/44 and p38 MAPK phosphorylation in PAEC. In order to determine the contribution of ER α and ER β on these intracellular mechanisms, PAEC were treated with antisense oligomers targeting ER α or ER β mRNA. PBS-treated PAEC showed a basal phosphorylation of p42/44 (Figure 7A) and p38 MAPK (Figure 7B). Stimulation with 17 β E (10^{-8} mol/L) for 5 minutes increased p42/44 MAPK phosphorylation by 317%, and 30 minutes stimulation with 17 β E increased p38 MAPK phosphorylation by 254%. Treatment of PAEC with AS1-ER α and AS2-ER α prevented p42/44 and p38 MAPK phosphorylation induced by 17 β E (Figures 7A and 7B). In contrast, treatment with antisense oligomers targeting ER β mRNA did not reduce significantly p42/44 and p38 MAPK phosphorylation mediated by 17 β E. Treatment with scrambled oligomers did not influence 17 β E activity on p42/44 and p38 MAPK phosphorylation (Figures 7A and 7B).

5.5 Discussion

Previous studies have demonstrated that the disruption of ER α in mice reduces the cardioprotective effects of estrogens on restenosis.¹¹ However, other investigators have indicated that ER β , the major ER expressed within the vasculature, might contribute to the beneficial effects of estrogens.¹⁷ Previously, we demonstrated that a local delivery of 17 β E upon a porcine coronary angioplasty reduces restenosis by improving the reendothelialization process, the eNOS expression and the vascular healing.^{13,14} In addition, we showed under *in vitro* conditions that the beneficial effects of 17 β E on restenosis may be explained by a reduction of PSMC p38 and p42/44 MAPK phosphorylation, migration and proliferation combined to a positive effect of these mechanisms in PAEC.¹⁶ To the best of our knowledge, the specific contribution of each ER (ER α and ER β) on MAPK phosphorylation and vascular cell migration and proliferation remained unknown. In the current study, we demonstrated that these effects

of 17 β E on PAEC are mediated through ER α activation whereas, in PSMC, 17 β E activities are mediated through ER β stimulation.

5.5.1 Regulation of ER α and ER β Protein Expression by Antisense Gene Therapy

We used an antisense gene therapy approach to prevent selectively the protein expression of ER α or ER β which allowed us to evaluate separately the contribution of ER α and ER β on intracellular pathways in native endothelial and smooth muscle cells. Other investigators have used antisense gene therapy to decrease brain estrogen receptors.¹⁸ In their experiments, the intraventricular infusion of antisense decreased ER protein expression by 65% at 6 hours post-infusion. In our study, we observed that a treatment of PSMC or PAEC with selective antisense oligomers (10^{-6} mol/L) for 4 days decreased ER α and ER β protein expression up to 97% (Figure 1). ER α and ER β can form homo and heterodimers in living cells.¹⁹ By down regulating ER α or ER β , we observed that 17 β E can still induce selective effects on vascular cells suggesting that the heterodimerization is not necessarily required in the biological activities studied.

5.5.2 Biological Activities of 17 β E Are Mediated Through ER β in PSMC

Usually activated by growth factors and cytokines, SMC proliferation and migration remain an important target to prevent in-stent restenosis. Many studies have indicated that estrogens prevent restenosis formation by inhibiting SMC proliferation and migration after balloon injury. We have previously demonstrated that local delivery of 17 β E prevents restenosis upon an angioplasty.¹³ In the current study, we observed that a treatment with 17 β E (10^{-8} mol/L) inhibits PSMC migration and proliferation induced by PDGF-BB. In addition, the downregulation of ER β protein expression reduced the inhibitory effects of 17 β E on PSMC proliferation and migration. Our results support other studies suggesting

that gene knockout of ER β leads to hyperproliferative disease.²⁰ Recently, we have reported that a treatment of PSMC with 17 β E reduces p42/44 and p38 MAPK phosphorylation induced by PDGF-BB.¹⁶ To further evaluate the contribution of ER α and ER β on PSMC, we demonstrated that a treatment with antisense oligomers targeting ER β mRNA abrogated the inhibitory effects of 17 β E on p42/44 and p38 MAPK phosphorylation mediated by PDGF-BB. These results support previous observations that ER β may be responsible for an abnormal vascular contraction, ion channel dysfunction and hypertension in mice deficient in ER β .¹² Lindner and co-workers have also demonstrated that ER β mRNA expression is induced after vascular injury, supporting a direct contribution of this receptor in the vascular effects of estrogen.²¹ In contrast to ER β , the absence of ER α protein expression did not influence the inhibitory effects of 17 β E on p42/44 and p38 MAPK phosphorylation in PSMC.

5.5.3 ER α Activation by 17 β E Induces MAPK Phosphorylation in PAEC

Various conditions such as hypercholesterolemia, hypertension, inflammation, and estrogen deficiency have been associated with endothelial dysfunction.⁴ The vessel wall impairment may contribute to the development of atherosclerosis and CVD. Several animal and *in vitro* studies have shown that estrogens improve endothelial function. We have demonstrated that local delivery of 17 β E improves vascular healing and reendothelialization by promoting endothelial cell proliferation, migration and eNOS expression. However, the respective contribution of ER α and ER β to these effects of 17 β E has not been specifically evaluated. In the current study, we showed that the beneficial effects of 17 β E on PAEC migration and proliferation are mediated through ER α stimulation. Our results are in agreement with the study of Brouchet et al,²² who observed that ER α is required for estrogen-accelerated reendothelialization in an electric injury model. Estrogens can also interact with MAPK pathway²³ and we have previously

demonstrated that 17 β E induced significantly p42/44 and p38 MAPK activation on EC.¹⁶ In the present paper, we showed that the inhibition of ER α protein expression reduces p42/44 and p38 MAPK phosphorylation induced by 17 β E. These results support previous work demonstrating a strong relationship between ER α activation by estrogens and MAPK activity in breast cancer cells.²⁴ Furthermore, our results confirm that the principal action of estrogen on endothelial cells are not mediated through ER β . Ihionkhan and co-workers have postulated that estrogens upregulate ER α expression in endothelial cells supporting an important role for ER α in the biological effects of 17 β E on the endothelium.²⁵

In conclusion, the properties of 17 β E to promote p38 and p42/44 MAPK activation, migration and proliferation of PAEC are directly mediated through ER α stimulation. In contrast, 17 β E inhibits these same events in PSMC which are mediated through ER β activation. Our results suggest that in different vascular cell types but on the same mechanisms, effects of 17 β E are not mediated through the same ER which may explain the distinct biological activity of estrogens. This study is providing new insights to our understanding on the specific contribution of estrogens on the vascular healing process.

5.6 Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-43919) and from the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr. Sirois, and from the “Fonds de la recherche en santé du Québec” to Dr. Tanguay. Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research, and Dr. Tanguay is a scholar for the “Fonds de la recherche en santé du Québec”.

5.7 References

1. Mosca L, Manson JE, Sutherland SE, Langer RD, Manolio T, Barrett-Connor E. Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation*. 1997;96:2468-2482.

2. Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health*. 1998;19:55-72.
3. Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation*. 1987;75:1102-1109.
4. Koh KK. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2002;55:714-726.
5. Haynes MP, Li L, Russell KS, Bender JR. Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:99-108.
6. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*. 1998;280:605-613.
7. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288:321-333.
8. Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002;80:369-381.
9. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801-1811.
10. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V. Cloning chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*. 1997;11:353-365.
11. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*. 2002;90:1087-1092.
12. Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgin J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science*. 2002;295:505-508.

13. Chandrasekar B, Tanguay JF. Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1972-1978.
14. Chandrasekar B, Nattel S, Tanguay JF. Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1570-1576.
15. Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB. Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J Biol Chem.* 2002;277:22558-22565.
16. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1585-1590.
17. Arnal JF, Bayard F. Alteration in endothelial estrogen receptor expression: a potential key of vasculoprotection by estrogens? *Circ Res.* 2002;91:759-760.
18. Inamdar SR, Eyster KM, Schlenker EH. Estrogen receptor-alpha antisense decreases brain estrogen receptor levels and affects ventilation in male and female rats. *J Appl Physiol.* 2001;91:1886-1892.
19. Bai Y, Giguere V. Isoform-Selective Interactions between Estrogen Receptors and Steroid Receptor Coactivators Promoted by Estradiol and ErbB-2 Signaling in Living Cells. *Mol Endocrinol.* 2003;17:589-599.
20. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr., Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem.* 2002;277:24353-24360.
21. Lindner V, Kim SK, Karas RH, Kuiper GG, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res.* 1998;83:224-229.
22. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation.* 2001;103:423-428.

23. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*. 2002;67:471-475.
24. Zhang Z, Maier B, Santen RJ, Song RX. Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;294:926-933.
25. Ihionkhan CE, Chambliss KL, Gibson LL, Hahner LD, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res*. 2002;91:814-820.

5.8 Figure Legends

Figure 1: Antisense regulation of ER α and ER β expression on PSMC and PAEC:

PSMC and PAEC were seeded at 1×10^6 cells/100-mm culture plate and grown to confluence. Cells were treated with PBS (Control) or either with antisense or scrambled oligomers as described in the methods. In PSMC and PAEC, treatment with antisense oligomers against ER α and ER β mRNA decreased ER α (66 kDa) and ER β (54 kDa) protein expression, respectively (Figure 1A and 1C). These effects were specific as the antisense oligomers against ER α did not alter ER β protein expression and vice-versa (Figure 1B and 1D). Image densitometry results are given as relative expression (%) as compared to control PBS-treated cells.

Figure 2: Contribution of ER α and ER β on PSMC proliferation:

PSMC were seeded at 1×10^4 cells/well and stimulated with or without antisense oligomers as described in the methods. Cells were then stimulated with or without 17 β E (10^{-8} mol/L) and a cell count achieved 72 hours post-treatment. The values are means of cell counts obtained from 6 wells for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to day 0; †, $P < 0.05$ as compared to control (1% FBS); ‡, $P < 0.05$ as compared to cells treated with 17 β E (10^{-8} mol/L).

Figure 3: Contribution of ER α and ER β on PSMC migration:

PSMC were trypsinized and resuspended in DMEM; 2.5×10^5 cells/well of a six-well tissue culture plate were stimulated with or without antisense oligomers as described in the methods. 2.5×10^4 cells were added in the higher compartment of the modified Boyden chamber apparatus with or without antisense oligomers, and the lower chamber was filled with DMEM 1% FBS, and antibiotics with or without PDGF-BB (10 ng/ml). Five hours postincubation at 37°C, the migrated cells were fixed, stained and counted by using a microscope adapted to a digitized video camera. The values are represented as relative mean of migrating cells from 6 chambers for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared unstimulated cells; †, $P < 0.05$ as compared to cells treated with PDGF-BB; ‡, $P < 0.05$ as compared to cells treated with 17 β E (10^{-8} mol/L).

Figure 4: Contribution of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK activation in PSMC:

PSMC were seeded at 1×10^6 cells/100-mm culture plate and grown to confluence. Cells were treated either with antisense or scrambled oligomers as described in the methods. Cells were then treated with or without 17 β E (10^{-8} mol/L) for 30 minutes and stimulated 5 minutes for p42/44 MAPK (A) or 30 minutes for p38 MAPK (B) with PDGF-BB. Proteins were detected by Western blot analyses. Image densitometry results are given as relative expression (%) as compared to control PBS-treated cells.

Figure 5: Contribution of ER α and ER β on PAEC proliferation:

PAEC were seeded at 1×10^4 cells/well and stimulated with or without antisense oligomers as described in the methods. Cells were then stimulated with or without 17 β E (10^{-8} mol/L) and a cell count achieved 72 hours post-treatment. The values are means of cell counts obtained from 6 wells for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to day 0; †, $P < 0.05$ as compared to control (1% FBS); ‡, $P < 0.05$ as compared to cells treated with 17 β E (10^{-8} mol/L).

Figure 6: Contribution of ER α and ER β on PAEC migration:

PAEC were trypsinized and resuspended in DMEM; 2.5×10^5 cells/well of a six-well tissue culture plate were stimulated with or without antisense oligomers as described in the methods. 2.5×10^4 cells were added in the higher compartment of the modified Boyden chamber apparatus with or without antisense oligomers, and the lower chamber was filled with DMEM 1% FBS, and antibiotics with or without 17 β E (10^{-8} mol/L). Five hours postincubation at 37°C, the migrated cells were fixed, stained and counted by using a microscope adapted to a digitized video camera. The values are represented as relative mean of migrating cells/mm² from 6 chambers for each treatment. *, $P < 0.05$ as compared to unstimulated cells; †, $P < 0.05$ as compared to cells treated with 17 β E (10^{-8} mol/L).

Figure 7: Contribution of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK activation in PAEC:

PAEC were seeded at 1×10^6 cells/100-mm culture plate and grown to confluence. Cells were treated either with antisense or scrambled oligomers as described in the methods. Cells were then treated with or without 17 β E (10^{-8} mol/L) for 5 minutes for p42/44 MAPK activation (A) or 30 minutes for p38 MAPK stimulation (B). Proteins were detected by Western blot analyses. Image densitometry results are given as relative expression (%) as compared to control PBS-treated cells.

Figure 1: Antisense regulation of ER α and ER β expression on PSMC and PAEC

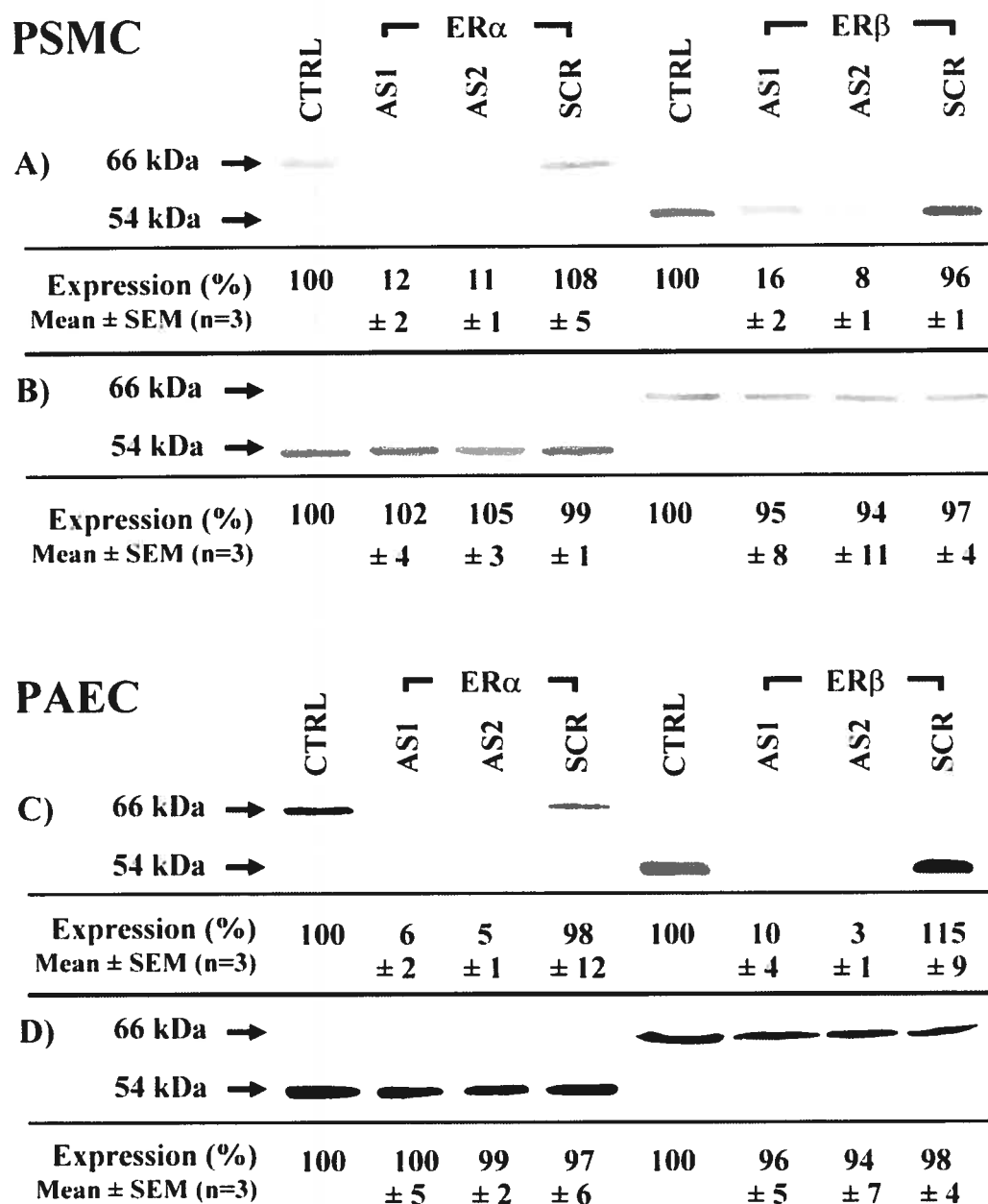


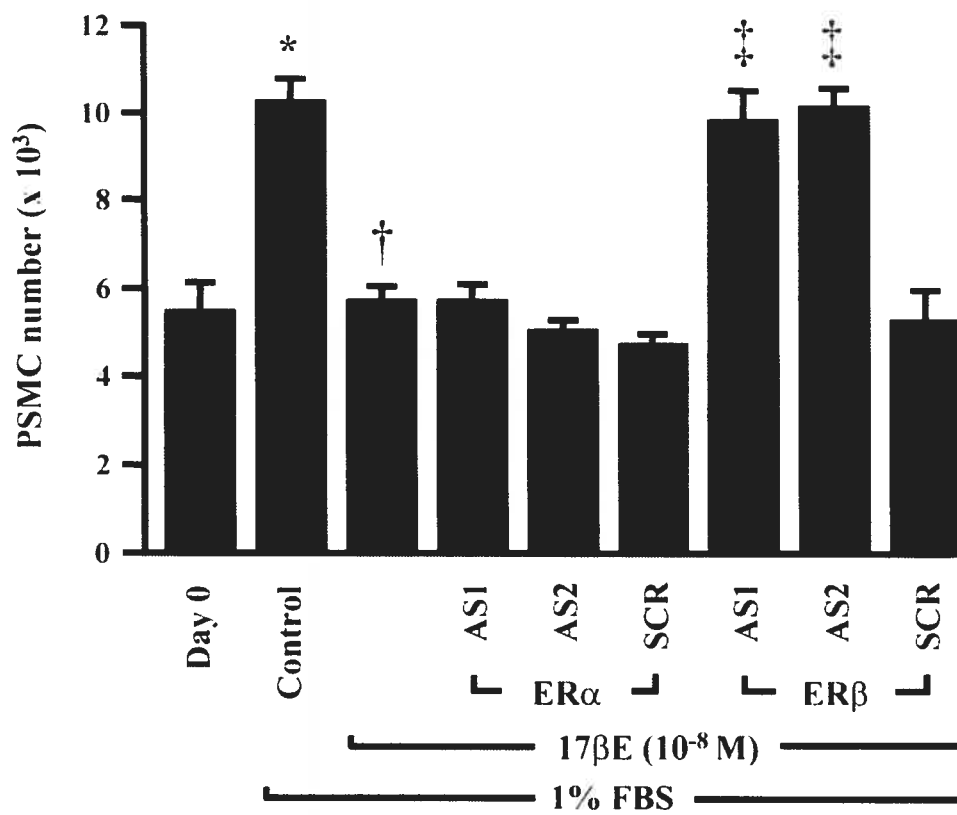
Figure 2: Contribution of ER α and ER β on PSMC proliferation

Figure 3: Contribution of ER α and ER β on PSMC migration

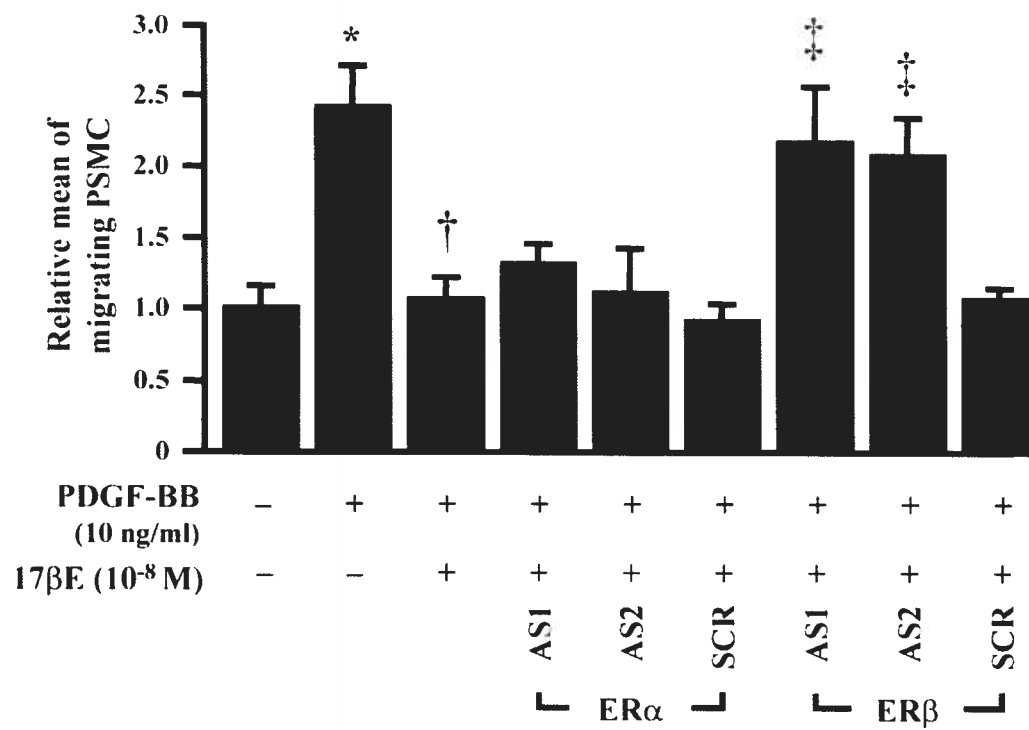


Figure 4: Contribution of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK activation in PSMC

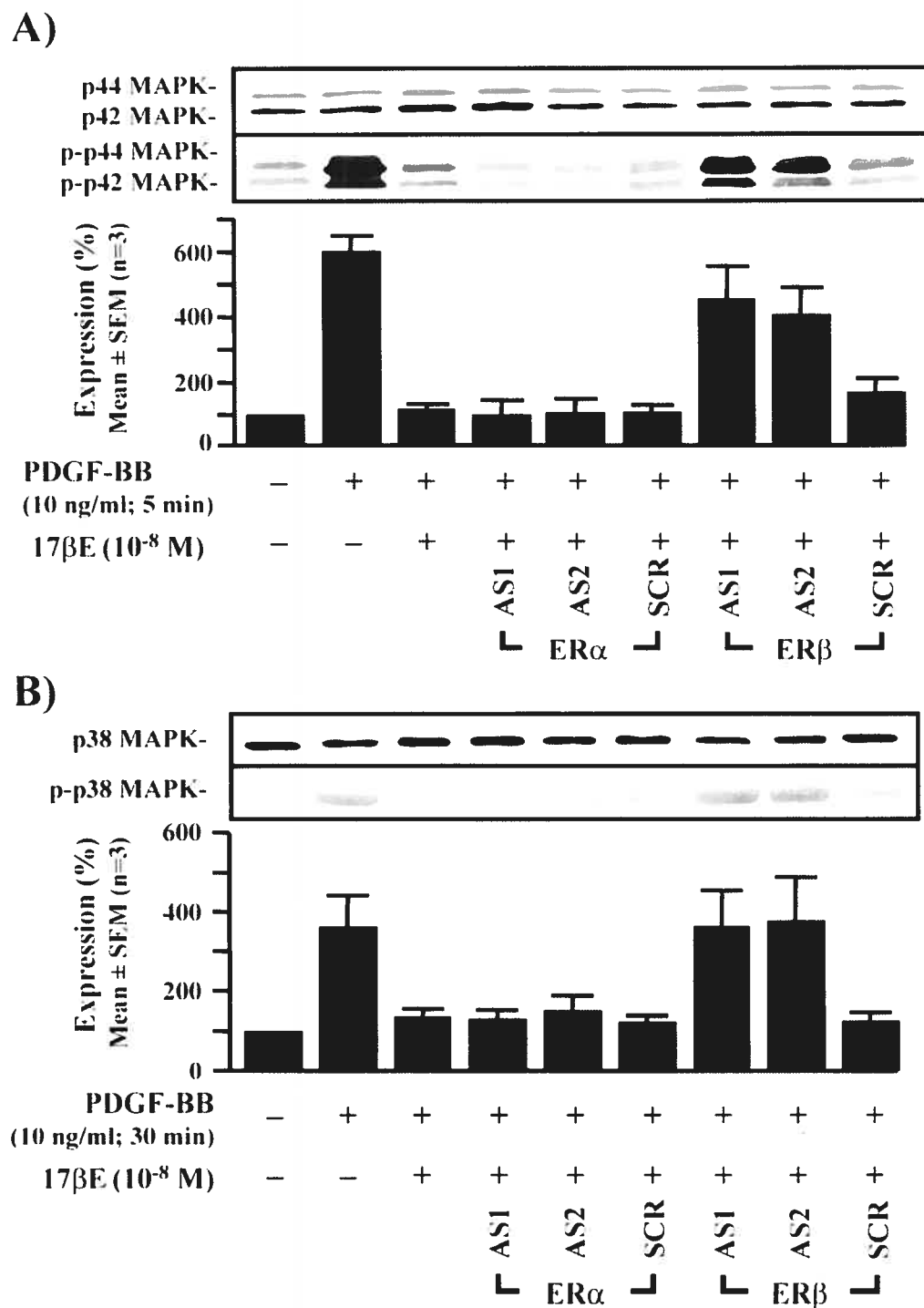


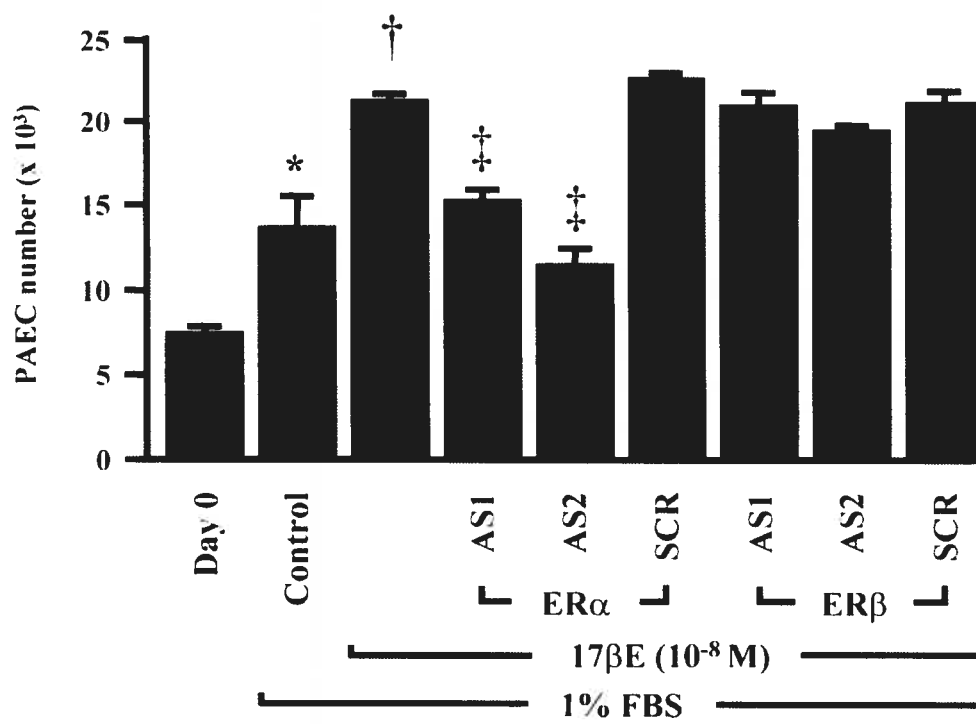
Figure 5: Contribution of ER α and ER β on PAEC proliferation

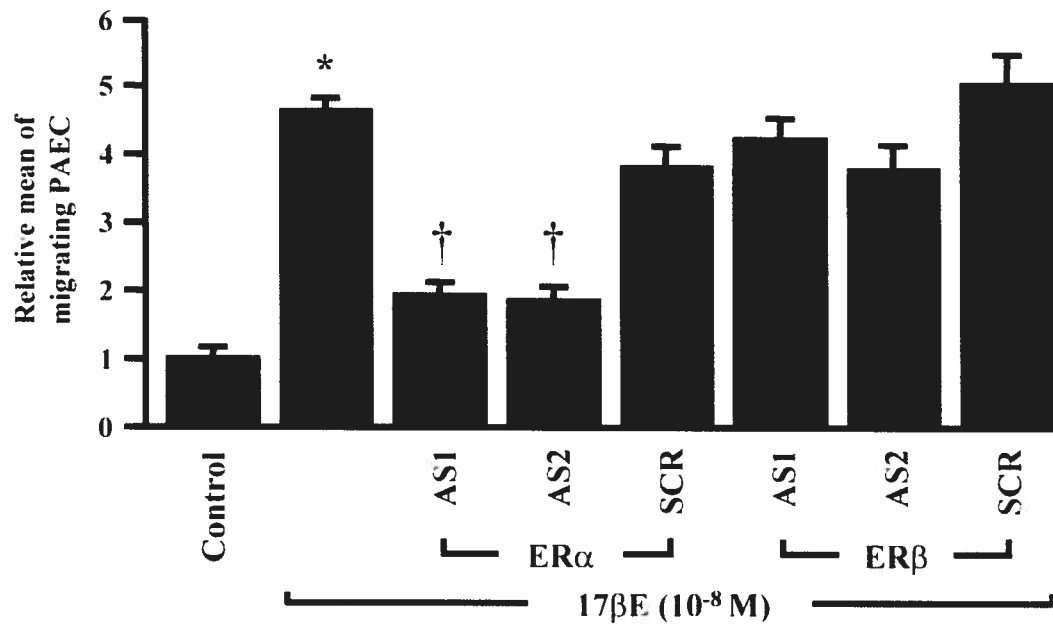
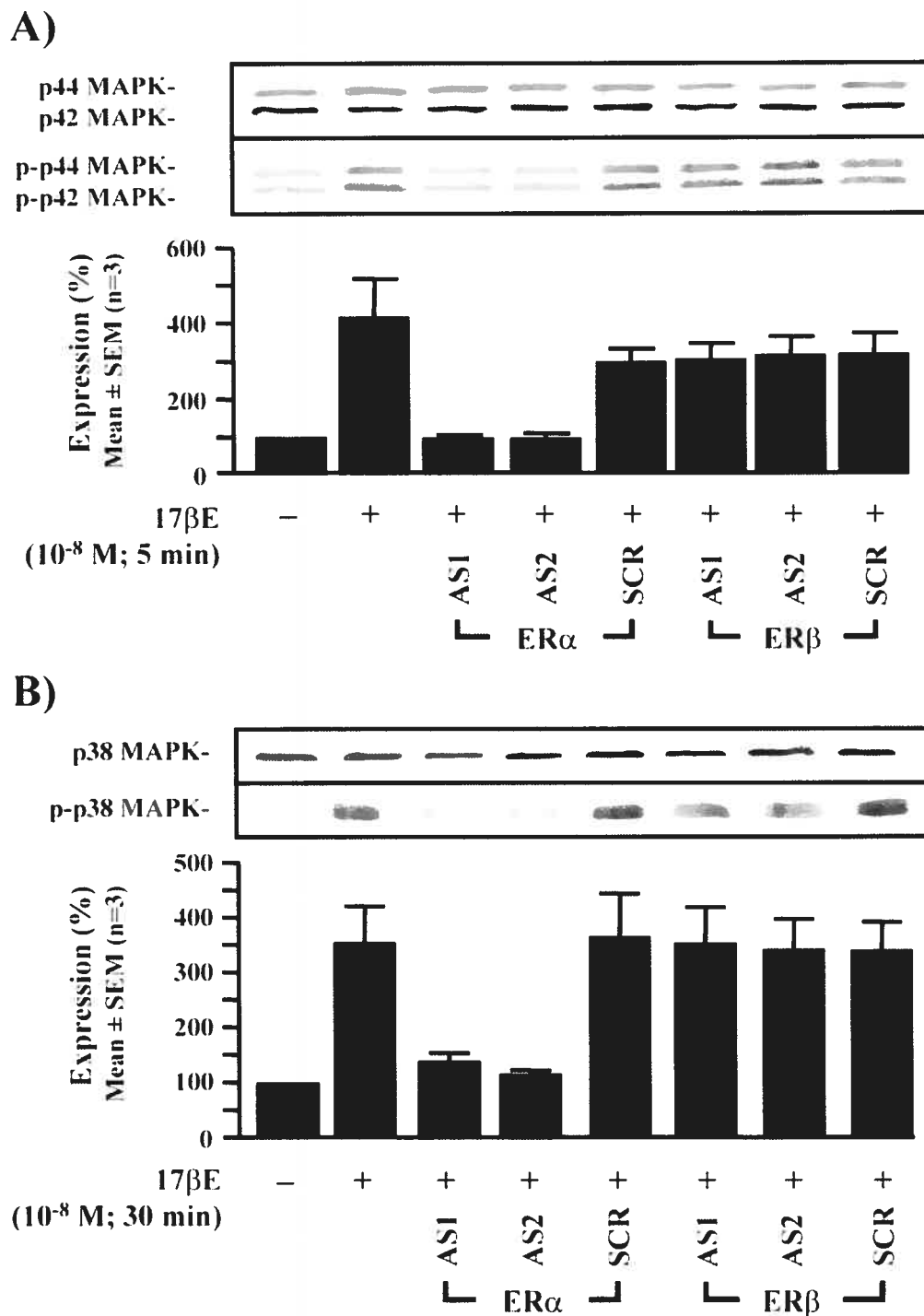
Figure 6: Contribution of ER α and ER β on PAEC migration

Figure 7: Contribution of ER α and ER β on p42/44 and p38 MAPK activation in PAEC



6 Article #3

Estradiol Blocks the Induction of CD40 and CD40L Expression on Endothelial Cells and Prevents Neutrophil Adhesion: an ER α -Mediated Pathway


Pedro Geraldes, Stéphanie Gagnon, Sofiane Hadjadj, Yahye Merhi, Martin G. Sirois, Isabelle Cloutier, Jean-François Tanguay

Short title: CD40/CD40L expression, neutrophil adhesion and ER α

Word count: 5,757

Abstract: 184

Figures: 6

From the Research Center of Montreal Heart Institute (P.G., S.G., S.H., Y.M., M.G.S., I.C., J-F.T.); Department of Medicine of Montreal Heart Institute (P.G., S.G., Y.M., J-F.T.); and the Department of Pharmacology (M.G.S.), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. Correspondence to Dr. Jean-François Tanguay, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3250; Fax: (514) 593-2596; E-mail: 

6.1 Abstract

Objective: Interferon gamma (IFN- γ) was shown to induce CD40 and CD40L expression on endothelial cells (ECs) and consequently to promote neutrophil adhesion. The pro- and anti-inflammatory effects of estrogens are well recognized but their role on the regulation of CD40 and CD40L expression on ECs remains undefined.

Methods and results: Treatment of porcine aortic endothelial cells (PAEC) with IFN- γ for 24 hours enhanced CD40 and CD40L expression by 97% and 78%, respectively. Pretreatment of PAEC with 17-beta-estradiol (17 β E) for 24 hours prevented the latter expression of CD40/CD40L. Treatment of PAEC with antisense oligomers targeting ER α mRNA attenuated the ability of 17 β E to inhibit the IFN- γ -induced CD40 and CD40L protein expression. The IFN- γ activation pathway of CD40 is known to involve the phosphorylation of the janus activated kinase (JAK) and the signal transducer and activator of transcription 1 (Stat1). 17 β E, acting via ER α , abrogated IFN- γ -mediated effects on Stat1 but failed to inhibit Jak1 and Jak2 phosphorylation. Furthermore, 17 β E prevented neutrophil adhesion induced by IFN- γ .

Conclusion: In summary, 17 β E binding to ER α blocked IFN- γ -induced Stat1 phosphorylation, CD40 and CD40L protein expression and neutrophil adhesion onto ECs.

Keywords: Restenosis – Estrogens – Cytokines – Receptors – Endothelial function

6.2 Introduction

The pathophysiology of restenosis involves early elements of direct injury to ECs, smooth muscle cells (SMCs) and thrombus deposition. The widespread use of coronary stents has fundamentally altered the vascular response to injury by causing a more intense and prolonged inflammatory state.[1] Elevated levels of inflammatory markers such as CD40-CD40L were shown to predict future cardiovascular diseases.[2] CD40 is a cell surface receptor belonging to the tumour necrosis factor (TNF) receptor superfamily. It is expressed primarily on antigen presenting cells, but also by a variety of nonimmune cells such as SMCs, fibroblasts, platelets and ECs.[3] The corresponding ligand, CD40 ligand (CD40L, also known as CD154), a transmembrane protein originally identified on CD4+ T cells, is likewise expressed on SMCs, platelets and ECs.[3, 4] Under pro-inflammatory conditions, cytokines such as IFN- γ induce CD40 and CD40L expression on ECs.[3] The binding of IFN- γ to its receptors (IFNGR1 and IFNGR2) activates the receptor-associated Janus tyrosine kinases (JAKs), Jak1 and Jak2. JAKs tyrosines phosphorylate the latent cytoplasmic protein Stat1 which translocates to the nucleus and induces CD40 expression.[5] A previous study demonstrated that the administration of a neutralizing anti-CD40L monoclonal antibody reduced the initiation and progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic mice and further, modulated plaque architecture or plaque stability in such a manner suggesting a lower risk of thrombosis.[6] Collectively, these findings suggest an important role of CD40/CD40L interaction in the physiopathology of restenosis formation and related vascular diseases. Furthermore, this association may represent a key event to increase the expression of cellular adhesion molecules (CAMs) such as E-selectin, intercellular adhesion molecules (ICAM-1) and vascular cellular adhesion molecules (VCAM-1), and/or secretion of cytokines which contribute to leukocyte adhesion to the endothelium.[7]

Healthy women with increased plasma levels of soluble CD40L were shown to be at risk for cardiovascular events.[8] Estrogens regulate a variety of pathways such as nitric oxide (NO) production which can directly influence the inflammatory process. The effects of estrogens are primarily mediated by estrogen receptors (ER) alpha and beta (ER α and

ER β). Clinical trials suggested that enhance estrogen levels correlated with increased C-reactive protein (CRP), a marker of inflammation associated with elevated risk of future cardiovascular events.[9] By contrast, estrogens induce anti-inflammatory effects by blocking monocyte/macrophage production of cytokines such as TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1 and inhibit interleukin-1-induced expression of CAMs on ECs.[10-12] The effects of estrogens on CD40 and CD40L are not fully understood. A recent study demonstrated that CD40 and CD40L were upregulated in platelets of ovariectomized pigs and the response was abrogated with estrogen treatment.[13] Previous studies also reported that 17 β E has dual effects on the expression of CD40 and CD40L in inflammatory cells.[14, 15] However, the role of estrogens on CD40 and CD40L protein expression on ECs is unknown. Thus, to better understand the mode of action of 17 β E, we characterized the specific role of ER α and ER β on CD40 and CD40L expression and neutrophil adhesion on ECs under IFN- γ stimulation. Moreover, Stat1, Jak1 and Jak2 phosphorylation state was examined as those molecules are possible intracellular targets of 17 β E in the activation cascade of IFN- γ .

6.3 Materials and Methods

6.3.1 Cell culture

All experimental procedures were done following NIH guidelines for animal care. Porcine aortic endothelial cells (PAEC) were isolated from freshly harvested aortas, cultured and characterized as described previously.[16] PAEC were used between passages 1 and 3.

6.3.2 Antisense oligonucleotide gene therapy

The specific role of either ER α and ER β in the 17 β E-mediated effects on CD40L and CD40 expression on PAEC was assessed by using antisense oligonucleotides complementary to porcine ER α and ER β mRNA (GeneBank accession numbers Z37167 and AF164957, respectively) as previously described.[17]

6.3.3 Analyses of CD40 and CD40L expression

PAEC were plated at 1×10^5 cells/well in 6-well tissue culture plates (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Life Technologies Inc. Carlsbad, CA) containing 5% of fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Laboratories, Logan, UT) and antibiotics (penicillin and streptomycin, Sigma, St-Louis, MO) for 24 hours at 37°C. G_0 synchronization was achieved by starving the cells for 48 hours in DMEM containing 0.1% FBS. Cells were then grown for 16 hours in DMEM with 1% FBS before the administration of 17 β E-water soluble (10^{-10} to 10^{-6} mol/L, Sigma) and cells were incubated for an additional 24 hours. Cells were rinsed and incubated in DMEM with recombinant porcine IFN- γ (1000 U/mL, R&D systems, Minneapolis, MN) at 37°C for 24 hours. The efficacy and specificity of our antisense oligomers to prevent the expression of targeted proteins were previously demonstrated.[17] For antisense treatment, oligomers (10^{-6} mol/L) were added daily as previously described.[17] For Western blot analysis, equal amount of total protein (100 μ g) was loaded and migrated on 10% SDS-PAGE (Protein II kit; Bio-Rad, Hercules, CA) under reducing conditions and transblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp., Bedford, MA). Membranes were incubated overnight with one of the following antibodies; rabbit polyclonal anti-human-CD40, anti-human-CD40L (1:1 000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-phospho-Stat1, anti-phospho-Jak1 or anti-phospho-Jak2 (1:1 000 dilution, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Visualization of protein bands was achieved with an anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:20 000 dilution, Santa Cruz Biotechnology) and a chemiluminescence reagent (NEN Life Science Products, Boston, MA). Membranes were stripped with Re-Blot Plus (Chemicon International Inc, Temecula, CA) and total protein expression was determined with a rabbit polyclonal anti- β -actin (1:2 000 dilution, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-Stat1, anti-Jak1 or anti-Jak2 (1:1 000 dilution, Cell Signaling Technology). Results are presented as the relative expression of CD40, CD40L, phospho-Stat1, phospho-Jak1 and phospho-Jak2 proteins normalized with the expression of β -actin, Stat1, Jak1 or Jak2 using Digital image densitometry (PDI Bioscience, Aurora, ON). Western blot analyses were

performed in triplicate and results of image densitometry are representative of these experiments.

6.3.4 Analyses of CD40 mRNA levels

To study the effect of 17 β E on the expression of CD40 and CD40L at mRNA levels, PAEC were stimulated as described above. Total RNA was isolated using TRIZOL reagent according to the manufacturer's instructions (Life Technologies Inc.). For each sample, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed into cDNA using p(N6) primer random hexamer (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada). CD40 forward 5-TGTACCAACAGCGCCTGTGA-3' (nt 331-350) and reverse primers 5'-CTCTGTGCGCCATCTGCTTGA-3'(nt 411-392), and CD40L forward 5-ATTCACTTGGGCGGAGTCTTC-3' (nt 667-687) and reverse primers 5-GTGGCTCACTTGGCTTGGAT-3' (nt 747-728) complementary to the pig CD40 and CD40L genes were synthesized (Life Technologies Inc.). The ABI 5700 Sequence Detection System PE of Applied Biosystems (Foster City, CA) was used to amplify cDNA and detect PCR products. Final reaction volume of 25 μ L for each PCR reaction was set up with 15 μ L of Master SYBER Green I Kit (PE of Applied Biosystems), 9×10^{-7} mol/L of each of the forward and reverse primers, and 5 μ L of cDNA. Standard curves were generated from serial dilutions (0 to 1000 ng) of total RNA obtained from IFN- γ treated cells. The values for CD40 mRNA were normalized to the level of 18S rRNA expressed in each sample. Each experiment was performed in triplicate. At the end of the amplification, 10 μ L of PCR products were analyzed by electrophoresis on a 4% agarose gel to confirm products size (80 bp).

6.3.5 Neutrophil isolation and purification

As previously described,[18] neutrophils were isolated from swine blood by red blood cell sedimentation with dextran 4% (ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH), followed by Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences) density gradient centrifugation. Using Coulter counter and by Wright-Giemsa staining, the purity of neutrophils was evaluated to be up to

97%. Viability was found to be greater than 99% as assessed by trypan blue dye exclusion assay.

6.3.6 Neutrophil adhesion assay

PAEC were seeded in 96-well tissue culture plates coated with 0.25% of gelatin and treated with or without antisense oligomers and/or 17 β E before stimulation with IFN- γ as described above. Relative importance of CD40 and CD40L was evaluated by treatment of PAEC for one hour either with neutralizing anti-CD40 (5 μ g/mL, clone 82102), anti-CD40L (1 μ g/mL, clone 40804) or both (R&D systems) and anti-ICAM-1 (10 μ g/mL, clone BBIG-11) after IFN- γ stimulation. Normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) was used as negative control. Neutrophils (1×10^5 cells) were then added to PAEC. After one hour incubation, wells were flicked dry, washed 3 times with HBSS, and adherent cells were estimated using the myeloperoxidase (MPO) assay of Grisham, Benoit, and Granger with a minor modification.[19] Each experiment is means obtained from 6 wells for each treatment and performed in triplicate. The absorbance of PAEC without neutrophils was subtracted from all the data as background value to exclude any potential effect of nNOS produce by PAEC. Cell counts were extrapolated from the absorbance of experimental samples using a standard curve which was established over a range of 1.0×10^4 to 1.4×10^5 neutrophils with a *R*-value of 0.988. Data are reported as relative mean of neutrophil adhesion compared to baseline.

6.3.7 Statistical Analysis

Data are mean \pm SEM. Statistical comparisons were determined by ANOVA followed by a Bonferroni's test correction for multiple comparisons. A *P* value <0.05 was considered as significant. *, *P* <0.05 as compared PBS-treated cells; †, *P* <0.05 as compared to cells treated with IFN- γ (1000 U/mL); ‡, *P* <0.05 as compared to cells treated with 17 β E (10^{-7} mol/L) and IFN- γ .

6.4 Results

6.4.1 Effect of 17 β E on CD40 and CD40L mRNA and Protein Expression

IFN- γ -induced CD40 and CD40L expression were reported for human ECs.[3] We first assessed if treatment with IFN- γ could influence CD40 and CD40L mRNA and protein expression on PAEC. In unstimulated cells, we observed a minimal basal expression level of both proteins and mRNA. We performed a concentration-dependent stimulation of PAEC with IFN- γ and found that maximal effect on CD40 and CD40L protein expression was achieved after 24 hours of treatment with a concentration of 1000 U/mL (data not shown). The 24 hours treatment with IFN- γ (1000 U/mL) increased the protein expression of CD40 and CD40L by 97% and 78%, respectively (Figure 1). Pretreatment with 17 β E (10^{-10} to 10^{-6} mol/L) for 24 hours provided a concentration-dependent and complete inhibition of CD40 and CD40L expression mediated by IFN- γ (Figure 1). CD40 and CD40L mRNA levels were also increase by 200% and 87% with IFN- γ stimulation (Figure 2) while, pretreatment with 17 β E (10^{-7} mol/L) for 24 hours prevented this latter induction. Protein expression of CD40 and CD40L were equivalent between cells from passages 1 to 3. In PAEC treated with 17 β E alone (10^{-7} mol/L), CD40 and CD40L mRNA and protein levels were comparable to PBS-treated cells (data not shown).

6.4.2 Role of ER α and ER β on CD40 and CD40L Expression

To evaluate the specific contribution of ER subtypes in the regulation of CD40 and CD40L protein expression, we used an antisense oligomer gene therapy approach. As previously demonstrated,[17] the antisense oligomers AS1-ER α and AS2-ER α (10^{-6} mol/L) blocked PAEC ER α protein expression by 94% and 95%, while AS1-ER β and AS2-ER β (10^{-6} mol/L) suppressed ER β protein expression by 90% and 97%, respectively. Treatment of PAEC with AS1-ER α and AS2-ER α reduced the inhibitory effect of 17 β E on IFN- γ -

induced CD40 protein expression by 53% and 61%, and CD40L protein expression by 74%, 71%, respectively (Figure 3). In contrast, treatment with antisense oligomers targeting ER β mRNA or scrambled oligomers had no detectable effect (Figure 3). In the same series of experiments, we also evaluated the expression of ERs after IFN- γ treatment alone to ensure that ER α and ER β expression levels were not affected. Western blot analyses confirmed that IFN- γ did not modulate the expression of ER α and ER β (Figure 3).

6.4.3 Effect of ER α on IFN- γ Signalling Pathway

The most well defined signalling cascade for type II IFN/IFN receptor involves JAK-STAT pathway. The following experiments examined whether the inhibitory effect of 17 β E on IFN- γ -mediated induction of CD40 and CD40L was associated with concomitant inactivation of JAK/STAT pathway. As expected, stimulation with IFN- γ for 24 hours induced an intense phosphorylation of Jak1, Jak2 and Stat1 in PAEC (Figure 4A and 4B). Treatment of ECs with 17 β E (10⁻⁷ mol/L) did not interfere with Jak1 and Jak2 activation induced by IFN- γ (Figure 4A). However, pretreatment with 17 β E (10⁻⁷ mol/L) completely blocked the phosphorylation of Stat1 mediated by IFN- γ (Figure 4B). Treatment with antisense oligomers demonstrated that the down regulation of ER α protein expression abrogated the inhibitory effects of 17 β E on Stat1 phosphorylation, whereas the inhibition of ER β protein expression did not influence the 17 β E activity on Stat1 phosphorylation (Figure 4B).

6.4.4 17 β E Inhibits Neutrophil Adhesion

Only one group has previously reported that human neutrophils expressed CD40L.[20] We confirmed by Western blot analyses and confocal microscopy that both CD40 and CD40L are present on porcine neutrophils (P.G. and J-F.T, unpublished data, November 2004). Upregulation of CD40 and CD40L expression on ECs increases neutrophil adhesion to the endothelium.[3] In this regard, we evaluated the relative role of CD40 and CD40L on neutrophil-EC adhesion by using antibodies able to block either

CD40 or CD40L. Treatment with IFN- γ (1000 U/mL) for 24 hours increased by 2-fold the adhesion of neutrophils to activated ECs (Figure 5). As shown by Lindmark *et al.*[21] in platelets and lymphocytes, the current study observed as well that maximal inhibition of neutrophil adhesion to EC was achieved using 5 μ g/mL of anti-CD40 and 1 μ g/mL of anti-CD40L antibodies prior to IFN- γ stimulation. In the present study, the use of an anti-CD40 antibody on ECs to prevent its binding onto CD40L expressed on neutrophils, reduced by 62% the adhesion of neutrophils onto IFN- γ -treated ECs. By the same way, the blocking anti-CD40L on ECs prevents its ligation to CD40 expressed on neutrophils, attenuated by 56% the adhesion of neutrophils to ECs following IFN- γ stimulation. Moreover, the combination of both blocking antibodies provided a greater inhibitory effect of IFN- γ -mediated adhesion of neutrophils to ECs (Figure 5). Treatment with either anti-ICAM-1 or control IgG had no significant effect on the adhesion of neutrophils onto PAEC. In this assay, the background was obtained by measuring MPO activity in PAEC alone to exclude any potential nNOS impact. We then investigated the effects of 17 β E on neutrophil adhesion to ECs. Pretreatment of ECs with 17 β E (10^{-7} mol/L) reduced by 79% neutrophil adhesion to PAEC mediated by IFN- γ (Figure 6). 17 β E alone does not affect the cell surface IFN- γ receptor expression level (data not shown). In order to characterize the implication of ERs in neutrophil-ECs interaction, we treated ECs with antisense oligomers before the addition of 17 β E. We demonstrated that ER α protein expression but not ER β protein expression is essential for the 17 β E-mediated control of neutrophil adhesion (Figure 6).

6.5 Discussion

Vascular inflammatory response plays an important role in the pathogenesis of restenosis and may contribute to the increased risk of unstable angina. It is well known that estrogens have both anti-inflammatory and pro-inflammatory effects. Estrogens were shown to modulate the expression of adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in response to cytokine stimulation in cultured human EC.[22] Moreover, in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), estrogens reduced the level of MCP-1 and IL-8 expression mediated by TNF- α . [12] By contrast, estrogens increased CRP expression suggesting a potential role in the proinflammatory response. In recent findings, CD40 and CD40L emerge as crucial mediators not only in the initial events of restenosis but also predict late restenosis following coronary stenting.[23] Therefore, because CD40/CD40L interaction favors the binding of leukocytes to ECs, the present study evaluated the effects of estrogens on CD40 and CD40L expression by PAEC and neutrophil adhesion. Our results demonstrate that 17 β E down modulates the impact of IFN- γ on CD40 and CD40L expression both at the mRNA and protein levels in PAEC. Furthermore, 17 β E mediates its effects through ER α activation and significantly reduces neutrophil adhesion to PAEC.

CD40 was originally discovered in immunohistochemical studies on the surface of B lymphocytes and its expression level varied with the B cell activation state. Activation of B lymphocytes required direct contact with CD40L expressed on T helper cells. The biological function of this receptor/ligand dyad established CD40/CD40L interactions as a crucial process in T cell-dependent B cell activation and differentiation. Further studies demonstrated that both CD40 and CD40L are also expressed on non-lymphoid cells, such as dendritic cells, monocytes, macrophages, NK cells, epithelial cells, platelets, SMC, fibroblasts, and EC providing autocrine and paracrine effects between circulating and vascular cells.[24] It has been proposed that the disruption of CD40-CD40L dyad could have therapeutic applications in a number of pathophysiological diseases such as the formation of inflammatory lesions and plaque instability.[6] Therefore, previous studies showed minimal expression of CD40 and CD40L on unstimulated human ECs but

upregulated expression following IFN- γ stimulation.[3, 25] However, IFN- γ was observed to reduce expression of CD40L by fibroblasts.[26] The current study demonstrated that a treatment of ECs with IFN- γ increased CD40 and CD40L mRNA and total protein expression, an effect that can be blocked by a pretreatment with 17 β E. By itself, 17 β E did not modulate CD40 and CD40L mRNA and protein expression or the IFN γ R level on unstimulated PAEC (data not shown). Our results are in agreement with previous studies in which a pretreatment with 17 β E decreased CD40 and CD40L surface expression in platelets of ovariectomized female pigs and in LPS-treated microglial cells.[13, 15] In addition to the downregulation of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in human ECs, the inhibition of IFN- γ -induced CD40 and CD40L expression by 17 β E may represent an additional possible mechanism by which estrogens attenuate inflammatory effects.

The implication and specific roles of each ER on the estrogens anti-inflammatory effects are not completely understood. Therefore, in apoE-deficient female mice treated with 17 β E, ER α was considered the major mediator in the reduction of atherosclerosis.[27] In a previous work, we showed the capacity of 17 β E to increase PAEC migration, proliferation and activation of mitogen-activated protein kinases through ER α stimulation.[17] In this current study, we used an antisense therapy approach to assess the role of each ERs on CD40/CD40L regulation on ECs. We demonstrated that the blockage of ER α mRNA translation, but not ER β mRNA, prevented the inhibitory effects of 17 β E on CD40 and CD40L protein expression induced by IFN- γ . Thus, these results suggested that ER α is mostly responsible for the prevention by 17 β E of IFN- γ mediated effects on EC.

It is well documented that the induction of the JAK-STAT signalling pathway represents one potential mechanism by which IFN- γ may influence gene expression.[5] In human ECs, the up-regulation of CD40 expression at the transcriptional level by IFN- γ is known to involve the Stat1 transcription factor.[25] Previous studies have also shown that short and long term exposure to IFN- γ are capable to increase Stat1 phosphorylation.[28] As expected, we observed that 24 hours stimulation with INF- γ activated Jak1, Jak2 and

Stat1 phosphorylation. Treatment of ECs with 17β E did not influence the ability of IFN- γ to activate Jak1 and Jak2. However, 17β E acting via ER α reduced Stat1 phosphorylation induced by IFN- γ on ECs. Relationship between Stat1 and CD40 expression in infiltrated-cells was also reported in a study using a single application of decoy oligonucleotide specific for Stat1.[29] However, at this point, the exact mechanism by which 17β E-ER α diminished Stat1 phosphorylation is unknown. Moreover, because the exposure time with 17β E (24 hours), we cannot exclude that long-term stimulation may transiently influence Jak1, Jak2 and Stat1 activity.

The ability of adhesion molecules to influence leukocyte-EC interactions and therefore to regulate neutrophil recruitment play a pivotal role in the modulation of the inflammatory and immune responses. Neutrophil binding and infiltration into the vascular wall are critical cellular steps of the inflammatory response during the early stage of restenosis formation. In response to endoluminal injury, various CAMs are rapidly induced on neutrophils and ECs such as β 2 integrin, ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin. It is now well recognized that the induction of CD40 and CD40L expression at the surface of ECs also contributes to neutrophil adhesion on the endothelium.[30] Recently, it was demonstrated that blockage of CD40-CD40L interaction by silencing human CD40 expression on ECs led to a reduction of leukocyte adherence on these cells.[31] Since both CD40 and CD40L are present on ECs and can bind with their counter receptors expressed on neutrophils, we used an *in vitro* adhesion and myeloperoxidase assay to assess the relative importance of CD40 and CD40L on neutrophil adhesion to ECs. Our data showed that blocking either CD40 or CD40L on PAEC with their representative antibody partially reduce the number of adhered neutrophils onto activated ECs. However, when PAEC were treated with both blocking antibodies, additive inhibition of neutrophil adhesion onto PAEC was achieved. Thus, both CD40 and CD40L on ECs can modulate the adhesion of neutrophils induced by IFN- γ in a static condition. However, these finding needs to be evaluated *in vivo* where shear stress and blood flow could modulate successive adhesion molecules expression implicated in the interaction of circulating leukocytes with the activated endothelium.

A number of other CAMs were shown to be required for neutrophil-EC interaction.[32] Previous study observed that IFN- γ stimulation increase ICAM-1 and VCAM-1 but not P-selectin and E-selectin expression in human EC.[33] However, because the counter receptor of VCAM-1 (VLA-4) was not expressed by neutrophils, the induction of ICAM-1 by proinflammatory cytokines was the main regulator of neutrophil migration and localisation in this specific system.[34, 35] Indeed, previous studies demonstrated that ligation of CD40 on human EC upregulates various CAMs such as ICAM-1.[36, 37] However, this effect can be drastically reduced in the presence of an anti-CD40 antibody in presence of proinflammatory molecule TNF- α . [38] Therefore, using a blocking antibody against ICAM-1, our results indicate only minor abrogation (less than 15%) of neutrophil adhesion to EC (Figure 5). Interestingly, some authors reported differences in IFN- γ effects on ICAM-1 levels between two distinct human EC even if both cell types exhibited a similar number of IFN- γ receptors.[39] Moreover, previous study reported that recombinant porcine IFN- γ only weakly stimulated ICAM-1 expression when incubated with PAEC.[40] Indeed, our findings are in agreement with others, supporting the hypothesis that alternative adhesion pathway(s) independent of P-selectin and ICAM-1 participate in neutrophil adhesion.[41, 42]

In conclusion, as compared to previous work on estrogen mediated down regulation of CD40 and CD40L in platelets, our study explored the role of estrogen receptors and the signalling pathway involved in the inhibition by 17 β E of INF- γ -induced expression of CD40 and CD40L in PAEC. Therefore, the present study demonstrated that 17 β E, through ER α -activation, diminished Stat1 phosphorylation induced by IFN- γ , abrogated the upregulation of CD40 and CD40L protein expression by PAEC and subsequently reduced the adhesion of neutrophils. Our results provide new insights to the understanding of the specific contribution of ERs on the control of inflammatory marker expression by PAEC.

6.6 Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-43919) to Dr. Sirois, and from the “Fonds de la recherche en santé du

Québec”, “Fondation des Maladies du Coeur du Québec” and “Fondation de l’Institut de Cardiologie de Montréal” to Dr. Tanguay. Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research, Dr. Tanguay and Mr. Geraldès are respectively recipient of a scholarship and studentship from the “Fonds de la recherche en santé du Québec”.

6.7 References

- [1] Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, et al. Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 2003;108:2776-2782.
- [2] Lutgens E, van Suylen RJ, Faber BC, Gijbels MJ, Eurlings PM, Bijnens AP, et al. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2123-2130.
- [3] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1931-1936.
- [4] Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 2003;92:1041-1048.
- [5] Nguyen VT, Benveniste EN. Involvement of STAT-1 and its family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 2000;275:23674-23684.
- [6] Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998;394:200-203.
- [7] Kotowicz K, Dixon GL, Klein NJ, Peters MJ, Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000;100:441-448.

- [8] Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001;104:2266-2268.
- [9] Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JE. Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999;100:713-716.
- [10] Caulin-Glaser T, Farrell WJ, Pfau SE, Zaret B, Bungler K, Setaro JF, et al. Modulation of circulating cellular adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1555-1560.
- [11] Srivastava S, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Adler S, Pacifici R. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. *J Clin Invest* 1999;104:503-513.
- [12] Rodriguez E, Lopez R, Paez A, Masso F, Montano LF. 17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription. *Life Sci* 2002;71:2181-2193.
- [13] Jayachandran M, Sanzo A, Owen WG, Miller VM. Estrogenic regulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in platelets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1908-1916.
- [14] Rider V, Jones S, Evans M, Bassiri H, Afsar Z, Abdou NI. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28:2644-2649.
- [15] Dimayuga FO, Reed JL, Carnero GA, Wang C, Dimayuga ER, Dimayuga VM, et al. Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *J Neuroimmunol* 2005;161:123-136.
- [16] Geraldès P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1585-1590.
- [17] Geraldès P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res* 2003;93:399-405.
- [18] Bienvenu JG, Tanguay JF, Theoret JF, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through

inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation* 2001;103:1128-1134.

[19] Grisham MB, Benoit JN, Granger DN. Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestine. *Methods Enzymol* 1990;186:729-742.

[20] Ricardo C, Toro F, Bianco NE, De Sanctis JB. CD40-CD40L Interaction increases peroxide production in human neutrophils. *Clin Invest Med* 2004;27:44C.

[21] Lindmark E, Tenno T, Siegbahn A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2322-2328.

[22] Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 1996;98:36-42.

[23] Yip HK, Wu CJ, Yang CH, Chang HW, Fang CY, Hung WC, et al. Serial changes in circulating concentrations of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in patients with unstable angina undergoing coronary stenting. *Circ J* 2005;69:890-895.

[24] Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4-43.

[25] Wagner AH, Gebauer M, Pollok-Kopp B, Hecker M. Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1. *Blood* 2002;99:520-525.

[26] Kaufman J, Sime PJ, Phipps RP. Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis. *J Immunol* 2004;172:1862-1871.

[27] Hodgin JB, Krege JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, Maeda N. Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe^{-/-} mice. *J Clin Invest* 2001;107:333-340.

[28] Magro F, Fraga S, Soares-da-Silva P. Signaling of short- and long-term regulation of intestinal epithelial type 1 Na⁺/H⁺ exchanger by interferon-gamma. *Br J Pharmacol* 2005;145:93-103.

- [29] Quarcoo D, Weixler S, Groneberg D, Joachim R, Ahrens B, Wagner AH, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 1 attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:288-295.
- [30] Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594.
- [31] Pluvinet R, Petriz J, Torras J, Herrero-Fresneda I, Cruzado JM, Grinyo JM, et al. RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells. *Blood* 2004;104:3642-3646.
- [32] Burns AR, Bowden RA, Abe Y, Walker DC, Simon SI, Entman ML, et al. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol* 1999;65:299-306.
- [33] Raab M, Daxecker H, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller MM. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin Chim Acta* 2002;321:11-16.
- [34] Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991;173:1553-1557.
- [35] Walsh GM, Mermod JJ, Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is alpha 4 beta 1 (very late antigen-4) dependent. *J Immunol* 1991;146:3419-3423.
- [36] Yellin MJ, Brett J, Baum D, Matsushima A, Szabolcs M, Stern D, et al. Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals. *J Exp Med* 1995;182:1857-1864.
- [37] Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4342-4346.
- [38] Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1995;182:33-40.

- [39] Look DC, Rapp SR, Keller BT, Holtzman MJ. Selective induction of intercellular adhesion molecule-1 by interferon-gamma in human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;263:L79-87.
- [40] Stocker CJ, Sugars KL, Yarwood H, Delikouras A, Lechler RI, Dorling A, et al. Cloning of porcine intercellular adhesion molecule-1 and characterization of its induction on endothelial cells by cytokines. *Transplantation* 2000;70:579-586.
- [41] Crockett ET, Remelius C, Hess K, Al-Ghawi H. Gene deletion of P-Selectin and ICAM-1 does not inhibit neutrophil infiltration into peritoneal cavity following cecal ligation-puncture. *BMC Clin Pathol* 2004;4:2.
- [42] Thienel U, Loike J, Yellin MJ. CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell Immunol* 1999;198:87-95.

6.8 Figure Legends

Figure 1: Effect of $17\beta\text{E}$ on CD40 and CD40L expression induced by IFN- γ .

Cells were pretreated $\pm 17\beta\text{E}$ for 24 hours and then stimulated with IFN- γ for 24 hours as described in the methods. Protein expression of CD40 (A) and CD40L (B) was detected by Western blot analyses. Values are mean \pm SEM of at least 3 experiments.

Figure 2: Effect of $17\beta\text{E}$ on CD40 and CD40L mRNA expression induced by IFN- γ in PAEC.

Cells were pre-treated $\pm 17\beta\text{E}$ for 24 hours and then stimulated with IFN- γ for 24 hours as described in the methods. Quantitative analysis of CD40 (A) and CD40L (B) expression was performed by real-time RT-PCR. Values are mean \pm SEM of at least 3 experiments.

Figure 3: Contribution of ER α and ER β on the regulation of CD40 and CD40L expression in PAEC.

Cells were treated either with antisense or scrambled oligomers (10^{-6} mol/L) as described in the methods. Cells were then treated $\pm 17\beta\text{E}$ for 24 hours and stimulated with IFN- γ for 24

hours. Proteins expression of CD40 (A) and CD40L (B) was detected by Western blot analyses. Values are mean \pm SEM of at least 3 experiments.

Figure 4: Role of 17 β E and ER on Jak1, Jak2 and Stat1 phosphorylation induced by IFN- γ .

Cells were treated \pm antisense or scrambled oligomers (10^{-6} mol/L) as described in the methods. Cells were then incubated \pm 17 β E for 24 hours and stimulated with IFN- γ (1000 U/mL) for another 24 hours. Protein expression of (A) phospho-Jak1, Jak1, phospho-Jak2, Jak2, (B) phospho-Stat1 and Stat1 was detected by Western blot analyses. Values are mean \pm SEM of at least 3 experiments.

Figure 5: Contribution of ICAM, CD40 and CD40L on neutrophil adhesion on PAEC.

Cells were stimulated with INF- γ before the addition of either blocking antibodies against ICAM-1 (10 μ g/mL), CD40 (5 μ g/mL), CD40L (1 μ g/mL) or a control IgG for 1 hour and neutrophils (1×10^5 cells) were added for another 1 hour. Neutrophil adhesion was evaluated by MPO assay as described in the methods. Values are mean \pm SEM of at least 7 experiments. *, $P < 0.05$ as compared IgG-treated cells; †, $P < 0.05$ as compared to cells treated with IFN- γ (1000 U/mL).

Figure 6: Effects of 17 β E on neutrophil adhesion on PAEC.

Cells were treated either with antisense or scrambled oligomers as described in the methods. Cells were then treated \pm 17 β E for 24 hours and stimulated with IFN- γ for 24 hours. Neutrophil adhesion was evaluated by MPO assay as described in the methods. Values are mean \pm SEM of at least 7 experiments.

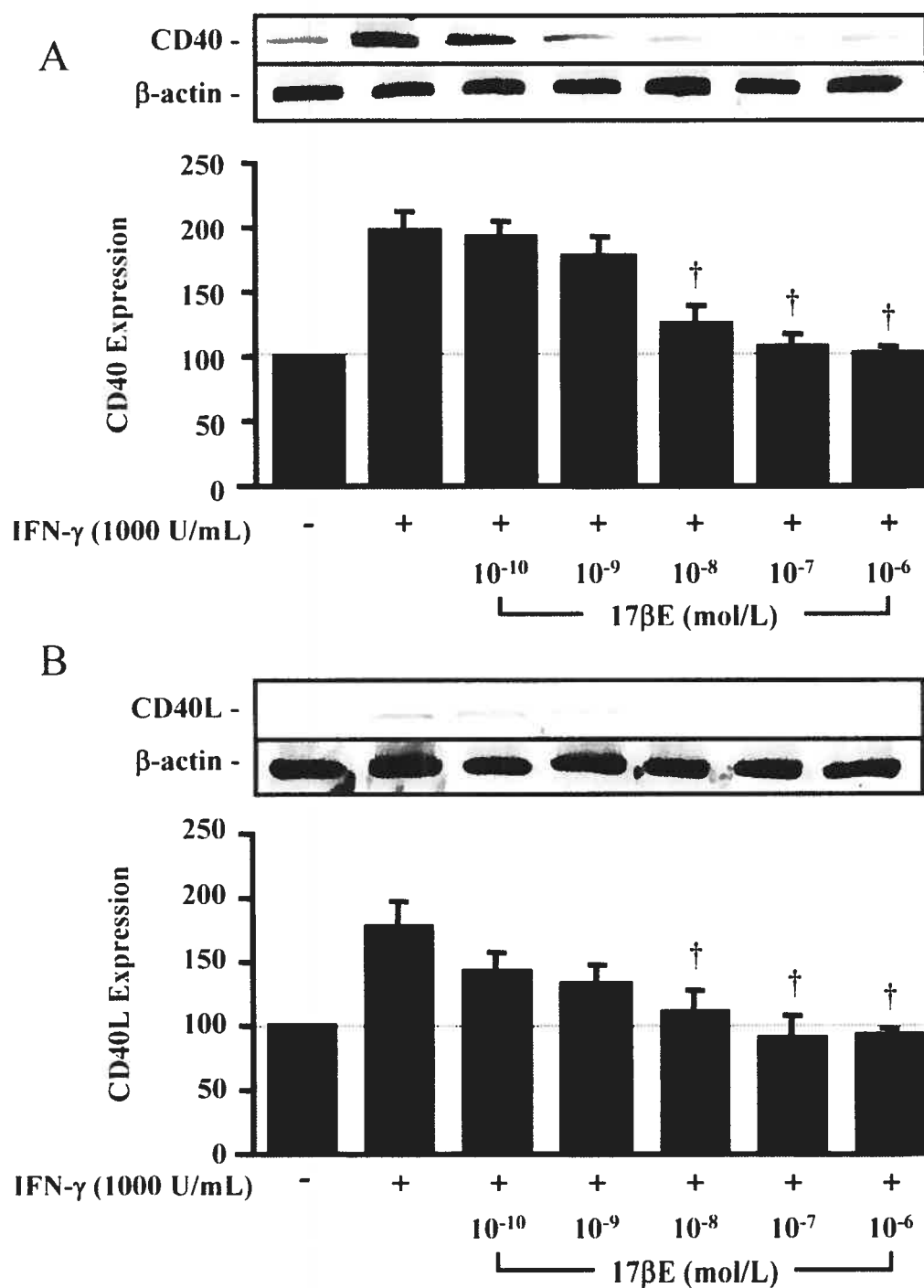
Figure 1: Effect of 17 β E on CD40 and CD40L expression induced by IFN- γ **γ** 

Figure 2: Effect of 17 β E on CD40 and CD40L mRNA expression induced by IFN- γ in PAEC

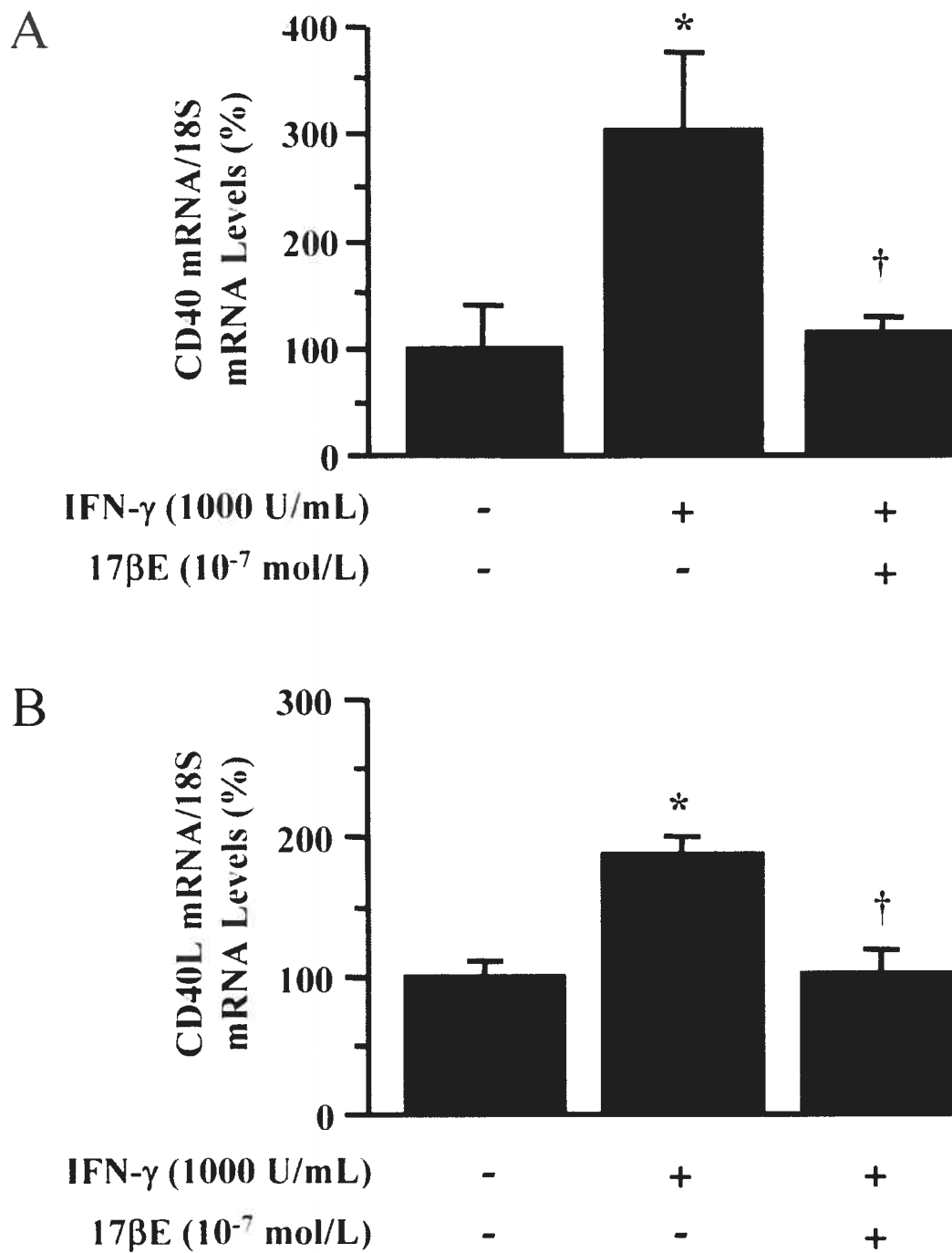


Figure 3: Contribution of ER α and ER β on the regulation of CD40 and CD40L expression in PAEC

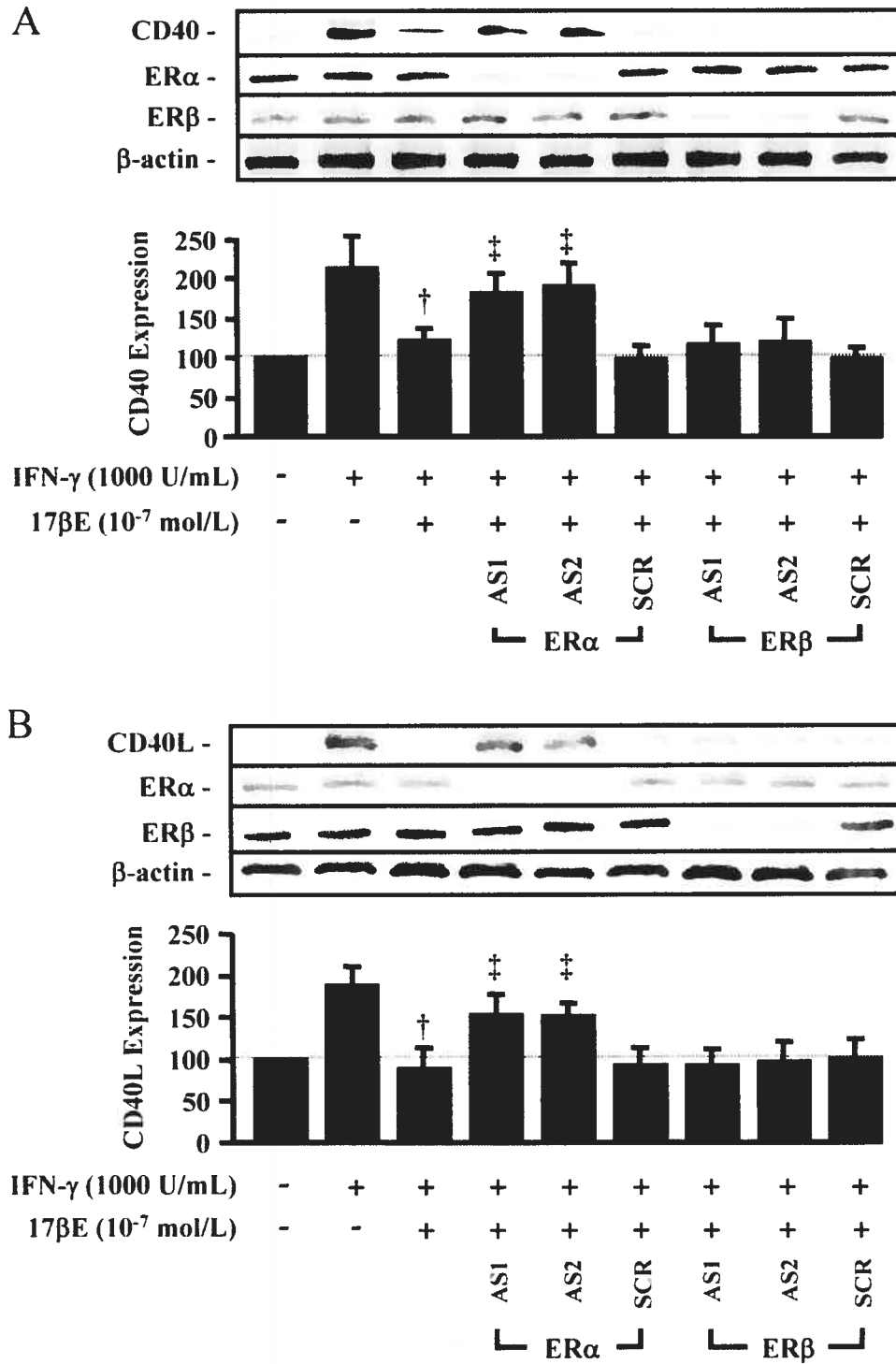


Figure 4: Role of 17 β E and ER on Jak1, Jak2 and Stat1 phosphorylation induced by IFN- γ

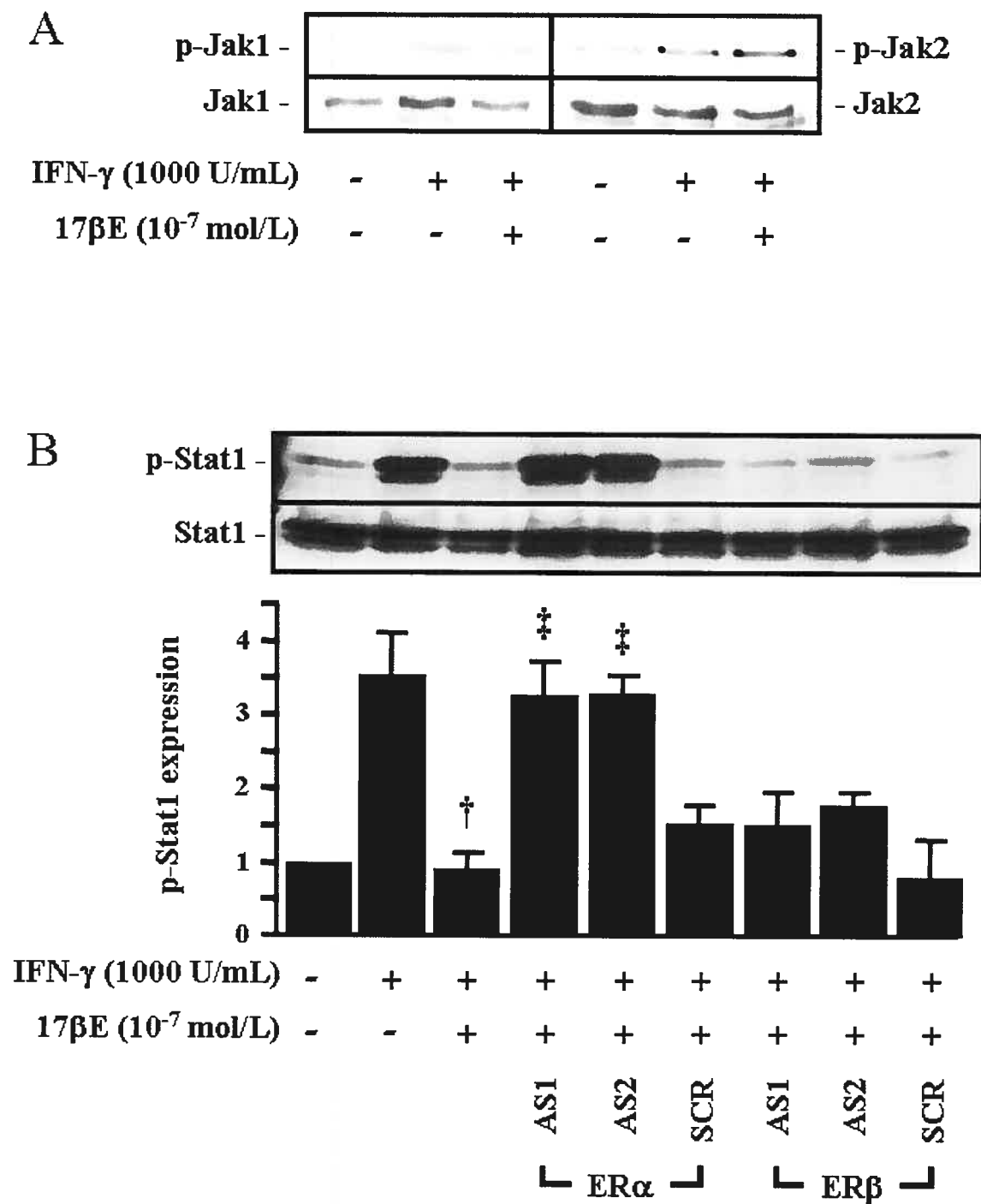


Figure 5: Contribution of ICAM, CD40 and CD40L on neutrophil adhesion on PAEC

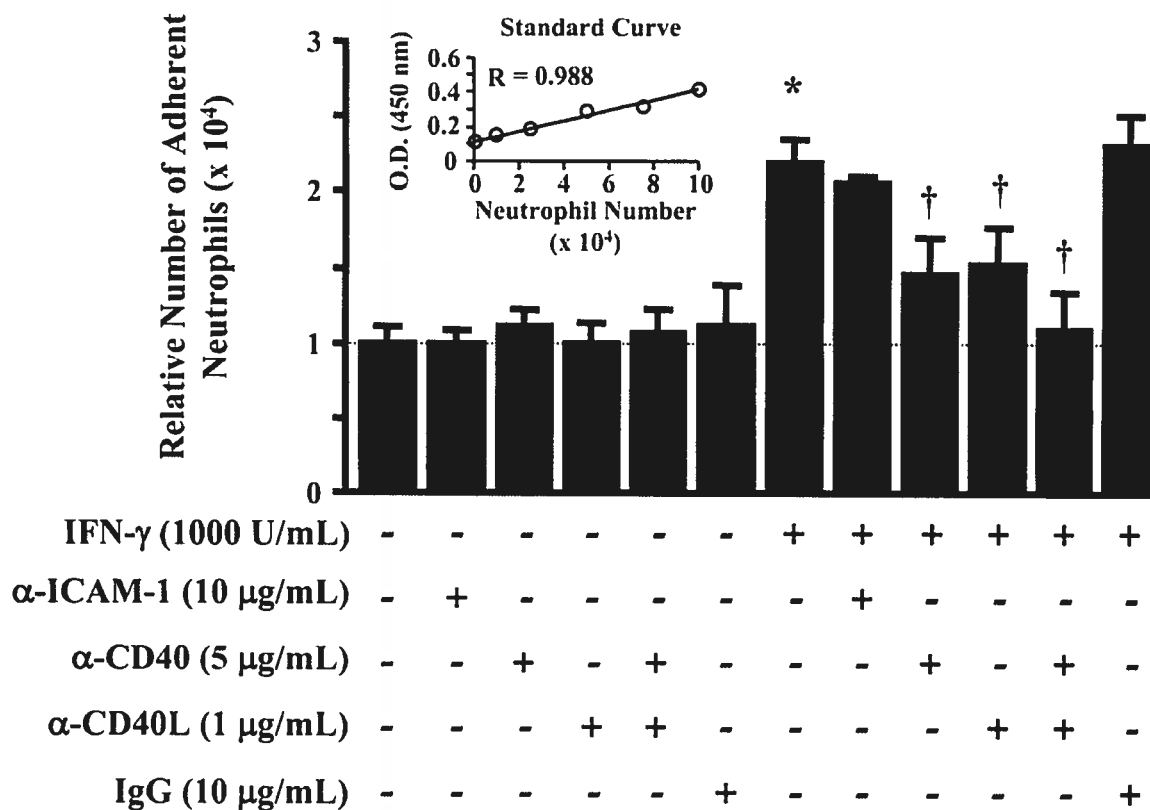
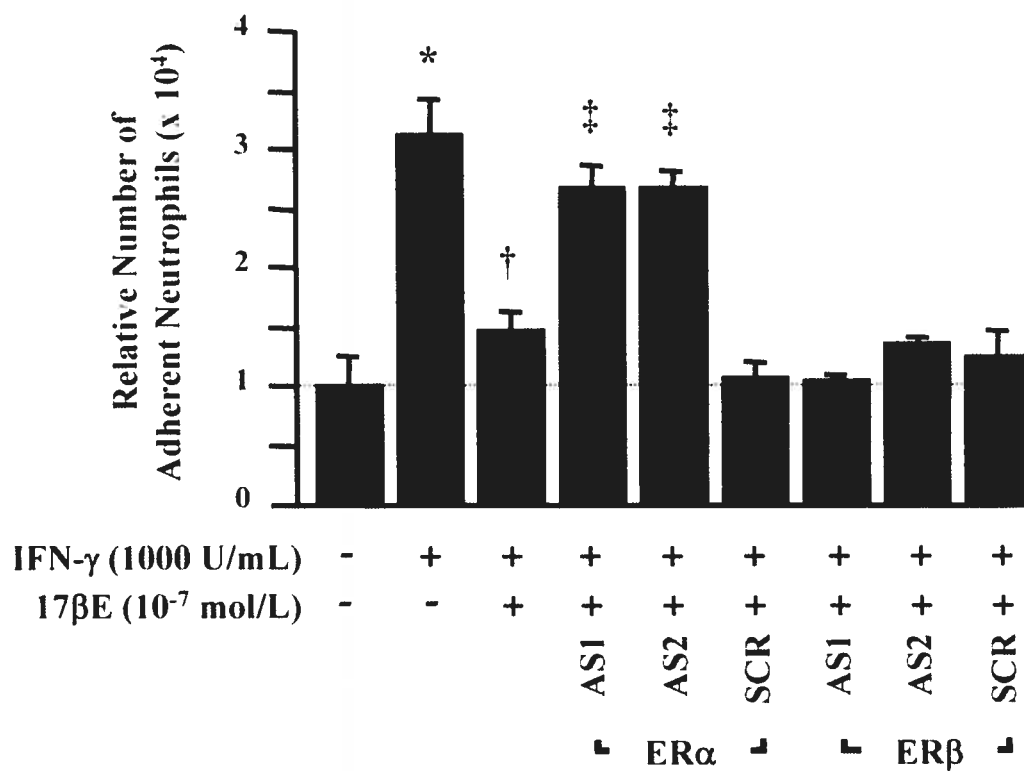


Figure 6: Effects of $17\beta\text{E}$ on neutrophil adhesion on PAEC



7 Discussion

La maladie coronarienne est l'une des principales causes de mortalité chez la femme ménopausée. Pendant plusieurs années, il a été proposé que la prise d'hormones substitutives conférant aux FM une protection contre les MCV. Or, suite aux résultats d'études cliniques randomisées, la TRH n'est plus conseillée aux femmes dans le but de prévenir le risque d'événements cardiaques. Il ne faut pas perdre de vue que le premier bénéfice de la TRH est de supprimer les effets secondaires liés à la ménopause tels que les troubles vasomoteurs (bouffées de chaleur, sueurs nocturnes) et les troubles trophiques génito-urinaires (incontinence). Cependant, les résultats des études cliniques divergent des données obtenues *in vitro* et à l'aide de modèles expérimentaux. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette discordance soit l'âge moyen des femmes participantes, le type d'hormones utilisées et la voie d'administration. De plus, il a été suggéré que le premier passage hépatique suite à la prise orale d'hormones par voie orale augmente l'expression de marqueurs proinflammatoires tels que la CRP, ce qui pourrait en partie expliquer les résultats décevants. L'utilisation d'une livraison locale d'un bolus d'estrogènes pour le traitement ou la prévention des problèmes vasculaires permet de contourner cette problématique. Des études dans le laboratoire du Dr Tanguay ont démontré que la livraison locale de $17\beta\text{E}$ suite à une APTC prévient jusqu'à 50% la resténose coronarienne en favorisant la réendothélialisation, l'expression de eNOS et la guérison vasculaire.³⁶⁹ Il a également été observé que la livraison locale de $17\beta\text{E}$ suite à l'implantation d'une endoprothèse vasculaire réduit la formation de resténose en diminuant l'infiltration de cellules inflammatoires au site de lésion.³⁷¹ Au cours des présents travaux, nous avons identifié et tenté de comprendre et de clarifier les mécanismes intracellulaires par lesquels le $17\beta\text{E}$ exerce ses effets. Dans un premier temps, nous rapportons que le $17\beta\text{E}$ stimule la prolifération et la migration des CE par l'activation de la p42/44 et p38 MAPK tout en inhibant ces mêmes mécanismes au niveau des CML. Dans un deuxième temps, dans le but de caractériser le rôle précis de chaque RE, nous démontrons à l'aide d'une technique d'antisens que la capacité du $17\beta\text{E}$ à stimuler la phosphorylation des MAPKs p42/44 et p38, la prolifération et la migration des CE passe par l'activation du $\text{RE}\alpha$. De plus, nous

rapportons que le $17\beta\text{E}$, via sa liaison à son $\text{RE}\beta$, induit ses effets inhibiteurs sur la phosphorylation de la p42/44 et p38 MAPK, la prolifération et la migration des CML. Finalement, dans un troisième temps, nous observons que le $17\beta\text{E}$ prévient la phosphorylation de Stat1, l'expression de CD40 et de CD40L et l'adhésion des neutrophiles induit par l'IFN- γ au niveau des CE. Finalement, nous démontrons que des propriétés anti-inflammatoires du $17\beta\text{E}$ passent par la stimulation du $\text{RE}\alpha$.

7.1 La régulation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses et endothéliales par le $17\beta\text{E}$: Rôle de la p42/44 et p38 MAPK

Certaines études ont démontré que le traitement aux estrogènes pouvait avoir des effets cardioprotecteurs en réduisant la formation néointimale suite à une lésion vasculaire dans des artères carotidiennes.³⁷² Les estrogènes peuvent agir à différents niveaux dans les mécanismes de resténose. Suite à une angioplastie ou à l'implantation d'une endoprothèse, les CML migrent de la média vers l'intima, prolifèrent et synthétisent de la MEC. Plusieurs facteurs sont impliqués dans la formation de la resténose dont le PDGF, sécrétés par les plaquettes et les macrophages, qui jouent un rôle prédominant dans la prolifération et la migration des CML. Nous démontrons dans notre première étude que le $17\beta\text{E}$ réduit de façon dose-dépendante la prolifération et la migration des CML induites par le PDGF. Nous observons que les effets inhibiteurs du $17\beta\text{E}$ sont maximaux à une concentration physiologique (10^{-8} M). Nos résultats confirment les données expérimentales *in vitro* et *in vivo* par lesquelles les estrogènes inhibent la prolifération et la migration des CML vasculaires.³⁷³⁻³⁷⁵ La majorité des effets des estrogènes sont attribuables à ses actions via les RE. Cependant, il a été démontré que les estrogènes peuvent induire des effets indépendants de $\text{RE}\alpha$ et de $\text{RE}\beta$. En effet, des études ont rapporté que le $17\beta\text{E}$ réduit la relâche de Ca^{2+} au niveau des CML sans impliquer les RE.³⁷⁶ Afin de vérifier si les effets du $17\beta\text{E}$ sur la prolifération et la migration des CML sont dépendants ou indépendants des RE, nous avons utilisé des antagonistes des RE, soit le tamoxifène, le 4-OH-tamoxifène et

le raloxifène. Nous démontrons clairement que les effets inhibiteurs du 17 β E sur la prolifération et la migration des CML sont dépendants des RE puisque les différents antagonistes bloquent les actions du 17 β E. Il est bien connu que le PDGF, via son récepteur tyrosine kinase, active les voies des MAPKs dont ERK-1 et -2, protéines impliquées dans la prolifération des cellules.³⁷⁷ L'activité de la p38 MAPK induite par le PDGF est aussi impliquée dans la migration des CML.³⁷⁸ Par nos études, nous démontrons que le PDGF-BB induit rapidement la phosphorylation de la p42/44 et de la p38 MAPK après 5 et 30 minutes de stimulation respectivement. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des estrogènes sur l'inhibition de la prolifération et la migration des CML, nous avons traité pendant des temps très courts les CML au 17 β E afin d'étudier les effets nongénomiques des estrogènes. Nos résultats indiquent que le traitement de 30 minutes au 17 β E, avant une stimulation au PDGF, réduit la phosphorylation des trois MAPKs au niveau des CML. D'autres études ont rapporté que les estrogènes conjugués utilisés en clinique avaient la capacité d'inhiber la prolifération des CML humaines en réduisant l'activité de la p42/44 MAPK.³⁷⁹ Notre étude démontre que le 17 β E possède une activité nongénomique sur des mécanismes intracellulaires au niveau des CML. Cependant, une autre étude a montré que le 17 β E inhibe la phosphorylation de ERK-1 et -2 au niveau des CML de rat sans pour autant affecter les voies de la p38 MAPK et JNK.³⁸⁰ D'autres médiateurs tels que l'ET-1 et l'ANG II peuvent participer à l'activation d'ERK-1 et -2 chez les CML. Ainsi, certaines expériences ont proposé que le 17 β E prévient l'activité de *c-fos* et de *c-myc*, des protéines activées via les MAPKs et inhibe la prolifération des CML humaines à la suite d'une stimulation par l'ET-1 ou l'ANG II.^{381, 382} Nous avons ensuite validé que les actions nongénomiques du 17 β E étaient toujours dépendantes des RE. Ainsi, nous démontrons que les effets rapides du 17 β E se font via les RE puisque l'ajout du tamoxifène, du 4-OH-tamoxifène et du raloxifène bloque les actions du 17 β E sur l'activité de la p42/44 et p38 MAPK induite par le PDGF-BB. Nos résultats sont en accord avec une autre étude qui rapporte que le PDGF induit la phosphorylation de la protéine Rb qui, lorsqu'elle est hyperphosphorylée, favorise la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Il semble que le traitement au 17 β E prévient cette hyperphosphorylation induite par le PDGF.³⁶⁴ Le 17 β E joue également un rôle sur d'autres molécules impliquées dans la

régulation du cycle cellulaire. En effet, les estrogènes sont associés à une diminution de l'expression de la cycline D1. Dans ces deux cas, les effets du 17 β E sur la cycline D1 et sur la phosphorylation de la protéine Rb induite par le PDGF sont dépendants des RE.³⁶⁴ Les différents antagonistes utilisés font partie de la famille des modulateurs sélectifs des RE et peuvent avoir des activités agonistes en absence d'estrogène. En effet, il a été rapporté que le tamoxifène bloque la croissance et l'induction des canaux ioniques des CML alors que le raloxifène inhibe la prolifération des CML, la production d'espèces réactives induites par l'ANG II et l'influx calcique.^{365, 383-386} Cependant, en présence de tamoxifène ou de raloxifène seul, nous n'observons aucun changement dans la phosphorylation des trois MAPKs, de la prolifération et la migration des CML induites par le PDGF-BB. Nos résultats indiquent donc que le tamoxifène et le raloxifène n'interfèrent pas dans les voies de signalisation stimulées par le PDGF.

La réendothélialisation joue un rôle crucial dans les mécanismes de la réparation vasculaire à la suite d'une intervention coronarienne. Une accélération de ce processus a pour effet de favoriser la guérison vasculaire et de réduire la formation de la resténose. Une étude clinique conduite chez des hommes en bonne santé démontre que l'administration d'estrogènes améliore la fonction endothéliale.³⁸⁷ De plus, des études dans le laboratoire du Dr Tanguay ont montré que la livraison locale de 17 β E favorise la réendothélialisation et la fonction endothéliale.^{369, 370} Nos résultats *in vitro* confirment que le 17 β E participe au processus de régénération endothéliale en augmentant la prolifération et la migration des CE de porc. Nos données ont été confirmées par une autre étude où il a été montré que les estrogènes stimulaient la prolifération des CE vasculaires de rats femelles.³⁸⁸ Nos résultats démontrent également que les effets stimulateurs du 17 β E sur la prolifération et la migration des CE de porc sont dépendants des RE puisque l'ajout d'antagonistes des RE prévient ses effets. Nos résultats expérimentaux soutiennent des données précédentes indiquant que les estrogènes favorisent la prolifération des CE humaines de cordons ombilicaux selon un mécanisme dépendant des RE.³⁸⁹ Comme dans le cas des CML, le 17 β E agit sur la voie des MAPKs au niveau des CE. Des études antérieures ont rapporté que le 17 β E stimule la p42/44 au niveau des CE humaines et la p38 MAPK au niveau de CE bovines.^{390, 391} Nous démontrons que le 17 β E induit une phosphorylation intense de la

p42/44 MAPK, après 5 minutes de stimulation et de la p38 MAPK après 30 minutes de stimulation. De plus, nos données montrent clairement que les effets nongénomiques du 17 β E sont dépendants des RE et que le traitement aux modulateurs sélectifs des RE seuls n'a pas d'effet sur l'activité de base de la p42/44 et de la p38 MAPK chez les CE de porc. Les effets de ces modulateurs sur la fonction endothéliale restent contradictoires. Ainsi, plusieurs études ont démontré que le tamoxifène, 4-OH-tamoxifène et le raloxifène exercent des effets anti-athérosclérotiques par le maintien de la fonction endothéliale alors que d'autres soutiennent qu'ils n'ont aucune action sur les marqueurs endothéliaux.³⁹²⁻³⁹⁶ Cependant, ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'utilisation d'approches, de systèmes cellulaires, de concentrations et de temps d'incubation différents.

7.2 La caractérisation du rôle des RE α et RE β dans les mécanismes de régulation de la p42/44 et p38 MAPK, de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses et endothéliales de porc

Il est maintenant bien reconnu que la majorité des effets des estrogènes (génomiques et nongénomiques) se font via leur association aux RE. Le rôle précis de chaque RE dans la guérison vasculaire n'est pas très bien compris. Des études ont démontré que le RE β est surexprimé au niveau des carotides de rat à la suite d'une lésion endovasculaire. D'autres études ont cependant rapporté une diminution de l'expression du RE α dans des artères athérosclérotiques en comparaison de vaisseaux sains. Ces données suggèrent donc que la carence en RE α favoriserait le développement de la plaque athéromateuse.³⁹⁷ Les deux RE semblent donc chacun jouer un rôle dans les différents processus vasculaires. Avec l'avènement de l'inactivation génique par recombinaison homologe, la souris est devenue un modèle clé pour l'identification des gènes et des voies impliquées dans les mécanismes d'action des RE. Ainsi, des études antérieures ont rapporté que l'absence du gène codant pour le RE α chez la souris réduisait les effets bénéfiques des estrogènes à la suite d'une blessure vasculaire.³⁹⁸ Toutefois, l'utilisation de modèle de

souris transgéniques peut occasionner des phénomènes de compensation (la perte d'un des RE entraîne une suractivité du récepteur opposé) et ainsi produire des effets non représentatifs. En effet, des études ont démontré que certaines lignées de souris transgéniques déficientes pour le gène RE α manifestaient une expression d'isoformes tronquées du RE α et ainsi les effets des estrogènes n'étaient complètement pas abolis.^{215, 398} Pour contourner ce problème, nous avons eu recours à la thérapie génique pour moduler spécifiquement sur une courte période chacun des RE au niveau des CML et des CE de porc. Cette technique nous a permis d'évaluer séparément le rôle précis que joue chaque RE dans les mécanismes intracellulaires. Un autre groupe a également utilisé la technique des antisens afin de réguler négativement les RE au niveau du cerveau de souris.³⁹⁹ Cette étude a montré que l'administration d'antisens dirigés contre l'ARN messager du RE α diminue sa production dans le cortex et l'hypothalamus de 65% après 6 heures et de 35% après 24 heures. Nos résultats démontrent une efficacité beaucoup plus grande de notre protocole expérimental utilisant les antisens qui s'explique par l'utilisation d'un modèle *in vitro* et d'un agent transfectant (lipofectamine). Dans notre modèle, nous observons que le traitement aux antisens diminue l'expression protéique du RE α et du RE β jusqu'à 97% dans les CML et les CE. Il est bien connu que les RE α et RE β forment des homodimères, mais également des hétérodimères qui influencent le recrutement de cofacteurs et la réponse aux estrogènes. Au cours de nos expériences, nous montrons que le 17 β E est capable d'induire des effets au niveau des cellules vasculaires en présence d'un seul type de RE. Nos résultats suggèrent donc que l'hétérodimérisation n'est pas nécessairement requise dans toutes les activités biologiques du 17 β E dépendant des RE. Au cours de cette deuxième étude, nous confirmons également les résultats présentés dans le premier article à ber>752</rec-number><refient la prolifération et la migration des CML induites par le PDGF. Le traitement aux antisens démontre que l'inhibition spécifiquement de l'expression protéique du RE α n'affecte pas les effets anti-mitogéniques et anti-chimiotactiques du 17 β E au niveau des CML de porc. Par contre, lorsque nous bloquons spécifiquement l'expression protéique du RE β au niveau des CML, une réduction significative est observée des effets inhibiteurs du 17 β E sur la prolifération et la migration des CML induites par le PDGF-BB. Une étude a rapporté que les estrogènes via sa liaison au RE β inhibent

l'activation de l'expression du gène de la cycline D1 impliquée dans le cycle cellulaire.²²³ Il est donc possible de penser que les estrogènes agissent au niveau des molécules régulatrices du cycle cellulaire et affectent les mécanismes liés à la prolifération des cellules. Puisque nous avons montré que les effets du 17 β E sur l'activité des MAPKs étaient dépendants des RE, nous avons évalué le rôle des RE au niveau des mécanismes de phosphorylation de la p42/44 et p38 MAPK. Nos résultats démontrent que le traitement aux antisens dirigés contre l'ARN messager du RE β prévient les effets inhibiteurs du 17 β E sur la phosphorylation de la p42/44 et p38 MAPK induite par le PDGF-BB au niveau des CML. En comparaison, l'absence de RE α n'affecte pas la capacité du 17 β E à bloquer la phosphorylation des trois MAPKs. Ainsi, nos résultats peuvent expliquer pourquoi une hypertension et une repolarisation ventriculaire prolongée sont observées chez les souris déficientes pour le gène du RE β .^{400, 401} Le remodelage touchant la paroi vasculaire implique un processus prolifératif qui inclut la migration et la prolifération des CML en réponse à l'agression mécanique, thrombotique, inflammatoire ou oxydante. L'inhibition de ce processus prolifératif pourrait en partie prévenir l'hyperplasie néointimale à la suite d'une lésion artérielle. Des études *in vivo* ont démontré que le 17 β E reste capable de diminuer l'épaississement de la média à la suite d'une blessure au niveau des carotides chez la souris déficiente pour le gène du RE α .^{402, 403} Cette étude propose donc que les effets des estrogènes au niveau de la prolifération et migration des CML soient principalement liés au RE β . Toutefois, ce même groupe a rapporté que le 17 β E a la capacité d'inhiber l'épaisseur de la média dans ce même modèle de blessure artérielle chez la souris déficiente pour le gène du RE β . Ces données suggèrent donc que les RE α participent également à la prévention de l'hyperplasie néointimale impliquant d'autres mécanismes que la régulation de la prolifération et la migration des CML.

Le rôle des RE sur la fonction endothéliale n'était également pas connu. Il est maintenant bien établi qu'une altération de la paroi vasculaire contribue à la formation de la resténose. Plusieurs études *in vitro*, animales et humaines, ont clairement démontré que les estrogènes amélioraient la fonction endothéliale. Les données obtenues par le Dr Brouchet confirment que le RE α est essentiel à l'effet bénéfique du 17 β E sur la régénération endothéliale dans un modèle de blessure artérielle.⁴⁰³ Notre groupe a rapporté que la

livraison locale de $17\beta\text{E}$ favorisait la réendothélialisation et l'expression d'eNOS suite à l'induction d'une blessure vasculaire. Au cours de notre deuxième étude, nous avons caractérisé le rôle précis de chaque RE dans les mécanismes intracellulaires chez les CE de porc. Nous démontrons que les actions du $17\beta\text{E}$ à promouvoir la prolifération et la migration des CE sont liées à l'activation de son $\text{RE}\alpha$. En effet, le traitement aux antisens dirigés spécifiquement contre l'ARN messager du $\text{RE}\alpha$ bloque les propriétés mitogéniques et chimiotactiques du $17\beta\text{E}$ au niveau des CE. En comparaison, l'inhibition de l'expression protéique du $\text{RE}\beta$ par les antisens n'influence pas les effets stimulateurs du $17\beta\text{E}$. Une autre étude a également montré que les estrogènes n'ont plus la capacité d'induire leurs effets cardioprotecteurs chez les souris déficientes à la fois pour le gène de l'apoE et $\text{RE}\alpha$.⁴⁰⁴ Au cours de notre première étude, nous rapportons que le $17\beta\text{E}$ active la voie de la p42/44 et p38 MAPK au niveau des CE et que ses effets sont dépendants des RE. À l'aide de la thérapie génique, nous démontrons plus spécifiquement que les propriétés activatrices du $17\beta\text{E}$ sont induites par la stimulation des $\text{RE}\alpha$. En effet, le traitement aux antisens inhibe la synthèse protéique du $\text{RE}\alpha$ et prévient de façon significative l'activité de la p42/44 et p38 MAPK par le $17\beta\text{E}$. En revanche, la réduction de l'expression protéique du $\text{RE}\beta$ n'influence en rien la capacité du $17\beta\text{E}$ à induire la phosphorylation de la p42/44 et p38 MAPK chez les CE. Nos résultats montrent clairement qu'au niveau des CE, les propriétés du $17\beta\text{E}$ à induire l'activation de la p42/44 et p38 MAPK sont dépendantes de $\text{RE}\alpha$.

Nos résultats démontrent que, d'un type cellulaire à l'autre, les estrogènes agissent différemment sur de la régulation des MAPKs, la prolifération et la migration des cellules. Le $17\beta\text{E}$ inhibe ces mécanismes au niveau des CML alors qu'il les active au niveau des CE. À l'aide de la thérapie génique, nous mettons en évidence que les effets opposés du $17\beta\text{E}$ sur ces types cellulaires sont en partie dus à une implication ou une utilisation distincte des RE. De plus, nous avons été les premiers à caractériser le rôle précis de chaque RE dans la cascade de signalisation de ERK-1/-2 et p38 MAPK au niveau des CML et des CE natives de porc. Les effets inhibiteurs des estrogènes sur le CML se font via sa liaison au $\text{RE}\beta$ alors que ses effets stimulateurs sur les CE se font via son association au $\text{RE}\alpha$. D'autres études

ont également rapporté des effets opposés des RE sur un même mécanisme. En effet, les estrogènes stimulent via le RE α , mais inhibent via le RE β , l'expression du gène de la cycline D1 au niveau d'une lignée de cellules cancéreuses.²²³ De plus, d'autres expériences ont suggéré que les RE régulent différemment la transcription des gènes en se liant à l'élément de réponse AP-1. L'association du RE β et de AP-1 empêche la transcription des gènes alors qu'une interaction du RE α et de AP-1 stimule la transcription.⁴⁰⁵ Il est donc possible d'envisager que le 17 β E inhibe la prolifération et la migration des CML en partie dues aux propriétés des estrogènes à se lier à leur RE β et d'empêcher la transcription des gènes via leur association à l'élément de réponse AP-1. De même, la capacité du 17 β E à stimuler la prolifération et la migration des CE serait en partie liée à l'association des RE α à l'élément de réponse AP-1 afin d'induire la transcription.

Bien que les RE interagissent de façon opposée lorsque liés à l'élément de réponse nonclassique AP-1, le 17 β E induit des effets similaires via ses deux RE par la voie de régulation impliquant l'ERE. En effet, il a été démontré que les RE α et RE β sont capable d'induire une même réponse à l'activité des estrogènes dans trois différents mécanismes : l'inhibition de l'expression de la E-sélectine par l'IL-1 β , l'inhibition de la production d'ET-1 et l'induction d'enzymes modifiant la matrice.⁴⁰⁶ Le recrutement et les interactions des RE avec l'élément de réponse classique (l'ERE) et non classiques (l'AP-1) peuvent être différents dépendant du type cellulaire et peuvent expliquer cette divergence dans la régulation des gènes par les RE. De plus, puisque le domaine A/B pour chaque RE n'est pas homologue, l'activité d'AF-1 présente dans ce domaine est différente pour chaque RE. En effet, l'activité d'AF-1 est très importante chez le RE α alors qu'elle l'est peu chez les RE β .²⁰⁷ Les mécanismes régulateurs impliquant d'autres voies de signalisation des RE ont également été étudiés. Ainsi, les estrogènes activent la voie de la PI3K au niveau des CE. Simoncini et ses collaborateurs ont démontré que cette modulation de la voie PI3K/AKT par les estrogènes est causée par l'association du RE α à la sous-unité p85 de la PI3K, ce qui a pour effet d'activer rapidement la eNOS.⁴⁰⁷ Plusieurs études ont également proposé des rôles bien distincts pour chaque RE. En effet, le RE α et non le RE β , est responsable des effets rapides des estrogènes sur la production de NO en augmentant sa biodisponibilité.⁴⁰⁸

Cependant, d'autres ont proposé que le RE α et le RE β se colocalisent avec la eNOS au niveau des membranes des cavéoles et qu'une stimulation au 17 β E favorise l'activité biologique de la eNOS.²⁷⁷ Les effets rapides des estrogènes ont suscité un intérêt pour l'hypothèse selon laquelle les RE pouvaient se retrouver à la membrane cellulaire. La présence d'un RE α membranaire a été par la suite confirmée dans plusieurs systèmes. Cette accessibilité membranaire pourrait expliquer la relâche rapide de Ca²⁺, de la prolactine et l'activation des MAPKs en présence d'estrogènes.^{246, 409-411} Certaines de ces études suggèrent que les RE α membranaires sont identiques à ceux présents dans le cytoplasme cellulaire puisque ceux-ci sont encodés par la même séquence génomique.^{246, 412} Partant du principe que les RE nucléaires translocalisent au niveau de la membrane plasmique, il n'a pas été possible d'identifier une séquence qui permette aux RE de s'insérer à la membrane. De plus, les RE ne possèdent pas de motif homologue à un domaine catalytique ou kinase tel que retrouvé chez les récepteurs des facteurs de croissance.⁴¹³ Il a donc été proposé que les RE se comparent aux récepteurs couplés aux protéines G et s'associent avec des protéines adaptatrices Shc présentes dans le cytoplasme.⁴¹⁴

7.3 Les effets du 17 β E sur la phosphorylation de Stat1, l'expression protéique de CD40 et CD40L et l'adhésion des neutrophiles induits par l'IFN- γ au niveau des CE : implication du RE α

Le recrutement des cellules inflammatoires au site de lésion est une étape cruciale dans l'initiation et la progression de plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose. Ce processus implique la production de cytokines proinflammatoires entraînant la surexpression de molécules d'adhésion telles que la E-sélectine, la P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1. Il existe plusieurs données sur l'impact des niveaux d'estrogènes sur la production de cytokines durant la grossesse. Durant la phase lutéale du cycle menstruel où les niveaux d'estrogènes sont élevés, la réponse immune s'oriente vers une réponse de type TH2 caractérisée par l'augmentation de la production d'IL-4.⁴¹⁵ Les estrogènes semblent

donc associés à une altération du ratio TH1/TH2 en favorisant la réponse immune TH2.⁴¹⁶ En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que les niveaux de cytokines proinflammatoires tels que l'IFN- γ augmentent chez les femmes ménopausées et que la TRH prévient cette élévation.⁴¹⁷ Il a été suggéré que l'un des mécanismes potentiels par lesquels les estrogènes induisent des effets inhibiteurs de la réponse inflammatoire passait par la régulation négative des molécules d'adhésion. Des études *in vitro* ont rapporté que des doses physiologiques ou supra-physiologiques d'estrogènes réduisaient l'adhésion des monocytes sur les CE induites par une stimulation au TNF- α .⁴¹⁸ D'autres molécules telles que le CD40 et son ligand, le CD40L, sont également impliquées dans les processus inflammatoires. En effet, ces deux molécules sont induites au cours des événements initiaux de l'athérosclérose et sont des médiateurs cruciaux durant l'évolution de la plaque instable. L'interaction CD40/CD40L favorise l'adhésion des leucocytes à la surface des CE en stimulant l'expression de molécules d'adhésion.¹⁵⁰ Toutefois, les effets du 17 β E et le rôle précis des RE dans les mécanismes de régulation de CD40 et CD40L au niveau des CE en condition d'inflammation ne sont pas connus. Chez les CE humaines non stimulées, le CD40 et CD40L ne sont exprimés que minimalement alors qu'un traitement à l'IFN- γ stimule l'expression de CD40 et de CD40L.¹⁶ Cependant, la régulation négative des niveaux de CD40 par l'IFN- γ a été observée chez des fibroblastes.⁴¹⁹ Dans le troisième volet de ma thèse, nous montrons que les CE de porc, lorsque stimulées à l'IFN- γ durant 24 heures, expriment significativement plus de CD40 et de CD40L. Les estrogènes modulent l'expression de CD40 et CD40L, mais ses effets sont contradictoires en fonction des études. Tout d'abord nos résultats concordent avec les données d'une étude précédente qui a démontrée que le traitement au 17 β E diminue la relâche de cytokines proinflammatoires et réduit l'expression de CD40 au niveau des plaquettes et à la surface des cellules de la microglie à la suite d'une stimulation au LPS.^{420, 421} De récentes évidences indiquent également que les estrogènes inhibent la production de cytokines proinflammatoires TH1 telles que le TNF- α et l'IFN- γ alors qu'ils stimulent la production de cytokines anti-inflammatoires TH2 telles que l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- β .⁴²² Une étude antérieure a démontré que le 17 β E inhibe le nombre de lymphocytes activés exprimant le CD40L ainsi que leur production des cytokines inflammatoires TNF- α et IFN- γ .⁴²³ Cependant, d'autres

données rapportent que les estrogènes augmentent l'expression de CD40L dans les cellules T chez les femmes atteintes de lupus érythémateux systémique.⁴²⁴ Nos résultats démontrent qu'un traitement de 24 heures au 17 β E prévient de façon dose-dépendante l'induction de l'ARN messager et l'expression protéique de CD40 et CD40L par l'IFN- γ . Étant donné que l'expression de CD40 et le CD40L sont associées à l'athérogénèse, nous proposons que la réduction de l'expression de CD40 et CD40L par les estrogènes en condition d'inflammation a pour effet de réduire et/ou de ralentir la formation de la plaque athéromateuse en plus d'agir sur l'expression d'autres marqueurs inflammatoires tels que E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1.³⁰⁰ Puisque les estrogènes peuvent produire diverses actions indépendantes ou dépendantes de ses RE, nous avons utilisé des antagonistes des RE, soit le tamoxifène, le raloxifène et le ICI182780 pour déterminer quel mécanisme était impliqué (Annexe 1). Nos résultats démontrent que les effets du 17 β E sont dépendants de ses RE, car l'ajout d'ICI182780, un antagoniste pur des RE, bloque complètement les effets inhibiteurs du 17 β E sur l'expression de CD40 et de CD40L à la suite d'une stimulation à l'IFN- γ au niveau des CE de porc. En comparaison, l'ajout de tamoxifène et de raloxifène ne bloque que partiellement les actions du 17 β E sur l'expression protéique de CD40 et CD40L. Cette réduction partielle peut principalement s'expliquer par deux facteurs. Dans un premier temps, les propriétés agonistes et antagonistes du tamoxifène et du raloxifène peuvent affecter leurs actions sur les RE. Dans un deuxième temps, ces deux modulateurs sélectifs des RE possèdent une affinité moindre pour les RE en comparaison de 17 β E ou de l'ICI182780.¹⁷⁵ Puisque ces antagonistes ne sont pas spécifiques pour chaque RE, nous avons utilisé la thérapie génique afin de caractériser le rôle du RE α et RE β dans les mécanismes d'actions du 17 β E sur l'expression de CD40 et CD40L. À l'aide de souris déficientes pour le gène apoE, il a été défini que la capacité du 17 β E à réduire le développement de l'athérosclérose passait par l'activation du RE α .⁴⁰⁴ Les données de nos expériences avec les antisens démontrent que les effets du 17 β E sur l'induction de CD40 et CD40L par l'IFN- γ se font via sa liaison à son RE α . En comparaison, le traitement aux antisens dirigés contre l'ARN messager du RE β n'affecte pas les actions inhibitrices du 17 β E sur l'expression protéique de CD40 et CD40L. Une autre étude a rapporté que les effets anti-inflammatoires du 17 β E sur l'activité des macrophages dans le cerveau

impliquent son RE α .⁴²⁵ Puisque le RE α est impliqué dans la prolifération, la migration, l'activité de plusieurs voies de signalisation et la synthèse de la NO synthase, il semble de plus en plus évident que le RE α est le principal médiateur des effets bénéfiques des estrogènes sur les CE.

La voie de JAK-STAT a été la première cascade de signalisation des récepteurs à l'IFN qui a été identifiée. Les différents interférons induisent un signal impliquant la translocation rapide et l'initiation de la transcription des gènes au niveau du noyau par les STATs. Ces derniers doivent préalablement avoir été phosphorylés près de la membrane cellulaire en réponse à une stimulation des JAKs. Cette voie de signalisation dans la cascade d'activation des IFN est l'une des plus largement étudiées et son rôle a été fermement établi par plusieurs approches expérimentales. La voie classique de l'INF- γ implique principalement la stimulation de Stat1 comme facteur de transcription. En effet, suite à la liaison de l'IFN- γ au RIFN de type II, Jak1 et Jak2 s'activent et régulent la phosphorylation des Stat1 sur le résidu tyrosine en position 701. Cette phosphorylation provoque l'association en homodimère de Stat1 qui translocalise alors vers le noyau pour y induire la transcription des gènes. Des études passées ont révélé que la phosphorylation des protéines kinases telles que Stat1 et Stat3 était augmentée à la suite d'une blessure artérielle. L'induction de Stat1 et Stat3 moins élevée chez les souris femelles intactes en comparaison des mâles ou des femelles ovariectomisées suggère un rôle des estrogènes dans l'activité de Stat1 au niveau vasculaire.⁴²⁶ Dans le but de mieux comprendre par quel mécanisme le 17 β E bloque les effets proinflammatoires de l'IFN- γ sur l'expression protéique de CD40 et CD40L, nous avons effectué une série d'expériences sur les effets du 17 β E sur l'activation de Jak1, Jak2 et Stat1 au niveau des CE de porc. Nos résultats démontrent qu'une stimulation de 24 heures à l'IFN- γ induit une forte phosphorylation des protéines Jak1, Jak2 et du résidu tyrosine en position 701 de Stat1. Les effets de l'INF- γ sur l'activité de Stat1 sont inhibés par le traitement de 24 heures au 17 β E. Toutefois, le traitement au 17 β E n'a eu aucun effet sur la phosphorylation de Jak1 et Jak2 induits par l'IFN- γ . À l'aide de la technique d'antisens d'ODN, nous avons évalué le rôle de chaque RE dans l'activité de Stat1. En inhibant l'expression du RE α , les effets du 17 β E sur la

phosphorylation de Stat1 induite par l'IFN- γ sont abolis. En comparaison, l'inhibition de l'expression protéique du RE β n'affecte pas les propriétés du 17 β E à bloquer la phosphorylation de Stat1. Les estrogènes possèdent la capacité de réguler l'activité biologique d'autres STATs. Notamment, il a été rapporté que le 17 β E a la possibilité de supprimer, via la stimulation de son RE α , la phosphorylation de Stat5a dans le foie.⁴²⁷ Bien qu'une étude récente ait rapporté que les estrogènes réduisent l'expression de CD40 et de CD40L au niveau des plaquettes de porc, notre étude démontre clairement et pour la première fois par quels mécanismes intracellulaires et récepteurs le 17 β E induit ses effets inhibiteurs sur l'expression de CD40 et CD40L au niveau des CE.

L'infiltration des neutrophiles est une manifestation cellulaire critique de la réponse inflammatoire durant les premières étapes de la formation de la plaque athéromateuse et de la resténose. En réaction à une blessure artérielle, plusieurs médiateurs tels que les CAMs sont exprimés rapidement par les neutrophiles et les CE. Ils sont essentiels à l'interaction CE-neutrophiles et subséquentement à la migration transendothéliale. L'induction de l'expression de CD40 et de CD40L à la surface des CE contribue également à l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium.¹³⁶ Il est donc possible que les effets inhibiteurs du 17 β E sur l'expression de CD40/CD40L pourraient avoir un impact sur l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE. En premier lieu, nous avons validé le patron d'expression des deux protéines au niveau des CE et des neutrophiles. Par la suite, nous avons déterminé l'impact de l'interaction CD40/CD40L dans l'adhésion des neutrophiles sur les CE de porc. Pour ce faire, nous avons utilisé un essai d'adhésion *in vitro* et d'analyse de la myéloperoxydase, une protéine exprimée par les neutrophiles. Dans un premier temps, la stimulation des CE à l'IFN- γ pendant 24 heures augmente significativement le nombre de neutrophiles adhérents. Dans un deuxième temps, à l'aide d'un anticorps bloquant l'interaction du récepteur CD40 présent sur les CE avec le CD40L exprimé par les neutrophiles, nous prévenons de 63% l'adhésion des neutrophiles aux CE. En parallèle, en empêchant la liaison du CD40L des CE à son récepteur CD40 présent sur les neutrophiles par un anticorps spécifique, nous montrons une réduction de 56% de l'adhésion de neutrophiles à la surface de CE de porc. Toutefois, lorsque nous traitons les CE avec l'IFN- γ en présence des deux anticorps neutralisants combinés, l'adhésion des neutrophiles est

presque entièrement inhibée. Nos résultats suggèrent donc que la liaison CD40/CD40L induite par stimulation à l'IFN- γ joue un rôle primordial dans l'adhérence des neutrophiles à la surface des CE de porc. D'autres études ont démontré que le blocage efficace de CD40/CD40L par une réduction de l'expression de CD40 au niveau des CE prévient l'adhésion des leucocytes sur ces cellules.⁴²⁸ Il est bien connu que d'autres molécules telles que la P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 participent grandement à l'interaction entre les neutrophiles et les CE dans les premières heures suivant la stimulation. Cependant, dans notre système *in vitro*, nos résultats démontrent que l'adhésion des neutrophiles aux CE à la suite d'une stimulation plus longue à l'IFN- γ est principalement dépendante des liaisons entre CD40 et CD40L. Des études antérieures ont rapporté que le traitement à l'IFN- γ n'influence pas l'expression de la P-sélectine et la E-sélectine, mais augmente les niveaux de la ICAM-1 et la VCAM-1.⁴²⁹ Par contre, l'induction de la VCAM-1 par l'IFN- γ est transitoire avec un effet maximal à 4 heures.⁴³⁰ Bien que des expériences ont démontré que la liaison de CD40 au niveau des CE par son ligand stimule l'expression de diverses molécules d'adhésion telles que ICAM-1,⁴³¹ l'utilisation d'un anticorps anti-CD40 réduit drastiquement ces effets sur l'expression de ICAM-1 et ce même en présence du TNF- α .⁴³² Il est possible, qu'en bloquant les interactions CD40/CD40L, que ICAM-1 seul ne soit pas suffisant pour permettre une adhésion ferme des neutrophiles à la surface des CE. Pour ce faire, nous avons utilisé un anticorps anti-ICAM-1 afin d'évaluer l'impact d'ICAM-1 dans notre modèle *in vitro*. Nos résultats suggèrent que le blocage de ICAM-1 n'affecte que 15% de l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE. Selon des études antérieures, les effets de l'IFN- γ sur les niveaux de ICAM-1 sur deux types de CE sont très différents et ce même si ces deux types cellulaires possèdent le même nombre de récepteurs à l'IFN. De plus, il a été rapporté qu'une stimulation à l'IFN- γ porcin recombinant n'induit qu'une faible action sur l'expression de ICAM-1 au niveau des CE porcines. Nos données sont en accord avec celles d'une autre étude qui a proposé l'hypothèse de voies alternatives participant à l'adhésion des neutrophiles qui sont indépendantes de la P-sélectine ou d'ICAM-1.⁴³³ Par le passé, des résultats d'expériences ont montré que l'administration de 17 β E inhibait l'expression d'ICAM-1, une protéine en partie responsable de l'adhésion des leucocytes, protégeant ainsi le myocarde des blessures causées par l'ischémie-reperfusion.⁴³⁴ D'autres

études ont également rapporté que le 17 β E diminuait l'expression de l'ARN messager des molécules d'adhésion (P-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1), des chimioattractants (MCP-1), des cytokines proinflammatoires (IL-1, IL-6) et l'adhésion des neutrophiles dans les artères ayant subi une lésion vasculaire.⁴³⁵ Par contre, au niveau de l'endomètre, le 17 β E augmente l'adhérence des neutrophiles aux CE.⁴³⁶ Ces résultats indiquent que les estrogènes agissent différemment en fonction de la spécificité du tissu. Nous avons donc voulu évaluer les effets du 17 β E sur l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE suite à une plus longue stimulation proinflammatoire. Nos résultats démontent que le traitement de 24 heures au 17 β E réduit l'adhérence des neutrophiles au niveau des CE de porc suite à une stimulation de 24 heures à l'IFN- γ . Les effets des estrogènes sur l'adhésion des neutrophiles induits par d'autres cytokines ont également été évalués. Une étude antérieure a rapporté que le 17 β E inhibe les actions de l'IL-1 β sur l'induction de l'expression d'ICAM-1, l'activation du NF κ B et l'adhésion des leucocytes à la surface des CE cérébrales.⁴³⁷ Il a également été suggéré que les effets anti-athérosclérotiques des estrogènes par la libération du NO et de la prostacycline inhibent les actions de cytokines dans le recrutement de leucocytes.⁴³⁸ Des expériences *in vitro* ont montré que des concentrations physiologiques du 17 β E réduisent l'attraction des leucocytes polymorphonucléaires par la relâche de NO et l'augmentation intracellulaires Ca²⁺ selon un mécanisme dépendant des RE.⁴³⁹ Nos résultats concordent donc avec des données antérieures qui ont rapportées que l'administration du 17 β E réduisait les lésions causées par l'infiltration des neutrophiles selon un mécanisme impliquant les RE dans un modèle d'ischémie-reperfusion.⁴⁴⁰ Cependant, le rôle de chaque RE sur l'adhésion des neutrophiles au niveau des CE n'est pas connu. Ainsi, le traitement aux différents antisens d'ODN nous a permis de montrer que l'inhibition de l'expression du RE α au niveau des CE prévient les actions des estrogènes sur l'adhésion des neutrophiles induits par l'IFN- γ . Par contre, la régulation négative de l'expression du RE β n'affecte pas les effets inhibiteurs du 17 β E sur l'attachement des neutrophiles aux CE. Caulin-Glaser et ses collaborateurs ont également montré que l'inhibition par les estrogènes de l'expression d'ICAM-1, de VCAM-1 et d'E-sélectine induite par l'IL-1 β au niveau des CE humaines de cordons ombilicaux était dépendante des RE.³⁰⁰ Il a également été démontré dans une lignée de cellules endothéliales que la surexpression du RE α favorise significativement les

actions inhibitrices des estrogènes sur les effets du TNF- α dans l'activation du NF κ B, de l'expression de VCAM-1 et de l'adhésion de monocytes.⁴⁴¹ Finalement, nos données démontrent clairement que l'inhibition de l'expression de CD40 et de CD40L au niveau des CE concorde avec une réduction de l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE. Nos résultats pourraient donc expliquer en partie pourquoi un traitement au 17 β E prévient l'adhésion des leucocytes chez les souris déficientes pour les gènes apoE, ICAM-1 et P-sélectine.⁴⁴²

Certaines questions demeurent toutefois sans réponse. En effet, nous n'avons pas défini par quel mécanisme de régulation le RE α intervient dans l'activité de Stat1 induit par l'IFN- γ . Est-ce que les effets du 17 β E sur l'expression de CD40/CD40L et sur l'adhésion des neutrophiles seraient les mêmes suite à une stimulation à d'autres cytokines proinflammatoires? De plus, il serait intéressant d'évaluer les effets des estrogènes dans la cascade de signalisation du CD40 suite à une stimulation au CD40L. Notre laboratoire s'intéresse également aux interactions plaquettes/neutrophiles via la P-sélectine. Suite à une stimulation à l'histamine, la P-sélectine translocalise à la surface des cellules endothéliales afin d'interagir avec son ligand présent à la surface des neutrophiles. La P-sélectine peut ensuite être internalisée dans les corps de Weibel-Palade ou clivée par des protéases nécessitant une synthèse *de novo*. Il est également connu que la stimulation de CD40 induit l'expression de certaines CAM dont la P-sélectine. Il serait donc intéressant d'étudier les effets d'une stimulation de CD40 dans les mécanismes de synthèse ou de recharge de la P-sélectine au niveau des CE. De plus, des expériences préliminaires dans notre laboratoire ont montré qu'un traitement au 17 β E réduit l'expression de la P-sélectine suite à une stimulation à l'histamine à la surface des CE. Par contre, le rôle des RE au niveau de la régulation de la P-sélectine suite à un traitement à l'histamine ou au CD40L n'a pas encore été élucidé.

Conclusions

À la lumière des résultats obtenus, il nous est possible de formuler les conclusions suivantes :

- i. Un traitement au 17 β E prévient la phosphorylation de la p42/44 MAPK, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de porc via l'activation de RE β .
- ii. Un traitement au 17 β E, via son interaction avec le RE α , stimule la phosphorylation de la p42/44 MAPK, la prolifération et la migration des cellules endothéliales de porc.
- iii. Un traitement au 17 β E, en se liant au RE α , prévient l'activation de la protéine Stat1 et l'expression de l'ARN messenger et protéique du CD40 et du CD40L induite par une stimulation à l'IFN- γ .
- iv. L'interaction CD40/CD40L est le principal médiateur de l'adhésion de neutrophiles à la surface des cellules endothéliales de porc suite à une stimulation de 24 heures à l'IFN- γ .
- v. Un traitement au 17 β E inhibe l'adhésion des neutrophiles induits par l'IFN- γ à la surface des cellules endothéliales de porc et ce, via son interaction avec le RE α .

Nos résultats conduisent à une meilleure compréhension des effets régulateurs des estrogènes sur les mécanismes de formation de la resténose. Ainsi, il nous a été possible de mieux comprendre le rôle de chaque RE sur les voies d'activation des MAPKs et sur certaines propriétés anti-inflammatoires du 17 β E au niveau vasculaire.

Bibliographie

1. Wielgosz, A., Arango, M., Carew, M., Ferguson, A., Johansen, H., Nair, C., Phillips, S., Reeder, B., Wilson, E., Zelmer, J., *Le nouveau visage des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada 2000*, Fondation des Maladies du Coeur du Canada, 1999; Octobre:1-110
2. Hanke, H., Lenz, C., Finking, G., *The discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis--a review*, Acta Chir Belg, 2001; 101:162-9
3. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*, N Engl J Med, 1999; 340:115-26.
4. Leopold, J. A., Loscalzo, J., *Clinical importance of understanding vascular biology*, Cardiol Rev, 2000; 8:115-23
5. Davignon, J., Ganz, P., *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*, Circulation, 2004; 109:III27-32
6. Russo, G., Leopold, J. A., Loscalzo, J., *Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis*, Vascul Pharmacol, 2002; 38:259-69
7. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*, J Biol Chem, 1997; 272:20963-6
8. Chisolm, G. M., Steinberg, D., *The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview*, Free Radic Biol Med, 2000; 28:1815-26
9. Chisolm, G. M., 3rd, Hazen, S. L., Fox, P. L., Cathcart, M. K., *The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms*, J Biol Chem, 1999; 274:25959-62
10. Boullier, A., Bird, D. A., Chang, M. K., Dennis, E. A., Friedman, P., Gillotre-Taylor, K., Horkko, S., Palinski, W., Quehenberger, O., Shaw, P., Steinberg, D.,

- Terpstra, V., Witztum, J. L., *Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis*, Ann N Y Acad Sci, 2001; 947:214-22; discussion 22-3
11. Glass, C. K., Witztum, J. L., *Atherosclerosis. the road ahead*, Cell, 2001; 104:503-16
 12. Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I. F., *Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*, Nature, 1998; 394:894-7
 13. Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C. H., Young, S. G., Rollins, B. J., Charo, I. F., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*, J Clin Invest, 1999; 103:773-8
 14. de Winther, M. P., van Dijk, K. W., Havekes, L. M., Hofker, M. H., *Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000; 20:290-7
 15. Smith, J. D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., Miyata, M., *Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995; 92:8264-8
 16. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Bourcier, T., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S., Libby, P., *Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1997; 94:1931-6
 17. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Majeau, G. R., Fiers, W., Cotran, R. S., Gimbrone, M. A., Jr., *Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1986; 83:4533-7

18. Scarpati, E. M., Sadler, J. E., *Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate 13-acetate and tumor necrosis factor*, J Biol Chem, 1989; 264:20705-13
19. Opal, S. M., DePalo, V. A., *Anti-inflammatory cytokines*, Chest, 2000; 117:1162-72
20. Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W., Libby, P., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*, J Clin Invest, 1994; 94:2493-503
21. Friedman, M., *Pathogenesis of coronary thrombosis, intramural and intraluminal hemorrhage*, Adv Cardiol, 1970; 4:20-46
22. Davies, M. J., Thomas, A., *Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death*, N Engl J Med, 1984; 310:1137-40
23. Falk, E., *Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi*, Br Heart J, 1983; 50:127-34
24. Forrester, J. S., *Prevention of plaque rupture: a new paradigm of therapy*, Ann Intern Med, 2002; 137:823-33
25. Felton, C. V., Crook, D., Davies, M. J., Oliver, M. F., *Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997; 17:1337-45
26. Chen, Y. H., Chen, Y. L., Lin, S. J., Chou, C. Y., Mar, G. Y., Chang, M. S., Wang, S. P., *Electron microscopic studies of phenotypic modulation of smooth muscle cells in coronary arteries of patients with unstable angina pectoris and postangioplasty restenosis*, Circulation, 1997; 95:1169-75

27. Tedgui, A., Mallat, Z., *Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall*, Circ Res, 2001; 88:877-87
28. Bennett, M. R., Evan, G. I., Schwartz, S. M., *Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques*, J Clin Invest, 1995; 95:2266-74
29. Henderson, E. L., Geng, Y. J., Sukhova, G. K., Whittemore, A. D., Knox, J., Libby, P., *Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms*, Circulation, 1999; 99:96-104
30. Damas, J. K., Waehre, T., Yndestad, A., Otterdal, K., Hognestad, A., Solum, N. O., Gullestad, L., Froland, S. S., Aukrust, P., *Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets*, Circulation, 2003; 107:2670-6
31. Falk, E., Shah, P. K., Fuster, V., *Coronary plaque disruption*, Circulation, 1995; 92:657-71
32. Heeschen, C., Dimmeler, S., Hamm, C. W., Fichtlscherer, S., Boersma, E., Simoons, M. L., Zeiher, A. M., *Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes*, Circulation, 2003; 107:2109-14
33. Wagner, D. D., Burger, P. C., *Platelets in inflammation and thrombosis*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003; 23:2131-7
34. Gruntzig, A., *Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis*, Lancet, 1978; 1:263
35. Timmis, S. B., Burns, W. J., Hermiller, J. B., Parker, M. A., Meyers, S. N., Davidson, C. J., *Influence of coronary atherosclerotic remodeling on the mechanism of balloon angioplasty*, Am Heart J, 1997; 134:1099-106

36. Kastrati, A., Mehilli, J., Dirschinger, J., Pache, J., Ulm, K., Schuhlen, H., Seyfarth, M., Schmitt, C., Blasini, R., Neumann, F. J., Schomig, A., *Restenosis after coronary placement of various stent types*, Am J Cardiol, 2001; 87:34-9
37. Albiero, R., Nishida, T., Karvouni, E., Corvaja, N., Vaghetti, M., Di Mario, C., Colombo, A., *Cutting balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis*, Catheter Cardiovasc Interv, 2000; 50:452-9
38. Giri, S., Ito, S., Lansky, A. J., Mehran, R., Margolis, J., Gilmore, P., Garratt, K. N., Cummins, F., Moses, J., Rentrop, P., Oesterle, S., Power, J., Kent, K. M., Satler, L. F., Pichard, A. D., Wu, H., Greenberg, A., Bucher, T. A., Kerker, W., Abizaid, A. S., Saucedo, J., Leon, M. B., Popma, J. J., *Clinical and angiographic outcome in the laser angioplasty for restenotic stents (LARS) multicenter registry*, Catheter Cardiovasc Interv, 2001; 52:24-34
39. Dangas, G., Fuster, V., *Management of restenosis after coronary intervention*, Am Heart J, 1996; 132:428-36
40. Karthikeyan, G., Bhargava, B., *Prevention of restenosis after coronary angioplasty*, Curr Opin Cardiol, 2004; 19:500-9
41. Kipshidze, N., Dangas, G., Tsapenko, M., Moses, J., Leon, M. B., Kutryk, M., Serruys, P., *Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions*, J Am Coll Cardiol, 2004; 44:733-9
42. Schwartz, L., Bourassa, M. G., Lesperance, J., Aldridge, H. E., Kazim, F., Salvatori, V. A., Henderson, M., Bonan, R., David, P. R., *Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty*, N Engl J Med, 1988; 318:1714-9
43. Schomig, A., Neumann, F. J., Walter, H., Schuhlen, H., Hadamitzky, M., Zitzmann-Roth, E. M., Dirschinger, J., Hausleiter, J., Blasini, R., Schmitt, C., Alt, E., Kastrati,

- A., *Coronary stent placement in patients with acute myocardial infarction: comparison of clinical and angiographic outcome after randomization to antiplatelet or anticoagulant therapy*, *J Am Coll Cardiol*, 1997; 29:28-34
44. *Acute platelet inhibition with abciximab does not reduce in-stent restenosis (ERASER study)*. The ERASER Investigators, *Circulation*, 1999; 100:799-806
45. Bornfeldt, K. E., Raines, E. W., Nakano, T., Graves, L. M., Krebs, E. G., Ross, R., *Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation*, *J Clin Invest*, 1994; 93:1266-74
46. Uchida, K., Sasahara, M., Morigami, N., Hazama, F., Kinoshita, M., *Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries*, *Atherosclerosis*, 1996; 124:9-23
47. Lee, M. S., David, E. M., Makkar, R. R., Wilentz, J. R., *Molecular and cellular basis of restenosis after percutaneous coronary intervention: the intertwining roles of platelets, leukocytes, and the coagulation-fibrinolysis system*, *J Pathol*, 2004; 203:861-70
48. Sirois, M. G., Simons, M., Edelman, E. R., *Antisense oligonucleotide inhibition of PDGFR-beta receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening*, *Circulation*, 1997; 95:669-76
49. Ward, M. R., Sasahara, T., Agrotis, A., Dilley, R. J., Jennings, G. L., Bobik, A., *Inhibitory effects of tranilast on expression of transforming growth factor-beta isoforms and receptors in injured arteries*, *Atherosclerosis*, 1998; 137:267-75
50. Wolf, Y. G., Rasmussen, L. M., Ruoslahti, E., *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model*, *J Clin Invest*, 1994; 93:1172-8

51. Alessi, M. C., Juhan-Vague, I., *Contribution of PAI-1 in cardiovascular pathology*, Arch Mal Coeur Vaiss, 2004; 97:673-8
52. Carmeliet, P., Stassen, J. M., Schoonjans, L., Ream, B., van den Oord, J. J., De Mol, M., Mulligan, R. C., Collen, D., *Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis*, J Clin Invest, 1993; 92:2756-60
53. Lee, H. B., Ha, H., *Plasminogen activator inhibitor-1 and diabetic nephropathy*, Nephrology (Carlton), 2005; 10 Suppl 2:S11-3
54. McMahon, G. A., Petitclerc, E., Stefansson, S., Smith, E., Wong, M. K., Westrick, R. J., Ginsburg, D., Brooks, P. C., Lawrence, D. A., *Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis*, J Biol Chem, 2001; 276:33964-8
55. Sato, Y., Asada, Y., Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Sumiyoshi, A., *Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells*, Thromb Haemost, 1996; 75:389-92
56. Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K., Ruf, W., *The structural biology of expression and function of tissue factor*, Thromb Haemost, 1991; 66:67-79
57. Markovitz, J. H., Roubin, G. S., Parks, J. M., Bittner, V., *Platelet activation and restenosis after coronary stenting: flow cytometric detection of wound-induced platelet activation*, Coron Artery Dis, 1996; 7:657-65
58. Weyrich, A. S., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., *Platelets, endothelial cells, inflammatory chemokines, and restenosis: complex signaling in the vascular play book*, Circulation, 2002; 106:1433-5

59. Ihida, K., Predescu, D., Czekay, R. P., Palade, G. E., *Platelet activating factor receptor (PAF-R) is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells*, J Cell Sci, 1999; 112 (Pt 3):285-95
60. Montrucchio, G., Alloatti, G., Camussi, G., *Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology*, Physiol Rev, 2000; 80:1669-99
61. Lorant, D. E., Topham, M. K., Whatley, R. E., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., *Inflammatory roles of P-selectin*, J Clin Invest, 1993; 92:559-70
62. Steinberg, D., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis*, Circulation, 1997; 95:1062-71
63. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D., Lusis, A. J., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*, Circulation, 1995; 91:2488-96
64. Kohno, M., Yokokawa, K., Yasunari, K., Minami, M., Kano, H., Hanehira, T., Yoshikawa, J., *Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration*, Circulation, 1998; 98:353-9
65. Bartkova, J., Gron, B., Dabelsteen, E., Bartek, J., *Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing*, Arch Oral Biol, 2003; 48:125-32
66. Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A., *Cell cycle and apoptosis*, Neoplasia, 2000; 2:291-9
67. Morgan, D. O., *Principles of CDK regulation*, Nature, 1995; 374:131-4
68. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*, Genes Dev, 1998; 12:2245-62

69. Harbour, J. W., Dean, D. C., *Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis*, Nat Cell Biol, 2000; 2:E65-7
70. Smits, V. A., Medema, R. H., *Checking out the G(2)/M transition*, Biochim Biophys Acta, 2001; 1519:1-12
71. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., *14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression*, Mol Cell, 1997; 1:3-11
72. Bunz, F., Dutriax, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*, Science, 1998; 282:1497-501
73. Zhang, W., Liu, H. T., *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*, Cell Res, 2002; 12:9-18
74. Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M. H., *MAP kinases*, Chem Rev, 2001; 101:2449-76
75. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*, Endocr Rev, 2001; 22:153-83
76. Seger, R., Krebs, E. G., *The MAPK signaling cascade*, Faseb J, 1995; 9:726-35
77. Farooq, A., Zhou, M. M., *Structure and regulation of MAPK phosphatases*, Cell Signal, 2004; 16:769-79
78. Kyriakis, J. M., Avruch, J., *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*, Physiol Rev, 2001; 81:807-69

79. Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R., Kolettis, G. J., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*, N Engl J Med, 1987; 316:1371-5
80. McPherson, D. D., Sirna, S. J., Hiratzka, L. F., Thorpe, L., Armstrong, M. L., Marcus, M. L., Kerber, R. E., *Coronary arterial remodeling studied by high-frequency epicardial echocardiography: an early compensatory mechanism in patients with obstructive coronary atherosclerosis*, J Am Coll Cardiol, 1991; 17:79-86
81. Sukhova, G. K., Schonbeck, U., Rabkin, E., Schoen, F. J., Poole, A. R., Billingham, R. C., Libby, P., *Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques*, Circulation, 1999; 99:2503-9
82. Lemaitre, V., O'Byrne, T. K., Borczuk, A. C., Okada, Y., Tall, A. R., D'Armiento, J., *ApoE knockout mice expressing human matrix metalloproteinase-1 in macrophages have less advanced atherosclerosis*, J Clin Invest, 2001; 107:1227-34
83. Costa, M. A., Sabate, M., van der Giessen, W. J., Kay, I. P., Cervinka, P., Ligthart, J. M., Serrano, P., Coen, V. L., Levendag, P. C., Serruys, P. W., *Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy*, Circulation, 1999; 100:789-92
84. Waksman, R., Ajani, A. E., White, R. L., Pinnow, E., Dieble, R., Bui, A. B., Taaffe, M., Gruberg, L., Mintz, G. S., Satler, L. F., Pichard, A. D., Kent, K. K., Lindsay, J., *Prolonged antiplatelet therapy to prevent late thrombosis after intracoronary gamma-radiation in patients with in-stent restenosis: Washington Radiation for In-Stent Restenosis Trial plus 6 months of clopidogrel (WRIST PLUS)*, Circulation, 2001; 103:2332-5
85. Lee, M., Simon, A. D., Stein, C. A., Rabbani, L. E., *Antisense strategies to inhibit restenosis*, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1999; 9:487-92

86. Askari, F. K., McDonnell, W. M., *Antisense-oligonucleotide therapy*, N Engl J Med, 1996; 334:316-8.
87. Kipshidze, N. N., Kim, H. S., Iversen, P., Yazdi, H. A., Bhargava, B., New, G., Mehran, R., Tio, F., Haudenschild, C., Dangas, G., Stone, G. W., Iyer, S., Roubin, G. S., Leon, M. B., Moses, J. W., *Intramural coronary delivery of advanced antisense oligonucleotides reduces neointimal formation in the porcine stent restenosis model*, J Am Coll Cardiol, 2002; 39:1686-91
88. Kutryk, M. J., Foley, D. P., van den Brand, M., Hamburger, J. N., van der Giessen, W. J., deFeyter, P. J., Bruining, N., Sabate, M., Serruys, P. W., *Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial*, J Am Coll Cardiol, 2002; 39:281-7
89. Varenne, O., Pislaru, S., Gillijns, H., Van Pelt, N., Gerard, R. D., Zoldhelyi, P., Van de Werf, F., Collen, D., Janssens, S. P., *Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs*, Circulation, 1998; 98:919-26
90. Yla-Herttuala, S., Martin, J. F., *Cardiovascular gene therapy*, Lancet, 2000; 355:213-22
91. Crook, M. F., Akyurek, L. M., *Gene transfer strategies to inhibit neointima formation*, Trends Cardiovasc Med, 2003; 13:102-6
92. Moses, J. W., Leon, M. B., Popma, J. J., Fitzgerald, P. J., Holmes, D. R., O'Shaughnessy, C., Caputo, R. P., Kereiakes, D. J., Williams, D. O., Teirstein, P. S., Jaeger, J. L., Kuntz, R. E., *Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery*, N Engl J Med, 2003; 349:1315-23

93. Stone, G. W., Ellis, S. G., Cox, D. A., Hermiller, J., O'Shaughnessy, C., Mann, J. T., Turco, M., Caputo, R., Bergin, P., Greenberg, J., Popma, J. J., Russell, M. E., *A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease*, N Engl J Med, 2004; 350:221-31
94. Schwartz, R. S., Chronos, N. A., Virmani, R., *Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn*, J Am Coll Cardiol, 2004; 44:1373-85
95. Callow, A. D., Choi, E. T., Trachtenberg, J. D., Stevens, S. L., Connolly, D. T., Rodi, C., Ryan, U. S., *Vascular permeability factor accelerates endothelial regrowth following balloon angioplasty*, Growth Factors, 1994; 10:223-8
96. Van Belle, E., Tio, F. O., Couffinhal, T., Maillard, L., Passeri, J., Isner, J. M., *Stent endothelialization. Time course, impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition*, Circulation, 1997; 95:438-48
97. Van Belle, E., Tio, F. O., Chen, D., Maillard, L., Kearney, M., Isner, J. M., *Passivation of metallic stents after arterial gene transfer of phVEGF165 inhibits thrombus formation and intimal thickening*, J Am Coll Cardiol, 1997; 29:1371-9
98. Swanson, N., Hogrefe, K., Javed, Q., Malik, N., Gershlick, A. H., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-eluting stents: in vivo effects on thrombosis, endothelialization and intimal hyperplasia*, J Invasive Cardiol, 2003; 15:688-92
99. Nabel, E. G., Plautz, G., Boyce, F. M., Stanley, J. C., Nabel, G. J., *Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall*, Science, 1989; 244:1342-4
100. Thompson, M. M., Budd, J. S., Eady, S. L., Allen, K. E., James, M., James, R. F., Bell, P. R., *Endothelial cell seeding of damaged native vascular surfaces: prostacyclin production*, Eur J Vasc Surg, 1992; 6:487-93

101. Conte, M. S., Birinyi, L. K., Miyata, T., Fallon, J. T., Gold, H. K., Whittemore, A. D., Mulligan, R. C., *Efficient repopulation of denuded rabbit arteries with autologous genetically modified endothelial cells*, *Circulation*, 1994; 89:2161-9
102. Szmitko, P. E., Fedak, P. W., Weisel, R. D., Stewart, D. J., Kutryk, M. J., Verma, S., *Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart*, *Circulation*, 2003; 107:3093-100
103. Kong, D., Melo, L. G., Mangi, A. A., Zhang, L., Lopez-Illasaca, M., Perrella, M. A., Liew, C. C., Pratt, R. E., Dzau, V. J., *Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells*, *Circulation*, 2004; 109:1769-75
104. Goldschmidt-Clermont, P. J., *Loss of bone marrow-derived vascular progenitor cells leads to inflammation and atherosclerosis*, *Am Heart J*, 2003; 146:S5-12
105. Ong, A. T., Aoki, J., Kutryk, M. J., Serruys, P. W., *How to accelerate the endothelialization of stents*, *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005; 98:123-6
106. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*, *Nature*, 2002; 420:868-74
107. Libby, P., Ridker, P. M., Maseri, A., *Inflammation and atherosclerosis*, *Circulation*, 2002; 105:1135-43
108. Rossi, D., Zlotnik, A., *The biology of chemokines and their receptors*, *Annu Rev Immunol*, 2000; 18:217-42
109. Merrill, J. E., Benveniste, E. N., *Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful*, *Trends Neurosci*, 1996; 19:331-8
110. Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., Boldin, M. P., *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms*, *Annu Rev Immunol*, 1999; 17:331-67

111. Boisvert, W. A., *Modulation of atherogenesis by chemokines*, Trends Cardiovasc Med, 2004; 14:161-5
112. Young, J. L., Libby, P., Schonbeck, U., *Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis*, Thromb Haemost, 2002; 88:554-67
113. Molony, L., Armstrong, L., *Cytoskeletal reorganizations in human umbilical vein endothelial cells as a result of cytokine exposure*, Exp Cell Res, 1991; 196:40-8
114. Brett, J., Gerlach, H., Nawroth, P., Steinberg, S., Godman, G., Stern, D., *Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins*, J Exp Med, 1989; 169:1977-91
115. Koga, S., Morris, S., Ogawa, S., Liao, H., Bilezikian, J. P., Chen, G., Thompson, W. J., Ashikaga, T., Brett, J., Stern, D. M., et al., *TNF modulates endothelial properties by decreasing cAMP*, Am J Physiol, 1995; 268:C1104-13
116. Gotsch, U., Jager, U., Dominis, M., Vestweber, D., *Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo*, Cell Adhes Commun, 1994; 2:7-14
117. Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N., Brandtzaeg, P., *Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells*, J Immunol, 1996; 156:2558-65
118. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*, Nat Rev Cancer, 2002; 2:420-30
119. Pestka, S., *The interferon receptors*, Semin Oncol, 1997; 24:S9-18-S9-40
120. Plataniias, L. C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*, Nat Rev Immunol, 2005; 5:375-86

121. Uze, G., Lutfalla, G., Gresser, I., *Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA*, Cell, 1990; 60:225-34
122. Bach, E. A., Aguet, M., Schreiber, R. D., *The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling*, Annu Rev Immunol, 1997; 15:563-91
123. Schindler, C., Darnell, J. E., Jr., *Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway*, Annu Rev Biochem, 1995; 64:621-51
124. Lemmon, M. A., Schlessinger, J., *Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization*, Trends Biochem Sci, 1994; 19:459-63
125. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R., Silverman, R. H., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95:15623-8
126. Ihle, J. N., *Cytokine receptor signalling*, Nature, 1995; 377:591-4
127. Pellegrini, S., Dusanter-Fourt, I., *The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs)*, Eur J Biochem, 1997; 248:615-33
128. Ihle, J. N., Kerr, I. M., *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*, Trends Genet, 1995; 11:69-74
129. Ihle, J. N., *STATs: signal transducers and activators of transcription*, Cell, 1996; 84:331-4
130. Van Kooten, C., Banchereau, J., *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*, Adv Immunol, 1996; 61:1-77
131. Grewal, I. S., Flavell, R. A., *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*, Annu Rev Immunol, 1998; 16:111-35

132. Clark, L. B., Foy, T. M., Noelle, R. J., *CD40 and its ligand*, Adv Immunol, 1996; 63:43-78
133. Schonbeck, U., Mach, F., Libby, P., *CD154 (CD40 ligand)*, Int J Biochem Cell Biol, 2000; 32:687-93
134. Schonbeck, U., Libby, P., *CD40 signaling and plaque instability*, Circ Res, 2001; 89:1092-103
135. Schonbeck, U., Libby, P., *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*, Cell Mol Life Sci, 2001; 58:4-43
136. Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., Kroczeck, R. A., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*, Nature, 1998; 391:591-4
137. Krzesz, R., Wagner, A. H., Cattaruzza, M., Hecker, M., *Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappaB and signal transducer and activation of transcription-1*, FEBS Lett, 1999; 453:191-6
138. Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C., Kroczeck, R. A., *A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation*, Eur J Immunol, 1995; 25:1749-54
139. Morris, A. E., Remmele, R. L., Jr., Klinke, R., Macduff, B. M., Fanslow, W. C., Armitage, R. J., *Incorporation of an isoleucine zipper motif enhances the biological activity of soluble CD40L (CD154)*, J Biol Chem, 1999; 274:418-23
140. Inui, S., Kaisho, T., Kikutani, H., Stamenkovic, I., Seed, B., Clark, E. A., Kishimoto, T., *Identification of the intracytoplasmic region essential for signal transduction through a B cell activation molecule, CD40*, Eur J Immunol, 1990; 20:1747-53

141. Karmann, K., Min, W., Fanslow, W. C., Pober, J. S., *Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1*, J Exp Med, 1996; 184:173-82
142. Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Atkinson, E., Libby, P., *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling*, Nature, 1998; 394:200-3
143. Ruedl, C., Bachmann, M. F., Kopf, M., *The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand*, Eur J Immunol, 2000; 30:2056-64
144. Mosca, P. J., Hobeika, A. C., Clay, T. M., Nair, S. K., Thomas, E. K., Morse, M. A., Lysterly, H. K., *A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment*, Blood, 2000; 96:3499-504
145. Weiler, M., Kachko, L., Chaimovitz, C., Van Kooten, C., Douvdevani, A., *CD40 ligation enhances IL-15 production by tubular epithelial cells*, J Am Soc Nephrol, 2001; 12:80-7
146. Sugiura, T., Kawaguchi, Y., Harigai, M., Takagi, K., Ohta, S., Fukasawa, C., Hara, M., Kamatani, N., *Increased CD40 expression on muscle cells of polymyositis and dermatomyositis: role of CD40-CD40 ligand interaction in IL-6, IL-8, IL-15, and monocyte chemoattractant protein-1 production*, J Immunol, 2000; 164:6593-600
147. Ribbens, C., Dayer, J. M., Chizzolini, C., *CD40-CD40 ligand (CD154) engagement is required but may not be sufficient for human T helper 1 cell induction of interleukin-2- or interleukin-15-driven, contact-dependent, interleukin-1beta production by monocytes*, Immunology, 2000; 99:279-86
148. Wagner, D. H., Jr., Stout, R. D., Suttles, J., *Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4+ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis*, Eur J Immunol, 1994; 24:3148-54

149. Brossart, P., Zobywalski, A., Grunebach, F., Behnke, L., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Kanz, L., Brugger, W., *Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells*, *Cancer Res*, 2000; 60:4485-92
150. Thienel, U., Loike, J., Yellin, M. J., *CD154 (CD40L) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets*, *Cell Immunol*, 1999; 198:87-95
151. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., *Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions*, *J Clin Invest*, 1996; 98:1699-702
152. Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., Juliano, R. L., *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins*, *Pharmacol Rev*, 1998; 50:197-263
153. Lawrence, M. B., Kansas, G. S., Kunkel, E. J., Ley, K., *Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)*, *J Cell Biol*, 1997; 136:717-27
154. Kansas, G. S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*, *Blood*, 1996; 88:3259-87
155. Vestweber, D., Blanks, J. E., *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*, *Physiol Rev*, 1999; 79:181-213
156. Smolen, J. E., Petersen, T. K., Koch, C., O'Keefe, S. J., Hanlon, W. A., Seo, S., Pearson, D., Fossett, M. C., Simon, S. I., *L-selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase*, *J Biol Chem*, 2000; 275:15876-84

157. Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., Engel, P., *The selectins: vascular adhesion molecules*, *Faseb J*, 1995; 9:866-73
158. Steegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H. P., Kleuser, B., Vestweber, D., *The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor*, *Nature*, 1995; 373:615-20
159. Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J., Collins, T., *Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways*, *J Biol Chem*, 1997; 272:2753-61
160. Yoshida, M., Westlin, W. F., Wang, N., Ingber, D. E., Rosenzweig, A., Resnick, N., Gimbrone, M. A., Jr., *Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton*, *J Cell Biol*, 1996; 133:445-55
161. Simon, S. I., Hu, Y., Vestweber, D., Smith, C. W., *Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway*, *J Immunol*, 2000; 164:4348-58
162. Kunkel, E. J., Jung, U., Bullard, D. C., Norman, K. E., Wolitzky, B. A., Vestweber, D., Beaudet, A. L., Ley, K., *Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1*, *J Exp Med*, 1996; 183:57-65
163. Manka, D., Collins, R. G., Ley, K., Beaudet, A. L., Sarembock, I. J., *Absence of p-selectin, but not intercellular adhesion molecule-1, attenuates neointimal growth after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice*, *Circulation*, 2001; 103:1000-5
164. McCafferty, D. M., Kanwar, S., Granger, D. N., Kubes, P., *E/P-selectin-deficient mice: an optimal mutation for abrogating antigen but not tumor necrosis factor-alpha-induced immune responses*, *Eur J Immunol*, 2000; 30:2362-71

165. Yusuf-Makagiansar, H., Anderson, M. E., Yakovleva, T. V., Murray, J. S., Siahaan, T. J., *Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases*, Med Res Rev, 2002; 22:146-67
166. Kim, I., Moon, S. O., Kim, S. H., Kim, H. J., Koh, Y. S., Koh, G. Y., *Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells*, J Biol Chem, 2001; 276:7614-20
167. Wong, D., Prameya, R., Dorovini-Zis, K., *In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1*, J Neuropathol Exp Neurol, 1999; 58:138-52
168. Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Serrador, J. M., Montoya, M. C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., Sanchez-Madrid, F., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*, J Cell Biol, 2002; 157:1233-45
169. Hood, J. D., Cheresh, D. A., *Role of integrins in cell invasion and migration*, Nat Rev Cancer, 2002; 2:91-100
170. Sheppard, D., *In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice*, Matrix Biol, 2000; 19:203-9
171. Giancotti, F. G., *Complexity and specificity of integrin signalling*, Nat Cell Biol, 2000; 2:E13-4
172. Takagi, J., Springer, T. A., *Integrin activation and structural rearrangement*, Immunol Rev, 2002; 186:141-63

173. Allport, J. R., Muller, W. A., Luscinskas, F. W., *Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow*, J Cell Biol, 2000; 148:203-16
174. Barrett-Connor, E., Grady, D., Stefanick, M. L., *The rise and fall of menopausal hormone therapy*, Annu Rev Public Health, 2005; 26:115-40
175. Gruber, C. J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J. C., *Production and actions of estrogens*, N Engl J Med, 2002; 346:340-52.
176. Edwards, D. P., *Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone*, Annu Rev Physiol, 2005; 67:335-76
177. Barrett-Connor, E., Grady, D., *Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations*, Annu Rev Public Health, 1998; 19:55-72
178. Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C., Manson, J. E., Rosner, B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H., *Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study*, N Engl J Med, 1991; 325:756-62
179. Grady, D., Rubin, S. M., Petitti, D. B., Fox, C. S., Black, D., Ettinger, B., Ernster, V. L., Cummings, S. R., *Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women*, Ann Intern Med, 1992; 117:1016-37
180. Stampfer, M. J., Colditz, G. A., *Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence*, Prev Med, 1991; 20:47-63
181. Rijpkema, A. H., van der Sanden, A. A., Ruijs, A. H., *Effects of post-menopausal oestrogen-progestogen replacement therapy on serum lipids and lipoproteins: a review*, Maturitas, 1990; 12:259-85

182. Grodstein, F., Manson, J. E., Colditz, G. A., Willett, W. C., Speizer, F. E., Stampfer, M. J., *A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease*, *Ann Intern Med*, 2000; 133:933-41
183. Bush, T. L., *The epidemiology of cardiovascular disease in postmenopausal women*, *Ann N Y Acad Sci*, 1990; 592:263-71; discussion 334-45
184. Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., Vittinghoff, E., *Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group*, *Jama*, 1998; 280:605-13.
185. Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., Hsia, J., Hulley, S., Herd, A., Khan, S., Newby, L. K., Waters, D., Vittinghoff, E., Wenger, N., *Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II)*, *Jama*, 2002; 288:49-57.
186. Herrington, D. M., Reboussin, D. M., Brosnihan, K. B., Sharp, P. C., Shumaker, S. A., Snyder, T. E., Furberg, C. D., Kowalchuk, G. J., Stuckey, T. D., Rogers, W. J., Givens, D. H., Waters, D., *Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis*, *N Engl J Med*, 2000; 343:522-9.
187. Viscoli, C. M., Brass, L. M., Kernan, W. N., Sarrel, P. M., Suissa, S., Horwitz, R. I., *A clinical trial of estrogen-replacement therapy after ischemic stroke*, *N Engl J Med*, 2001; 345:1243-9.
188. Hodis, H. N., Mack, W. J., Azen, S. P., Lobo, R. A., Shoupe, D., Mahrer, P. R., Faxon, D. P., Cashin-Hemphill, L., Sanmarco, M. E., French, W. J., Shook, T. L., Gaarder, T. D., Mehra, A. O., Rabbani, R., Sevanian, A., Shil, A. B., Torres, M., Vogelbach, K. H., Selzer, R. H., *Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women*, *N Engl J Med*, 2003; 349:535-45

189. Angerer, P., Stork, S., Kothny, W., Schmitt, P., von Schacky, C., *Effect of oral postmenopausal hormone replacement on progression of atherosclerosis : a randomized, controlled trial*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001; 21:262-8.
190. Kelemen, M., Vaidya, D., Waters, D. D., Howard, B. V., Cobb, F., Younes, N., Tripputti, M., Ouyang, P., *Hormone therapy and antioxidant vitamins do not improve endothelial vasodilator function in postmenopausal women with established coronary artery disease: a substudy of the Women's Angiographic Vitamin and Estrogen (WAVE) trial*, *Atherosclerosis*, 2005; 179:193-200
191. Clarke, S. C., Kelleher, J., Lloyd-Jones, H., Slack, M., Schofield, P. M., *A study of hormone replacement therapy in postmenopausal women with ischaemic heart disease: the Papworth HRT atherosclerosis study*, *Bjog*, 2002; 109:1056-62
192. Cherry, N., Gilmour, K., Hannaford, P., Heagerty, A., Khan, M. A., Kitchener, H., McNamee, R., Elstein, M., Kay, C., Seif, M., Buckley, H., *Oestrogen therapy for prevention of reinfarction in postmenopausal women: a randomised placebo controlled trial*, *Lancet*, 2002; 360:2001-8
193. *Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial*, *Jama*, 1995; 273:199-208
194. Hodis, H. N., Mack, W. J., Lobo, R. A., Shoupe, D., Sevanian, A., Mahrer, P. R., Selzer, R. H., Liu Cr, C. R., Liu Ch, C. H., Azen, S. P., *Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, *Ann Intern Med*, 2001; 135:939-53.
195. *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*, *Jama*, 2002; 288:321-33.

196. Anderson, G. L., Limacher, M., Assaf, A. R., Bassford, T., Beresford, S. A., Black, H., Bonds, D., Brunner, R., Brzyski, R., Caan, B., Chlebowski, R., Curb, D., Gass, M., Hays, J., Heiss, G., Hendrix, S., Howard, B. V., Hsia, J., Hubbell, A., Jackson, R., Johnson, K. C., Judd, H., Kotchen, J. M., Kuller, L., LaCroix, A. Z., Lane, D., Langer, R. D., Lasser, N., Lewis, C. E., Manson, J., Margolis, K., Ockene, J., O'Sullivan, M. J., Phillips, L., Prentice, R. L., Ritenbaugh, C., Robbins, J., Rossouw, J. E., Sarto, G., Stefanick, M. L., Van Horn, L., Wactawski-Wende, J., Wallace, R., Wassertheil-Smoller, S., *Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial*, *Jama*, 2004; 291:1701-12
197. Cushman, M., *Hormone therapies and vascular outcomes: who is at risk?*, *J Thromb Thrombolysis*, 2003; 16:87-90
198. Suparto, I. H., Koudy Williams, J., Fox, J. L., Vinten-Johansen, J., *A comparison of two progestins on myocardial ischemia-reperfusion injury in ovariectomized monkeys receiving estrogen therapy*, *Coron Artery Dis*, 2005; 16:301-8
199. Silvestri, A., Gebara, O., Vitale, C., Wajngarten, M., Leonardo, F., Ramires, J. A., Fini, M., Mercurio, G., Rosano, G. M., *Increased levels of C-reactive protein after oral hormone replacement therapy may not be related to an increased inflammatory response*, *Circulation*, 2003; 107:3165-9
200. Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., et al., *Cloning of the human estrogen receptor cDNA*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985; 82:7889-93
201. Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjold, M., Gustafsson, J. A., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*, *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82:4258-65.

202. Mendelsohn, M. E., Karas, R. H., *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*, N Engl J Med, 1999; 340:1801-11.
203. Luconi, M., Forti, G., Baldi, E., *Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction*, J Steroid Biochem Mol Biol, 2002; 80:369-81.
204. Hewitt, S. C., Harrell, J. C., Korach, K. S., *Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals*, Annu Rev Physiol, 2005; 67:285-308
205. Pettersson, K., Gustafsson, J. A., *Role of estrogen receptor beta in estrogen action*, Annu Rev Physiol, 2001; 63:165-92
206. Lannigan, D. A., *Estrogen receptor phosphorylation*, Steroids, 2003; 68:1-9.
207. Matthews, J., Gustafsson, J. A., *Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta*, Mol Interv, 2003; 3:281-92
208. Kos, M., Denger, S., Reid, G., Gannon, F., *Upstream open reading frames regulate the translation of the multiple mRNA variants of the estrogen receptor alpha*, J Biol Chem, 2002; 277:37131-8
209. Scobie, G. A., Macpherson, S., Millar, M. R., Groome, N. P., Romana, P. G., Saunders, P. T., *Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants*, Steroids, 2002; 67:985-92
210. Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., Gannon, F., *Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1*, Embo J, 2000; 19:4688-700.
211. Denger, S., Reid, G., Kos, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K. S., Sonntag-Buck, V., Gannon, F., *ERalpha gene expression in human primary*

- osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins*, Mol Endocrinol, 2001; 15:2064-77
212. Hisamoto, K., Bender, J. R., *Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors*, Steroids, 2005; 70:382-7
213. Hall, J. M., McDonnell, D. P., *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*, Endocrinology, 1999; 140:5566-78
214. Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. F., Korach, K. S., Smithies, O., *Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993; 90:11162-6
215. Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., Mark, M., *Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes*, Development, 2000; 127:4277-91
216. Muramatsu, M., Inoue, S., *Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions?*, Biochem Biophys Res Commun, 2000; 270:1-10
217. Andersen, T. I., Heimdal, K. R., Skrede, M., Tveit, K., Berg, K., Borresen, A. L., *Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility*, Hum Genet, 1994; 94:665-70
218. Lehrer, S., Rabin, J., Kalir, T., Schachter, B. S., *Estrogen receptor variant and hypertension in women*, Hypertension, 1993; 21:439-41
219. Herrington, D. M., Howard, T. D., Hawkins, G. A., Reboussin, D. M., Xu, J., Zheng, S. L., Brosnihan, K. B., Meyers, D. A., Bleecker, E. R., *Estrogen-receptor*

- polymorphisms and effects of estrogen replacement on high-density lipoprotein cholesterol in women with coronary disease*, N Engl J Med, 2002; 346:967-74
220. Kunnas, T. A., Laippala, P., Penttila, A., Lehtimaki, T., Karhunen, P. J., *Association of polymorphism of human alpha oestrogen receptor gene with coronary artery disease in men: a necropsy study*, Bmj, 2000; 321:273-4
221. Sundarajan, C., Liao, W. X., Roy, A. C., Ng, S. C., *Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders*, J Clin Endocrinol Metab, 2001; 86:135-9
222. Mansur Ade, P., Nogueira, C. C., Strunz, C. M., Aldrighi, J. M., Ramires, J. A., *Genetic polymorphisms of estrogen receptors in patients with premature coronary artery disease*, Arch Med Res, 2005; 36:511-7
223. Liu, M. M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., Price, R. H., Jr., Pestell, R. G., Kushner, P. J., *Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression*, J Biol Chem, 2002; 277:24353-60
224. Lindberg, M. K., Moverare, S., Skrtic, S., Gao, H., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A., Ohlsson, C., *Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice*, Mol Endocrinol, 2003; 17:203-8
225. Castles, C. G., Oesterreich, S., Hansen, R., Fuqua, S. A., *Auto-regulation of the estrogen receptor promoter*, J Steroid Biochem Mol Biol, 1997; 62:155-63
226. Denger, S., Reid, G., Brand, H., Kos, M., Gannon, F., *Tissue-specific expression of human ERalpha and ERbeta in the male*, Mol Cell Endocrinol, 2001; 178:155-60
227. Ihionkhan, C. E., Chambliss, K. L., Gibson, L. L., Hahner, L. D., Mendelsohn, M. E., Shaul, P. W., *Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression*, Circ Res, 2002; 91:814-20.

228. Nakamura, Y., Suzuki, T., Miki, Y., Tazawa, C., Senzaki, K., Moriya, T., Saito, H., Ishibashi, T., Takahashi, S., Yamada, S., Sasano, H., *Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens*, Mol Cell Endocrinol, 2004; 219:17-26
229. Gabel, S. A., Walker, V. R., London, R. E., Steenbergen, C., Korach, K. S., Murphy, E., *Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury*, J Mol Cell Cardiol, 2005; 38:289-97
230. Miller, H., Poon, S., Hibbert, B., Rayner, K., Chen, Y. X., O'Brien, E. R., *Modulation of estrogen signaling by the novel interaction of heat shock protein 27, a biomarker for atherosclerosis, and estrogen receptor beta: mechanistic insight into the vascular effects of estrogens*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005; 25:e10-4
231. Post, W. S., Goldschmidt-Clermont, P. J., Wilhide, C. C., Heldman, A. W., Sussman, M. S., Ouyang, P., Milliken, E. E., Issa, J. P., *Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system*, Cardiovasc Res, 1999; 43:985-91
232. Sasaki, M., Tanaka, Y., Perinchery, G., Dharia, A., Kotcherguina, I., Fujimoto, S., Dahiya, R., *Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer*, J Natl Cancer Inst, 2002; 94:384-90
233. Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., Auricchio, F., *Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor*, Embo J, 1998; 17:2008-18
234. Hall, J. M., Couse, J. F., Korach, K. S., *The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling*, J Biol Chem, 2001; 276:36869-72.

235. Tremblay, G. B., Giguere, V., *Coregulators of estrogen receptor action*, Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2002; 12:1-22
236. Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J. A., *Mechanisms of estrogen action*, Physiol Rev, 2001; 81:1535-65
237. McKenna, N. J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., *Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions*, J Steroid Biochem Mol Biol, 1999; 69:3-12
238. Picotto, G., Vazquez, G., Boland, R., *17beta-oestradiol increases intracellular Ca²⁺ concentration in rat enterocytes. Potential role of phospholipase C-dependent store-operated Ca²⁺ influx*, Biochem J, 1999; 339 (Pt 1):71-7
239. Le Mellay, V., Grosse, B., Lieberherr, M., *Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol*, J Biol Chem, 1997; 272:11902-7
240. Teoh, H., Man, R. Y., *Enhanced relaxation of porcine coronary arteries after acute exposure to a physiological level of 17beta-estradiol involves non-genomic mechanisms and the cyclic AMP cascade*, Br J Pharmacol, 2000; 129:1739-47
241. Rosenfeld, C. R., White, R. E., Roy, T., Cox, B. E., *Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000; 279:H319-28
242. Ruehlmann, D. O., Steinert, J. R., Valverde, M. A., Jacob, R., Mann, G. E., *Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells*, Faseb J, 1998; 12:613-9
243. White, R. E., Darkow, D. J., Lang, J. L., *Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism*, Circ Res, 1995; 77:936-42

244. Ohya, S., Kuwata, Y., Sakamoto, K., Muraki, K., Imaizumi, Y., *Cardioprotective effects of estradiol include the activation of large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in cardiac mitochondria*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005; 289:H1635-42
245. Prakash, Y. S., Togaibayeva, A. A., Kannan, M. S., Miller, V. M., Fitzpatrick, L. A., Sieck, G. C., *Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle*, *Am J Physiol*, 1999; 276:H926-34
246. Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L., Levin, E. R., *Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells*, *Mol Endocrinol*, 1999; 13:307-19.
247. Wade, C. B., Robinson, S., Shapiro, R. A., Dorsa, D. M., *Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway*, *Endocrinology*, 2001; 142:2336-42
248. Chang, L., Karin, M., *Mammalian MAP kinase signalling cascades*, *Nature*, 2001; 410:37-40
249. Frodin, M., Gammeltoft, S., *Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction*, *Mol Cell Endocrinol*, 1999; 151:65-77
250. Wilsbacher, J. L., Goldsmith, E. J., Cobb, M. H., *Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases*, *J Biol Chem*, 1999; 274:16988-94
251. Karas, R. H., Gauer, E. A., Bieber, H. E., Baur, W. E., Mendelsohn, M. E., *Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway*, *J Clin Invest*, 1998; 101:2851-61

252. Toker, A., *Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling*, Mol Pharmacol, 2000; 57:652-8
253. Sato, S., Fujita, N., Tsuruo, T., *Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2000; 97:10832-7
254. Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W., Liao, J. K., *Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase*, Nature, 2000; 407:538-41
255. Haynes, M. P., Sinha, D., Russell, K. S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., Bender, J. R., *Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells*, Circ Res, 2000; 87:677-82.
256. Kelly, M. J., Wagner, E. J., *Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors*, Trends Endocrinol Metab, 1999; 10:369-74
257. Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., Shaul, P. W., *Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen*, J Clin Invest, 1999; 103:401-6
258. Monje, P., Boland, R., *Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus*, Mol Cell Endocrinol, 1999; 147:75-84
259. Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E., Soria, B., *Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2000; 97:11603-8
260. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., Dong, J., *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells*, Endocrinology, 2005; 146:624-32

261. Pedram, A., Razandi, M., Levin, E. R., *Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane*, Mol Endocrinol, 2006; 20:1996-2009
262. Wilcox, J. G., Hwang, J., Hodis, H. N., Sevanian, A., Stanczyk, F. Z., Lobo, R. A., *Cardioprotective effects of individual conjugated equine estrogens through their possible modulation of insulin resistance and oxidation of low-density lipoprotein*, Fertil Steril, 1997; 67:57-62
263. Machkenzie, j., *Irritation of the sexual apparatus as an etiological factor in the production of nasal disease.*, Am j Med Sci, 1884; 87:360-265
264. Killam, A. P., Rosenfeld, C. R., Battaglia, F. C., Makowski, E. L., Meschia, G., *Effect of estrogens on the uterine blood flow of oophorectomized ewes*, Am J Obstet Gynecol, 1973; 115:1045-52
265. Miller, V. M., Vanhoutte, P. M., *Enhanced release of endothelium-derived factor(s) by chronic increases in blood flow*, Am J Physiol, 1988; 255:H446-51
266. Wellman, G. C., Bonev, A. D., Nelson, M. T., Brayden, J. E., *Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca(2+)-dependent K⁺ channels*, Circ Res, 1996; 79:1024-30
267. Geary, G. G., Krause, D. N., Duckles, S. P., *Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000; 279:H511-9
268. New, G., Timmins, K. L., Duffy, S. J., Tran, B. T., O'Brien, R. C., Harper, R. W., Meredith, I. T., *Long-term estrogen therapy improves vascular function in male to female transsexuals*, J Am Coll Cardiol, 1997; 29:1437-44
269. Conrad, K. P., Joffe, G. M., Kruszyna, H., Kruszyna, R., Rochelle, L. G., Smith, R. P., Chavez, J. E., Mosher, M. D., *Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats*, Faseb J, 1993; 7:566-71

270. Best, P. J., Berger, P. B., Miller, V. M., Lerman, A., *The effect of estrogen replacement therapy on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in postmenopausal women*, Ann Intern Med, 1998; 128:285-8
271. Hishikawa, K., Nakaki, T., Marumo, T., Suzuki, H., Kato, R., Saruta, T., *Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells*, FEBS Lett, 1995; 360:291-3
272. MacRitchie, A. N., Jun, S. S., Chen, Z., German, Z., Yuhanna, I. S., Sherman, T. S., Shaul, P. W., *Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium*, Circ Res, 1997; 81:355-62
273. Nuedling, S., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Meyer, R., Vetter, H., Grohe, C., *Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes*, FEBS Lett, 2001; 502:103-8.
274. Xu, H. L., Galea, E., Santizo, R. A., Baughman, V. L., Pelligrino, D. A., *The key role of caveolin-1 in estrogen-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase function in cerebral arterioles in vivo*, J Cereb Blood Flow Metab, 2001; 21:907-13
275. Wagner, A. H., Schroeter, M. R., Hecker, M., *17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells*, Faseb J, 2001; 15:2121-30.
276. Lantin-Hermoso, R. L., Rosenfeld, C. R., Yuhanna, I. S., German, Z., Chen, Z., Shaul, P. W., *Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium*, Am J Physiol, 1997; 273:L119-26.
277. Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Anderson, R. G., Mendelsohn, M. E., Shaul, P. W., *ERbeta has nongenomic action in caveolae*, Mol Endocrinol, 2002; 16:938-46.

278. Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kanda, Y., Adachi, K., Nishio, Y., Hayakawa, J., Mabuchi, S., Takahashi, K., Tasaka, K., Miyamoto, Y., Taniguchi, N., Murata, Y., *Induction of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by the raloxifene analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells*, J Biol Chem, 2001; 276:47642-9
279. Rodriguez, J., Garcia de Boto, M. J., Hidalgo, A., *Mechanisms involved in the relaxant effect of estrogens on rat aorta strips*, Life Sci, 1996; 58:607-15
280. Han, S. Z., Karaki, H., Ouchi, Y., Akishita, M., Orimo, H., *17 beta-Estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery*, Circulation, 1995; 91:2619-26
281. Lip, G. Y., Blann, A. D., Jones, A. F., Beevers, D. G., *Effects of hormone-replacement therapy on hemostatic factors, lipid factors, and endothelial function in women undergoing surgical menopause: implications for prevention of atherosclerosis*, Am Heart J, 1997; 134:764-71
282. Oian, P., Osterud, B., *Monocyte-platelet function and protection against cardiovascular disease*, Maturitas, 1996; 23 Suppl:S57-60
283. Aune, B., Oian, P., Omsjo, I., Osterud, B., *Hormone replacement therapy reduces the reactivity of monocytes and platelets in whole blood--a beneficial effect on atherogenesis and thrombus formation?*, Am J Obstet Gynecol, 1995; 173:1816-20
284. Koh, K. K., Mincemoyer, R., Bui, M. N., Csako, G., Pucino, F., Guetta, V., Waclawiw, M., Cannon, R. O., 3rd, *Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women*, N Engl J Med, 1997; 336:683-90
285. Sobel, M. I., Winkel, C. A., Macy, L. B., Liao, P., Bjornsson, T. D., *The regulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in endothelial cells by sex hormones*, Am J Obstet Gynecol, 1995; 173:801-8

286. Smith, L. H., Coats, S. R., Qin, H., Petrie, M. S., Covington, J. W., Su, M., Eren, M., Vaughan, D. E., *Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in endothelial cells*, *Circ Res*, 2004; 95:269-75
287. Koh, K. K., Horne, M. K., 3rd, Cannon, R. O., 3rd, *Effects of hormone replacement therapy on coagulation, fibrinolysis, and thrombosis risk in postmenopausal women*, *Thromb Haemost*, 1999; 82:626-33
288. Caine, Y. G., Bauer, K. A., Barzegar, S., ten Cate, H., Sacks, F. M., Walsh, B. W., Schiff, I., Rosenberg, R. D., *Coagulation activation following estrogen administration to postmenopausal women*, *Thromb Haemost*, 1992; 68:392-5
289. Koh, K. K., Horne, M. K., 3rd, Csako, G., Waclawiw, M. A., Cannon, R. O., 3rd, *Relation of fibrinolytic potentiation by estrogen to coagulation pathway activation in postmenopausal women*, *Am J Cardiol*, 1999; 83:466-9, A10
290. Grady, D., Wenger, N. K., Herrington, D., Khan, S., Furberg, C., Hunninghake, D., Vittinghoff, E., Hulley, S., *Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study*, *Ann Intern Med*, 2000; 132:689-96
291. Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B., *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*, *Annu Rev Immunol*, 1998; 16:225-60
292. Deshpande, R., Khalili, H., Pergolizzi, R. G., Michael, S. D., Chang, M. D., *Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages*, *Am J Reprod Immunol*, 1997; 38:46-54
293. Pelzer, T., Neumann, M., de Jager, T., Jazbutyte, V., Neyses, L., *Estrogen effects in the myocardium: inhibition of NF-kappaB DNA binding by estrogen receptor-alpha and -beta*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 286:1153-7

294. Stein, B., Yang, M. X., *Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta*, Mol Cell Biol, 1995; 15:4971-9
295. Quaedackers, M. E., Van Den Brink, C. E., Wissink, S., Schreurs, R. H., Gustafsson Jk, J. A., Van Der Saag, P. T., Van Der Burg, B. B., *4-hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kappa B activity in human osteoblastic U2-OS cells through estrogen receptor (ER)alpha, and not through ER beta*, Endocrinology, 2001; 142:1156-66
296. Sun, W. H., Keller, E. T., Stebler, B. S., Ershler, W. B., *Estrogen inhibits phorbol ester-induced I kappa B alpha transcription and protein degradation*, Biochem Biophys Res Commun, 1998; 244:691-5
297. Nakai, K., Itoh, C., Kawazoe, K., Miura, Y., Sotoyanagi, H., Hotta, K., Itoh, T., Kamata, J., Hiramori, K., *Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta*, Coron Artery Dis, 1995; 6:497-502
298. Haught, W. H., Mansour, M., Rothlein, R., Kishimoto, T. K., Mainolfi, E. A., Hendricks, J. B., Hendricks, C., Mehta, J. L., *Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease*, Am Heart J, 1996; 132:1-8
299. Koh, K. K., Jin, D. K., Yang, S. H., Lee, S. K., Hwang, H. Y., Kang, M. H., Kim, W., Kim, D. S., Choi, I. S., Shin, E. K., *Vascular effects of synthetic or natural progestagen combined with conjugated equine estrogen in healthy postmenopausal women*, Circulation, 2001; 103:1961-6
300. Caulin-Glaser, T., Watson, C. A., Pardi, R., Bender, J. R., *Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression*, J Clin Invest, 1996; 98:36-42

301. Cid, M. C., Kleinman, H. K., Grant, D. S., Schnaper, H. W., Fauci, A. S., Hoffman, G. S., *Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1*, J Clin Invest, 1994; 93:17-25
302. Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., Braunwald, E., *Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction*, Circulation, 2000; 101:2149-53
303. Srivastava, S., Weitzmann, M. N., Cenci, S., Ross, F. P., Adler, S., Pacifici, R., *Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD*, J Clin Invest, 1999; 104:503-13
304. Koh, K. K., Ahn, J. Y., Kang, M. H., Kim, D. S., Jin, D. K., Sohn, M. S., Park, G. S., Choi, I. S., Shin, E. K., *Effects of hormone replacement therapy on plaque stability, inflammation, and fibrinolysis in hypertensive or overweight postmenopausal women*, Am J Cardiol, 2001; 88:1423-6, A8
305. Sukovich, D. A., Kauser, K., Shirley, F. D., DeVecchio, V., Halks-Miller, M., Rubanyi, G. M., *Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998; 18:1498-505
306. Aukrust, P., Berge, R. K., Ueland, T., Aaser, E., Damas, J. K., Wikeby, L., Brunsvig, A., Muller, F., Forfang, K., Froland, S. S., Gullestad, L., *Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes*, J Am Coll Cardiol, 2001; 37:485-91
307. Pervin, S., Singh, R., Rosenfeld, M. E., Navab, M., Chaudhuri, G., Nathan, L., *Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998; 18:1575-82

308. Rogers, A., Eastell, R., *The effect of 17beta-estradiol on production of cytokines in cultures of peripheral blood*, Bone, 2001; 29:30-4
309. Keck, C., Herchenbach, D., Pfisterer, J., Breckwoldt, M., *Effects of 17beta-estradiol and progesterone on interleukin-6 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells*, Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1998; 106:334-9
310. Cushman, M., Meilahn, E. N., Psaty, B. M., Kuller, L. H., Dobs, A. S., Tracy, R. P., *Hormone replacement therapy, inflammation, and hemostasis in elderly women*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999; 19:893-9
311. Burke, A. P., Farb, A., Malcom, G. T., Liang, Y. H., Smialek, J., Virmani, R., *Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly*, N Engl J Med, 1997; 336:1276-82
312. Walsh, B. W., Cox, D. A., Sashegyi, A., Dean, R. A., Tracy, R. P., Anderson, P. W., *Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein in postmenopausal women*, Am J Cardiol, 2001; 88:825-8
313. Selzman, C. H., Gaynor, J. S., Turner, A. S., Whitehill, T. A., Horwitz, L. D., Harken, A. H., *Estrogen replacement inhibits intimal hyperplasia and the accumulation and effects of transforming growth factor beta1*, J Surg Res, 1998; 80:380-5
314. Djurovic, S., Os, I., Hofstad, A. E., Abdelnoor, M., Westheim, A., Berg, K., *Increased plasma concentrations of TGF-beta1 after hormone replacement therapy*, J Intern Med, 2000; 247:279-85
315. Pasceri, V., Willerson, J. T., Yeh, E. T., *Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells*, Circulation, 2000; 102:2165-8

316. Ridker, P. M., Buring, J. E., Shih, J., Matias, M., Hennekens, C. H., *Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women*, *Circulation*, 1998; 98:731-3
317. Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Rifai, N., Buring, J. E., Manson, J. E., *Hormone replacement therapy and increased plasma concentration of C-reactive protein*, *Circulation*, 1999; 100:713-6
318. Modena, M. G., Bursi, F., Fantini, G., Cagnacci, A., Carbonieri, A., Fortuna, A., Rossi, R., *Effects of hormone replacement therapy on C-reactive protein levels in healthy postmenopausal women: comparison between oral and transdermal administration of estrogen*, *Am J Med*, 2002; 113:331-4
319. Staessen, J. A., Ginocchio, G., Thijs, L., Fagard, R., *Conventional and ambulatory blood pressure and menopause in a prospective population study*, *J Hum Hypertens*, 1997; 11:507-14
320. Dubey, R. K., Oparil, S., Imthurn, B., Jackson, E. K., *Sex hormones and hypertension*, *Cardiovasc Res*, 2002; 53:688-708
321. Cagnacci, A., Rovati, L., Zanni, A., Malmusi, S., Facchinetti, F., Volpe, A., *Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women*, *Am J Physiol*, 1999; 276:H1355-60
322. Crane, M. G., Harris, J. J., *Estrogens and hypertension: effect of discontinuing estrogens on blood pressure, exchangeable sodium, and the renin-aldosterone system*, *Am J Med Sci*, 1978; 276:33-55
323. Vedernikov, Y. P., Liao, Q. P., Jain, V., Saade, G. R., Chwalisz, K., Garfield, R. E., *Effect of chronic treatment with 17beta-estradiol and progesterone on endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation in isolated aortic rings from ovariectomized rats*, *Am J Obstet Gynecol*, 1997; 176:603-8

324. Farhat, M. Y., Chen, M. F., Bhatti, T., Iqbal, A., Cathapermal, S., Ramwell, P. W., *Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats*, Br J Pharmacol, 1993; 110:719-23
325. Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., Kangawa, K., *Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes*, Hypertension, 2000; 35:19-24
326. Sumino, H., Ichikawa, S., Kanda, T., Sakamaki, T., Nakamura, T., Sato, K., Kobayashi, I., Nagai, R., *Hormone replacement therapy in postmenopausal women with essential hypertension increases circulating plasma levels of bradykinin*, Am J Hypertens, 1999; 12:1044-7
327. Proudler, A. J., Ahmed, A. I., Crook, D., Fogelman, I., Rymer, J. M., Stevenson, J. C., *Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women*, Lancet, 1995; 346:89-90
328. Nickenig, G., Baumer, A. T., Grohe, C., Kahlert, S., Strehlow, K., Rosenkranz, S., Stablein, A., Beckers, F., Smits, J. F., Daemen, M. J., Vetter, H., Bohm, M., *Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo*, Circulation, 1998; 97:2197-201
329. van Baal, W. M., Smolders, R. G., van der Mooren, M. J., Teerlink, T., Kenemans, P., *Hormone replacement therapy and plasma homocysteine levels*, Obstet Gynecol, 1999; 94:485-91
330. Dubey, R. K., Jackson, E. K., Keller, P. J., Imthurn, B., Rosselli, M., *Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism*, Hypertension, 2001; 37:640-4

331. Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Mi, Z., Rosselli, M., Keller, P. J., Jackson, E. K., *Estradiol inhibits smooth muscle cell growth in part by activating the cAMP-adenosine pathway*, Hypertension, 2000; 35:262-6
332. Chang, W. C., Nakao, J., Orimo, H., Murota, S. I., *Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells*, Biochim Biophys Acta, 1980; 620:472-82
333. Ylikorkala, O., Orpana, A., Puolakka, J., Pyorala, T., Viinikka, L., *Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1*, J Clin Endocrinol Metab, 1995; 80:3384-7
334. Dannenberg, A. L., Levy, D., Garrison, R. J., *Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study)*, Am J Cardiol, 1989; 64:1066-8
335. Lim, W. K., Wren, B., Jepson, N., Roy, S., Caplan, G., *Effect of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy*, Am J Cardiol, 1999; 83:1132-4, A9
336. Gallagher, P. E., Li, P., Lenhart, J. R., Chappell, M. C., Brosnihan, K. B., *Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA*, Hypertension, 1999; 33:323-8
337. van Eickels, M., Grohe, C., Cleutjens, J. P., Janssen, B. J., Wellens, H. J., Doevendans, P. A., *17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy*, Circulation, 2001; 104:1419-23
338. Xu, Y., Arenas, I. A., Armstrong, S. J., Davidge, S. T., *Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart*, Cardiovasc Res, 2003; 57:388-94
339. Christodoulakos, G. E., Panoulis, C. P., Lambrinoudaki, I. V., Botsis, D. S., Dendrinou, S. G., Economou, E., Creatsas, G. C., *The effect of hormone therapy and*

- raloxifene on serum matrix metalloproteinase-2 and -9 in postmenopausal women*, *Menopause*, 2004; 11:299-305
340. Li, J., Liao, E. Y., Dai, R. C., Wei, Q. Y., Luo, X. H., *Effects of 17 beta-estradiol on the expression of interstitial collagenases-8 and -13 (MMP-8 and MMP-13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in ovariectomized rat osteoblastic cells*, *J Mol Histol*, 2004; 35:723-31
341. Grodstein, F., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Colditz, G. A., Willett, W. C., Rosner, B., Speizer, F. E., Hennekens, C. H., *Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease*, *N Engl J Med*, 1996; 335:453-61
342. Kim, Y. D., Chen, B., Beauregard, J., Kouretas, P., Thomas, G., Farhat, M. Y., Myers, A. K., Lees, D. E., *17 beta-Estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion*, *Circulation*, 1996; 94:2901-8
343. Knowlton, A. A., Sun, L., *Heat-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001; 280:H455-64
344. Pelzer, T., Schumann, M., Neumann, M., deJager, T., Stimpel, M., Serfling, E., Neyses, L., *17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes*, *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 268:192-200
345. Alexander, K. P., Newby, L. K., Hellkamp, A. S., Harrington, R. A., Peterson, E. D., Kopecky, S., Langer, A., O'Gara, P., O'Connor, C. M., Daly, R. N., Califf, R. M., Khan, S., Fuster, V., *Initiation of hormone replacement therapy after acute myocardial infarction is associated with more cardiac events during follow-up*, *J Am Coll Cardiol*, 2001; 38:1-7
346. Carmeliet, P., Jain, R. K., *Angiogenesis in cancer and other diseases*, *Nature*, 2000; 407:249-57

347. Risau, W.,Flamme, I., *Vasculogenesis*, Annu Rev Cell Dev Biol, 1995; 11:73-91
348. Morales, D. E., McGowan, K. A., Grant, D. S., Maheshwari, S., Bhartiya, D., Cid, M. C., Kleinman, H. K.,Schnaper, H. W., *Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model*, Circulation, 1995; 91:755-63
349. Kyriakides, Z. S., Petinakis, P., Kaklamanis, L., Sbarouni, E., Karayannakos, P., Iliopoulos, D., Dontas, I.,Kremastinos, D. T., *Intramuscular administration of estrogen may promote angiogenesis and perfusion in a rabbit model of chronic limb ischemia*, Cardiovasc Res, 2001; 49:626-33
350. Shifren, J. L., Tseng, J. F., Zaloudek, C. J., Ryan, I. P., Meng, Y. G., Ferrara, N., Jaffe, R. B.,Taylor, R. N., *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*, J Clin Endocrinol Metab, 1996; 81:3112-8
351. Cid, M. C., Esparza, J., Schnaper, H. W., Juan, M., Yague, J., Grant, D. S., Urbano-Marquez, A., Hoffman, G. S.,Kleinman, H. K., *Estradiol enhances endothelial cell interactions with extracellular matrix proteins via an increase in integrin expression and function*, Angiogenesis, 1999; 3:271-80
352. Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G., Montano, M., Sun, J., Weis, K.,Katzenellenbogen, J. A., *Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology*, J Steroid Biochem Mol Biol, 2000; 74:279-85
353. MacGregor, J. I.,Jordan, V. C., *Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action*, Pharmacol Rev, 1998; 50:151-96
354. Osborne, C. K., *Tamoxifen in the treatment of breast cancer*, N Engl J Med, 1998; 339:1609-18

355. Goldstein, S. R., Siddhanti, S., Ciaccia, A. V., Plouffe, L., Jr., *A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators*, Hum Reprod Update, 2000; 6:212-24
356. Barakat, R. R., *Tamoxifen and endometrial neoplasia*, Clin Obstet Gynecol, 1996; 39:629-40
357. Cummings, S. R., Eckert, S., Krueger, K. A., Grady, D., Powles, T. J., Cauley, J. A., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N. H., Morrow, M., Lippman, M. E., Black, D., Glusman, J. E., Costa, A., Jordan, V. C., *The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation*, Jama, 1999; 281:2189-97
358. Barrett-Connor, E., Mosca, L., Collins, P., Geiger, M. J., Grady, D., Kornitzer, M., McNabb, M. A., Wenger, N. K., *Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women*, N Engl J Med, 2006; 355:125-37
359. Bjarnason, N. H., Haarbo, J., Byrjalsen, I., Kauffman, R. F., Christiansen, C., *Raloxifene inhibits aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits*, Circulation, 1997; 96:1964-9
360. Clarkson, T. B., Anthony, M. S., Jerome, C. P., *Lack of effect of raloxifene on coronary artery atherosclerosis of postmenopausal monkeys*, J Clin Endocrinol Metab, 1998; 83:721-6
361. Walsh, B. W., Kuller, L. H., Wild, R. A., Paul, S., Farmer, M., Lawrence, J. B., Shah, A. S., Anderson, P. W., *Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women*, Jama, 1998; 279:1445-51
362. de Valk-de Roo, G. W., Stehouwer, C. D., Meijer, P., Mijatovic, V., Kluft, C., Kenemans, P., Cohen, F., Watts, S., Netelenbos, C., *Both raloxifene and estrogen reduce major cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women: A 2-*

- year, placebo-controlled study, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999; 19:2993-3000*
363. Simoncini, T., Genazzani, A. R., *Raloxifene acutely stimulates nitric oxide release from human endothelial cells via an activation of endothelial nitric oxide synthase, J Clin Endocrinol Metab, 2000; 85:2966-9*
364. Takahashi, K., Ohmichi, M., Yoshida, M., Hisamoto, K., Mabuchi, S., Arimoto-Ishida, E., Mori, A., Tsutsumi, S., Tasaka, K., Murata, Y., Kurachi, H., *Both estrogen and raloxifene cause G1 arrest of vascular smooth muscle cells, J Endocrinol, 2003; 178:319-29*
365. Mori-Abe, A., Tsutsumi, S., Takahashi, K., Toya, M., Yoshida, M., Du, B., Kawagoe, J., Nakahara, K., Takahashi, T., Ohmichi, M., Kurachi, H., *Estrogen and raloxifene induce apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase cascade in synthetic vascular smooth muscle cells, J Endocrinol, 2003; 178:417-26*
366. Walsh, B. W., Paul, S., Wild, R. A., Dean, R. A., Tracy, R. P., Cox, D. A., Anderson, P. W., *The effects of hormone replacement therapy and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial, J Clin Endocrinol Metab, 2000; 85:214-8*
367. Blum, A., Schenke, W. H., Hathaway, L., Mincemoyer, R., Csako, G., Waclawiw, M. A., Cannon, R. O., 3rd, *Effects of estrogen and the selective estrogen receptor modulator raloxifene on markers of inflammation in postmenopausal women, Am J Cardiol, 2000; 86:892-5*
368. Fischman, D. L., Leon, M. B., Baim, D. S., Schatz, R. A., Savage, M. P., Penn, I., Detre, K., Veltri, L., Ricci, D., Nobuyoshi, M., et al., *A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators, N Engl J Med, 1994; 331:496-501*

369. Chandrasekar, B., Tanguay, J. F., *Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model*, J Am Coll Cardiol, 2000; 36:1972-8
370. Chandrasekar, B., Nattel, S., Tanguay, J. F., *Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function*, J Am Coll Cardiol, 2001; 38:1570-6
371. Chandrasekar, B., Sirois, M. G., Geoffroy, P., Lauzier, D., Nattel, S., Tanguay, J. F., *Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model*, Thromb Haemost, 2005; 94:1042-7
372. Finking, G., Krauss, N., Romer, S., Eckert, S., Lenz, C., Kamenz, J., Menke, A., Brehme, U., Hombach, V., Hanke, H., *17beta-estradiol, gender independently, reduces atheroma development but not neointimal proliferation after balloon injury in the rabbit aorta*, Atherosclerosis, 2001; 154:39-49.
373. Lavigne, M. C., Ramwell, P. W., Clarke, R., *Inhibition of estrogen receptor function promotes porcine coronary artery smooth muscle cell proliferation*, Steroids, 1999; 64:472-80.
374. Kolodgie, F. D., Jacob, A., Wilson, P. S., Carlson, G. C., Farb, A., Verma, A., Virmani, R., *Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro*, Am J Pathol, 1996; 148:969-76.
375. Espinosa, E., Oemar, B. S., Luscher, T. F., *17 beta-Estradiol and smooth muscle cell proliferation in aortic cells of male and female rats*, Biochem Biophys Res Commun, 1996; 221:8-14.

376. Salom, J. B., Burguete, M. C., Perez-Asensio, F. J., Centeno, J. M., Torregrosa, G., Alborch, E., *Acute relaxant effects of 17-beta-estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery*, *Steroids*, 2002; 67:339-46
377. Irons, C. E., Flynn, M. A., Mok, L. M., Reynolds, E. E., *Endothelin and PDGF enhance arachidonic acid release and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*, *Am J Physiol*, 1996; 270:C1642-6
378. Hedges, J. C., Yamboliev, I. A., Ngo, M., Horowitz, B., Adam, L. P., Gerthoffer, W. T., *p38 mitogen-activated protein kinase expression and activation in smooth muscle*, *Am J Physiol*, 1998; 275:C527-34.
379. Dubey, R. K., Jackson, E. K., Gillespie, D. G., Zacharia, L. C., Imthurn, B., Keller, P. J., *Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20:964-72.
380. Hwang, K. C., Lee, K. H., Jang, Y., *Inhibition of MEK1,2/ERK mitogenic pathway by estrogen with antiproliferative properties in rat aortic smooth muscle cells*, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002; 80:85-90.
381. Morey, A. K., Pedram, A., Razandi, M., Prins, B. A., Hu, R. M., Biesiada, E., Levin, E. R., *Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation*, *Endocrinology*, 1997; 138:3330-9.
382. Takeda-Matsubara, Y., Nakagami, H., Iwai, M., Cui, T. X., Shiuchi, T., Akishita, M., Nahmias, C., Ito, M., Horiuchi, M., *Estrogen Activates Phosphatases and Antagonizes Growth-Promoting Effect of Angiotensin II*, *Hypertension*, 2002; 39:41-5.
383. Song, J., Standley, P. R., Zhang, F., Joshi, D., Gappy, S., Sowers, J. R., Ram, J. L., *Tamoxifen (estrogen antagonist) inhibits voltage-gated calcium current and*

- contractility in vascular smooth muscle from rats*, J Pharmacol Exp Ther, 1996; 277:1444-53
384. Tsang, S. Y., Yao, X., Wong, C. M., Chan, F. L., Chen, Z. Y., Huang, Y., *Differential regulation of K⁺ and Ca²⁺ channel gene expression by chronic treatment with estrogen and tamoxifen in rat aorta*, Eur J Pharmacol, 2004; 483:155-62
385. Wassmann, S., Laufs, U., Stamenkovic, D., Linz, W., Stasch, J. P., Ahlbory, K., Rosen, R., Bohm, M., Nickenig, G., *Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production*, Circulation, 2002; 105:2083-91.
386. Leung, F. P., Yao, X., Lau, C. W., Ko, W. H., Lu, L., Huang, Y., *Raloxifene relaxes rat intrarenal arteries by inhibiting Ca²⁺ influx*, Am J Physiol Renal Physiol, 2005; 289:F137-44
387. Sader, M. A., McCredie, R. J., Griffiths, K. A., Wishart, S. M., Handelsman, D. J., Celermajer, D. S., *Oestradiol improves arterial endothelial function in healthy men receiving testosterone*, Clin Endocrinol (Oxf), 2001; 54:175-81.
388. Liu, J., Wu, S., Wei, H., Zhou, K., Ruan, Y., Lai, W., *Effects of sex hormones and their balance on the proliferation of rat vascular endothelial cells*, Horm Res, 2002; 58:16-20
389. Kim-Schulze, S., McGowan, K. A., Hubchak, S. C., Cid, M. C., Martin, M. B., Kleinman, H. K., Greene, G. L., Schnaper, H. W., *Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells*, Circulation, 1996; 94:1402-7.
390. Russell, K. S., Haynes, M. P., Sinha, D., Clerisme, E., Bender, J. R., *Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2000; 97:5930-5.

391. Razandi, M., Pedram, A., Levin, E. R., *Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function*, J Biol Chem, 2000; 275:38540-6.
392. Sugama, D., Nakajima, H., Maehara, K., Hara, I., Lawlor, G. F., Inazu, M., Yamashina, A., Matsumiya, T., *Anti-atherosclerotic effects of tamoxifen in cholesterol-fed ovariectomized rabbits*, Jpn Heart J, 2002; 43:545-58
393. Colacurci, N., Manzella, D., Fornaro, F., Carbonella, M., Paolisso, G., *Endothelial function and menopause: effects of raloxifene administration*, J Clin Endocrinol Metab, 2003; 88:2135-40
394. Stamatelopoulos, K. S., Lekakis, J. P., Poulakaki, N. A., Papamichael, C. M., Venetsanou, K., Aznaouridis, K., Protogerou, A. D., Papaioannou, T. G., Kumar, S., Stamatelopoulos, S. F., *Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women*, Am Heart J, 2004; 147:1093-9
395. Griffiths, K. A., Sader, M. A., Skilton, M. R., Harmer, J. A., Celermajer, D. S., *Effects of raloxifene on endothelium-dependent dilation, lipoproteins, and markers of vascular function in postmenopausal women with coronary artery disease*, J Am Coll Cardiol, 2003; 42:698-704
396. Duschek, E. J., Stehouwer, C. D., de Valk-de Roo, G. W., Schalkwijk, C. G., Lambert, J., Netelenbos, C., *Raloxifene, conjugated oestrogen and endothelial function in postmenopausal women*, J Intern Med, 2003; 254:85-94
397. Losordo, D. W., Kearney, M., Kim, E. A., Jekanowski, J., Isner, J. M., *Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women*, Circulation, 1994; 89:1501-10.
398. Pare, G., Krust, A., Karas, R. H., Dupont, S., Aronovitz, M., Chambon, P., Mendelsohn, M. E., *Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury*, Circ Res, 2002; 90:1087-92.

399. Inamdar, S. R., Eyster, K. M., Schlenker, E. H., *Estrogen receptor-alpha antisense decreases brain estrogen receptor levels and affects ventilation in male and female rats*, J Appl Physiol, 2001; 91:1886-92.
400. Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., Karas, R. H., Bao, L., Cox, D., Hodgins, J., Shaul, P. W., Thoren, P., Smithies, O., Gustafsson, J. A., Mendelsohn, M. E., *Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta*, Science, 2002; 295:505-8.
401. Korte, T., Fuchs, M., Arkudas, A., Geertz, S., Meyer, R., Gardiwal, A., Klein, G., Niehaus, M., Krust, A., Chambon, P., Drexler, H., Fink, K., Grohe, C., *Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction*, Circulation, 2005; 111:2282-90
402. Iafrati, M. D., Karas, R. H., Aronovitz, M., Kim, S., Sullivan, T. R., Jr., Lubahn, D. B., O'Donnell, T. F., Jr., Korach, K. S., Mendelsohn, M. E., *Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice*, Nat Med, 1997; 3:545-8.
403. Brouchet, L., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Bayard, F., Arnal, J. F., *Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta*, Circulation, 2001; 103:423-8.
404. Hodgins, J. B., Kregge, J. H., Reddick, R. L., Korach, K. S., Smithies, O., Maeda, N., *Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe-/- mice*, J Clin Invest, 2001; 107:333-40.
405. Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., Ito, A., *Suppression by estrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha*, J Steroid Biochem Mol Biol, 2001; 78:177-84.

406. Evans, M. J., Harris, H. A., Miller, C. P., Karathanasis, S. K., Adelman, S. J., *Estrogen receptors alpha and beta have similar activities in multiple endothelial cell pathways*, *Endocrinology*, 2002; 143:3785-95.
407. Simoncini, T., Fornari, L., Mannella, P., Varone, G., Caruso, A., Liao, J. K., Genazzani, A. R., *Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase*, *Steroids*, 2002; 67:935-9.
408. Darblade, B., Pendaries, C., Krust, A., Dupont, S., Fouque, M. J., Rami, J., Chambon, P., Bayard, F., Arnal, J. F., *Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor*, *Circ Res*, 2002; 90:413-9.
409. Pietras, R. J., Szego, C. M., *Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells*, *Nature*, 1977; 265:69-72
410. Pietras, R. J., Szego, C. M., *Endometrial cell calcium and oestrogen action*, *Nature*, 1975; 253:357-9
411. Zysek, E., Dufy-Barbe, L., Dufy, B., Vincent, J. D., *Short-term effect of estrogen on release of prolactin by pituitary cells in culture*, *Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 102:1151-7
412. Evinger, A. J., 3rd, Levin, E. R., *Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function*, *Steroids*, 2005; 70:361-3
413. Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., Levin, E. R., *ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions*, *Mol Endocrinol*, 2002; 16:100-15.

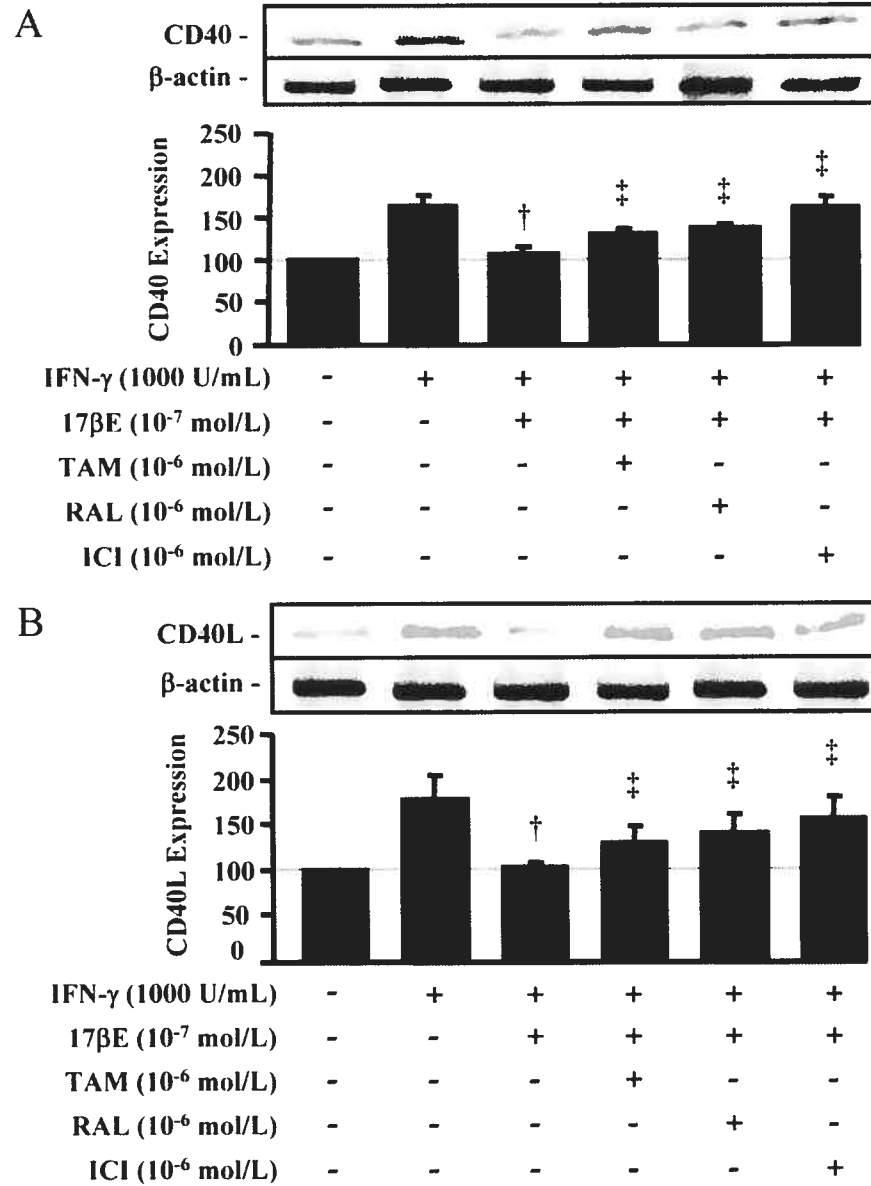
414. Song, R. X., McPherson, R. A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., Santen, R. J., *Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation*, Mol Endocrinol, 2002; 16:116-27.
415. Faas, M. M., Bakker, W. W., Valkhof, N., Schuiling, G. A., *Effect of estradiol and progesterone on the low-dose endotoxin-induced glomerular inflammatory response of the female rat*, Am J Reprod Immunol, 1999; 41:224-31
416. Krishnan, L., Guilbert, L. J., Russell, A. S., Wegmann, T. G., Mosmann, T. R., Belosevic, M., *Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines*, J Immunol, 1996; 156:644-52
417. Kamada, M., Irahara, M., Maegawa, M., Ohmoto, Y., Murata, K., Yasui, T., Yamano, S., Aono, T., *Transient increase in the levels of T-helper 1 cytokines in postmenopausal women and the effects of hormone replacement therapy*, Gynecol Obstet Invest, 2001; 52:82-8
418. Rodriguez, E., Lopez, R., Paez, A., Masso, F., Montano, L. F., *17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription*, Life Sci, 2002; 71:2181-93
419. Kaufman, J., Sime, P. J., Phipps, R. P., *Expression of CD154 (CD40 ligand) by human lung fibroblasts: differential regulation by IFN-gamma and IL-13, and implications for fibrosis*, J Immunol, 2004; 172:1862-71
420. Jayachandran, M., Sanzo, A., Owen, W. G., Miller, V. M., *Estrogenic regulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in platelets*, Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005; 289:H1908-16
421. Dimayuga, F. O., Reed, J. L., Carnero, G. A., Wang, C., Dimayuga, E. R., Dimayuga, V. M., Perger, A., Wilson, M. E., Keller, J. N., Bruce-Keller, A. J.,

- Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines*, J Neuroimmunol, 2005; 161:123-36
422. Salem, M. L., *Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production*, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2004; 3:97-104
423. Salem, M. L., Hossain, M. S., Nomoto, K., *Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF-alpha and IFN-gamma*, Int Arch Allergy Immunol, 2000; 121:235-45
424. Rider, V., Jones, S., Evans, M., Bassiri, H., Afsar, Z., Abdou, N. I., *Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus*, J Rheumatol, 2001; 28:2644-9
425. Vegeto, E., Belcredito, S., Etteri, S., Ghisletti, S., Brusadelli, A., Meda, C., Krust, A., Dupont, S., Ciana, P., Chambon, P., Maggi, A., *Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2003; 100:9614-9
426. Liu, H. W., Iwai, M., Takeda-Matsubara, Y., Wu, L., Li, J. M., Okumura, M., Cui, T. X., Horiuchi, M., *Effect of estrogen and AT1 receptor blocker on neointima formation*, Hypertension, 2002; 40:451-7; discussion 48-50.
427. Cao, J., Wood, M., Liu, Y., Hoffman, T., Hyde, J., Park-Sarge, O. K., Vore, M., *Estradiol represses prolactin-induced expression of Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide in liver cells through estrogen receptor-alpha and signal transducers and activators of transcription 5a*, Endocrinology, 2004; 145:1739-49

428. Pluvinet, R., Petriz, J., Torras, J., Herrero-Fresneda, I., Cruzado, J. M., Grinyo, J. M., Aran, J. M., *RNAi-mediated silencing of CD40 prevents leukocyte adhesion on CD154-activated endothelial cells*, Blood, 2004; 104:3642-6
429. Raab, M., Daxecker, H., Markovic, S., Karimi, A., Griesmacher, A., Mueller, M. M., *Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application*, Clin Chim Acta, 2002; 321:11-6
430. Shen, J., SS, T. T., Schrieber, L., King, N. J., *Early E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and late major histocompatibility complex antigen induction on human endothelial cells by flavivirus and comodulation of adhesion molecule expression by immune cytokines*, J Virol, 1997; 71:9323-32
431. Yellin, M. J., Brett, J., Baum, D., Matsushima, A., Szabolcs, M., Stern, D., Chess, L., *Functional interactions of T cells with endothelial cells: the role of CD40L-CD40-mediated signals*, J Exp Med, 1995; 182:1857-64
432. Hollenbaugh, D., Mischel-Petty, N., Edwards, C. P., Simon, J. C., Denfeld, R. W., Kiener, P. A., Aruffo, A., *Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells*, J Exp Med, 1995; 182:33-40
433. Crockett, E. T., Remelius, C., Hess, K., Al-Ghawi, H., *Gene deletion of P-Selectin and ICAM-1 does not inhibit neutrophil infiltration into peritoneal cavity following cecal ligation-puncture*, BMC Clin Pathol, 2004; 4:2
434. Squadrito, F., Altavilla, D., Squadrito, G., Campo, G. M., Arlotta, M., Arcoraci, V., Minutoli, L., Serrano, M., Saitta, A., Caputi, A. P., *17Beta-oestradiol reduces cardiac leukocyte accumulation in myocardial ischaemia reperfusion injury in rat*, Eur J Pharmacol, 1997; 335:185-92
435. Miller, A. P., Feng, W., Xing, D., Weathington, N. M., Blalock, J. E., Chen, Y. F., Oparil, S., *Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries*, Circulation, 2004; 110:1664-9

436. Heryanto, B., Girling, J. E., Rogers, P. A., *Intravascular neutrophils partially mediate the endometrial endothelial cell proliferative response to oestrogen in ovariectomised mice*, *Reproduction*, 2004; 127:613-20
437. Galea, E., Santizo, R., Feinstein, D. L., Adamsom, P., Greenwood, J., Koenig, H. M., Pelligrino, D. A., *Estrogen inhibits NF kappa B-dependent inflammation in brain endothelium without interfering with I kappa B degradation*, *Neuroreport*, 2002; 13:1469-72
438. Alvarez, A., Hermenegildo, C., Issekutz, A. C., Esplugues, J. V., Sanz, M. J., *Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation*, *Circ Res*, 2002; 91:1142-50.
439. Stefano, G. B., Prevot, V., Beauvillain, J. C., Cadet, P., Fimiani, C., Welters, I., Fricchione, G. L., Breton, C., Lassalle, P., Salzet, M., Bilfinger, T. V., *Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia*, *Circulation*, 2000; 101:1594-7.
440. Eckhoff, D. E., Bilbao, G., Frenette, L., Thompson, J. A., Contreras, J. L., *17-Beta-estradiol protects the liver against warm ischemia/reperfusion injury and is associated with increased serum nitric oxide and decreased tumor necrosis factor-alpha*, *Surgery*, 2002; 132:302-9
441. Mori, M., Tsukahara, F., Yoshioka, T., Irie, K., Ohta, H., *Suppression by 17beta-estradiol of monocyte adhesion to vascular endothelial cells is mediated by estrogen receptors*, *Life Sci*, 2004; 75:599-609
442. Gourdy, P., Mallat, Z., Castano, C., Garmy-Susini, B., Mac Gregor, J. L., Tedgui, A., Arnal, J. F., Bayard, F., *The atheroprotective effect of 17 beta-estradiol is not altered in P-selectin- or ICAM-1-deficient hypercholesterolemic mice*, *Atherosclerosis*, 2003; 166:41-8

Annexe 1



Les effets du 17 β E sur l'expression de CD40 et CD40L sont dépendants des RE

Les CE de porc ont étéensemencées à une concentration de 1x10⁶ cellules/puits dans des plaques de 6 puits de culture cellulaire et ont proliféré jusqu'à confluence. Les cellules ont été traitées simultanément avec le tamoxifène (TAM), le raloxifène (RAL) ou le ICI182780

(ICI) (10^{-6} mol/L) avec le 17 β E (10^{-7} mol/L) pendant 24 heures pour ensuite être stimulées à l'IFN- γ pour un autre 24 heures. L'expression protéique de CD40 (A) et de CD40L (B) a été détectée par immunobuvardage. Les résultats des images sont exprimés en pourcentage relatif normalisés par les niveaux protéiques de la β -actine. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne \pm erreur sous la moyenne pour au moins 3 expériences.