

Université de Montréal

**L'œstrogène: un rôle potentiel dans la modulation de
l'activation pro-inflammatoire des cellules endothéliales
vasculaires par la voie du *Toll-Like Receptor 2***

par

Geneviève Morin

Département des sciences biomédicales, Institut de Cardiologie de Montréal
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître *es* Science (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales
Option générale

Décembre 2010

© Geneviève Morin, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

L'œstrogène: un rôle potentiel dans la modulation de l'activation pro-inflammatoire des
cellules endothéliales vasculaires par la voie du *Toll-Like Receptor 2*

Présenté par :
Geneviève Morin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Céline Fiset, président-rapporteur
Dr. Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dre Julie Fradette, membre externe

Résumé

Grâce aux nombreuses études sur le sujet, nous savons qu'une stimulation inflammatoire vasculaire excessive entraîne un déséquilibre des fonctions homéostatiques de l'endothélium. Ce déséquilibre est à l'origine d'une dysfonction endothéliale définie comme étant l'étape clé contribuant au développement de l'athérosclérose. Le *Toll-like receptor-2* (TLR2) est impliqué dans l'activation cellulaire via la transcription des gènes liés à l'inflammation. Il reconnaît des molécules microbiennes mais également des facteurs endogènes non-infectieux tels que sécrétés par les tissus endommagés provenant de la dysfonction endothéliale. Ainsi, l'activation et la signalisation du TLR2 sont en étroite relation avec le développement de l'athérosclérose.

Les études épidémiologiques ont confirmé le rôle athéroprotecteur de l'œstrogène via de nombreux mécanismes d'action. Ainsi, nous avons cherché à identifier de nouvelles cibles moléculaires permettant de mieux interpréter les bénéfices potentiels de l'œstrogène sur le système cardiaque. Pour la première fois chez les cellules endothéliales (CE) vasculaires de souris, nos travaux ont confirmé l'effet anti-inflammatoire de l'œstrogène via la diminution de l'expression et de l'activité du TLR2. Nous avons également déterminé l'influence de l'œstrogène sur le profil de la réponse inflammatoire de ce récepteur en mesurant les potentiels endothéliaux de migration et d'adhésion. De plus, nous avons caractérisé les voies de signalisation impliquées en démontrant l'influence négative de l'œstrogène sur la phosphorylation des kinases activées par le TLR2; illustrant l'interaction entre l'œstrogène et la signalisation de ce récepteur. Nos travaux amènent ainsi de nouvelles connaissances sur la régulation endothéliale du TLR2 et mettent en lumière les effets anti-inflammatoires et vasculaires rapides de l'œstrogène.

Mots-clés : Inflammation, dysfonction endothéliale, *Toll-like receptor-2*, cellules endothéliales, œstrogène, signalisation cellulaire.

Abstract

Evidence supports the contribution of immune responses in atherosclerosis development in part by alterations in the endothelium activation status and by the recruitment of inflammatory cells triggered by cardiovascular risk factors. These alterations are the principal cause of endothelial dysfunction defined as the key step contributing to the development of atherosclerosis. Via the transcription of genes related to inflammation, the Toll-like receptor-2 (TLR2) is involved in endothelial cell activation. It generally recognizes microbial molecules but also non-infectious endogenous factors such as those secreted by damaged tissues from the endothelial dysfunction. Thus, activation and signalization of the TLR2 are closely linked with the development of atherosclerosis.

Epidemiological studies have confirmed the atheroprotective role of estrogen through multiple mechanisms of action. Thus, to better interpret the potential benefits of estrogen on the cardiovascular system, we sought to identify new molecular targets such as TLR2 regulation. For the first time in mouse vascular endothelial cells (EC), our results have confirmed the anti-inflammatory effect of estrogen via the decreased expression and activity of TLR2. We also determined the influence of estrogen on the profile of the inflammatory response triggered through this receptor by measuring endothelial migration and adhesion potentials. Furthermore, we demonstrated the interaction between estrogen and TLR2 signalling pathways with a negative influence of estrogen on the phosphorylation level of kinases activated by this receptor. Thus, our study brings new insights into the endothelial regulation of TLR2 and highlights rapid anti-inflammatory and cardioprotective effects from estrogen.

Keywords : Inflammation, endothelial dysfunction, Toll-like receptor-2, endothelial cells, estrogen, cellular signalling.

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
<i>Table des matières</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>vii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>x</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xii</i>
1. Introduction	1
1.1 L'endothélium vasculaire	2
1.1.1 L'anatomie d'un vaisseau	2
1.1.2 Les fonctions homéostatiques principales de l'endothélium	3
1.1.2.1 Le tonus vasculaire.....	4
1.1.2.2 Une barrière sélective.....	4
1.1.2.3 Participation aux réactions inflammatoires.....	5
1.2 L'athérosclérose	7
1.2.1 Définition de la maladie et ses facteurs de risques	7
1.2.1.1 L'hyperlipidémie.....	8
1.2.1.2 L'âge et le sexe	9
1.2.1.3 L'hypertension	9
1.2.1.4 Le tabagisme	10
1.2.1.5 La sédentarité et le diabète.....	10
1.2.1.6 Les infections	10
1.2.2 Les étapes de la maladie.....	11
1.2.2.1 Formation de la plaque : stries lipidiques et lésions athérosclérotiques	11

1.2.2.2 Progression de la plaque : processus inflammatoire et formation du cap fibreux	13
1.2.2.3 Rupture de la plaque : causes et complications liées à cette rupture	14
1.3 Les récepteurs Toll-Like (<i>Toll-like receptors</i> [TLR])	16
1.3.1 Les différentes familles des TLR	16
1.3.1.1 Structures, fonctions et distributions des TLR	16
1.3.1.2 Les ligands des TLR	18
1.3.1.3 La signalisation et ses mécanismes de régulation	20
1.3.2 L'athérosclérose et les TLR	25
1.3.2.1 La reconnaissance des facteurs de risques athérosclérotiques exogènes et endogènes	25
1.3.2.1.1 Les cellules pouvant être impliquées et les mécanismes d'activation ..	27
1.3.2.1.2 Les évidences in vitro et in vivo : étude sur les TLR2 et TLR4	28
1.4 Les œstrogènes	31
1.4.1 La biosynthèse des œstrogènes	31
1.4.2 Les récepteurs aux œstrogènes	33
1.4.2.1 Leur structure	33
1.4.2.1.1 Les récepteurs RE α et RE β	33
1.4.2.1.2 Le récepteur GPR30	34
1.4.2.2 Leur localisation et distribution	35
1.4.2.3 Leur activation et leurs mécanismes de signalisation	36
1.4.2.3.1 La voie génomique dite classique dépendante du ligand	36
1.4.2.3.2 La voie alternative indépendante du ligand	37
1.4.2.3.3 La voie non-génomique dite rapide dépendante du ligand	37
1.4.2.3.4 La voie indépendante des récepteurs	38
1.4.3 L'œstrogène et ses effets sur le système cardiovasculaire	39
1.4.3.1 Le profil lipidique	39
1.4.3.2 La biodisponibilité du NO	40

1.4.3.3 La paroi vasculaire et la guérison vasculaire	41
1.4.3.4 Le processus inflammatoire	43
1.5 La problématique.....	45
1.6 Le but du projet de recherche.....	46
1.6.1 La modulation de l'expression et de l'activité du TLR2.....	46
2. Article scientifique	48
2.1 ACCORD DES COAUTEURS	49
2.1.1 Estrogen Regulation of TLR2-mediated Pro-inflammatory Activation in Vascular Endothelial Cells.....	50
2.1.1.1 Abstract	51
2.1.1.2 Keywords	52
2.1.1.3. Introduction.....	53
2.1.1.4 Materials and Methods.....	56
2.1.1.5 Results.....	61
2.1.1.6 Discussion	66
2.1.1.7 Conclusion	73
2.1.1.8 Acknowledgements.....	74
2.1.1.9 References.....	75
2.1.1.10 Footnotes.....	84
2.1.1.11 Figure legends.....	85
2.1.1.12 Figures.....	87
3. Discussion.....	94
3.1 Modulation de la réponse inflammatoire activée par le TLR2.....	97
3.1.1 L'activation pro-inflammatoire du TLR2	97
3.1.2 L'influence de l'E2	98
3.2 Influence de l'E2 sur le profil de la réponse inflammatoire.....	101
3.2.1 Le recrutement et la transmigration des monocytes.....	101

3.2.1.1 Essais fonctionnels de migration et d'adhésion	102
3.3 L'interaction de l'E2 sur la signalisation du TLR2	106
3.3.1 Caractérisation de la signalisation impliquée.....	106
3.3.2 Le rétrocontrôle négatif de la signalisation du TLR2	109
3.3.3 La spécificité des récepteurs et leur implication	111
3.3.3.1 Le TLR2	111
3.3.3.2 Les récepteurs œstrogéniques	111
4. Conclusion.....	114
5. Bibliographie.....	xiv

Liste des abréviations

AVC	Accidents vasculaires cérébraux
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ANG II	Angiotensine II
CE	Cellules endothéliales
CEP	Cellules endothéliales progénitrices
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
EOMA	<i>Endothelial mouse cell derived from a hemangioendothelioma</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
E2	Oestradiol, 17- β -oestradiol
ERE	<i>Estrogen-response element</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
M-CSF	Facteur de stimulation de colonie de macrophages
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
HSP	<i>Heat shock proteins</i>
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
HCAEC	<i>Human coronary aortic endothelial cell</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- γ	Interféron-gamma
IL	Interleukine
JAKs	<i>Janus-kinase</i>
oxLDL	LDL oxydés
LRR	<i>Leucin-Rich Repeats</i>
LPS	Lipopolysaccharides

LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
Mac-1	<i>Macrophage antigen-1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	<i>Matrix metalloproteinase protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MO	Mœlle osseuse
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
NO	Monoxyde d'azote
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RE α	Récepteur oestrogénique alpha
RE β	Récepteur oestrogénique bêta
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signalling</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor-alpha</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

Liste des tableaux

Tableau I. Les différents TLR humains et murins exprimés et leurs ligands naturels 20

Tableau II. Les régulateurs négatifs des récepteurs TLR..... 23

Liste des figures

Figure 1. Les différentes couches composant un vaisseau.....	2
Figure 2. Le développement de la plaque; ses processus cellulaires et biochimiques..	12
Figure 3. L'évolution de la strie lipidique.....	14
Figure 4. La structure du récepteur Toll-Like humain.....	17
Figure 5. La signalisation des TLR.	22
Figure 6. La synthèse des œstrogènes à partir du cholestérol.....	32
Figure 7. La structure des récepteurs oestrogéniques.....	34
Figure 8. Les mécanismes d'activation et de signalisation des œstrogènes.....	38
Figure 9. Implication du NO dans les effets anti-inflammatoires de l'E2.....	108

«Je dédie ce mémoire à une personne très chère. Tout au long de mes travaux, et surtout lors des moments difficiles, elle m'a soutenu, aidé et aimé. Elle a su utiliser les bons mots aux bons moments. Sans toi, il n'y aurait que des pages blanches. Julien, il est pour toi ce mémoire. »

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier le Dr. Jean-François Tanguay qui a cru en mon potentiel dès le début. Pendant ces trois belles années, vous m'avez permis de parfaire mes connaissances autant techniques que théoriques. Maintenant, je sais où aller et surtout comment m'y rendre! Merci beaucoup, grâce à vous j'en sors grandis autant sur le plan professionnel que personnel.

Merci au Dre Céline Fiset et au Dre. Julie Fradette de prendre de votre précieux temps pour l'évaluation de ce mémoire. En vous souhaitant une bonne lecture!

Merci au Dre Isabelle Cloutier pour m'avoir épaulée aux moments difficiles et pour toute la confiance accordée au cours de ces années. Merci pour tous les nombreux conseils ainsi que pour l'écriture de mon article scientifique et de ce mémoire.

Un merci particulier à Pascale Geoffroy, Julie Lebel et Sandra Gilligan. Vous êtes à vous trois, l'équipe de travail que tout le monde voudrait avoir. Joviales, respectueuses, toujours à l'écoute, merci beaucoup! Merci de toute l'aide apportée, de votre professionnalisme et des nombreux moments de fous rires! Mes trois années ont passée à la vitesse de l'éclair et ce, grâce à vous trois.

Merci également à Marie-Élaine Clavet, Hortence Makui ainsi qu'à Dominique Lauzier. Malgré tout le travail que vous aviez à faire, vous n'avez jamais hésité à me conseiller et à m'aider. Merci pour votre grande générosité et pour votre temps si précieux.

J'aimerais remercier également mes deux stagiaires, Corinne St-Denis et Bettina Émile. Merci d'avoir volontairement participé à l'avancement de mon projet, de m'avoir aidé et conseillé et surtout, merci de m'avoir permis de réaliser qu'il serait possible pour moi d'aller plus loin dans l'enseignement et la formation des étudiants. Bonne chance dans l'avancement de vos projets respectifs.

Merci à Kim Tardif, Émilie Cossette, Vikie Lamontagne et Souhad El Akoum. Merci mille fois de tous vos conseils, de votre grande écoute et de votre passion pour la recherche. Vous avez été des modèles pour moi à plusieurs reprises! Merci pour tous les bons moments au laboratoire, les fous rires et l'aide apportée. Sans vous, je serais encore en train de lyser des cellules!!!

Enfin, j'aimerais remercier ma famille et mes amis. Jamais je n'aurai pu faire ces études sans leur support. Se sentir épaulé et aimé, c'est plus fort que tout. Merci!

1. Introduction

1.1 L'endothélium vasculaire

1.1.1 L'anatomie d'un vaisseau

Les vaisseaux sanguins sont les structures anatomiques responsables du transport du sang dans l'organisme. On distingue deux réseaux principaux soit les veines, qui transportent le sang vers le cœur, et les artères qui transportent le sang du cœur vers les organes.

En coupe transversale, un vaisseau présente de l'extérieur vers l'intérieur trois principales couches :

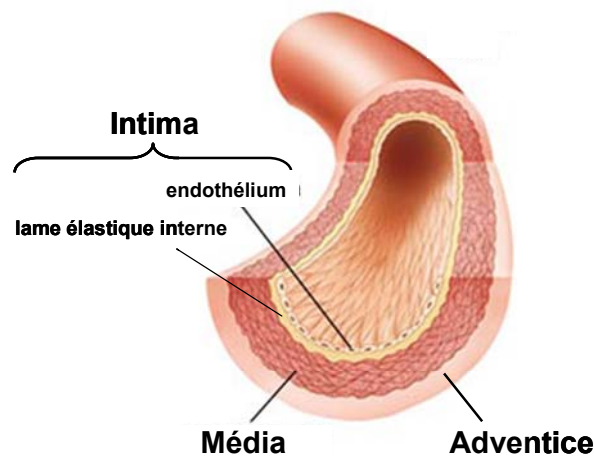


Figure 1. Les différentes couches composant un vaisseau. Chez les vertébrés, le vaisseau sanguin est une structure tubulaire complexe qui en fait un organe à part entière. Il est formé de trois couches soit l'adventice, la média et l'intima qui est constituée d'une lame élastique et de l'endothélium. Image adaptée de ¹.

L'adventice (tunique externe) est une enveloppe conjonctive peu organisée contenant les éléments nerveux du vaisseau. Dans les vaisseaux de plus gros calibre,

l'adventice contient des petits vaisseaux que l'on appelle vasa vasorum permettant son irrigation.

La média (tunique moyenne) est composée de tissu musculaire lisse, de collagène et d'élastine qui contrôle le diamètre vasculaire et joue ainsi un rôle dans le maintien de la pression artérielle.

L'intima (tunique interne) est une membrane élastique composée de fines fibres de tissu conjonctif ainsi que d'une couche de cellules épithéliales formant l'endothélium. Ces cellules sont plates et polarisées; la face apicale est en contact avec la lumière du vaisseau alors que la face basale est fixée sur une lame basale collagénique synthétisée par l'endothélium. Il s'agit d'un tissu pouvant résister à de fortes sollicitations mécaniques, mais qui est perméable aux substances dissoutes de petites tailles et à l'eau. Les cellules telles que les globules rouges ne peuvent pas le traverser mais les leucocytes, très déformables, le peuvent².

Ces trois couches se retrouvent autant dans les veines que dans les artères mais les couches sont plus minces et moins élastiques dans une veine. Ainsi, une artère est plus élastique et possède une média beaucoup plus importante puisqu'elle doit être en mesure de recevoir la pleine intensité de la pression systolique venant du cœur.

1.1.2 Les fonctions homéostatiques principales de l'endothélium

En 1865, un anatomiste suisse, Wilhelm His, utilise le terme endothélium pour la première fois dans le but de différencier l'épithélium de la couche intérieure des cavités³. La fonction la plus évidente de l'endothélium est de contenir le sang ou la lymphe à l'intérieur des vaisseaux. Toutefois, au-delà de cette aptitude et en conditions normales, il joue un rôle important dans plusieurs fonctions physiologiques lesquelles sont responsables du maintien de l'homéostasie vasculaire. Elles sont d'ailleurs expliquées plus en détails dans les prochaines sections.

1.1.2.1 Le tonus vasculaire

L'endothélium régit le tonus vasculaire d'abord par la sécrétion d'agents vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline. Les cellules endothéliales (CE) synthétisent et sécrètent le NO via l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS pour *endothelial nitric oxide synthase*) ce qui permet la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et inhibent l'agrégation des plaquettes. Le NO est aussi considéré comme un agent anti-oxydant empêchant les radicaux libres d'endommager l'endothélium. Il permet également d'assurer son renouvellement en favorisant la prolifération des CE. La prostacycline, quant à elle, est produite naturellement par les CE par l'action de l'enzyme prostacycline synthétase sur la prostaglandine H₂ (PGH₂). La principale action de la prostacycline est d'empêcher l'agrégation des plaquettes en diminuant la sécrétion de thromboxane A₂. Elle est aussi un vasodilatateur efficace et contrôle en plus le tonus vasculaire en diminuant la prolifération des CMLV. L'endothélium équilibre l'effet vasodilatateur de ces substances à l'aide de peptides vasoconstricteurs, tels l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (ANG II). C'est donc la balance des effets vasoconstricteurs et vasodilatateurs de l'endothélium qui dicte le tonus vasculaire⁴.

1.1.2.2 Une barrière sélective

L'endothélium est qualifié comme étant une membrane semi-perméable permettant le transport des fluides, des solutés ainsi que de certaines cellules, telles que les globules blancs présents dans la circulation. En conditions basales, l'endothélium dirige un flux constant d'échanges entre le sang et le liquide interstitiel des tissus. Ces échanges sont modulés par l'hétérogénéité de la perméabilité endothéliale définie par des différences jonctionnelles intercellulaires, par la présence ou non de fenestrations et de récepteurs spécifiques et par des différences dans l'activité de la machinerie du transport cellulaire³. La barrière sélective dépend aussi de l'ancrage des CE via les intégrines à certaines protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telles la fibronectine, la vitronectine, la

laminine et le collagène. Le relâchement de ces interactions entre les cellules et la MEC est responsable du transport transendothélial ⁵.

1.1.2.3 Participation aux réactions inflammatoires

L'inflammation est une réponse locale spécifique suscitée par une blessure tissulaire dans le but de détruire l'agent injurieux ou le tissu blessé. L'étape caractéristique de cette réponse est l'augmentation de l'afflux de leucocytes au site inflammatoire; un mécanisme finement régulé par l'endothélium. Face à divers médiateurs pro-inflammatoires physiologiques tels que les cytokines et les chemokines sécrétées au niveau de la blessure, les CE s'activent; elles changent de conformation et sécrètent plus d'agents vasodilatateurs. Ceci favorise une plus grande perméabilité vasculaire et augmente ainsi le recrutement des leucocytes ⁶.

En fait, suite à son activation, l'endothélium contrôle le recrutement des leucocytes par l'expression des molécules d'adhésion spécifiques. Ce recrutement en trois étapes, définies par le roulement, l'adhérence et la transmigration, se produit selon une cinétique d'expression précise des sélectines, des intégrines et des immunoglobulines de type Ig par les CE et les leucocytes ⁶. D'abord, l'expression rapide de la E- et P-sélectine par les CE ainsi que de la L-sélectine par les leucocytes induite suite à une stimulation par diverses molécules pro-inflammatoires telles que le TNF (pour *tumor necrosis factor*) et l'interleukine-1bêta (IL-1 β), permettent le roulement et l'adhérence initiale des leucocytes à l'endothélium ^{7, 8}. Les sélectines reconnaissent plusieurs ligands, notamment le PSLG-1 (pour *P-selectin glycoprotein-1*) et le ESL-1 (pour *E-selectin ligand-1*) exprimés sur les monocytes et les neutrophiles ⁶, mais reconnaissent également avec une grande affinité des glycoprotéines ressemblant à la famille des mucines ⁹. Les leucocytes sont ainsi liés faiblement à l'endothélium où ils s'adhéreront plus fermement via les intégrines et la super-famille des immunoglobulines de type Ig telles que ICAM-1 (pour *intercellular adhesion molecule-1*) et VCAM-1 (pour *vascular cell adhesion molecule-1*). Les intégrines servent

d'abord de récepteurs à la matrice extracellulaire ainsi qu'à d'autres récepteurs sur les cellules adjacentes. Constitutivement exprimées par les leucocytes, les intégrines $\beta 1$ VLA-4 (pour *very late antigen-4*), $\beta 2$ Mac-1 (pour *macrophage antigen-1*) et LFA-1 (pour *lymphocyte function-associated antigen-1*) reconnaissent les molécules ICAM et VCAM exprimées par les CE activées. Cette liaison induit plusieurs signaux intracellulaires amenant un changement de conformation des leucocytes à l'origine de leur migration transendothéliale ⁸.

Toutefois, si la fonction des CE est altérée par exemple lors d'une stimulation excessive par des cytokines inflammatoires ou par des forces de cisaillements élevées (appelé en anglais le *shear stress*) due à un flux sanguin perturbé ¹⁰, l'endothélium perd sa capacité à contrôler cette réponse entraînant un débalancement de ses fonctions homéostatiques. Ce débalancement, caractérisé par une dérégulation sévère du tonus vasculaire due à la diminution de la biodisponibilité du NO, est à l'origine de la dysfonction endothéliale (ou blessure endothéliale). Au site de la dysfonction, une plus grande perméabilité endothéliale ainsi qu'une augmentation des propriétés procoagulantes et pro-inflammatoires de l'endothélium sont observées. Ceci favorise une agrégation anormale des plaquettes, une prolifération importante des CMLV, une sécrétion accrue de cytokines ainsi que la présence excessive de cellules inflammatoires dans l'intima. La diminution de NO entraîne aussi l'augmentation du stress oxydant qui favorise alors l'oxydation des *low density lipoproteins* (LDL) ^{11, 12}. La dysfonction endothéliale est donc définie comme étant l'étape clé favorisant le développement de l'athérosclérose.

1.2 L'athérosclérose

Réel problème de santé publique responsable de la première cause de mortalité dans les pays occidentalisés, l'athérosclérose et ses complications vasculaires sont à l'origine de maladies et d'atteintes coronariennes ainsi que d'invalidité et de morbidité reliées par exemple à l'insuffisance cardiaque et aux séquelles d'accidents vasculaires cérébraux (AVC). Les études épidémiologiques indiquent que dans les décennies à venir, dû à notre rythme de vie moderne, l'augmentation de l'incidence de l'athérosclérose prendra des proportions épidémiques et ce, partout dans le monde ¹³. La population mondiale est de plus en plus vieillissante et les facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'obésité et le diabète de type 2 augmentent dangereusement chez les enfants et les adolescents, contribuant ainsi à la recrudescence des maladies cardiovasculaires pour les années à venir.

Pourtant, il est étonnant de savoir que cette maladie existe depuis déjà fort longtemps. Un pionnier de la paléopathologie, Sir Marc Ruffer, aurait identifié en 1911 la présence de plaques athérosclérotiques chez une momie égyptienne; cas confirmé par le paléontologiste Andrew T. Sandison ¹⁴.

1.2.1 Définition de la maladie et ses facteurs de risques

L'étymologie du mot athérosclérose (*athéro(me)-sclérose*) explique clairement l'origine et les facteurs de risques de cette maladie. D'abord, le mot « athérome » définit le remodelage de l'intima des artères de moyen à gros calibre, telles les artères coronariennes et l'aorte, par l'accumulation fragmentaire de lipides, de produits sanguins, de tissus adipeux et de dépôts calcaires. C'est ce que l'on appelle la plaque d'athérome. L'expression « sclérose », quant à elle, signifie la dégénérescence fibreuse d'un tissu, qui est habituellement reliée au vieillissement physiologique normal des organes. Un tissu sclérosé perd donc de son élasticité et devient plus rigide. Ainsi, l'athérosclérose se définit comme étant un vieillissement prématuré des artères dû à l'épaississement de sa paroi vasculaire

par les plaques d'athérome. Ce phénomène réduit la lumière vasculaire et est responsable, entre autres, de l'angine de poitrine et de l'ischémie cérébrale transitoire. Si la maladie progresse à des stades plus avancés, la plaque d'athérome peut se rompre et/ou obstruer l'artère; engendrant l'infarctus du myocarde ou un AVC. Les étapes de la maladie sont discutées plus en détail à la section 1.2.2.

Cependant, au travers des années, la définition réelle de la maladie n'a pas toujours été claire. Certains croyaient qu'elle était une maladie proliférative alors que d'autres voyaient la cause de l'athérome comme étant la résorption du thrombus. Aujourd'hui, l'athérosclérose est considérée comme une maladie complexe qui résulterait d'une dysfonction endothéliale telle que définie à la section 1.1.2.3. Se développant généralement avec l'âge, plusieurs facteurs de risque cardiaques peuvent contribuer à la dysfonction endothéliale accélérant ainsi la progression de la maladie.

1.2.1.1 L'hyperlipidémie

La corrélation positive entre le taux de cholestérol sanguin et les maladies cardiovasculaires a été démontrée il y a de cela plusieurs années par les expérimentations de deux chercheurs russes, Anitchkow et Chaladow ¹⁵. Ensemble, ils ont constaté que des lapins nourris avec une diète riche en œufs développaient des lésions lipidiques ressemblant à l'athérosclérose humaine.

Un niveau sanguin élevé en LDL et bas en HDL (pour *high density lipoproteins*) favorise ainsi le développement de l'athérosclérose; les LDL en excès s'accumulent très rapidement à la paroi vasculaire et leur oxydation contribue à la formation de cellules spumeuses responsables du développement des lésions athérosclérotiques ¹⁶. Une réduction du cholestérol sanguin permet donc d'éviter un développement précoce de la maladie.

1.2.1.2 L'âge et le sexe

Les cellules ne sont pas éternelles; à un moment de leur vie elles arrêtent de croître irréversiblement. Ceci définit la sénescence cellulaire, un phénomène relié au développement de plusieurs maladies. Dans les cellules vasculaires d'artères plus vieilles, l'expression de ICAM-1 augmente et favorise l'adhésion des leucocytes ¹⁷. De plus, un endothélium affaibli par l'âge n'est plus en mesure de contrôler le tonus vasculaire normal ainsi qu'une réponse inflammatoire efficace. Au niveau des lésions athérosclérotiques, les CE et les CMLV présentent une physiologie comparable à celle des cellules en sénescence ¹⁸. En effet, les CE au niveau des plaques diminuent la biodisponibilité en NO via l'altération de l'activité de la eNOS et les CMLV, la réactivité à ce puissant vasoconstricteur.

Même si le vieillissement est en corrélation avec le développement des maladies cardiovasculaires, il reste que la prévalence de ces pathologies est sept fois plus élevée chez l'homme que chez la femme préménopausée de même âge. Mais cet écart entre les sexes tend à s'estomper lorsque la femme devient ménopausée, illustrant ainsi le rôle important de l'œstrogène comme facteur cardioprotecteur ¹⁹. Ce sujet est d'ailleurs discuté plus en détails à la section 1.4.3.

1.2.1.3 L'hypertension

Les plaques d'athérosclérose se localisent préférentiellement dans les régions artérielles soumises à de fortes perturbations du flux sanguin, suggérant un rôle des contraintes mécaniques dans le développement de la maladie ²⁰. L'hypertension artérielle, par l'induction de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus inflammatoire, augmente la sécrétion d'ANG II. Ce puissant vasoconstricteur stimule la production de radicaux libres ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les CE et les CMLV et perturbe donc le maintien normal du tonus vasculaire par l'endothélium ²¹.

1.2.1.4 Le tabagisme

Des études épidémiologiques sur le tabagisme ont démontré qu'un tiers des décès reliés à la cigarette serait dû au développement de maladies cardiovasculaires via l'augmentation des altérations structurelles et fonctionnelles des vaisseaux sanguins²². Des changements dans la conformation vasculaire réduisent la capacité des vaisseaux à se dilater et à se contracter normalement. L'usage de la cigarette augmente également la viscosité sanguine et par le fait même, les risques de thrombose et de réactions inflammatoires.

1.2.1.5 La sédentarité et le diabète

L'inactivité, ou la sédentarité, est aussi un facteur de risque cardiovasculaire évitable surtout quand on sait que l'exercice physique de façon modérée à intense améliore grandement la santé cardiaque. Il rétablit les fonctions endothéliales de patients souffrant de maladies coronariennes, réduit le poids, la pression sanguine ainsi que l'inflammation. L'exercice accroît la réparation vasculaire et favorise l'homéostasie endothéliale²³.

L'hyperglycémie et l'augmentation du stress oxydant associés au diabète et à l'obésité avivent la production de produits de glycation avancés (AGE pour *Advanced glycation end products*) qui une fois liés à leur récepteur (RAGE pour *Receptor for advanced glycation end products*) entraînent une réaction inflammatoire endothéliale²⁴. L'augmentation de la glycation favorise également la modification des LDL, les rendant pro-athérogéniques²⁵. De plus, la délicate balance régulant le tonus vasculaire est altérée chez les diabétiques, contribuant ainsi au développement de la dysfonction endothéliale²⁶.

1.2.1.6 Les infections

Plusieurs études ont démontré la corrélation entre le développement de maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde et la présence d'agents infectieux. La recherche a d'ailleurs confirmé que les infections respiratoires sévères augmentaient les

risques associés à la rupture de la plaque athérosclérotique ²⁷. Ainsi, la bactérie *Porphyromonas gingivalis* a fait l'objet de nombreuses recherches en cardiologie qui ont démontré un lien direct avec le développement de l'athérosclérose. Cette bactérie responsable d'infections dentaires telles que la parodontopathie, a été détectée au niveau des plaques athérosclérotiques ²⁸. Elle affecte l'intégrité des CE, le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques, la coagulation ainsi que la fonction plaquettaire. L'induction d'une réponse inflammatoire locale par *P. gingivalis* augmente également la sécrétion des médiateurs inflammatoires tels que la protéine C-réactive (CRP pour *C-reactive protein*) et contribue donc au développement de la dysfonction endothéliale.

1.2.2 Les étapes de la maladie

1.2.2.1 Formation de la plaque : stries lipidiques et lésions athérosclérotiques

L'initiation de l'athérosclérose origine donc d'une dysfonction endothéliale. Caractérisée par la diminution dans la biodisponibilité du NO et par une perméabilité vasculaire anormale, la dysfonction endothéliale favorise la diffusion de fines particules de LDL à travers l'intima où elles s'accumulent et s'oxydent. Les LDL oxydés (oxLDL) promeuvent l'expression des molécules d'adhésion par les CE telles que les E-sélectines, VCAM-1 et ICAM-1 ce qui permet aux leucocytes circulants, plus particulièrement les monocytes, d'adhérer via leur intégrines et de transmigrer à travers l'endothélium ²⁹. Dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages grâce au facteur de stimulation de colonie de macrophages (M-CSF) sécrété par les CE activées et accumulent les oxLDL. Les macrophages deviendront progressivement des cellules spumeuses, composant ainsi la strie lipidique et caractéristique des premiers stades de l'athérosclérose ^{30, 31}. Cette strie lipidique progresse ensuite en lésion athérosclérotique caractérisée par la prolifération et la migration des CMLV de la média vers l'intima. Les CE ainsi que les CMLV sécrètent conjointement la protéine chimioattractante des monocytes (MCP-1 pour *monocyte chemoattractant protein-1*) favorisant d'avantage l'accumulation des macrophages dans l'intima (figure 2).

La lésion athérosclérotique est ainsi constituée de cellules de la paroi vasculaire, de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les lymphocytes T, de tissus conjonctifs et de lipides.

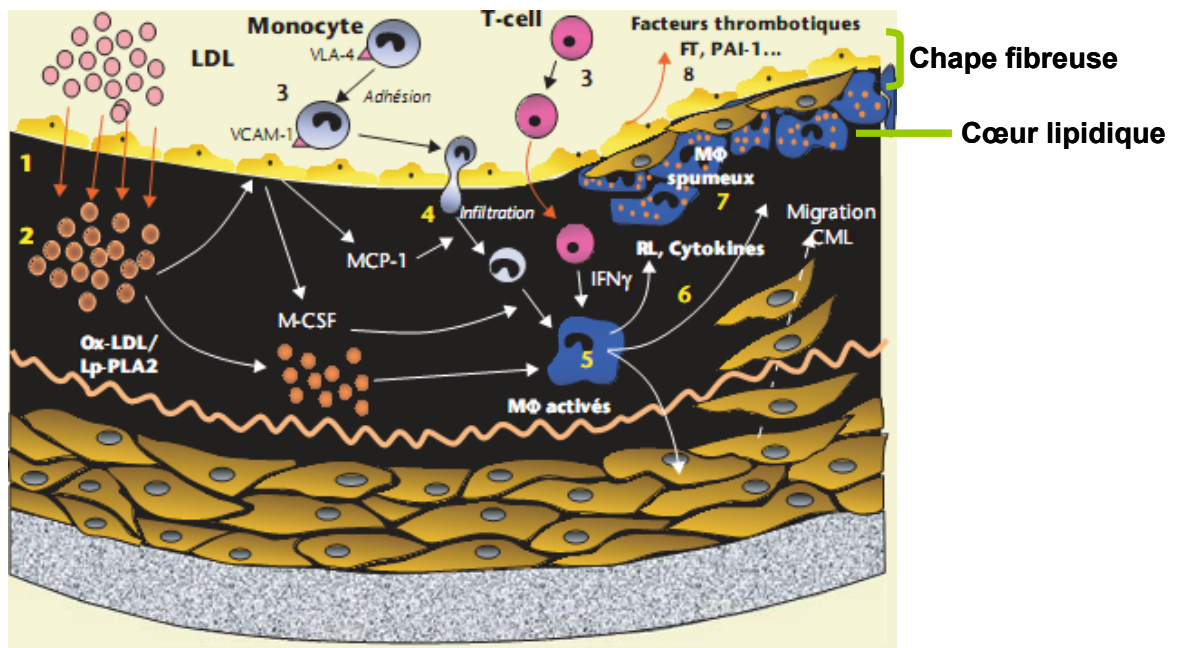


Figure 2. Le développement de la plaque; ses processus cellulaires et biochimiques. D'abord, les LDL s'infiltrent dans l'intima et s'oxydent, favorisant ainsi l'adhésion et l'infiltration des leucocytes par l'activation des CE (étapes 1 à 4). La réaction immunitaire innée et acquise se mettent en place et induit une activation du processus inflammatoire conduisant à la formation de macrophages (MΦ) spumeux, et à la libération de cytokines proinflammatoires (étapes 5, 6 et 7). Les CMLV provenant de la média renforcent la chape fibreuse au-dessus du cœur lipidique qui continue de croître (étape 7). La rupture de la plaque expose des agents thrombotiques responsables de la formation du trombus (étape 8). Image adaptée de ²⁹.

1.2.2.2 Progression de la plaque : processus inflammatoire et formation du cap fibreux

L'infiltration et l'accumulation des macrophages spumeux et des lymphocytes T au sein de la plaque engendrent une réaction inflammatoire dite 'chronique' définie par une abondante sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines tels que le PDGF (*platelet-derived growth factor*), le TNF-alpha (TNF- α), le TNF-bêta (TNF- β), l'IL-1 β , l'IL-6 et l'interféron-gamma (IFN- γ). Cette forte réaction augmente la migration et la prolifération des CMLV qui contribuent à la formation de cellules spumeuses qui accumulent elles aussi les oxLDL (figure 2) ^{11, 27, 31}. Ainsi, le cœur lipidique de la plaque continue de croître et commence à devenir apoptotique puis nécrotique. De plus, les CMLV synthétisent la matrice extra-cellulaire (MEC) composée de collagène, de protéoglycans et de fibrine formant ce que l'on appelle le 'cap fibreux' ³². L'accumulation de collagène ainsi que les phénomènes de calcification et de minéralisation par les CMLV permettront de stabiliser la plaque athéromateuse qui diminue de plus en plus la lumière vasculaire sans l'obstruer complètement ³³. Pour palier à cette obstruction partielle, l'artère peut se remodeler, augmentant ainsi son diamètre pour permettre une circulation sanguine efficace. Par contre, si la maladie progresse, la plaque peut devenir instable et se rompre, provoquant la formation d'un thrombus qui bloque l'artère atteinte (figure 3).

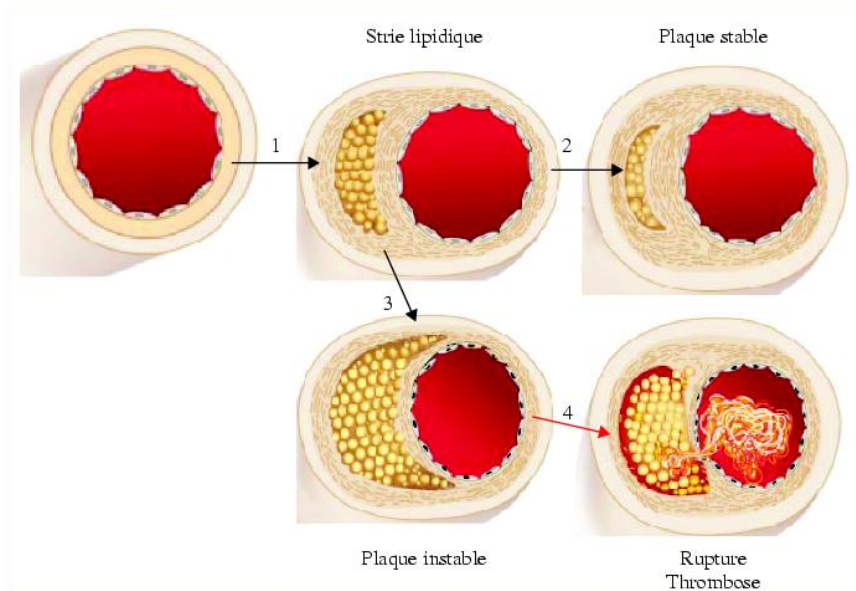


Figure 3. L'évolution de la strie lipidique. Au stade précoce de la maladie (étape 1), la strie lipidique est chapeautée d'une cape fibromusculaire menant à sa stabilisation (étape 2). Lorsque la maladie progresse, la chape s'amincit (étape 3) et peut se rompre exposant ainsi le matériel lipidique thrombogénique (étape 4). Un thrombus peut ainsi se former et, si il bloque entièrement la lumière vasculaire, est responsable d'ischémie et de nécrose. Image tirée de ³⁴.

1.2.2.3 Rupture de la plaque : causes et complications liées à cette rupture

Quand la réponse inflammatoire à l'origine de la formation du cap fibreux persiste, elle interfère sur l'intégrité de la matrice de collagène produite par les CMLV et rend la plaque vulnérable. L'infiltration accrue de lymphocytes T est principalement responsable de cet état. L'IFN- γ sécrété par ces cellules inhibe la prolifération des CE et la sécrétion de TNF- β , de PDGF et d'IL-1; empêchant ainsi la production de collagène par les CMLV ²⁹. Les lymphocytes T augmentent également la destruction des fibres de collagène existantes et provoquent la desquamation de l'endothélium en favorisant la sécrétion et l'activation des métalloprotéinases (MMP pour *matrix metalloproteinase protein*) de type collagénase par les macrophages ^{31, 35}. De plus, ils stimulent la production d'agents

athéromatose, dont le facteur tissulaire (ou *tissu factor*) et le PAI-1 (pour *plasminogen activator inhibitor-1*), par les CE et les macrophages³⁵. À cette étape, la plaque est ainsi caractérisée par un gros cœur lipidique mou et prothrombotique ayant une chape fibreuse mince et fragile prête à se rompre (figure 3, étape 3).

Suite à la rupture du cap fibreux, les facteurs thrombotiques du cœur lipidique sont en contact avec les facteurs de coagulation du sang, dont le facteur VIIa, enclenchant ainsi le processus de thrombose (figure 3, étape 4)^{27, 31}. Ce processus est caractérisé par la formation d'un thrombus de fibrine et de collagène qui sert de matrice à l'agrégation plaquettaire³⁶. Cependant, il ne tend pas à se dissoudre normalement par fibrinolyse puisque le PAI-1 inhibe ce phénomène. Ainsi, soit il bloque complètement le vaisseau d'origine ou soit il se détache. En se détachant, le thrombus peut bloquer une artère plus distale soit coronarienne, pulmonaire ou cérébrale causant l'infarctus, l'embolie pulmonaire ou l'AVC. L'endommagement endothélial contribue également au processus de thrombose en augmentant l'exposition du facteur de von Willebrand et du collagène ce qui contribue à augmenter le recrutement, l'activation et l'agrégation des plaquettes³⁶.

Les réactions inflammatoires responsable de la progression de la plaque sont également garantes de son instabilité. Conséquemment, il est logique d'affirmer que l'athérosclérose est une maladie dans laquelle les composantes inflammatoires jouent des rôles clés et qu'il est nécessaire de bien comprendre leurs mécanismes d'action.

1.3 Les récepteurs Toll-Like (*Toll-like receptors* [TLR])

Le rôle du système immunitaire est de détecter et d'éliminer les pathogènes en discriminant les antigènes du soi versus du non-soi. Divisé en deux catégories, soient le système adaptatif et le système inné, le système immunitaire est capable de reconnaître une très grande variété d'antigènes à l'aide de différents récepteurs. Au niveau du système adaptatif, les immunoglobulines sécrétées par les lymphocytes B ainsi que les récepteurs spécifiques des lymphocytes T permettent au corps d'identifier et de garder en mémoire les pathogènes infectieux. La réponse innée, quant à elle, est considérée comme faisant partie d'un système de reconnaissance primaire et rapide. Présente dans tous les organismes multi-cellulaires et génétiquement conservée, la réponse innée a pour but d'éviter une infection en protégeant le corps contre l'entrée de microorganismes via leur reconnaissance par les récepteurs Toll-like³⁷.

1.3.1 Les différentes familles des TLR

1.3.1.1 Structures, fonctions et distributions des TLR

Les TLR humains appartiennent à la grande famille des PRR (pour *pattern-recognition receptors*) et tiennent leur nom à leur homologie avec une famille de molécules retrouvées chez la drosophile dont le principal membre s'appelle *Toll*. Initialement identifié en 1996 comme étant un gène responsable du développement embryonnaire de la drosophile³⁸, Toll a aussi démontré son rôle dans l'immunité anti-fongique du même insecte³⁹. Aujourd'hui, nous savons que les TLR reconnaissent des molécules associées à des menaces microbiennes appelées PAMP (pour *pathogen-associated molecular patterns*), non sujettes à des mutations, et spécifiques de ces menaces, i.e qu'on ne retrouve pas normalement dans l'hôte où le TLR est exprimé. Une fois activés, les TLR sont impliqués dans l'activation cellulaire par le facteur NF-κB (pour *nuclear factor kappa B*) via la transcription des gènes liés à l'inflammation. Ils sont ainsi responsables de la maturation,

de la migration et de l'adhésion des lymphocytes ⁴⁰⁻⁴⁴, d'une action antivirale par la sécrétion d'IFN ^{37, 45} et induisent la production de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8, permettant subséquemment l'élimination du pathogène ⁴⁶⁻⁴⁹. Les différents ligands et les voies de signalisation des TLR sont expliqués plus en détails aux sections 1.3.1.2 et 1.3.1.3.

Les TLR sont tous des récepteurs trans-membranaires de type 1 à trois domaines principaux : un domaine extracellulaire récepteur du signal de danger et composé de nombreux motifs de répétition riche en leucine (LRR pour *Leucin-Rich Repeats*), un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine cytoplasmique C-terminal contenant un *Death Domain* (figure 4). Ce dernier domaine permet la transduction du signal d'activation. Il est également homologue avec le récepteur à l'IL-1, d'où le nom de domaine TIR pour *Toll-interleukine 1 receptor* ³⁷. La majorité des TLR sont localisés à la membranaire cellulaire, exception faite des TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 qui eux, se situent à la membrane des endosomes. Leur structure et leurs fonctions sont les mêmes que pour les autres TLR.

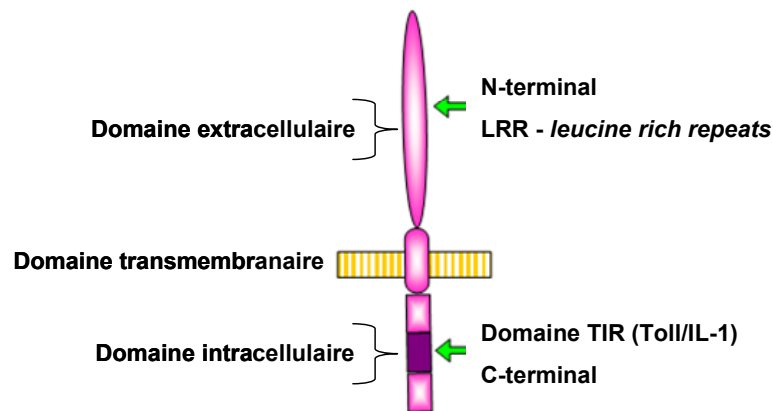


Figure 4. La structure du récepteur Toll-Like humain. Le TLR humain est un récepteur transmembranaire composé de trois domaines (extracellulaire, transmembranaire et cytoplasmique). Son domaine de reconnaissance extracellulaire est composé de LRR alors que son domaine intracellulaire, responsable de la transduction du signal, possède une homologie avec le récepteur à l'IL-1. Image adaptée de ³⁷.

La plupart des espèces de mammifères ont entre dix et quinze types de TLR. Treize TLR (appelés simplement TLR1 à TLR13) ont été identifiés chez l'homme et la souris tandis que des formes équivalentes mais différentes ont été trouvées chez d'autres espèces telles que les oiseaux, les poissons et les reptiles. Cependant, certains TLR sont spécifiques à l'humain, comme le TLR10. La souris exprime par contre les TLR11, TLR12 et TLR13, inexistantes chez l'homme ⁴⁸. Toutes les cellules du système immunitaire expriment les TLR, mais à des niveaux différents. Par exemple, les neutrophiles, impliqués dans la phagocytose des pathogènes, ainsi que les monocytes/macrophages expriment tous les TLR à l'exception du TLR3 ⁵⁰. Il a aussi été démontré qu'un patron spécifique d'expression est présent dépendamment du degré de maturation des leucocytes ⁵¹. Les TLR sont également exprimés par les cellules exposées aux microorganismes, comme les kératinocytes de la peau et les cellules épithéliales pulmonaires. De même, ils sont exprimés à la face basale et non à la face apicale des cellules épithéliales de l'intestin. Cette polarisation particulière permettrait d'éviter une activation inflammatoire continue dans un intestin constamment exposé aux bactéries. Les systèmes rénal et génital expriment eux aussi ces récepteurs. Les CE ne sont pas en reste et via leur expression des TLR, l'organisme possède un autre système de détection efficace des pathogènes, contribuant ainsi à la protection contre les infections ⁵⁰.

1.3.1.2 Les ligands des TLR

Les TLR reconnaissent les PAMP, tels les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes et les lipoprotéines que l'on définit comme étant des ligands exogènes provenant des microorganismes. Mais ils sont également capables de se lier à des facteurs non pathogènes produits durant la maladie, le stress ou un traumatisme. Le fibrinogène, impliqué dans le processus de coagulation, et les protéines de choc thermique HSP (pour *heat shock proteins*), générées lors d'un stress thermique comme la fièvre, peuvent activer les TLR2 et TLR4. Ceci est la base d'un modèle immunitaire étudié depuis 1994 du « modèle de danger » qui suggère que ces ligands endogènes sont reconnus et associés à un

risque accru de maladie et mettent le système immunitaire en alerte via l'activation des TLR⁵².

Individuellement, chaque TLR reconnaît un ou plusieurs PAMP spécifiques, permettant ainsi une surveillance immunitaire large via une vaste reconnaissance d'agents et/ou d'activateurs⁵³. Ces récepteurs sont habituellement sous forme de dimère, plus spécifiquement, d'homodimère. Par contre, le TLR2 a la particularité de former des hétérodimères avec le TLR1 ou le TLR6, chaque hétérodimère ayant une spécificité de ligand différente. Les TLR peuvent aussi dépendre d'autres co-récepteurs pour la sensibilité totale au ligand³⁷. C'est le cas de la reconnaissance du LPS par le TLR4 qui requiert la présence de MD-2. Le CD14 et les protéines liant le LPS (pour *LPS binding protein*) sont aussi connus pour faciliter la présentation du LPS au MD-2. Le CD14 est plus fortement exprimé à la membrane cellulaire des monocytes, macrophages et des neutrophiles. Par souci de synthèse, les différents ligands reconnus par les TLR humains et murins sont présentés sous forme de tableau (tableau I, résumé de^{37, 48}). À noter que les ligands des TLR10, TLR12 et TLR13 sont inconnus encore aujourd'hui.

Tableau I. Les différents TLR humains et murins exprimés et leurs ligands naturels

Les TLR	Ligand(s) naturel(s)
TLR1	Triacyl des lipoprotéines (bactéries Gram+ et Gram-)
TLR2	Peptidoglycane des bactéries Gram+, acides lipotéichoïques, zymosane (champignons et levures), glycoprotéines virales, LPS atypiques : <i>P.gingivalis</i> , <i>L.interrogans</i> , HSP70
TLR3	ARN double brin d'origine virale ou parasitaire
TLR4	LPS (Gram-), glycoprotéines virales, fibrinogènes/fibrine , HSP60 et HSP70
TLR5	Flagelline
TLR6	Diacyl des lipoprotéines
TLR7	Imidazoquinolines, ARN viral simple brin
TLR8	ARN viral simple brin
TLR9	ADN bactérien (ADN CpG non-méthylé)
<i>TLR10</i>	<i>Inconnu</i>
TLR11	Profiline, bactéries uropathogéniques : <i>Toxoplasma gondi</i>
<i>TLR12</i>	<i>Inconnu</i>
<i>TLR13</i>	<i>Inconnu</i>

1.3.1.3 La signalisation et ses mécanismes de régulation

Une fois les récepteurs TLR activés, des molécules adaptatrices seront recrutées au niveau du *Death Domain* du domaine cytoplasmique TIR, dans le but de propager le signal d'activation (figure 5). A ce jour, quatre adaptateurs sont connus dans la signalisation des TLR, la principale étant MyD88, un facteur de différenciation myéloïde. Une fois associée avec le domaine TIR, MyD88 mobilise les kinases sérine/thréonine IRAK1 et IRAK4 (pour

IL-1-receptor-associated kinases), qui elles, une fois phosphorylées, recrutent TRAF6 (pour *TNF-receptor-activated factor-6*). TRAF6 activée résulte en l'activation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (*extracellular signal-regulated kinase* (ERK), *c-jun N-terminal kinase* (JNK), p38) ainsi qu'en la translocation nucléaire des facteurs NF- κ B et AP-1 (pour *activator protein-1*), responsables de la transcription de gènes pro-inflammatoires via la phosphorylation du complexe de kinases I κ B⁵⁴. TIRAP/Mal (pour *TIR domain-containing adaptor protein/MyD88-adaptor-like*) est une autre molécule adaptatrice présente aux récepteurs TLR2 et TLR4 qui active la voie NF- κ B via sa dimérisation avec MyD88. Il est également démontré que la voie du TLR2/MyD88/TIRAP, par Rac1 (pour *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) et la PI3K (pour *phosphatidylinositol 3-kinase*), favorise la translocation et l'activation de NF- κ B via la phosphorylation d'Akt^{50,55}.

Des études ont toutefois mis en évidence que des macrophages murins déficients en MyD88 étaient capables d'activer les facteurs NF- κ B et AP-1 suite à leur stimulation avec le LPS, illustrant ainsi l'existence d'une voie MyD88 indépendante⁵⁶. Cette voie a été démontré comme étant présente seulement pour les récepteurs TLR3 et TLR4. Une fois activés, les molécules adaptatrices TRIF (pour *TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β*) et TRAM (pour *TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β -related adaptor molecule*) sont recrutées aux récepteurs et permettent la phosphorylation d'IRF3 (pour *interferon regulatory factor 3*). Ce dernier transloque au noyau où il régulera l'expression de l'IFN- β . TRAM/TRIF activent aussi les MAPK ainsi que le NF- κ B via la mobilisation de TRAF6⁵⁵.

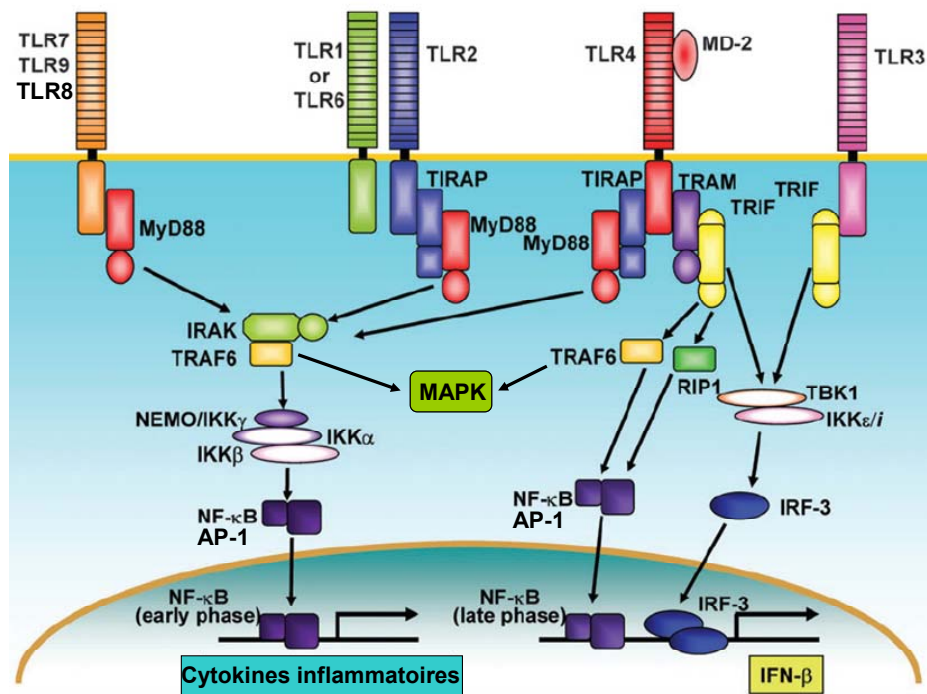


Figure 5. La signalisation des TLR. Le TLR2 (en combinaison avec le TLR1 et le TLR6) et le TLR4 utilisent les molécules adaptatrices MyD88 et TIRAP/MAL pour activer les facteurs NF-κB et AP-1 et les MAPK. Ces activations amènent ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Le TLR4 ainsi que le TLR3 peuvent activer les NF-κB/AP-1/MAPK et favoriser la sécrétion d'IFN-β, indépendamment de MyD88, grâce aux adaptateurs TRIF et TRAM. Les TLR7, 8 et 9 se trouvent normalement aux endosomes et n'utilisent que la voie MyD88 dépendante sans avoir recours à TIRAP/MAL. La signalisation du TLR5, récepteur transmembranaire non représenté dans cette image, s'apparente à celle des TLR7, 8 et 9. Image adaptée de ⁵⁷.

La réponse immunitaire est une fine balance entre des effets anti-inflammatoires et pro-inflammatoires, d'où l'importance de réguler étroitement l'activation des récepteurs TLR. Un contrôle inefficace de leurs signalisations est à l'origine de maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux et également d'inflammation chronique telle que l'asthme ^{58, 59}. Le tableau II, adapté de ⁵⁹, résume les nombreux régulateurs négatifs des TLR, leur induction ainsi que leurs mécanismes d'action.

Tableau II. Les régulateurs négatifs des récepteurs TLR

Régulateurs	Induction	TLR impliqué	Mécanisme utilisé
sTLR2	Constitutivement exprimé dans le lait maternel et dans le plasma	TLR2	Antagoniste du TLR2
sTLR4	Non-déterminé	TLR4	Bloque l'interaction entre MD2 et TLR4
MyD88s	Expression induite par le LPS au niveau de la rate	TLR4	Antagoniste de MyD88
IRAKM	Expression induite dans les monocytes par le LPS	TLR4, 9	Inhibe la phosphorylation de IRAK1
SOCS1	Expression induite dans les macrophages par le LPS et le CpG	TLR4, 9	Supprime IRAK
NOD2	Non-déterminé	TLR2	Supprime NF- κ B
PI3K	Constitutivement exprimée dans la plupart des cellules	TLR2, 4, 9	Inhibe les fonctions de p38, JNK et de NF- κ B
TOLLIP	Constitutivement exprimée par plusieurs types de tissus	TLR2, 4	Autophosphoryle IRAK1
A20	Expression induite dans les macrophages par le LPS	TLR2, 3, 4, 9	Désubiquitile TRAF6
ST2L	Expression induite dans les macrophages par le LPS	TLR2, 4, 9	Séquestre MyD88 et MAL
SIGIRR	Exprimé par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques immatures	TLR4, 9	Interagit avec TRAF6 et IRAK
TRAILR	Constitutivement exprimée dans la plupart des cellules	TLR2, 3, 4	Stabilise I κ B α
TRIAD3A	Constitutivement exprimée dans la plupart des cellules et tissus	TLR4, 9	Ubiquitile les TLR

NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*); SIGIRR (*single immunoglobulin interleukin-1-related receptor*); SOCS1 (*suppressor of cytokine signalling 1*); sTLR (*soluble decoy TLR*); TOLLIP (*Toll-interacting protein*); TRAILR (*tumour-necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor*).

Les mécanismes de régulation des TLR se font donc à plusieurs niveaux. La première voie de contrôle utilisée lors d'une infection bactérienne aiguë est la sécrétion naturelle des sTLR dans le sang et les tissus, empêchant ainsi la liaison du ligand à son TLR respectif. Lorsqu'il y a interaction ligand-TLR, les voies de signalisation sont plutôt contrôlées par les régulateurs transmembranaires (TRAILR, SIGIRR et ST2L) ou intracellulaires (tous les autres à l'exception des sTLR et MyD88s). Certains, constitutivement présents, contrôlent l'activation dite physiologique des TLR. Par contre, lors d'une infection, donc d'un niveau d'activation plus important, ces régulateurs seront exprimés plus fortement. Un autre mécanisme de contrôle négatif utilisé par la cellule est la réduction de l'expression des TLR, soit via la diminution de la transcription du gène ou bien par la dégradation protéique des récepteurs. Si les mécanismes de régulation ne sont pas assez efficaces, la cellule hyperactivée meurt par apoptose ⁵⁹.

Un autre mode de régulation négative de l'activation des TLR implique le récepteur TAM à activité tyrosine kinase composé des sous-unités Tyro3, Axl, et Mer. Sa signalisation est associée au récepteur de l'IFN- α/β (IFNAR) ainsi qu'au facteur de transcription Stat1 (pour *signal transducer and activator of transcription 1*) ⁶⁰⁻⁶². D'abord, la sécrétion de cytokines par l'activation des TLR amène l'excitation de différents récepteurs aux cytokines, dont l'IFNAR. La signalisation activée par les cytokines la plus largement étudiée est celle des JAKs/STATs (pour *Janus-kinase / Signal transducer and activator of transcription*). La protéine JAK est constitutivement exprimée et se retrouve associée aux récepteurs des cytokines. Lorsqu'il y a activation des récepteurs, cette protéine s'auto-phosphoryle et subséquemment, entraîne la phosphorylation de résidus tyrosines créant ainsi des sites de liaisons à d'autres protéines telles que les facteurs de transcription STATs. Les STATs, liées aux récepteurs des cytokines, sont à leur tour phosphorylées par les JAKs donnant lieu à des STATs activées qui se dimérisent et qui transloquent au noyau où elles activeront les gènes de l'inflammation reliés aux cytokines ⁶³. La phosphorylation et l'activation de Stat1 induit l'expression du récepteur TAM et la signalisation de TAM amène la transcription des protéines SOCS1/3 (pour *suppressors of cytokine signalling 1/3*)

qui elles, inhibent l'activation des récepteurs des cytokines ainsi que des TLR. Ces protéines dégradent les TLR ou bien empêchent l'activation de TRAF6⁶¹. Ce sont les récepteurs TLR3, TLR4 et TLR9 qui sont les plus touchés par ce mécanisme de régulation. Des mutations de TAM, le rendant inactif, seraient responsables de maladies auto-immunes telles que le lupus⁶⁴ alors qu'une suractivation serait garant d'une immunosuppression à l'origine d'une septicémie⁶⁵.

1.3.2 L'athérosclérose et les TLR

Puisque le développement de l'athérosclérose est en partie relié à l'induction d'une réponse inflammatoire, les TLR et leur signalisation sont en étroite relation avec cette maladie. À ce jour, les études sur le sujet concernent surtout l'implication du TLR2 et du TLR4, mais les autres TLR peuvent également y être impliqués^{66,67}.

1.3.2.1 La reconnaissance des facteurs de risques athérosclérotiques exogènes et endogènes

Comme discuté à la section 1.3.1.2, les TLR reconnaissent des facteurs exogènes, dits 'infectieux', tels que les PAMP. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'exposition de ces « pathogènes » au niveau artériel. D'abord, les monocytes circulants ont pour rôle de phagocyter les bactéries présentes à un site d'inflammation chronique. Par la suite, ces mêmes monocytes pourront délivrer leur cargaison (tuée ou partiellement détruite) au niveau vasculaire d'une dysfonction endothéliale en développement⁶⁸. Un autre mécanisme, tel qu'expliqué à la section 1.2.1.6, suggère l'implication des bactériémies dues aux pathogènes oraux et respiratoires dans le développement de l'athérosclérose. La parodontopathie par *P. gingivalis* ainsi que les infections pulmonaires par *Chlamydia pneumoniae* favorisent la présence de bactéries et d'endotoxines dans le sang et au niveau de la plaque athérosclérotique^{69,70}. Leur reconnaissance par les TLR induit la sécrétion de facteurs proathérogéniques tels que l'IL-8 et la MCP-1 ainsi que la surexpression des

molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, expliquant de cette façon leur relation avec l'augmentation des risques d'atteintes coronariennes et d'infarctus du myocarde ^{28, 71}. D'autres facteurs de risques athérosclérotiques tels que l'obésité, une diète riche en gras, principalement en gras saturés, et le tabagisme seraient également responsables de l'augmentation d'endotoxines dans le sang, promouvant ainsi l'inflammation artérielle ⁶⁸.

Les TLR reconnaissent également des facteurs endogènes non-infectieux provenant du soi, comme les HSP et le fibrinogène à l'origine du « modèle de danger » (voir section 1.3.1.2). En outre, certaines études ont démontré une activation et une surexpression des TLR par les oxLDL présents en grande quantité au niveau de la plaque athéroscléreuse ⁷²⁻⁷⁴. Par contre, ces résultats sont contestés par d'autres chercheurs qui n'ont observé aucun effet des oxLDL sur l'activation des TLR ⁷⁵. Le cœur lipidique de la plaque en formation est également rempli de cellules nécrotiques. Cette nécrose cellulaire est le résultat du processus pathologique de l'athérosclérose mais se produit aussi lors de traumatismes tissulaires, d'infarctus ou par la seule présence de toxines ⁷⁶. Au contraire des cellules en apoptose, qui sont en général phagocytées par l'organisme, les cellules nécrotiques activent la réponse immunitaire innée via la libération de facteurs de danger due à la destruction de leur membrane plasmique. Un de ces facteurs est la protéine nucléaire HMGB1 (pour high mobility group box 1) normalement présente dans toutes les cellules et qui se retrouve liée à la chromatine où elle favorise la stabilité des nucléosomes et régule la transcription des gènes ⁷⁷. Toutefois, une fois libérée de la cellule en nécrose, la HMGB1 active le TLR2 et le TLR4 et induit ainsi une réponse inflammatoire ⁷⁸. D'autres facteurs endogènes peuvent activer les TLR tels que l'acide hyaluronique composant la matrice extracellulaire, l'acide urique et les défensines, qui sont normalement produites lors d'infections bactériennes ^{79, 80}.

1.3.2.1.1 Les cellules pouvant être impliquées et les mécanismes d'activation

Les facteurs exogènes et endogènes promeuvent les étapes clés responsables du développement de l'athérosclérose via l'activation des TLR de deux types cellulaires très importants; les CE et les monocytes. D'abord, ils stimulent la réponse immunitaire innée des CE en augmentant leur sécrétion de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires ainsi qu'en favorisant l'expression des molécules d'adhésion et des TLR^{81, 82}. Ces mêmes facteurs peuvent activer directement les TLR des monocytes en circulation ce qui a pour effet d'augmenter l'expression de leur molécules d'adhésion telles que VLA-4, LFA-1, Mac-1 et uPAR (pour *urokinase receptor*)⁶⁸. Les monocytes activés sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire en favorisant l'induction de médiateurs inflammatoires par les CE⁸³. Ceci illustre bien les conclusions tirées des études de co-cultures de CE et de monocytes qui démontrent qu'ensemble, ces cellules forment un « réseau de coopération » et sécrètent plus d'IL-6, d'IL-8 et d'IL-1 β une fois activées par le LPS⁸⁴. Toutes ces réponses accroissent le recrutement et l'adhésion des monocytes au site de blessure endothéliale, contribuant ainsi au développement de la plaque. D'autre part, il a été démontré que l'activation des TLR par les PAMP favorisait la transformation des macrophages en cellules spumeuses; cellules qui composent la strie lipidique et marquent l'initiation de l'athérosclérose^{85, 86}.

En outre, il y a d'autres types cellulaires pouvant être activés via les TLR et étant ainsi impliqués dans le développement de la lésion. On sait, par exemple, que l'activation des TLR des CMLV stimule leur prolifération et leur migration à l'intima^{87, 88}. Ils sont aussi responsables de l'activation de certaines MMP par les CMLV, dont la MMP-2 et la MMP-9, responsable de l'instabilité de la plaque athérosclérotique⁸⁹. De plus, la HMGB1 sécrétée par les CE activées, favorise la production de cytokines par les neutrophiles⁸⁸.

Les plaquettes expriment également les TLR, plus particulièrement les TLR2, 4 et 9, et jouent un rôle important dans l'induction de la réponse immunitaire⁹⁰. Par la

reconnaissance des microorganismes via les TLR, elles adhèrent aux neutrophiles, induisent leur activation et favorisent l'élimination du pathogène ⁹¹. Toutefois, cette agrégation plaquettes-bactéries-neutrophiles peut être responsable d'événements thrombotiques aigus tels que l'infarctus du myocarde. Les plaquettes sont aussi sensibles à la blessure endothéliale, particulièrement par l'exposition du collagène (voir sections 1.2.2.2 et 1.2.2.3). Une fois activées via les TLR, elles sécrètent des cytokines (IL-1, HMGB1), des facteurs de croissances (TGF- β , PDGF) et le PF-4 (pour *platelet factor-4*) et expriment la molécule d'adhésion P-sélectine qui, ensemble, agissent comme signal inflammatoire ^{92, 93}. Elles augmentent donc l'activation des CE, le recrutement et l'activation des monocytes et contribuent à la migration et à la prolifération des CMLV ^{94, 95}; démontrant ainsi leur participation dans le développement de l'athérosclérose.

1.3.2.1.2 Les évidences *in vitro* et *in vivo* : étude sur les TLR2 et TLR4

De tous les TLR, ce sont les TLR2 et TLR4 qui ont démontré le plus d'évidences quant à leur lien avec le développement de l'athérosclérose. D'ailleurs, on sait que toutes les cellules impliquées dans la maladie, telles que les CE, les monocytes/macrophages, les plaquettes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T, ainsi que les CMLV expriment les récepteurs TLR2 et TLR4 ⁹⁶.

Les études *in vitro* ont d'abord permis d'établir une spécificité de ligand pouvant être reconnus par le TLR2 et par le TLR4, plus précisément sur la reconnaissance du LPS puisqu'il est le médiateur inflammatoire le plus étudié. Les résultats ont démontré une spécificité du LPS dérivé de *P. gingivalis* pour le récepteur TLR2 ^{81, 97, 98}. Le récepteur TLR4 n'est pas activé par cet agoniste mais reconnaît d'autres souches de LPS dont celle de *Escherichia coli* ⁹⁹ également reconnu par le TLR2. D'autre part, l'activation du TLR2 par le LPS de *P. gingivalis* résulte en l'expression de gènes différents de ceux activés par le TLR4 via le LPS de *E. coli* chez les monocytes, illustrant ainsi que les récepteurs n'utilisent pas les mêmes voies de signalisation ^{97, 100}. Par contre, d'autres études sont nécessaires

puisque certains ont démontré une surexpression du TLR2 mais non du TLR4 chez les CE stimulées avec LPS de *E. coli*¹⁰¹ ou encore, que le LPS de *P. gingivalis* pouvait activer le TLR4¹⁰².

Toutefois, toutes ces études s'accordent pour dire que l'activation *in vitro* du TLR2 et du TLR4 par leurs agonistes exogènes et endogènes amène l'induction d'une réponse inflammatoire; réponse qui se traduit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, par la surexpression des molécules d'adhésion et des TLR et ce, par l'activation du facteur de transcription NF-κB. Les études *in vitro* ont également démontré la surexpression du TLR2 par les CE d'artères coronaires humaines (HCAEC pour *human coronary aortic endothelial cell*) soumises à des forces de cisaillements élevées versus celles soumises à un flux laminaire constant, qui elles, ne répondent pas aux agonistes du TLR2¹⁰³. Ceci illustre bien la relation entre l'expression de ce récepteur et le développement des plaques d'athérosclérose localisées préférentiellement dans les régions artérielles soumises à de fortes perturbations du flux sanguin.

Pour confirmer les études *in vitro*, des analyses immunohistochimiques d'artères de patients atteints d'athérosclérose ont révélé la surexpression *in vivo* des récepteurs TLR1, 2 et 4 au niveau de la lésion athérosclérotique, et qu'une portion considérable de ces récepteurs étaient actifs majoritairement dans les CE et les macrophages¹⁰⁴. D'ailleurs, le TLR2 et le TLR4 agissent de façon synergique. Localement, au niveau de l'endothélium vasculaire de lapin nourris avec une diète riche en gras, ils augmentent l'expression des molécules d'adhésion ainsi que la sécrétion de MCP-1 et favorisent ainsi le développement précoce de l'athérosclérose¹⁰⁵. L'implication *in vivo* du TLR2 a également été mis en évidence dans un modèle de souris hyperlipidémique et proathérogénique déficiente en récepteur LDL (*Ldlr*^{-/-}). La délétion de l'expression du TLR2 chez ces souris (*Ldlr*^{-/-} *Tlr2*^{-/-}) a donné lieu à une diminution de la taille de la plaque, soulignant ainsi son rôle proathérogène¹⁰⁶. Des résultats semblables chez des souris *Apoε*^{-/-} *Tlr2*^{-/-}, *Apoε*^{-/-} *Tlr4*^{-/-} ou *Apoε*^{-/-} *MyD88*^{-/-} ont également été obtenus; le développement de l'athérosclérose au niveau

de l'aorte ainsi que la réponse inflammatoire ont été diminués via la réduction de l'accumulation de lipides et du recrutement des monocytes¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. De plus, certains résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par l'équipe de Curtiss LK. et al. qui a démontré que l'expression du TLR2 semblait restreinte au CE des sites où le flux sanguin est dit perturbé, tels qu'au niveau de la crosse aortique, chez les souris *Ldlr*^{-/-} nourries avec un diète riche en gras¹¹⁰. L'accumulation de leucocytes, la formation de cellules spumeuses ainsi que le développement de la lésion athérosclérotique ont tous diminués suite à la délétion du TLR2. De plus, les études protéomiques sur le sujet ont confirmé que l'expression du TLR2 au niveau de la plaque était responsable de son instabilité puisqu'elle induit de profonds changements dans sa composition : accumulation de lipides et de macrophages, augmentation de l'apoptose et réduction du cap fibreux¹¹¹. D'autre part, des traitements *in vivo* au LPS chez des souris ont démontré leur capacité à induire une thrombocytopenie significative due à l'augmentation de l'agrégation plaquettaire, et ce spécifiquement via le TLR2 et le TLR4^{47,90}.

Ainsi, la modulation de l'expression et de l'activation de ces deux récepteurs pourrait être des cibles thérapeutiques intéressantes chez les patients souffrant d'athérosclérose. Connus pour diminuer les risques d'infarctus ainsi que la réponse inflammatoire via divers mécanismes, les œstrogènes pourraient-ils réduire le développement de l'athérosclérose en interagissant sur les *Toll-like Receptors*? Comment pourraient-ils agir?

1.4 Les œstrogènes

1.4.1 La biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes, à l'état naturel, sont sécrétés aussi bien chez le mâle que chez la femelle. Impliqués principalement dans la reproduction, ils interviennent dans le développement du système nerveux central et de l'homéostasie du squelette. Ils ont également des effets sur le foie et le tissu adipeux en augmentant la sécrétion de facteur de coagulation et l'expression des récepteurs aux lipoprotéines. En outre, ces hormones influencent l'humeur, améliorent l'apparence de la peau, favorisent la croissance et la prolifération du tissu mammaire et réduisent la pression intraoculaire et les risques de cancer du côlon ¹¹². De plus, les œstrogènes ont un potentiel d'action important sur le système cardiovasculaire, point discuté plus en détails à la section 1.4.3.

Les œstrogènes se retrouvent sous trois différentes formes soient le 17- β -oestradiol (E2), l'oestrone (E1) et l'oestriol (E3). Dérivant du cholestérol, ils sont d'abord retrouvés sous forme d'androgènes. Ces précurseurs stéroïdiens, plus particulièrement l'androstènedione et la testostérone, seront convertis en oestrone et en E2 par l'aromatase monooxygénase P450 (figure 6). Ces deux œstrogènes peuvent, au long du processus, s'interconvertir. L'oestriol est quant à lui, un métabolite terminal de la transformation de l'oestrone et de l'E2 ¹¹³.

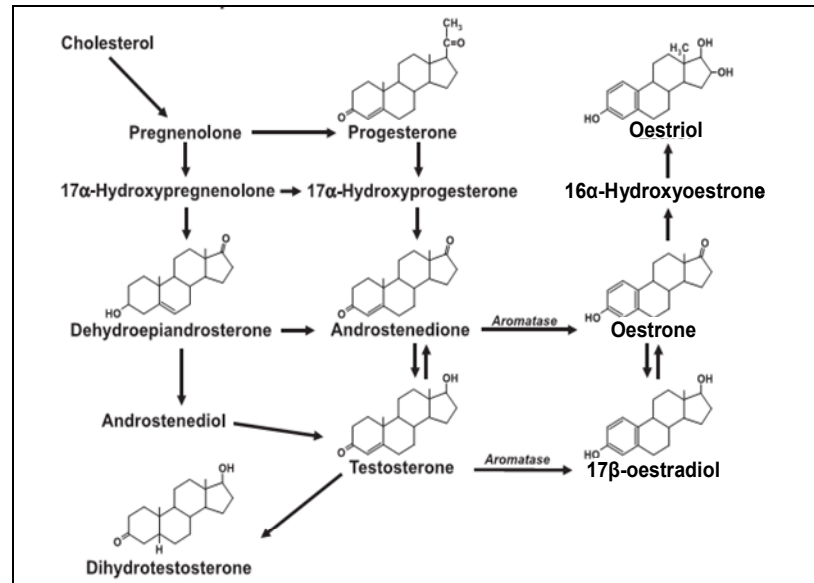


Figure 6. La synthèse des œstrogènes à partir du cholestérol. Une fois lié aux lipoprotéines, le cholestérol subit de nombreuses transformations à l'origine des différents précurseurs stéroïdiens tels que l'androstènedione et la testostérone. Ces précurseurs résultent en la production de l'oestrone, de l'oestradiol ainsi que de l'oestriol par le processus de l'aromatase. Image tirée de ¹¹³.

La source d'œstrogène sécrétée en plus grande quantité et ayant le plus puissant effet biologique chez la femme en âge de procréer est l'E2. Généralement sécrété par les cellules de la thèque et de la granulosa des follicules ovariens, il est aussi produit par le corps jaune et le placenta ¹¹⁴. Durant le cycle menstruel, la concentration d'E2 dans le sang varie selon la modulation de sa sécrétion par les différentes phases du cycle ovarien. De la phase folliculaire à l'ovulation, le taux sérique d'E2 passe de 100 pg/ml à 600 pg/ml. Il décline ensuite à son niveau le plus bas, soit environ 50 pg/ml, en phase prémenstruelle. Les œstrogènes, plus particulièrement l'oestrone et l'oestriol, sont aussi produits par le foie, la surrénale, les seins, les muscles et les tissus adipeux et nerveux. Ces sources secondaires deviennent importantes chez la femme après la ménopause. À ce moment, la concentration sérique d'E2 produit par les ovaires chute considérablement rejoignant le niveau retrouvé

chez l'homme, soit de 5 à 20 pg/ml ¹¹⁴. Chez l'homme, le processus d'aromatation à l'origine de l'E2 est présent normalement dans les cellules de Leydig des testicules.

1.4.2 Les récepteurs aux œstrogènes

Les deux principaux récepteurs des œstrogènes, soient le récepteur œstrogénique alpha (RE α) et le récepteur œstrogénique bêta (RE β), appartiennent à la famille des récepteurs intracellulaires dit nucléaires. Codés par deux gènes distincts, ils agissent principalement comme facteur de transcription. Un autre récepteur, appelé GPR30, couplé aux protéines G et codé par un troisième gène, a également été décrit comme étant activé par les œstrogènes au niveau de la membrane.

1.4.2.1 Leur structure

1.4.2.1.1 Les récepteurs RE α et RE β

Les récepteurs nucléaires RE α et RE β partagent une structure similaire composée d'abord, d'un domaine de liaison au ligand (LBD pour *ligand-binding domain*) en C-terminal relativement conservé avec 54% d'homologie (figure 7). Vient ensuite un domaine central, hautement conservé avec 96% d'homologie, responsable de la liaison des RE à l'ADN (DBD pour *DNA-binding domain*) grâce à la structure d'acides aminés en doigt de zinc. La région N-terminale est le domaine le plus variable entre les deux récepteurs avec seulement 17% d'homologie. Il possède également plusieurs sites de phosphorylation sérine/thréonine pouvant être régulés par une variété de kinases, permettant ainsi l'interaction des RE avec d'autres voies de signalisation ¹¹⁵. En plus de ces domaines, la structure des RE possède deux sous-domaines d'activation transcriptionnelle nommés AF-1 et AF-2 (AF pour *activation factor*). Le sous-domaine AF-1, indépendant du LBD et situé en N-terminal, est très actif chez le RE α . Par contre, son activation est plutôt minimale chez le RE β . Le domaine AF-2 situé en C-terminal est quant à lui, dépendant du LBD et permet le recrutement et l'interaction de cofacteurs et/ou de corépresseurs au niveau du promoteur.

Ensemble, le sous-domaine AF-2 et le domaine DBD sont responsables de la dimérisation des récepteurs ainsi que de leur translocation au noyau ¹¹⁶. Ces récepteurs peuvent donc se retrouver sous forme d'homodimères, soient RE α /RE α et RE β /RE β , ou sous forme d'hétérodimères (RE α /RE β) suite à leur activation.

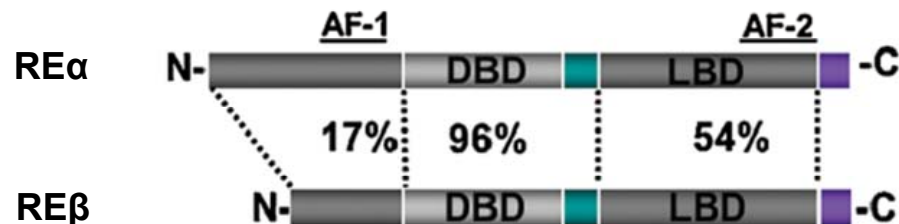


Figure 7. La structure des récepteurs oestrogéniques. Les récepteurs alpha et bêta possèdent une structure moléculaire similaire composée de plusieurs domaines et sous-domaines. Le domaine de liaison au ligand (LBD), en C-terminal, possède le sous-domaine AF-2 responsable de l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) est le plus conservé entre les deux récepteurs avec 96% d'homologie, et permet, avec le AF-2, la dimérisation des RE. Le sous-domaine d'activation transcriptionnelle AF-1 situé en N-terminal est plus actif chez le RE α que chez le RE β . Image adaptée de ¹¹⁵.

Malgré leur structure semblable, les RE sont codés par deux gènes différents situés sur des chromosomes distincts. Le gène codant pour le RE α humain (ESR1) est situé sur le chromosome 6 alors que celui codant pour le RE β humain (ESR2) est localisé sur le chromosome 14. Le RE α est une protéine de 595 acides aminés avec un poids moléculaire de 66 kDa. Le gène de RE β permet l'expression d'une protéine de 530 acides aminés de poids moléculaire d'environ 54 kDa ^{116, 117}.

1.4.2.1.2 Le récepteur GPR30

À la fin des années 90, plusieurs groupes de recherche ont identifié un orphelin de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR

pour *G protein-coupled receptors*) ayant une forte corrélation avec l'expression des RE au niveau des cellules cancéreuses du sein ^{118, 119}. Ce récepteur suggérait pour la première fois un lien possible entre la réponse physiologique normale de l'œstrogène de plusieurs tissus et le développement de certains cancers ¹¹⁸. Basé sur ces hypothèses, le groupe de Filardo a démontré dans un modèle de cellules cancéreuses exprimant le GPR30, une phosphorylation de ERK1/2 dépendante de l'œstrogène en l'absence du RE α ¹²⁰. D'autres études ont également démontré la capacité du GPR30 à lier l'œstrogène et à ainsi médier l'expression des gènes œstrogène-dépendants ¹²¹⁻¹²⁴. Ce récepteur, codé par le gène *GPER*, est une protéine de 375 acides aminés et de poids moléculaire de 38 kDa.

1.4.2.2 Leur localisation et distribution

Les récepteurs oestrogéniques α et β , lorsqu'ils sont inactifs, donc non liés au ligand, se retrouvent dans le cytoplasme des cellules mais également à la membrane. Lorsqu'ils sont activés, les récepteurs transloquent au noyau; lieu principal de leur fonction d'activation transcriptionnelle. Exprimés par de nombreux types tissulaires, leurs expressions peuvent se chevaucher au sein d'un même tissu mais généralement leur distribution diffère entre eux. Le RE α se retrouve principalement au niveau des cellules stromales des ovaires et de l'endomètre de l'utérus. Les cellules de la granulosa des ovaires, les spermatides en développement des testicules et la prostate expriment plus fortement le RE β . Pathologiquement, on les retrouve fortement au niveau des cellules cancéreuses du sein et des ovaires ^{112, 117}. Ces récepteurs sont également présents dans les tissus qui ne sont pas classiquement impliqués dans la reproduction, tels les reins, les poumons, la moelle osseuse, les os, le cerveau et la muqueuse intestinale avec toutefois, des degrés d'expression variables ¹²⁵. Cette distribution inégale suppose donc que les RE exercent des fonctions distinctes selon le type de tissu dans lesquels ils sont exprimés. En outre, les deux types de récepteurs sont présents au niveau du système cardiovasculaire puisqu'ils sont exprimés par les cardiomyocytes, les CML et par l'endothélium ^{126, 127}. Finalement, leur

expression a été démontré au niveau des cellules du système immunitaire, telles que les cellules T, les monocytes et les macrophages ¹²⁸.

Le récepteur GPR30 diffère des RE par sa localisation uniquement membranaire. En fait, sa localisation est dite intracellulaire puisqu'il est exprimé à la membrane du réticulum endoplasmique ¹²⁹. Un fois lié au ligand, le GPR30 ne transloque pas au noyau, contrairement aux RE. Ce récepteur est particulièrement abondant et actif au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse, de la médullosurrénale, des reins ainsi que dans les follicules ovariens en développement ¹³⁰. Il est également présent dans le système cardiovasculaire étant exprimé au niveau des artères et des veines ¹³¹.

1.4.2.3 Leur activation et leurs mécanismes de signalisation

Pendant plusieurs années, le mode d'activation des récepteurs aux œstrogènes était définie selon deux voies principales, soient la voie génomique et la voie non-génomique. Désormais, on sait qu'il existe au moins trois voies d'activation principales, définies aux sections suivantes. La section 1.4.2.3.4 définie, quant à elle, une voie d'activation indépendante des RE et du GPR30 utilisée par les œstrogènes.

1.4.2.3.1 La voie génomique dite classique dépendante du ligand

En mode inactif, les RE sont séquestrés et inhibés par un complexe multiprotéiques, composé en général de protéines chaperonnes HSP qui stabilise leur conformation. En présence d'œstrogènes intracellulaires, la conformation des RE se modifie pour devenir active; l'œstrogène se lie au domaine LBD et les protéines chaperonnes se dissocient. Après coup, le complexe ligand/récepteur diffuse au noyau où il se dimérise en homodimères ou en hétérodimères. Ces dimères se lient, via leur domaine DBD, à un domaine spécifique de liaison à l'ADN appelé le ERE (pour *estrogen-response element*). Ce processus entraîne également la liaison de divers coactivateurs de transcription qui stabilisent la formation du complexe préinitialisateur de transcription ainsi que la dissociation de la chromatine au

niveau du ERE¹³². Les récepteurs oestrogéniques peuvent aussi moduler la transcription de gènes ne possédant pas de domaine ERE en s'associant avec les sous-unités des protéines activatrice-1 et SP-1¹³³ (figure 8).

1.4.2.3.2 La voie alternative indépendante du ligand

L'activation des RE peut être modulée en absence d'œstrogène. En fait, les RE sont des phosphoprotéines et leur fonction peut ainsi être modulée selon leur état de phosphorylation. Les facteurs de croissance comme le EGF (pour *epidermal growth factor*) et le IGF-1 (pour *insulin-like growth factor*) peuvent phosphoryler les résidus sérine/thréonine des RE soit via l'activation de récepteur à activité tyrosine/kinase ou bien via l'action de seconds messagers tels que les MAPK (figure 8). La dopamine, à l'origine de l'adrénaline et de la noradrénaline ainsi que le TGF- α (pour *transforming growth factor-alpha*), produit par les macrophages et stimulant la prolifération cellulaire, sont eux aussi connus pour exercer une activité transcriptionnelle dépendante des RE en l'absence d'œstrogène^{133, 134}. L'importance de ce mode d'activation est toutefois peu connue. On suppose qu'il permettrait l'activation des RE lorsque le niveau en E2 sera plus bas comme chez l'homme et les femmes ménopausées.

1.4.2.3.3 La voie non-génomique dite rapide dépendante du ligand

Plusieurs groupes de recherche ont démontré dans le passé des effets rapides induits par les œstrogènes. Aujourd'hui, nous savons que ces effets sont le résultat d'une voie d'activation non-génomique par la capacité des RE à transmettre des signaux impliquant les MAPK ainsi que la PI3K (figure 8). En fait, les études sur le sujet ont démontré une forme membranaire des RE, couplée aux protéines G, capable d'induire une variété de réponse cellulaire via l'activation rapide de kinases^{133, 135, 136}. La découverte du récepteur GPR30 a également fait la lumière sur cette voie d'activation. En liant l'E2, ce récepteur active la PI3K et les MAPK par son interaction avec les récepteurs de facteurs de croissance. Les effets principaux de l'activation rapide par les œstrogènes sont la sécrétion de NO

responsable de la vasodilatation vasculaire, la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que de l'apoptose¹³⁷. Toutefois, il ne faut pas croire que la voie rapide s'arrête là. Plusieurs études ont démontré l'interaction de la voie non-génomique avec la voie génomique¹³⁸⁻¹⁴⁰. En fait, l'activation des MAPK et de la PI3K peut amener l'activation de facteurs de transcription nucléaires. Cette voie peut également influencer l'activation intrinsèque des RE en modulant leur degré de phosphorylation et ainsi favoriser la voie dite alternative¹⁴¹.

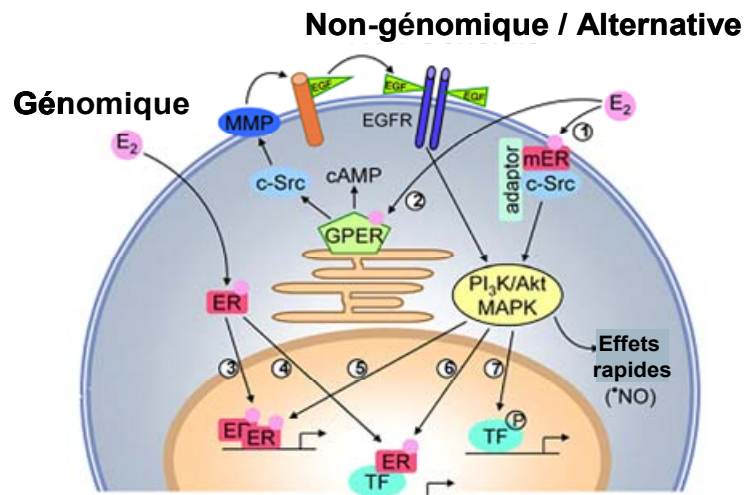


Figure 8. Les mécanismes d'activation et de signalisation des œstrogènes. Mécanismes d'action des récepteurs oestrogéniques, soit les RE α , RE β et GPR30, dans les différentes voies de signalisation non génomiques (1-2), génomique (3-4) et alternative indépendante du ligand. L'activation de la voie non-génomique peut amener aussi à l'activation de la voie génomique (5-6-7). Image adaptée de¹⁴². ER pour *Estrogen Receptor* et TF pour *Transcription Factors*.

1.4.2.3.4 La voie indépendante des récepteurs

Il a été démontré que l'E2 agissait directement et rapidement sur les canaux calciques, indépendamment des RE, au niveau des entérocytes^{143, 144}. Cette activation amène l'augmentation de l'entrée du Ca²⁺ ainsi que son absorption intestinale via l'action

de la phospholipase C (PLC) et de la protéine kinase C (PKC). Ainsi, la diminution de l'E2 sérique chez la femme ménopausée pourrait contribuer en partie au processus de l'ostéoporose, pathologie fréquemment observée chez ces individus, dû entre autre à la diminution de Ca^{2+} absorbé.

1.4.3 L'œstrogène et ses effets sur le système cardiovasculaire

Depuis la dernière décennie, les études épidémiologiques sur le sujet ont confirmé qu'au même âge, les hommes avaient de 2 à 4 fois plus de risque d'événements cardiovasculaires que les femmes non-ménopausées^{34, 145}. Par contre, à l'âge de la ménopause, le taux d'incidence rejoint graduellement celui des hommes, illustrant ainsi le rôle cardioprotecteur des œstrogènes¹⁴⁶. Toutefois, les effets des œstrogènes sur le processus athéroscléreux ne sont pas encore totalement élucidés; plusieurs travaux ont présenté des résultats discordants^{147, 148}. Ceci nous indique donc que les mécanismes d'action des œstrogènes sur le système cardiaque sont nombreux et variés.

1.4.3.1 Le profil lipidique

Comme expliqué à la section 1.2.1.1, la corrélation entre l'hypercholestérolémie et le développement précoce de l'athérosclérose a été depuis longtemps démontré. On sait également que les œstrogènes ont des effets bénéfiques sur le profil lipidique en abaissant les LDL sanguins au profit des HDL et des triglycérides¹⁴⁵. En fait, les œstrogènes diminuent la biodisponibilité des LDL et favorisent l'expression hépatique des récepteurs aux LDL, soient les apolipoprotéines^{149, 150}. Ainsi, chez un modèle de souris athérosclérotiques déficientes en apolipoprotéine ε ($\text{Apo}\epsilon^{-/-}$), l'E2 inhibe la constitution de la strie lipidique avec une réduction marquée des lésions de 75%¹⁵¹. Cette étude a démontré que l'effet athéroprotecteur de l'E2 aux stades précoces de la maladie serait attribuable au $\text{RE}\alpha$ et qu'à des stades plus tardifs, il agirait via le $\text{RE}\beta$.

L'E2 *in vitro* dispose également de propriétés anti-oxydantes permettant ainsi d'inhiber l'oxydation des LDL à l'origine du développement de la plaque athérosclérotique^{152, 153}. Ces effets anti-oxydants seraient dus à un changement dans l'expression génique de l'enzyme régulant la production et la dégradation des anions superoxydes¹⁵⁴. Ce mécanisme est également à l'origine de l'augmentation de la biodisponibilité en NO.

1.4.3.2 La biodisponibilité du NO

L'endothélium produit le NO, substance vasculoprotectrice de par ses propriétés vasodilatatrices et anti-agrégantes (voir section 1.1.2.1). De ce fait, certaines études ont démontré que l'administration d'E2 chez des modèles animaux ovariectomisés, tels que le porc et le rat, élevait la production de NO^{152, 155}. Plusieurs mécanismes, exclusivement médiés par le RE α , expliquent cette surproduction par l'E2. D'abord, par la voie génomique, l'E2 augmente l'expression de la eNOS et inhibe la production d'anions superoxydes via la diminution de l'expression de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase^{154, 156}. L'activation de la forme inductible de la NO synthase (iNOS) par la même voie est également responsable de l'augmentation en NO¹⁵⁷. C'est l'implication de la voie non-génomique, plus particulièrement de l'activation de la PI3K/Akt ainsi que des MAPK par l'E2 qui est à l'origine de l'augmentation de l'activation de la eNOS et donc de la production de NO^{158, 159}. L'augmentation de la production de NO par les œstrogènes n'est pas impliquée dans la prévention de la strie lipidique, comme l'a démontré certaines études^{30, 160}. Elle serait plutôt bénéfique à des stades plus avancés de l'athérosclérose grâce aux effets vasodilatateurs et anti-agrégants du NO.

Le NO n'est pas le seul agent pouvant être régulé par les œstrogènes. Ces derniers peuvent entre autres affecter le tonus vasculaire en modulant la synthèse de la prostacycline, qui est vasodilatatrice, et du thromboxane A2 qui lui, est un agent vasoconstricteur (voir section 1.1.2.1)¹¹⁴.

1.4.3.3 La paroi vasculaire et la guérison vasculaire

L'agression de l'endothélium de la paroi vasculaire par plusieurs facteurs de risques biologiques, à l'origine de la dysfonction endothéliale, conduit au développement de l'athérosclérose (voir section 1.1.2.3). Cliniquement, la dilatation de sténose artérielle et la pose d'endoprothèse vasculaire agressent eux aussi mécaniquement l'endothélium. La cicatrisation secondaire qui s'en suit peut prendre un caractère pathologique sous la forme d'une resténose, qui se produit lorsqu'une artère se rétrécit de nouveau en raison d'une prolifération de tissu cicatriciel, la néointima, lors de son processus de guérison. Les œstrogènes présentent plusieurs effets protecteurs sur la paroi vasculaire tant *in vivo* que *in vitro*. Notre laboratoire s'est particulièrement penché sur les processus utilisés par l'E2 dans le maintien de l'intégrité endothéliale ainsi que dans la réponse à une blessure vasculaire. *In vitro*, nous avons démontré que l'E2 promeut la prolifération et la migration des CE via l'activation des kinases ERK1/2 et p38 dépendante du RE α ^{161, 162}. Il prévient également l'apoptose des CE induite par le TNF- α ¹⁶³ et en conditions hypoxiques ¹⁶⁴. Par contre, à l'inverse des CE, nous avons démontré que l'E2, par le RE β , empêche la prolifération et la migration des CMLV en inhibant les mêmes kinases. Ainsi, l'E2 favorise la survie des CE et une meilleure cicatrisation vasculaire ce qui permet une plus grande réendothélialisation ainsi que la prévention du phénomène de resténose.

Nos études *in vivo*, par l'utilisation d'un modèle de blessure vasculaire, ont également confirmé les effets bénéfiques de l'E2 sur la paroi vasculaire. Chez le porc, l'E2 appliqué localement suite à une angioplastie ou précédant l'apposition d'une endoprothèse vasculaire diminue la prolifération de la néointima, augmente significativement la réendothélialisation et favorise une récupération plus rapide de la fonction endothéliale ^{165, 166}. D'autres études ont démontré des résultats semblables chez la souris et le rat ^{167, 168}. Chez l'humain, l'apposition d'une endoprothèse recouverte d'œstrogène est corrélée avec de faibles incidences de resténose sans association avec l'inflammation ¹⁶⁹. Bien que cette

étude n'ait pas démontré de diminution de la néointima, la prolifération et la migration des CMLV ont été grandement limitées par l'œstrogène présent sur l'endoprothèse.

La littérature s'intéresse également, et ce, de plus en plus, à un autre mécanisme utilisé par les œstrogènes dans le processus de guérison vasculaire : la régulation des cellules endothéliales progénitrices (CEP). Les CEP sont connues pour jouer un rôle important dans l'homéostasie de l'endothélium vasculaire prévenant ainsi le développement de l'athérosclérose et ses complications¹⁷⁰. En fait, elles agiraient comme un « pansement actif » en stimulant la régénération de l'endothélium natif et en inhibant l'hyperplasie néointimale¹⁷¹. L'activation endothéliale lors d'une blessure vasculaire module le fonctionnement des CEP en affectant la réserve des CEP dans la moëlle osseuse (MO), ainsi que leur détermination, leur prolifération et leur mobilisation hors de la MO. Elle affecte aussi la survie des CEP dans la circulation périphérique et/ou l'adhésion des CEP, leur migration et leur maturation finale en CE matures au niveau de la paroi vasculaire¹⁷²⁻¹⁷⁴. Par conséquent, la mesure des CEP en circulation fut proposée comme indicateur de prédiction d'incidents cardiovasculaires après l'observation, chez les patients asymptomatiques, d'une association entre le taux de CEP circulantes et la dysfonction endothéliale en plus de la sévérité de l'athérosclérose¹⁷⁵.

Des études récentes ont permis de démontrer un effet direct de l'E2 sur la physiologie des CEP. Les traitements oestrogéniques, via l'expression de la eNOS, augmente la mobilisation et la prolifération des CEP, accélérant ainsi la réendothélialisation^{176, 177}. L'E2, via ses RE, favorise également la guérison vasculaire dans un modèle murin d'infarctus du myocarde en augmentant l'incorporation des CEP aux sites d'ischémie^{178, 179}. En stimulant l'activité des télomérases et en inhibant leur apoptose, l'E2 accroît la survie des CEP¹⁸⁰. Ce mécanisme implique la diminution de l'activité de l'ANG II et ainsi, de la production d'anions superoxydes par la NADPH oxydase. Les anions superoxydes inactivent les télomérases et augmentent la sénescence cellulaire. Nos études en laboratoire ont également mis en évidence que le nombre et la maturation des CEP en CE changeaient

selon les sexes et les phases du cycle menstruel chez la femme ¹⁸¹. De plus, selon les niveaux d'œstrogènes sériques, le nombre et la fonctionnalité des CEP s'améliorent ¹⁸².

1.4.3.4 Le processus inflammatoire

Comme expliqué à la section 1.2.2.2, l'inflammation est un mécanisme déterminant dans la progression de la plaque d'athérome, et l'œstrogène est connu pour moduler cette inflammation. En fait, l'œstrogène exerce des effets sur les différentes composantes du système immuno-inflammatoire, contribuant ainsi à ses propriétés de protection vasculaires; en diminuant généralement l'adhésion et la transmigration endothéliale des leucocytes et des monocytes. D'abord, l'E2 altère le développement et la maturation des lymphocytes B et T en induisant l'apoptose de leurs précurseurs ¹⁸³. Il diminue également la chimiotaxie des monocytes en diminuant l'expression de la MCP-1 ¹⁸⁴ et atténue l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine induites par l'environnement pro-inflammatoire ^{185, 186}. Ceci diminue le recrutement des cellules inflammatoires à l'endothélium; étape clé du processus athéromateux.

Par ailleurs, notre laboratoire a démontré que l'œstrogène permet la réduction, au niveau des CE, de l'expression du récepteur CD40 ainsi que de son ligand, le CD40L, induites par l'IFN- γ . Ce mécanisme est associé à la diminution de l'adhésion des neutrophiles aux CE ¹⁸⁷. La CRP est également un marqueur inflammatoire modulé par l'œstrogène qui affecte directement sa synthèse hépatique ¹⁸⁸. Il diminue aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF par les CE ¹⁸⁹. Ces actions cardio-protectrices découleraient d'une régulation négative de l'activation du facteur de transcription NF- κ B impliqué dans le contrôle de l'expression des molécules d'adhésion ainsi que de certaines cytokines pro-inflammatoires, au niveau des CE et des monocytes/macrophages ¹⁹⁰⁻¹⁹³. De plus, des études *in vivo* ont démontré que l'E2, aux stades précoces de la maladie, prévenait la formation de strie lipidique chez des souris *ApoE*^{-/-} immuno-compétentes, mais que la même hormone n'avait plus cet effet protecteur

chez les souris *ApoE*^{-/-} déficientes en lymphocytes B et T matures ¹⁹⁴. Cette population leucocytaire est donc impliquée dans les effets athéroprotecteurs de l'œstrogène.

Toutefois, certaines études *in vivo* ont révélé un effet pro-inflammatoire de l'œstrogène via entre autre, l'augmentation de la sécrétion de TNF- α et d'IL-6 par les macrophages ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. L'E2 chez la souris améliore la sensibilité des macrophages à la réponse inflammatoire en augmentant l'expression du TLR4 ¹⁹⁸. Les recherches ont également confirmé que l'E2 favorise certaines populations lymphocytaires telles que les lymphocytes T CD4⁺ et *Natural Killer* (NKT) en affectant leur profil de sécrétion défini par l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ à l'encontre des cytokines anti-inflammatoires ^{199,}
200 .

1.5 La problématique

Les études épidémiologiques nous ont depuis longtemps confirmé que les œstrogènes protègent les femmes des risques d'atteintes coronariennes, et ce avant l'âge de la ménopause. Chez les femmes postménopausées, les résultats divergent encore. Les méga-études randomisées sur l'hormonothérapie, dont la HERS (pour *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*) et la WHI (pour *Women's Health Initiative study*), n'ont pas confirmé les effets bénéfiques escomptés des œstrogènes chez ces femmes, et ce, même si les résultats des modèles expérimentaux nous suggéraient le contraire²⁰¹⁻²⁰³. En fait, les conséquences positives de ces études n'ont pas réussi à compenser les effets délétères observés tels que l'augmentation du nombre de cancers du sein invasifs, d'événements cardiaques reliés à une maladie coronarienne, d'accidents vasculaires cérébraux et d'embolies pulmonaires. Toutefois, une importante limitation de cette étude était que les femmes sous traitement étaient âgées (moyenne de 64 ans) et étaient en ménopause depuis plus de 10 ans (en moyenne 13 ans). Certaines pathologies associées au développement de l'athérosclérose se sont probablement manifestées bien avant ces études et les atteintes cliniques observées sont probablement dues au temps écoulé depuis le début de la ménopause.

Aujourd'hui, en généralisant les résultats cliniques et expérimentaux, nous comprenons mieux le rôle joué par l'œstrogène sur l'athérosclérose. Aux stades précoces de l'athérosclérose, les actions anti-inflammatoires des œstrogènes sur l'endothélium ainsi que celles pro-inflammatoires seraient considérées athéroprotectrices. À des stades plus avancés, les effets pro-inflammatoires, dont l'augmentation de la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T, seraient responsables de la déstabilisation de la plaque²⁰⁴. Ces observations repositionnent les cibles cellulaires de l'œstrogène à savoir l'endothélium et/ou le système immunitaire. Ces deux populations cellulaires sont les médiateurs de l'effet de l'œstrogène puisqu'ils représentent ensemble l'étape clé du développement de l'athérosclérose.

1.6 Le but du projet de recherche

1.6.1 La modulation de l'expression et de l'activité du TLR2

À la lumière de toutes ces études, les mécanismes d'action des œstrogènes sur le système cardiovasculaire semblent donc nombreux et variés. Au sein de notre laboratoire, nous avons cherché, autant *in vitro* qu'*in vivo*, à mieux comprendre ces mécanismes et à ainsi identifier de nouvelles cibles moléculaires permettant de mieux interpréter les bénéfices potentiels des œstrogènes sur le système cardio-vasculaire.

Mon projet de recherche découle ainsi d'une étude sur l'influence des œstrogènes dans les processus biologiques modulant l'organisation fonctionnelle de la niche des CEP²⁰⁵. Les résultats de ces recherches ont démontré le rôle actif des œstrogènes dans le maintien de l'homéostasie du système cardiovasculaire par les CEP en révélant, entre autre, une modulation importante des gènes liés à la réponse immunitaire incluant le récepteur TLR2. Cet « équilibre » vasculaire dépend également des fonctions homéostatiques normales de l'endothélium, qui, une fois altérées, sont à l'origine de la dysfonction endothéliale. Ainsi, il est possible d'envisager que l'œstrogène influence la sensibilité des CE aux signaux pro-inflammatoires en modulant l'expression et l'activité du TLR2, ce qui pourrait contribuer à la réduction du développement de l'athérosclérose.

Mon projet avait donc pour objectif de (1) démontrer la modulation par l'E2 de la réponse inflammatoire activée via le TLR2 dans un modèle de CE matures de souris. Par la suite, nous voulions (2) déterminer l'influence de l'E2 sur le profil de cette réponse inflammatoire et (3) caractériser les voies de signalisation impliquées.

Le but de ces travaux de maîtrise était d'évaluer l'influence de l'E2 sur la signalisation du TLR2 amenant donc pour la première fois, chez les CE vasculaires, de nouvelles connaissances sur sa régulation par cette hormone. Cette étude se veut un premier

pas dans la démonstration du rôle clé de l'E2 comme modulateur de la réponse inflammatoire activée via le TLR2, un nouvel aspect de son potentiel vasculo-protecteur.

2. Article scientifique

2.1 ACCORD DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Geneviève Morin, M.Sc. Sciences Biomédicales (2-484-1-0), option générale

2. Description de l'article

Liste des auteurs : Geneviève Morin, B.Sc.; Bettina Émile; Isabelle Cloutier, Ph.D.; et Jean-François Tanguay, MD.

Titre : Estrogen Regulation of the TLR2-mediated Pro-inflammatory Activation in Vascular Endothelial Cells

Revue de soumission proposée : Molecular Immunology

État actuel de l'article : Soumis le 28 janvier 2011

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Geneviève Morin** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre : L'œstrogène: un rôle potentiel dans la modulation de l'activation pro-inflammatoire des cellules endothéliales vasculaires par la voie du TLR2.

Bettina Émile	Signature	13/10/2010
Coauteur		Date
Isabelle Cloutier	Signature	18/10/2010
Coauteur		Date
JEAN-FRANÇOIS TANGUAY	Signature	18/10/2010
Coauteur		Date

2.1.1 Estrogen Regulation of TLR2-mediated Pro-inflammatory Activation in Vascular Endothelial Cells

Geneviève Morin^{a,b,c}, Bettina Émile^a, Isabelle Cloutier^a, Jean-François Tanguay^{a,b,c,1}

^aResearch Center, Montreal Heart Institute; ^bBiomedical science department, ^cFaculty of medicine, Université de Montréal, 2900 Blv. Édouard-Montpetit, Montréal (Qc.), H3T 1J4, Canada.

Contribution of the authors:

Geneviève Morin: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Bettina Émile: flow cytometry analyses data, collection and/or assembly of data, manuscript writing.

Isabelle Cloutier: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing and review.

Jean-François Tanguay: conception and design, final approval of manuscript.

Corresponding author: Dr Jean-François Tanguay,

Tel.: 1-(514) 376-3330 ext. 3250; Fax: 1-(514) 593-2596;

Address : 5000 Bélanger, Montréal (Qc.), H1T 1C8, Canada.

2.1.1.1 Abstract

Experimental evidence support the contribution of the immune system in the pathogenesis of atherosclerosis, in part through the alteration of the endothelium activation status and the recruitment of inflammatory cells. Toll-like receptors (TLRs) are expressed by endothelial cells (ECs) and they belong to a family of pattern recognition receptors which recognize microbial components like lipopolysaccharides (LPS). Recently, an association between TLR2 overexpression and the development of atherosclerotic plaques was reported. Its pro-inflammatory activation contributes to the development of endothelial dysfunction and, eventually, atherosclerosis. Thus, the regulation of vascular EC responses to TLR2 agonists is believed to be a potential pivotal event that might prevent the development of endothelial dysfunction. Therefore, we hypothesized that 17- β -estradiol (E2), an hormone known to have cardioprotective properties, might modulate the sensitivity of ECs to TLR2-mediated activation. Our objectives were to determine if E2 could influence the amplitude and profile of the inflammatory response triggered through TLR2 in ECs, and to identify any crosstalk between these two signalling pathways. In mouse microvascular ECs, pretreatment for 1 hr with E2 (10^{-9} M) modulated TLR2 mRNA expression and activation profiles, as demonstrated by the decrease in IL-6 secretion induced by a 48-hr *Porphyromonas gingivalis* LPS stimulation (1000 ng/ml). E2 pretreatment also decreased the cell surface expression of ICAM-1 induced by a 24-hr LPS stimulation. Through western blot analysis, our results also revealed the E2-mediated down-regulation of TLR2 signalling pathways, resulting in decreased Akt, ERK1/2, and Stat1 phosphorylation. However, pretreatment with an estrogen receptors (ERs) antagonist (ICI 182780, 10^{-7} M) for 1 hr did not restore IL-6 secretion to a level similar to that of LPS alone, suggesting possible ER-independent mechanisms. Overall, such new E2-dependent anti-inflammatory mechanism through an interaction with TLR2 signalling pathways underscores the protective vascular effects of estrogens.

2.1.1.2 Keywords

Toll-Like Receptor-2, E2, Endothelial Cells, Inflammation, Signal transduction.

2.1.1.3. Introduction

For many years, atherosclerosis was described as the result of lipid accumulation within the arterial wall. It is now well accepted that inflammation is a key event involved in the development of atherosclerosis, from its initiation to the occurrence of thrombotic complications (Hansson and Libby, 2006; Loppnow et al., 2008; Ross, 1999). Cardiovascular risk factors, such as high fat diet and oral infection by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) have all been associated with the activation of pro-inflammatory responses in the vascular endothelium. Activation of endothelial cells (ECs) is reflected by the upregulation of adhesion molecule expression and cytokine secretion such as IL-6 (Glass and Witztum, 2001; Libby, 2002); events that amplify and sustain pro-inflammatory signals, thus contributing to the development of endothelial dysfunction and, eventually, atherosclerosis (Kofler et al., 2005). In fact, IL-6 is the only cytokine that can stimulate the synthesis of all acute phase proteins involved in the inflammatory response, thus supporting the direct link between IL-6 levels, vascular inflammation and cardiovascular disease (Woods et al., 2000).

Over the past few years, numerous reports in mice and humans have confirmed that toll-like receptor-4 (TLR4) activation was involved in the pathogenesis of atherosclerosis (Schoneveld et al., 2008; Xu et al., 2001). TLRs are key receptors in the innate immune recognition of microbial pathogens cell-wall molecular patterns (PAMPs). They also interact with stress- or damage-associated molecular patterns (DAMPs) that are released from damaged tissues or necrotic cells (Yu et al., 2010). This endogenous ligand-mediated TLRs signalisation is involved in many conditions, such as tissue injury, repair and regeneration. Experimental evidence have also supported the implication of TLR2 in the development of atherosclerosis, especially at the sites of disturbed blood flow (Dunzendorfer et al., 2004; Mullick et al., 2008). The receptor is overexpressed in atherosclerotic lesions, mainly by ECs, monocytes/macrophages, dendritic cells and

vascular smooth muscle cells (VSMCs) (Curtiss and Tobias, 2007; Edfeldt et al., 2002). In monocytes, TLR2 expression is up-regulated by pro-inflammatory cytokines, and primes these cells to other inflammatory signals, such as those originating from damaged tissues.

Nevertheless, the expression pattern of TLR2 in ECs is not well defined, and it appears to vary according to species and the localisation of the cells. For example, compared with veins, arteries have a greater susceptibility to plaque formation, as arterial ECs are responsive to a wider range of TLRs bacterial PAMPs (Erridge et al., 2008). Furthermore, TLR2-mediated EC stimulation initiates a cascade of intracellular signalling that leads to the activation of NF- κ B and MAPKs, such as the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), p38, c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), and PI3K/Akt, resulting in the expression of pro-inflammatory cytokines and cell adhesion molecules (Faure et al., 2001; Sandor and Buc, 2005; Sawa et al., 2008). Therefore, vascular EC responses to endogenous or exogenous TLR2 agonists are believed to be pivotal events in the endothelial dysfunction and regulation of TLR2 activation might prevent its development.

The atheroprotective effects of estrogens, and their role as modulators of inflammation have been demonstrated (Vitale et al., 2009; Xing et al., 2009). Through long-term genomic and rapid nongenomic pathways, estrogens regulate a variety of processes, such as nitric oxide (NO) synthesis and reductions in the vascular expression of chemokines, cytokines, and adhesion molecules (Babiker et al., 2002; Chakrabarti et al., 2008). Thus, estrogens can potentially interfere with early atherosclerotic steps by reducing lipid and leukocyte accumulation in the vascular wall (Miller et al., 2004). These biological effects are mostly mediated by the estrogen receptors (ERs) α and β expressed by ECs, but the presence of a membrane receptor coupled to G-protein (GPR30) and the rapid activation of calcium channels highlight the involvement of ER-independent mechanisms. In previous studies, we have demonstrated the specific contribution of estrogens and their receptors in the regulation of arterial vascular cell activation patterns and the endothelial healing processes. Indeed, through ER-mediated modulation of the ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathways, estrogens, particularly 17- β -estradiol (E₂), decreased VSMCs

proliferation and migration, while promoting them into ECs (Geraldles et al., 2002; Geraldles et al., 2003). We demonstrated that E2 can influence the IFN- γ signalling pathway in ECs, by decreasing the phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription-1 (Stat1) which, in turn, decreases CD40-CD40L protein expression. CD40-CD40L are two inflammatory and cardiovascular risk markers, and reduction of their expression affect neutrophil adhesion (Geraldles et al., 2006). *In vivo*, E2 leads to a significant reduction of macrophage infiltration in the peri-strut area of implanted stent in porcine arteries (Chandrasekar et al., 2005). Similarly, one study has shown that E2 can suppress murine macrophage cytokine production by decreasing NF- κ B binding activity (Deshpande et al., 1997). E2 treatment has also been reported to reduce lipopolysaccharides (LPS)-induced brain inflammation, and to increase TLR4 expression on macrophages, through an ER α -dependent mechanism (Calippe et al., 2010; Rettew et al., 2009; Vegeto et al., 2004).

The experiments described herein were designed to assess whether E2 could modulate the sensitivity of a vascular murine EC line to LPS-mediated inflammatory signal activation through crosstalk with the TLR2 signalisation. Our results revealed, for the first time, that E2 interfered with TLR2 expression and activation, as demonstrated by the decrease in the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and expression of adhesion molecules. We have also demonstrated the E2-mediated down-regulation of TLR2 signalling pathways, as reflected by the decreased phosphorylation of Akt, ERK1/2, and Stat1. Pretreatment with an ERs antagonist (ICI 182780) did not restore the secretion of IL-6 to a level similar to that of LPS alone, which strongly suggests possible ER-independent mechanisms. Overall, our results suggest a new E2-dependent anti-inflammatory mechanism through an interaction with TLR2 signalling pathways, which underscores the protective vascular effects of estrogens.

2.1.1.4 Materials and Methods

2.1.1.4.1 EOMAs culture

EOMAs (mouse endothelial cells derived from a hemangioendothelioma; American Type Culture Collection [ATCC], Cedarlane Laboratories inc., ON, Canada) were cultured in DMEM (ATCC), containing 4 mM L-glutamine supplement, 1% antibiotics (penicillin and streptomycin; Invitrogen Corporation, CA, USA), 15 mM HEPES buffer (J.T. Baker, NJ, USA), and 5% charcoal-treated (Sigma-Aldrich Canada Ltd., ON, Canada) FBS (PAA laboratories inc., Ontario, Canada) to deplete endogenous estrogens. Cells were characterized by their cobblestone monolayer morphology at confluence and were used between passages 3 and 7, with medium renewal every 2 to 3 days.

2.1.1.4.2 EOMAs stimulation, pretreatment and inhibition

Confluent EOMAs were trypsinised with 0.05% Trypsin-EDTA 1X (Invitrogen Corporation), and they were plated at 1×10^4 cells/cm² in DMEM 5% FBS for 48 hrs at 37°C before G₀ synchronization by starving EOMAs overnight in DMEM containing 0.1% FBS. Cells were then stimulated at 37°C in DMEM 1% FBS with LPS from *P. gingivalis* (1000 ng/ml; InvivoGen, Cedarlane) or with water soluble E2 (10^{-9} M; Sigma) for the indicated times. To assess the influence of E2 on the TLR2 pathway, EOMAs were pretreated for 1 or 24 hrs with E2 before LPS stimulation for the indicated times. In this series, the cells remained exposed to both LPS and E2 for the duration of the experiments. As a TLR2 pathway specificity control, EOMAs in selected wells were pretreated for 30 min with a blocking anti-mouse TLR2 monoclonal antibody (Ab) (1000 ng/ml; Invivogen, CA, USA) or with the corresponding mouse IgG₁ isotype (negative control for the TLR2 mAb) (R&D systems, Cedarlane) prior to LPS stimulation. To determine the involvement of TLR4, the cells were pretreated with a TLR4 specific inhibitor (CLI-095, 500 ng/ml and 1000 ng/ml; Invivogen) for 30 min before LPS stimulation. For the signalling pathway

studies, EOMAs were pretreated with a PI3K/Akt inhibitor (LY294002, 50 μ M; Invivogen) or an ERK1/2 inhibitor (U0126, 50 μ M; Invivogen) for 30 min before LPS or E2 stimulation. To investigate ERs involvement, the cells were pretreated with ICI 182780, an ERs antagonist, (Fulvestrant, 10⁻⁷M; Sigma) for 1 hr. At the end of the various treatments, the culture supernatants were collected, the EOMAs were washed twice with cold PBS 1X, scraped, and lysed for 30 min at 4°C with 100 μ l of lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1.2% Triton-X, 1 mM EGTA, EDTA and phenyl methanesulfonyl fluoride, 15.1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin and 1 mM NaVO₃. The supernatants and cell lysates were pelleted through centrifugation at 13 200 rpm at 4°C for 10 and 15 min, respectively. The lysates were stored at -20°C for later use. For mRNA and flow cytometry analyses, the EOMAs were washed twice with cold PBS 1X and processed as described below.

2.1.1.4.3 TLR2 mRNA analysis

Total RNA was isolated from EOMAs by using a total RNA extraction kit, according to the manufacturer's instructions (RNeasy Mini Kit; Quiagen inc., ON, Canada). Quantification of total RNA was assessed using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo scientific, DE, USA). For each sample, 500 ng of total RNA was reverse transcribed into cDNA using the iScript cDNA Synthesis Kit, according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, CA, USA). Messenger RNA levels of mouse TLR2 were determined by Q-PCR using cDNA obtained from the reverse transcription reactions as template. A final volume of 25 μ l for each Q-PCR reaction was prepared with 12.5 μ l of Master SYBER Green I Kit (BioRad), 0.3 μ M of reference dye ROX™ (Stratagene, ON, Canada), 3 μ M of each of the forward and reverse primers, and 10 μ l of cDNA. Standard curves were generated from serial dilutions (0 to 15 ng) of total RNA obtained from LPS-treated cells (stock at 25 ng/ μ l). Mouse GAPDH mRNA served as an internal control for the amount of cDNA present in each sample. Specific mouse oligonucleotide primer sequences used for mTLR2 were: forward 5'-CGCTGGAGG- TGTTGGATGTT-3' and reverse primer 5'-AGAGCTGGCGTCTCCATAGT-3' and for the mGAPDH: forward 5'-

CTGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and reverse 5'-ACTGTGGTCATGAGCCCTTCCA-3'. All reactions were performed using the Mx3000P Q-PCR System (Stratagene), and the data were analyzed with MxPro™ Q-PCR software version 3.00 (Stratagene). The specificity of the amplified Q-PCR product was determined by a melting point analysis, and the relative quantification of the TLR2 gene was normalized with GAPDH reference gene. All results are expressed as fold increase with respect to the level of TLR2 in unstimulated cells. Each condition was assessed in duplicate, and all experiments were performed at least three times.

2.1.1.4.4 Western blot (WB) analysis

Protein concentration from the EOMA lysates was determined using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad). Equal amounts of total protein were added in Laemmli buffer, boiled for 5 min, resolved on 10% SDS-PAGE (Mini Protean-3 Cell, Bio-Rad), and transblotted onto 0.2 µm polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Bio-Rad). After blocking for 1 hr in TBS-T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 5% non-fat dry milk (Bio-Rad), the membranes were washed three times in TBS-T and probed overnight at 4°C with one of the following anti-mouse primary Ab against the phosphorylated forms of Akt, ERK1/2 and Stat1 proteins (rabbit anti-pAkt (Ser473) (1:2000, Cell Signaling Technology, MA, USA), rabbit anti-pERK1/2 (1:5000, Cell Signaling Technology), or rabbit anti-pStat1 (Tyr701) (1:1000, Cell Signaling Technology). After three washes with TBS-T, the membranes were incubated for 1 hr at room temperature with a secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz). Visualization of the protein bands was achieved with an Immun-Star WesternC chemiluminescence reagent kit (Bio-Rad), and detected by digital image densitometry using a VersaDoc Imaging System Model 4000 (Bio-Rad) performed on X-ray film (Biomax Light Film from Kodak, NY, USA). The membranes were stripped with Re-Blot Plus solution (Chemicon International Inc., CA, USA) according to the manufacturer's instructions, and blotted with total Akt, ERK1/2 and Stat1 Ab (rabbit anti-Akt (1:5000, Cell Signaling Technology), rabbit anti-ERK1/2 (1:5000, Cell Signaling Technology), or rabbit anti-Stat1 (1:2000, Cell Signaling Technology). Band

quantifications were done with the Quantity One software (Bio-Rad). Results are presented as the relative expression of p-Akt, p-ERK1/2 and p-Stat1 normalized to the expression of total Akt, ERK1/2 and Stat1 respectively. The membranes were also blotted with the following anti-mouse primary Ab: rabbit anti-TLR2 (1:500, USBiological, MA, USA), rabbit anti-ER α (1:1000, Abcam inc., MA, USA), rabbit anti-ER β (1:1000, Abcam inc.), or rabbit anti-GPR30 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA). The experimental conditions, secondary Ab and quantification method were the same as described previously, but their respective expression was normalized to actin with a rabbit anti-actin Ab (I-19) (1:2000, Santa Cruz). Western blot analyses were performed at least in triplicates, and the results of the image densitometry are representative of these experiments.

2.1.1.4.5 IL-6 cytokine secretion

IL-6 levels in the supernatants were measured by ELISA using an OptEIA antibody set (BD; BD Biosciences, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the plates were coated with a capture Ab specific to mouse IL-6, and diluted supernatants were added in each well. The biotin-coupled detection antibody, also specific to mouse IL-6, was detected by the enzyme reagent streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. Chemiluminescence enzymatic activity was measured using the EL800 Universal Microplate Reader and software (Bio-Tek instruments inc., VT, USA). Each experimental condition was assessed in duplicate, and all experiments were performed at least three times.

2.1.1.4.6 VCAM-1 and ICAM-1 flow cytometry analyses

Following the different treatments, EOMAs were trypsinised and resuspended in PBS 1X solution containing 0.5% bovine serum albumin (BSA; Cedarlane), and non specific binding sites were blocked with a 5% normal rat serum diluted in PBS-BSA (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., Cedarlane) for 20 min at 4°C. To characterize the adhesion molecule cell surface expressions, cells were consecutively incubated for another

20 min with the following Ab diluted in PBS-BSA: monoclonal rat anti-mouse CD54 (ICAM-1) fluorescein (FITC)-conjugated (YN1/1.7.4; eBioscience, USA), and monoclonal rat anti-mouse CD106 (VCAM-1) phycoerythrin (PE)-conjugated (M/K-2; Abcam inc.). Monoclonal rat anti-mouse IgG2a isotype controls FITC- and PE-conjugated (Abcam) were used to define the background and acquisition statistic gates. Following each incubation, the cells were washed with PBS-BSA and resuspended in flow cytometry acquisition buffer (Flowshel; R&D Systems, Minneapolis, MN). Flow cytometry analyses were performed using an Epics Altra flow cytometer (Coulter Corp., Florida, USA) with EXPO™32 ADC analysis software. 10 000 to 20 000 events were analyzed per experimental condition. Data were analyzed as relative mean fluorescence intensity (MFI), representing the receptor density of the positive cells ($\% \text{ positive} \times \text{mean fluorescence intensity of positive cells}$) minus the Ig control background. Each experimental condition was assessed in duplicate, and all experiments were performed at least three times.

2.1.1.4.7 Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons with controls were determined by ANOVA followed by a Dunnet correction test. A Tukey-Kramer correction was used for multiple comparisons. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All statistics were performed using the GraphPad InStat® software Inc.

2.1.1.5 Results

2.1.1.5.1 TLR2 mRNA level is down-modulated by E2

We first determined if LPS stimulation could modulate TLR2 mRNA and protein expression in mouse EOMAs. In unstimulated cells, a constitutive basal TLR2 mRNA expression was detected, and set at 100% to serve as the reference level (Fig. 1A, white bars). LPS stimulation (1000 ng/mL) led to a maximal amplification after 4 hrs of treatment, with a four-fold increase in TLR2 mRNA expression (Fig. 1A, dark grey bar vs. white bar). Its expression was still significantly upregulated after 24 hrs, but at a much lower level. Compared with unstimulated cells, stimulation with a physiological concentration of E2 alone (10^{-9} M) did not influence TLR2 mRNA expression level (Fig. 1A, pale grey bars vs. white bars). To evaluate the potential of E2 to alter LPS-induced upregulation of TLR2 mRNA expression, cells were pretreated with E2 for 1 or 24 hrs before treatment with LPS for 4 hrs. Q-PCR results revealed that E2 pretreatment significantly decreased LPS-induced TLR2 mRNA expression by 12% (1 hr) and 18% (24 hrs), compared with EOMA stimulated only with LPS (Fig. 1B).

At the protein level, a 4-hr LPS stimulation period did not alter total TLR2 expression, compared to unstimulated cells (Fig. 1C, dark grey bar vs. white bar). As demonstrated in fig. 1C, although not significant, short and long-term E2 pretreatment reduced TLR2 protein expression by 20%, compared with LPS alone.

2.1.1.5.2 Short-term E2 pretreatment attenuates LPS-mediated inflammatory responses

In addition to TLR2 expression, stimulation of EOMAs with LPS also resulted in a pro-inflammatory activation, as reflected by the upregulation of IL-6 secretion, upregulation that was maximal after 48 hrs (Fig. 2A, by 576% vs. unstimulated cells, dark

grey bar vs. white bar). To evaluate the ability of E2 to modulate EC responses to TLR2 activation, we determined the impact of E2 pretreatment on LPS-induced IL-6 secretion. Figure 2A shows that a short-term (1 hr) E2 pretreatment followed by a 48-hr LPS stimulation period significantly reduced IL-6 secretion compared with LPS alone (15% reduction, Fig.2A, 48-hour hatched bar vs. dark grey bar). However, compared to unstimulated cells, stimulation with E2 alone for 24 and 48 hrs did not alter IL-6 secretion (Fig.2A, pale grey bars vs. white bars).

As a second important parameter of the inflammatory response that is known to be upregulated by TLR2 activation (Sawa et al., 2008), we have evaluated the cell surface expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. As expected, LPS stimulation of EOMAs induced maximal ICAM-1 and VCAM-1 expression after 24 hrs, with an upregulation of 409% and 94%, respectively (dark grey bar, Fig.2B-C). After 48 hrs, their expression diminished but still significantly increased compared with the unstimulated condition. Thereafter, short-term E2 pretreatment (1 hr) decreased by 19% the magnitude of ICAM-1 expression induced by a 24-hr LPS stimulation (Fig 2D, hatched bar vs. dark grey bar). On the other hand, our results revealed that E2 pretreatment did not modulate the cell surface expression of VCAM-1 induced by LPS (data not shown). Similar to IL-6, E2 treatment alone for 24 and 48 hrs did not trigger ICAM-1 and VCAM-1 expression, which remained similar to the unstimulated condition (fig. 2B-C, white bars vs. pale grey bars).

2.1.1.5.3 Implication of Estrogen Receptors in the E2 anti-inflammatory effects

Biological processes induced by E2 in ECs, such as protective vascular effects, are often mediated via the activation of the alpha isotype of ERs. Before evaluating whether it was also the case in EOMAs, we first assessed ER α and ER β protein expression and modulation after E2 stimulation. As shown in Fig. 3A, basal ER α expression became detectable after 48 hrs of cell culture. However, the expression of ER α was not enhanced by

a 24- or 48-hr E2 treatment. ER β expression level after 24 hrs was maintained until 48 hrs but was not affected by E2 treatment (Fig. 3B).

Using transfectant systems and selective estrogen receptor modulators (SERMs), previous studies from our laboratory revealed that E2 and its two main receptors contributed to the regulation of the inflammatory response in ECs (Geraldes et al., 2006; Geraldes et al., 2002; Geraldes et al., 2003). To evaluate the implication of ERs in the regulation of the LPS-induced inflammatory responses, the ER α and ER β activation pathways were blocked with the specific antagonist ICI 182780 (Fulvestrant, 10⁻⁷M). Pretreatment with ICI 182780 for 1 hr followed by a short-term E2 pretreatment (1 hr) before LPS stimulation for 48 hrs did not restore IL-6 secretion to a level similar to that observed in LPS-stimulated samples (Fig.3C). This observation strongly suggests that ERs are not involved in this anti-inflammatory effect, and sheds light on possible ER-independent mechanisms. These mechanisms can be mediated by the GPR30, an alternative membrane receptor for E2-mediated rapid estrogen-dependent gene expression and activation (Prossnitz et al., 2008; Revankar et al., 2005). Thus, we examined GPR30 expression by western blot. As shown in Fig.3D, EOMAs expressed a basal level of GPR30, which was not affected by E2 treatment.

2.1.1.5.4 Characterization of the signalling crosstalk between E2 and the LPS-mediated inflammatory response

We, and others, have demonstrated the stimulation of Akt and ERK1/2 phosphorylation by short-term exposures to E2, via ER-dependent and independent mechanisms (Filardo et al., 2000; Geraldes et al., 2002; Guo et al., 2006). Furthermore, complex intracellular signalling cascades are initiated after TLR2 inflammatory activation in ECs. The phosphorylation of specific kinases such as Akt and ERK1/2 leads to NF- κ B nuclear translocation and, ultimately, to pro-inflammatory gene induction (Sandor and Buc, 2005; Yumoto et al., 2007). In the present study, western blot analyses revealed a low basal

level of p-Akt in unstimulated cells, which increased by 225% and 235% after a 30 min exposure to E2 or LPS alone, respectively (Fig.4A). E2 or LPS treatment for 5 min also increased the basal level of p-ERK1/2 by a mean of 43% and 85%, respectively (Fig.4B). To investigate possible interplays between E2 and TLR2 signalling pathways in EOMAs, the ability of E2 to abrogate LPS-mediated kinase activation was evaluated. E2 pretreatment for 1 hr decreased LPS-induced Akt phosphorylation by 57% (Fig.4A, hatched bar vs. dark grey bar). Moreover, p-ERK1/2 upregulation was abrogated by E2 pretreatment for 1 hr (Fig.4B, hatched bar vs. dark grey bar).

In an attempt to clarify the implication of Akt and ERK1/2 activation in LPS-induced IL-6 secretion, specific inhibitors were used to block their respective activity. As shown in Fig. 4C, inhibition of Akt and ERK1/2 activation with LY294002 and U0126, followed by LPS stimulation for 48 hrs significantly reduced LPS-induced IL-6 secretion (both by 52% vs. LPS alone). No additive inhibition was observed with the combination of E2 pretreatment and LY294002 (58% reduction) or U0126 (53% reduction), compared to E2 pretreatment + LPS condition. Together, these results demonstrate that Akt and ERK1/2 are involved in the LPS-mediated TLR2 signalling events required for optimal stimulation of IL-6 secretion. Western blot scans confirmed the efficacy of both kinase inhibitors to completely block Akt and ERK1/2 phosphorylation (Fig.4A-B).

Via the activation of Stat1 transcription factor, the TLR2 signalling pathway has a positive feedback effect, promoting further IL-6 production thereby amplifying the inflammatory response (Rothlin et al., 2007). The anti-inflammatory effects of E2 in ECs were also demonstrated through the down-regulation of IFN- γ -induced Stat1 phosphorylation (Gerald et al., 2006). In unstimulated EOMAs, a basal level of p-Stat1 was detected (Fig. 5, white bars), which was significantly enhanced by 48 hrs of LPS stimulation (150%, Fig. 5, white bar vs. dark grey bar). When compared to unstimulated cells, E2 alone did not influence Stat1 activation. However, a short-term E2 exposure (1 hr) followed with LPS for 48 hrs significantly decreased by 37% LPS-induced Stat1 phosphorylation (Fig. 5, hatched bar vs. dark grey bar), to reach a level similar to that

observed in unstimulated condition (hatched bar vs. white bar). Together, these results demonstrate that in ECs, E2-mediated regulation of TLR2 activation pathways involves the down-regulation of ERK1/2 and Stat1 phosphorylation and, to a lesser extent, Akt phosphorylation.

2.1.1.5.5 LPS-induced inflammatory response is TLR2-specific and does not implicate TLR4

LPS from *P. gingivalis* is considered to be TLR2-specific (Triantafilou et al., 2007), but it is also known to activate TLR4 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Kocgozlu et al., 2009). Therefore, to ensure that the LPS-induced pro-inflammatory responses in EOMAs were TLR2-specific, the cells were pretreated for 30 min with an antibody directed against TLR2 prior to LPS stimulation, and IL-6 secretion was measured after 48 hrs. As shown in Fig. 6A, in presence of a TLR2 blocking antibody, IL-6 secretion was significantly reduced compared with LPS alone (58%, vertically striped bar vs. dark grey bar), and reached a level similar to that of unstimulated cells (vs. white bar). To confirm the specificity of the antibody, a mouse IgG₁ control was used and did not show any inhibitory activity on IL-6 secretion compared to LPS alone (Fig. 6A, horizontally striped bar vs. dark grey bar). To further ensure that LPS stimulation did not induce IL-6 secretion through TLR4, its signalling pathway was blocked with the specific antagonist, CLI-095 for 30 min, before LPS stimulation. As shown in Fig. 6B, the inhibition of the TLR4 signalling pathway did not alter the level of LPS-induced IL-6 secretion compared to LPS alone. Therefore, the source of LPS used in our experiments resulted in a TLR2-specific activation of EOMAs.

2.1.1.6 Discussion

Vascular inflammation is known to contribute to the development of endothelial dysfunction. However, the nature and diversity of the factors able to trigger inflammation and contribute to vascular injury and the development of atherosclerosis are still intensively investigated. TLR2^{-/-} mice were shown to be protected against postischemic coronary endothelial dysfunction and presented smaller infarcts, with less accumulation of neutrophils in the ischemic tissue and expression of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α (Favre et al., 2007). *In vitro*, the stimulation of THP-1 human monocytes with a TLR2 agonist leads to the activation of the inflammatory system, as demonstrated by TLR2 and cell adhesion molecule up-regulation. TLR2 agonists also promote the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IL-1 β , TNF- α , IL-8, MCP-1, and IL-6 by monocytes, thus emphasizing their involvement in early atherosclerotic events by triggering endothelial activation (Zhang et al., 2008). Indeed, the TLR2 agonist used in the present study, LPS derived from *P. gingivalis*, is a PAMP normally related to periodontal infection, a chronic inflammatory disease affecting gingivas and periodontium. LPS from this pathogen is present in atherosclerotic plaques, where it mediates EC inflammatory responses through TLR2, in addition to altering the normal functions of the endothelium and promoting endothelial injury (Gibson et al., 2006).

Nevertheless, despite the importance of monocyte activation in the pathogenesis of atherosclerosis, vascular ECs are critical targets since their activation is essential for leukocyte entry into the vascular wall. Therefore, it is important to better understand EC responses to TLR2 agonists and identify negative modulators that might interfere with this pro-inflammatory pathway. In the present study, we first confirmed that the activation of TLR2 with *P. gingivalis*-derived LPS leads to a pro-inflammatory response in mouse microvascular EOMAs. This response was characterized by the overexpression of TLR2, ICAM-1 and VCAM-1, and by the up-regulation of IL-6 secretion. Even if both TLR2

mRNA and protein expression were detected in unstimulated EOMAs, mRNA expression was the only one modulated by the LPS. Nevertheless, TLR2 expression in ECs is still under investigation, and numerous studies have highlighted the possible differences in TLR2 expression and activation based on their isolation site and activation status. Resting human coronary artery endothelial cells (HCAECs), human microvascular endothelial cells (HMECs), human aortic endothelial cells (HAECs) and HUVECs, which all express very low level of TLR2 at the mRNA and/or protein levels compared with THP-1 human monocytes, do not respond to TLR2 agonists. These cells must be challenged with pro-inflammatory stimuli, such as TNF- β and IFN- γ to up-regulate their receptor expression, thus rendering these cells more sensitive to microbial ligands that specifically activate TLR2 (Faure et al., 2000; Mullaly and Kubes, 2004; Satta et al., 2008; Shuang et al., 2007). Murine aortic ECs (MAECs) and murine lung vascular ECs (MLVECs) express TLR2 on their cell surface and respond to its ligands independently of any pro-inflammatory priming (Shuang et al., 2007), suggesting that the recognition of pathogens by TLRs and their subsequent activation are more finely regulated in humans than in mice. Nevertheless, both cell types trigger the activation of TLR2 target genes, such as ICAM-1 and VCAM-1. In EOMAs, the basal constitutive expression of ICAM-1 and, to a lesser extent, VCAM-1, were enhanced by LPS stimulation. As reported in other studies on vascular ECs activated by a TLR2 ligand, this overexpression was maintained for a period of at least 48 hrs in both cases (Carlos et al., 1990; Van Kampen and Mallard, 2001). Thus, mouse microvascular EC responses to a TLR2 agonist are in agreement with other studies on EC activation, and suggest that EOMAs are a good model to study TLR2 regulation. In addition, we have clearly demonstrated that EOMAs' inflammatory responses to *P. gingivalis*-derived LPS were TLR2-specific, and that IL-6 production did not involve TLR4. This highlights how *P. gingivalis* infections can lead to endothelial inflammation and promote the development of atherosclerosis.

Because we have previously demonstrated that estrogens were associated with diverse anti-inflammatory effects on vascular cells, through the regulation of EC activation

patterns and endothelial healing processes (Geraldes et al., 2006; Geraldes et al., 2003), we therefore investigated whether E2 could influence the sensitivity of EOMAs to TLR2-mediated activation of inflammatory signals, a mechanism that may have an impact on vascular protection against pro-atherogenic factors. Several studies have evaluated the influence of E2 on inflammation-mediated EC responses, through its capacity to reduce the expression of CD40-CD40L (Geraldes et al., 2006), ICAM-1 and VCAM-1 (Caulin-Glaser et al., 1996). In a model of arterial balloon-injury, Miller et al. demonstrated that E2 treatment attenuated neutrophil chemotaxis and adhesion, and prevented lesion development by down-regulating IL-6 and monocyte-chemoattractant protein (MCP-1) expression (Miller et al., 2004). Similarly, the mechanisms by which E2 influences TLR-mediated inflammatory responses, particularly those induced by TLR2 and TLR4 pathways, have been studied in monocytes/macrophages. In *in vitro* LPS-activated macrophages, E2 decreases the production of pro-inflammatory cytokines, and inhibits DNA binding and transcriptional activity of p65 NF κ B (Ghisletti et al., 2005; Vegeto et al., 2004). Similar results were also observed in other cell types, such as Kupffer and epithelial cells (Hsieh et al., 2007; Paimela et al., 2007). *In vivo* studies related to TLRs and its regulation by the estrous cycle revealed that TLR2 expression was upregulated during the diestrus phase, compare with the estrous phase, when the estradiol concentration is higher in human endometrium and in murine vaginal epithelium (Hirata et al., 2007; Yao et al., 2007). Until now, no study has investigated the influence of E2 on TLR2 expression and activation pathways in vascular ECs. In the present study, we have demonstrated for the first time the anti-inflammatory effect of E2 pretreatment on ECs. At the physiological concentration of 10^{-9} M, E2 pretreatment resulted in a decrease of TLR2 mRNA expression and the amplitude of *P. gingivalis* LPS-induced TLR2 activation responses, with decreases in ICAM-1 and IL-6 expression. IL-6 is the predominant mediator of the acute phase response, but it also stimulates B-lymphocyte antibody production, regulated macrophage and dendritic cells differentiation, and the response of regulatory T-lymphocytes to infection (Chiu et al., 2009). Therefore, the regulation of IL-6 production by E2 is part of the gender-specific profile of the immune response against incoming pathogens (Bird et al.,

2008). As opposed to men, women display higher immunoglobulin levels, a better response to immunization and a higher prevalence of auto-immune diseases; an immune sexual dimorphism attributed to estrogens (Aulock et al., 2006). Interestingly, regulation of IL-6 gene expression by E2 prevents osteoclast activation, which is responsible for bone resorption (Passeri et al., 1993; Stein and Yang, 1995). E2 treatment is also effective in reducing bone resorption in ovariectomized mice through a significant suppression of heat shock protein 60 secretion, also known to activate the TLR2 in osteoclasts (Koh et al., 2009).

As illustrated by cytokine up-regulation and increases of TLR4 expression in LPS-activated macrophages, some studies have highlighted the pro-inflammatory effects of *in vivo* or long-term E2 exposure (Calippe et al., 2010; Rettew et al., 2009; Soucy et al., 2005). These immunoenhancing effects of E2 allow the transfer from the innate to adaptive immunity, and explain why females generate stronger protective humoral immune responses than their male counterparts (Lang, 2004). In this study, the *in vitro* long-term E2 treatment (24 hrs) decreased LPS-induced TLR2 expression to a level similar to that of short-term E2 exposure (1 hr) (Fig. 1B). In fact, LPS-induced inflammatory responses did not appear to be enhanced by a 24-hr E2 pretreatment, as no decrease in the expression of IL-6 or ICAM-1 was observed, resulting in levels similar to that of the 1 hr pretreatment (data not shown).

The implication and specific roles of each ER in estrogen anti-inflammatory effects are still under investigation. In apoE-deficient female mice treated with E2, ER α was considered the major mediator in the attenuation of the atherosclerotic burden (Hodgin et al., 2001). Previous observations from our laboratory revealed that E2 improved porcine EC migration and proliferation through ER α activation, while they were decreased in VSMCs through ER β stimulation (Geraldès et al., 2003). In the present study, we have confirmed ERs protein expressions in EOMAs, but we did not observe a modulation of their expression by E2 at the pre-specified time points. Although ER β expression was detected and ER α expression was upregulated by the maintenance of confluence, these

receptors were not implicated in the E2 down-regulation of LPS-induced IL-6 response. Indeed, we observed a lack of inhibitory effects of the ERs antagonist ICI 182780 on E2-mediated reduction of IL-6 production. ICI 182780 inhibits competitively the binding of E2 to both ERs, present no agonistic effect like tamoxifen, impairs their dimerization and nuclear translocation, and accelerates the degradation of ERs protein without affecting their mRNA expression (Osborne et al., 2004). Therefore, our results suggest the involvement of an ER-independent mechanism.

Beside the classical ER-dependent activation of target genes, E2 can trigger EC activation through other pathways, such as the rapid activation of ER membrane receptor family coupled to G-protein, the GPR30. This receptor binds to estrogens induces rapid kinase phosphorylation, and mediates the expression of estrogen-dependent genes in the absence of ER α (Filardo et al., 2000; Prossnitz and Maggiolini, 2009). In the present study, we have shown the protein expression of GPR30 in EOMAs, which is in agreement with a previous study that demonstrated its expression in the endothelium of mammary arteries and saphenous veins (Haas et al., 2007). Therefore, investigation of GPR30 implication in the TLR2 signalling modulation is in progress using a high affinity and selective GPR30 receptor antagonist that displays no affinity for ER α and ER β .

Through ER-dependent and -independent mechanisms, E2 induces a rapid non-genomic effects mediated by kinase activation which, in turn, can modulate endothelial function (Meyer et al., 2009). E2 can also rapidly trigger a variety of signal transduction events, leading to the stimulation of calcium flux (Stefano et al., 1999). Following E2 stimulation in EOMAs, our results revealed the up-regulation of Akt and ERK1/2 phosphorylation, in agreement with our previous studies (Geraldès et al., 2002; Geraldès et al., 2003). These kinases are also involved in TLR2 signalling pathways, where they promote the secretion of cytokines such as IL-8 and IL-6 in human synovial fibroblasts and in human airway epithelial cells (Berube et al., 2009; Chiu et al., 2009). Therefore, because they have common kinase activation, possible crosstalk between E2 and TLR2 pathways may occur. In this present study, we have demonstrated the up-regulation of Akt and

ERK1/2 phosphorylation in EOMAs after LPS stimulation, thus establishing their implication in *P. gingivalis* LPS-induced IL-6 secretion. Our results also revealed for the first time in vascular ECs that E2 pretreatment for 1 hr decrease vascular inflammation through the negative regulation of TLR2-induced Akt and ERK1/2 phosphorylation.

E2-mediated Akt activation and the transient increase in intracellular Ca^{2+} , lead to NO synthesis and release, which is anti-atherogenic. NO produced by ECs modulates vascular tone, inhibits platelet aggregation, and VSMCs proliferation (Khan et al., 1996). It also attenuates leukocyte adhesion on the endothelium, and prevents monocyte recruitment by decreasing adhesion molecule expression and cytokine secretion by ECs (De Caterina et al., 1995). Suppression of NO synthesis by a NOS inhibitor in HUVECs has also been shown to promote pro-inflammatory responses such as neutrophil recruitment (Niu et al., 1994). In our experiments, in order to further investigate the mechanisms involved in E2-mediated reduction of IL-6 production, we have inhibited NO synthesis in EOMAs with the NOS inhibitor L-NAME. Pretreatment with L-NAME (100 μM) for 30 min followed by the short-term E2 pretreatment (1 hr) prior to LPS stimulation (48 hrs) did not abrogate E2 influence on the LPS-induced IL-6 secretion level (data not shown), thus excluding this pathway. After E2 activation, MAPK and Akt can rapidly translocate into the nucleus where they regulate ERs gene transcription (Dos Santos et al., 2002), highlighting the interaction between the E2 non-genomic and genomic pathways (Bjornstrom and Sjoberg, 2005) and, therefore, provide a possible explanation for the E2 anti-inflammatory effects responsible for IL-6 decrease.

Important transcription factors are involved in the regulation of adhesion molecule expression and cytokine secretion and, according to our results, some studies have demonstrated a lipoteichoic acid (LTA)-induced activation of Stat1 specific to TLR2 in murine macrophages (Liljeroos et al., 2008). Stat1 is a transcription factor which, upon phosphorylation, is primarily responsible for a positive feedback on TLR signalling, promoting further cytokine production, such as IFN- γ and IL-6 (Wormald et al., 2006). Our results are in agreement with previous studies that demonstrated the anti-inflammatory

effect of E2 in porcine ECs, with a decrease of the IFN- γ -induced Stat1 phosphorylation, an effect specifically induced by ER α (Geraldes et al., 2006). However, results of the present study could not pinpoint the exact mechanism(s) by which E2 decreased p-Stat1 expression. Furthermore, the anti-inflammatory effects of E2 pretreatment on LPS-induced Stat1 phosphorylation and IL-6 secretion were only observed after 48 hrs. One possible explanation is that E2 up-regulates the expression of proteins involved in the late negative feedback of TLR2 signalling pathways such as the suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins. These proteins, particularly SOCS1 and SOCS3, are implicated in the negative feedback of TLR signalling pathways through the inhibition of Stat1 phosphorylation in response to IL-6 cytokine (Wormald and Hilton, 2007). In fact, there are a multitude of negative pathways regulating TLRs signalling, including TAM receptor tyrosine kinases (Tyro3, Axl, and Mer) (Rothlin et al., 2007), all of which could be modulated by E2.

2.1.1.7 Conclusion

For the first time in a mouse model of vascular EC, our results bring new insights on the molecular and biochemical regulation of TLR2 activation. We have shown that stimulation of EOMAs with *P. gingivalis*-derived LPS resulted in the increased expression of TLR2, and induced a pro-inflammatory profile in ECs. This pathological mechanism contributed to the vascular activation of ECs, and the regulation of TLR2 signalling pathways which could potentially be considered as a therapeutic target against endothelial dysfunction and the development of atherosclerosis. Therefore, the present study demonstrates the key role of a physiological concentration of E2 as a modulator of TLR2-activated inflammatory processes. Our results have also established an interaction between E2 and TLR2 signalling pathways, with the modulation of Akt, ERK1/2 and Stat1 phosphorylation, thus illustrating another important aspect of estrogen essential vascular protective effects.

2.1.1.8 Acknowledgements

We would like to thank Maya Mamarbachi for her technical assistance in performing Q-PCR analyses.

This project was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, (CIHR; #159684), Fondation des Maladies du Coeur du Québec and Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal to Dr. Jean-François Tanguay.

None of the authors has competing financial interest to declare.

2.1.1.9 References

- Aulock S. V., Deininger S., Draing C., Gueinzius K., Dehus O. and Hermann C. (2006) Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA. *J Interferon Cytokine Res* **26**, 887-92.
- Babiker F. A., De Windt L. J., van Eickels M., Grohe C., Meyer R. and Doevendans P. A. (2002) Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res* **53**, 709-19.
- Berube J., Bourdon C., Yao Y. and Rousseau S. (2009) Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal* **21**, 448-56.
- Bird M. D., Karavitis J. and Kovacs E. J. (2008) Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cell Immunol* **252**, 57-67.
- Bjornstrom L. and Sjoberg M. (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* **19**, 833-42.
- Calippe B., Douin-Echinard V., Delpy L., Laffargue M., Lelu K., Krust A., Pipy B., Bayard F., Arnal J. F., Guery J. C. and Gourdy P. (2010) 17 β -Estradiol Promotes TLR4-Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor α Signaling in Macrophages In Vivo. *J Immunol* **185**, 1169-76.
- Carlos T. M., Schwartz B. R., Kovach N. L., Yee E., Rosa M., Osborn L., Chi-Rosso G., Newman B., Lobb R. and et al. (1990) Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* **76**, 965-70.
- Caulin-Glaser T., Watson C. A., Pardi R. and Bender J. R. (1996) Effects of 17 β -estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* **98**, 36-42.

- Chakrabarti S., Lekontseva O. and Davidge S. T. (2008) Estrogen is a modulator of vascular inflammation. *IUBMB Life* **60**, 376-82.
- Chandrasekar B., Sirois M. G., Geoffroy P., Lauzier D., Nattel S. and Tanguay J. F. (2005) Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost* **94**, 1042-7.
- Chiu Y. C., Lin C. Y., Chen C. P., Huang K. C., Tong K. M., Tzeng C. Y., Lee T. S., Hsu H. C. and Tang C. H. (2009) Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1-dependent pathway. *J Immunol* **183**, 2785-92.
- Curtiss L. K. and Tobias P. S. (2007) The toll of Toll-like receptors, especially toll-like receptor 2, on murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets* **8**, 1230-8.
- De Caterina R., Libby P., Peng H. B., Thannickal V. J., Rajavashisth T. B., Gimbrone M. A., Jr., Shin W. S. and Liao J. K. (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* **96**, 60-8.
- Deshpande R., Khalili H., Pergolizzi R. G., Michael S. D. and Chang M. D. (1997) Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* **38**, 46-54.
- Dos Santos E. G., Dieudonne M. N., Pecquery R., Le Moal V., Giudicelli Y. and Lacasa D. (2002) Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* **143**, 930-40.
- Dunzendorfer S., Lee H. K. and Tobias P. S. (2004) Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity. *Circ Res* **95**, 684-91.
- Edfeldt K., Swedenborg J., Hansson G. K. and Yan Z. Q. (2002) Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* **105**, 1158-61.

- Erridge C., Burdess A., Jackson A. J., Murray C., Riggio M., Lappin D., Milligan S., Spickett C. M. and Webb D. J. (2008) Vascular cell responsiveness to Toll-like receptor ligands in carotid atheroma. *Eur J Clin Invest* **38**, 713-20.
- Faure E., Equils O., Sieling P. A., Thomas L., Zhang F. X., Kirschning C. J., Polentarutti N., Muzio M. and Arditi M. (2000) Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 11058-63.
- Faure E., Thomas L., Xu H., Medvedev A., Equils O. and Arditi M. (2001) Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* **166**, 2018-24.
- Favre J., Musette P., Douin-Echinard V., Laude K., Henry J. P., Arnal J. F., Thuillez C. and Richard V. (2007) Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1064-71.
- Filardo E. J., Quinn J. A., Bland K. I. and Frackelton A. R., Jr. (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* **14**, 1649-60.
- Geraldes P., Gagnon S., Hadjadj S., Merhi Y., Sirois M. G., Cloutier I. and Tanguay J. F. (2006) Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ERalpha-mediated pathway. *Cardiovasc Res* **71**, 566-73.
- Geraldes P., Sirois M. G., Bernatchez P. N. and Tanguay J. F. (2002) 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* **22**, 1585-90.

- Geraldes P., Sirois M. G. and Tanguay J. F. (2003) Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res* **93**, 399-405.
- Ghisletti S., Meda C., Maggi A. and Vegeto E. (2005) 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol* **25**, 2957-68.
- Gibson F. C., 3rd, Yumoto H., Takahashi Y., Chou H. H. and Genco C. A. (2006) Innate immune signaling and Porphyromonas gingivalis-accelerated atherosclerosis. *J Dent Res* **85**, 106-21.
- Glass C. K. and Witztum J. L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503-16.
- Guo R. X., Wei L. H., Tu Z., Sun P. M., Wang J. L., Zhao D., Li X. P. and Tang J. M. (2006) 17 beta-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **99**, 9-18.
- Haas E., Meyer M. R., Schurr U., Bhattacharya I., Minotti R., Nguyen H. H., Heigl A., Lachat M., Genoni M. and Barton M. (2007) Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension* **49**, 1358-63.
- Hansson G. K. and Libby P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **6**, 508-19.
- Hirata T., Osuga Y., Hamasaki K., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Takemura Y., Koga K., Yoshino O., Tajima T., Hasegawa A., Yano T. and Taketani Y. (2007) Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Immunol* **74**, 53-60.
- Hodgin J. B., Krege J. H., Reddick R. L., Korach K. S., Smithies O. and Maeda N. (2001) Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe^{-/-} mice. *J Clin Invest* **107**, 333-40.

- Hsieh Y. C., Frink M., Thobe B. M., Hsu J. T., Choudhry M. A., Schwacha M. G., Bland K. I. and Chaudry I. H. (2007) 17Beta-estradiol downregulates Kupffer cell TLR4-dependent p38 MAPK pathway and normalizes inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage. *Mol Immunol* **44**, 2165-72.
- Khan B. V., Harrison D. G., Olbrych M. T., Alexander R. W. and Medford R. M. (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9114-9.
- Kocgozlu L., Elkaim R., Tenenbaum H. and Werner S. (2009) Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res* **88**, 741-5.
- Kofler S., Nickel T. and Weis M. (2005) Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* **108**, 205-13.
- Koh J. M., Lee Y. S., Kim Y. S., Park S. H., Lee S. H., Kim H. H., Lee M. S., Lee K. U. and Kim G. S. (2009) Heat shock protein 60 causes osteoclastic bone resorption via toll-like receptor-2 in estrogen deficiency. *Bone* **45**, 650-60.
- Lang T. J. (2004) Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol* **113**, 224-30.
- Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-74.
- Liljeroos M., Vuolteenaho R., Rounioja S., Henriques-Normark B., Hallman M. and Ojaniemi M. (2008) Bacterial ligand of TLR2 signals Stat activation via induction of IRF1/2 and interferon-alpha production. *Cell Signal* **20**, 1873-81.
- Loppnow H., Werdan K. and Buerke M. (2008) Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun* **14**, 63-87.
- Meyer M. R., Haas E., Prossnitz E. R. and Barton M. (2009) Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* **308**, 9-16.
- Miller A. P., Feng W., Xing D., Weathington N. M., Blalock J. E., Chen Y. F. and Oparil S. (2004) Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation* **110**, 1664-9.

- Mullaly S. C. and Kubes P. (2004) Toll gates and traffic arteries: from endothelial TLR2 to atherosclerosis. *Circ Res* **95**, 657-9.
- Mullick A. E., Soldau K., Kiosses W. B., Bell T. A., 3rd, Tobias P. S. and Curtiss L. K. (2008) Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med* **205**, 373-83.
- Niu X. F., Smith C. W. and Kubes P. (1994) Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* **74**, 1133-40.
- Osborne C. K., Wakeling A. and Nicholson R. I. (2004) Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer* **90 Suppl 1**, S2-6.
- Paimela T., Ryhanen T., Mannermaa E., Ojala J., Kalesnykas G., Salminen A. and Kaarniranta K. (2007) The effect of 17beta-estradiol on IL-6 secretion and NF-kappaB DNA-binding activity in human retinal pigment epithelial cells. *Immunol Lett* **110**, 139-44.
- Passeri G., Girasole G., Jilka R. L. and Manolagas S. C. (1993) Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology* **133**, 822-8.
- Prossnitz E. R., Arterburn J. B., Smith H. O., Oprea T. I., Sklar L. A. and Hathaway H. J. (2008) Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* **70**, 165-90.
- Prossnitz E. R. and Maggiolini M. (2009) Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol* **308**, 32-8.
- Rettew J. A., Huet Y. M. and Marriott I. (2009) Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology* **150**, 3877-84.
- Revankar C. M., Cimino D. F., Sklar L. A., Arterburn J. B. and Prossnitz E. R. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**, 1625-30.
- Ross R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26.

- Rothlin C. V., Ghosh S., Zuniga E. I., Oldstone M. B. and Lemke G. (2007) TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124-36.
- Sandor F. and Buc M. (2005) Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)* **51**, 188-97.
- Satta N., Kruithof E. K., Reber G. and de Moerloose P. (2008) Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. *Mol Immunol* **46**, 145-57.
- Sawa Y., Tsuruga E., Iwasawa K., Ishikawa H. and Yoshida S. (2008) Leukocyte adhesion molecule and chemokine production through lipoteichoic acid recognition by toll-like receptor 2 in cultured human lymphatic endothelium. *Cell Tissue Res* **333**, 237-52.
- Schoneveld A. H., Hoefler I., Sluijter J. P., Laman J. D., de Kleijn D. P. and Pasterkamp G. (2008) Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis* **197**, 95-104.
- Shuang C., Wong M. H., Schulte D. J., Arditi M. and Michelsen K. S. (2007) Differential expression of Toll-like receptor 2 (TLR2) and responses to TLR2 ligands between human and murine vascular endothelial cells. *J Endotoxin Res* **13**, 281-96.
- Soucy G., Boivin G., Labrie F. and Rivest S. (2005) Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *J Immunol* **174**, 6391-8.
- Stefano G. B., Prevot V., Beauvillain J. C., Fimiani C., Welters I., Cadet P., Breton C., Pestel J., Salzet M. and Bilfinger T. V. (1999) Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. *J Immunol* **163**, 3758-63.
- Stein B. and Yang M. X. (1995) Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* **15**, 4971-9.
- Triantafilou M., Gamper F. G., Lepper P. M., Mouratis M. A., Schumann C., Harokopakis E., Schifferle R. E., Hajishengallis G. and Triantafilou K. (2007) Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4,

- induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **9**, 2030-9.
- Van Kampen C. and Mallard B. A. (2001) Regulation of bovine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) on cultured aortic endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* **79**, 129-38.
- Vegeto E., Ghisletti S., Meda C., Etteri S., Belcredito S. and Maggi A. (2004) Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17beta-estradiol in macrophage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **91**, 59-66.
- Vitale C., Mendelsohn M. E. and Rosano G. M. (2009) Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. *Nat Rev Cardiol* **6**, 532-42.
- Woods A., Brull D. J., Humphries S. E. and Montgomery H. E. (2000) Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* **21**, 1574-83.
- Wormald S. and Hilton D. J. (2007) The negative regulatory roles of suppressor of cytokine signaling proteins in myeloid signaling pathways. *Curr Opin Hematol* **14**, 9-15.
- Wormald S., Zhang J. G., Krebs D. L., Mielke L. A., Silver J., Alexander W. S., Speed T. P., Nicola N. A. and Hilton D. J. (2006) The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J Biol Chem* **281**, 11135-43.
- Xing D., Nozell S., Chen Y. F., Hage F. and Oparil S. (2009) Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 289-95.
- Xu X. H., Shah P. K., Faure E., Equils O., Thomas L., Fishbein M. C., Luthringer D., Xu X. P., Rajavashisth T. B., Yano J., Kaul S. and Arditi M. (2001) Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* **104**, 3103-8.
- Yao X. D., Fernandez S., Kelly M. M., Kaushic C. and Rosenthal K. L. (2007) Expression of Toll-like receptors in murine vaginal epithelium is affected by the estrous cycle and stromal cells. *J Reprod Immunol* **75**, 106-19.

- Yu L., Wang L. and Chen S. (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med* **14**, 2592-603.
- Yumoto H., Yamada M., Shinohara C., Nakae H., Takahashi K., Azakami H., Ebisu S. and Matsuo T. (2007) Soluble products from *Eikenella corrodens* induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Oral Microbiol Immunol* **22**, 36-45.
- Zhang D., Chen L., Li S., Gu Z. and Yan J. (2008) Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity* **14**, 99-107.

2.1.1.10 Footnotes

¹Corresponding author: Dr Jean-François Tanguay,

Tel.: 1-(514) 376-3330 ext. 3250; Fax: 1-(514) 593-2596;

Address : Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger, Montréal (Qc.), H1T 1C8, Canada.

² Abbreviations:

E2; 17- β -estradiol, **ECs**; endothelial cells, **EOMA**; endothelial mouse cell derived from a hemangioendothelioma, **PAMPs**; pathogens cell-wall molecular patterns, **DAMPs**; damage-associated molecular patterns, **VSMCs**; vascular smooth muscle cells, **ERs**; estrogen receptors, **GPR30**; G-protein membrane receptor 30, **Stat1**; signal transducer and activator of transcription 1, **SERMs**; selective estrogen receptor modulators, **L-NAME**; N^G-Nitro-L-arginine-methyl ester, **SOCS**; suppressor of cytokine signalling, **LTA**; lipoteichoic acid.

2.1.1.11 Figure legends

Figure 1. Influence of E2 on TLR2 expressions. (A), Total RNA was extracted from EOMAs stimulated with E2 or with LPS at the indicated times. TLR2 mRNA was measured by Q-PCR and data are presented as the percentage of control (unstimulated cell); n=10 (4hrs) and n=6 (24hrs). (B), TLR2 mRNA level in EOMAs pretreated or not with E2 followed by LPS stimulation was measured by Q-PCR. The relative quantification of the TLR2 gene was normalized with GAPDH reference gene and data are expressed as fold increase in % to levels of TLR2 in unstimulated cells; n=10. (C), Whole-cell lysates were prepared from EOMAs treated with or without E2 followed by LPS stimulation. TLR2 protein expression was measured by WB and data are represented as TLR2 protein/actin protein expression ratios. WB scan is representative of six experiments. (**p<0.01 and ***p<0.001 vs. unstimulated), (†p<0.05 and ††p<0.01 vs. LPS).

Figure 2. Modulation of EC inflammatory responses to LPS by E2. (A), ELISA analysis of IL-6 level in culture supernatants from EOMAs stimulated with E2 or LPS at the indicated times. To demonstrate the role of E2, EOMAs were treated with E2 for 1hr prior to LPS stimulation (hatched bars); n=6 (24hrs) and n=3 (48hrs). (B-C) EOMAs stimulated with E2 or with LPS were labelled with ICAM-1 mAb and VCAM-1 mAb. Data were analyzed by flow cytometry and are presented as the MFI-fold increased of the unstimulated condition (% control); n=3 and n=4 (only for ICAM-1; 24hrs). (D), EOMAs treated with E2 for 1hr, followed by a 24-hour LPS stimulation were labelled with ICAM-1 mAb. Data were analyzed by flow cytometry and are presented as MFI values; n=4. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001 vs. unstimulated), (†p<0.05 vs. LPS).

Figure 3. E2 anti-inflammatory effects are not mediated by ERs

(A-B), Whole-cell lysates were prepared from EOMAs treated or not with E2 at the indicated times. ER α and ER β protein expressions were measured by WB and actin level

served as a loading control. WB scans are representative of three experiments. (C), EOMAs were pretreated with ICI 1hr before E2 treatment for 1hr and/or LPS stimulation for 48hrs. IL-6 level in culture supernatants was measured by ELISA; n=3. (D), Whole-cell lysates were prepared from EOMAs treated or not with E2 at the indicated times. GPR30 expression level was measured by WB and actin expression served as a loading control. WB scans are representative of three experiments. (**p<0.01 vs. unstimulated), (†p<0.05 vs. LPS).

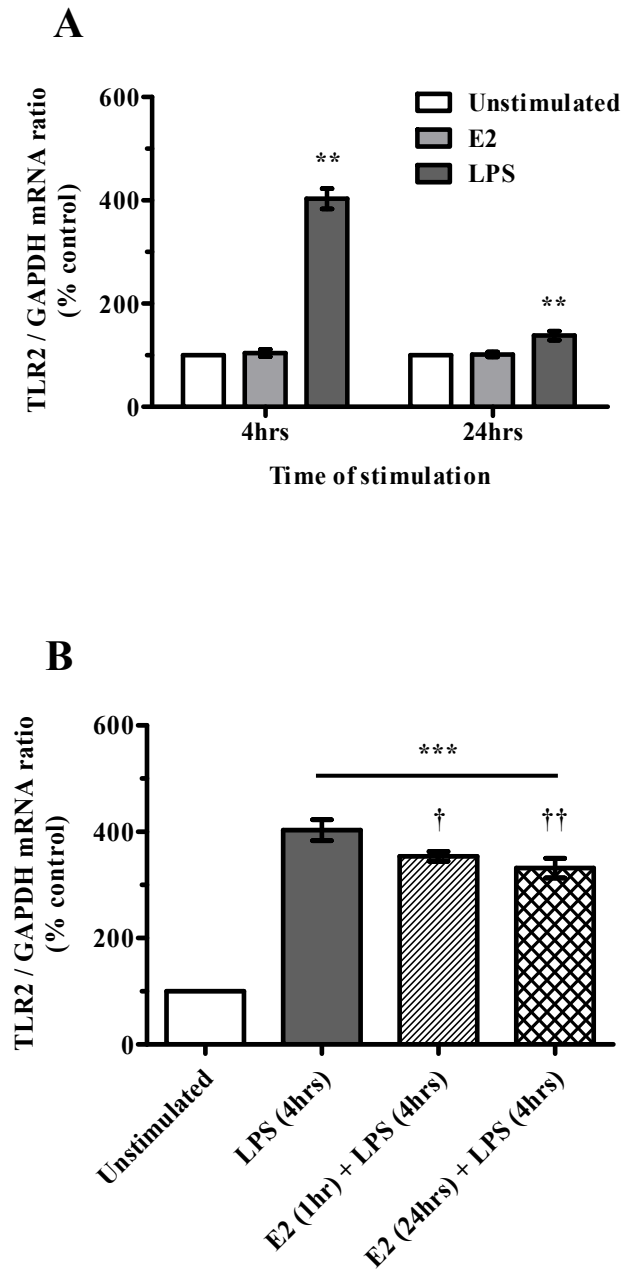
Figure 4. Phosphorylation levels of Akt and ERK1/2 are modulated by E2 pretreatment. Whole-cell lysates were prepared from EOMA treated with or without E2 for 1hr prior to LPS stimulation. Akt (A) and ERK1/2 (B) phosphorylation levels were measured by WB after 30min and 5min of LPS stimulation, respectively. Data are represented as phosphorylated protein/total protein expression ratios and WB scans are representative of nine (A) and five (B) experiments. (C), IL-6 secretion was measured in EOMAs pre-treated with the PI3K/Akt inhibitor (LY294002) or with the ERK1/2 inhibitor (U0126) prior to E2 treatment for 1hr and/or LPS stimulation for 48hrs; n=3. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. unstimulated), (†p<0.05, ††p<0.001 vs. LPS), (§p<0.001 vs. E2 + LPS).

Figure 5. Modulation by E2 of the Stat1 phosphorylation level. Whole-cell lysates were prepared from EOMAs treated with or without E2 for 1hr prior to LPS stimulation for 48hrs. Stat1 phosphorylation level was measured by WB and data are represented as phosphorylated protein/total protein expression ratios. WB scan is representative of four experiments. (**p<0.01 vs. unstimulated), (†p<0.05 vs. LPS).

Figure 6. IL-6 secretion induced by LPS is specific to the TLR2. IL-6 secretion was measured in EOMAs treated with (A) an inhibitory Ab for TLR2 and the corresponding mouse IgG₁ isotype control; n=3 and (B), with a specific TLR4 antagonist prior to LPS stimulations for 48hrs; n=3. (**p<0.01 vs. unstimulated), (††p<0.01 vs. LPS).

2.1.1.12 Figures

Figure 1.



C

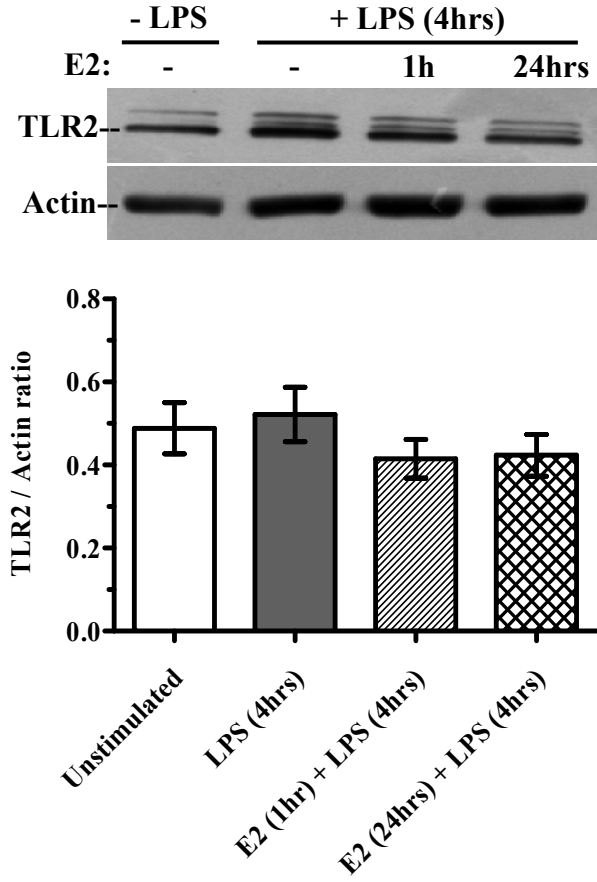


Figure 2.

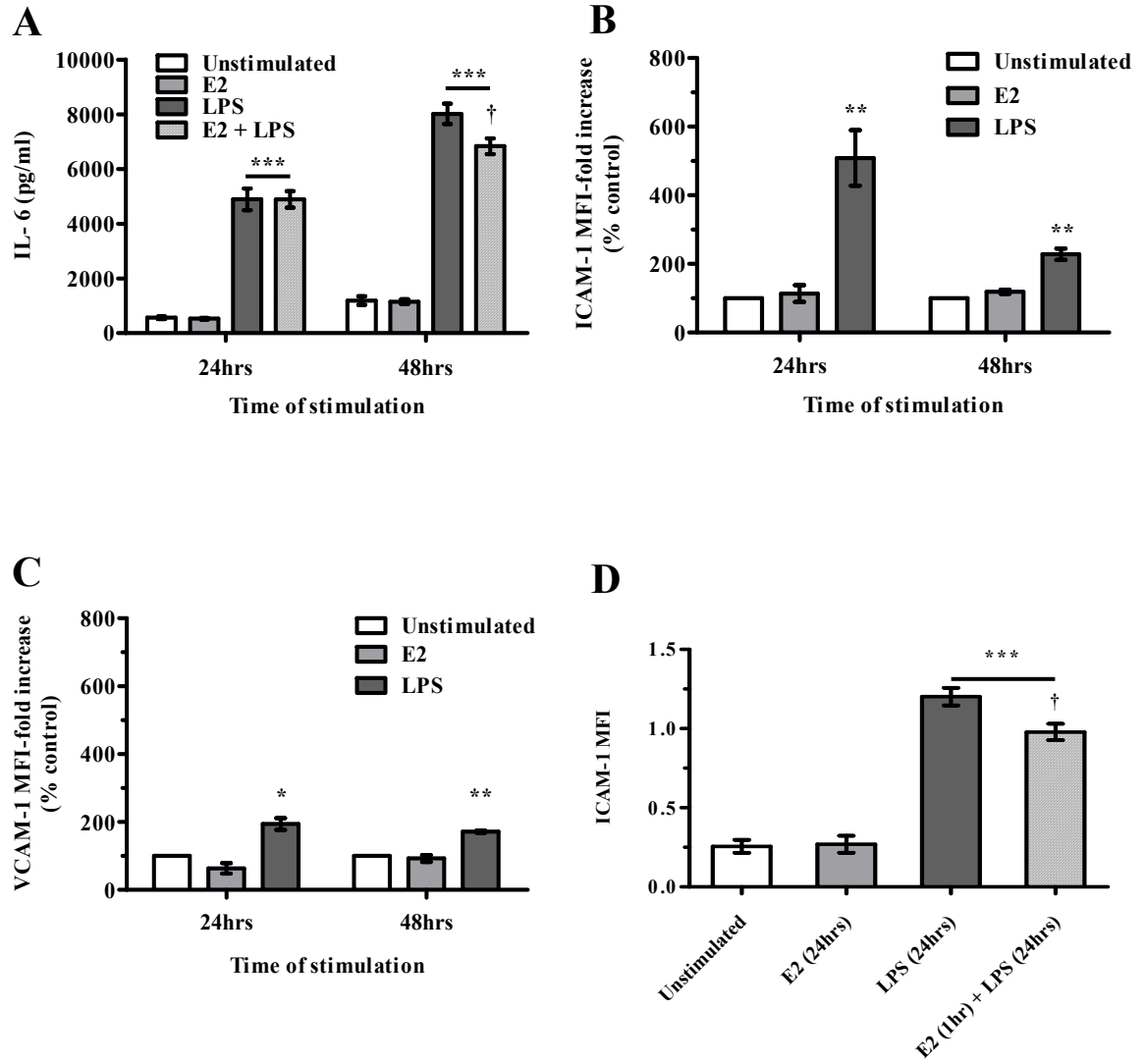


Figure 3.

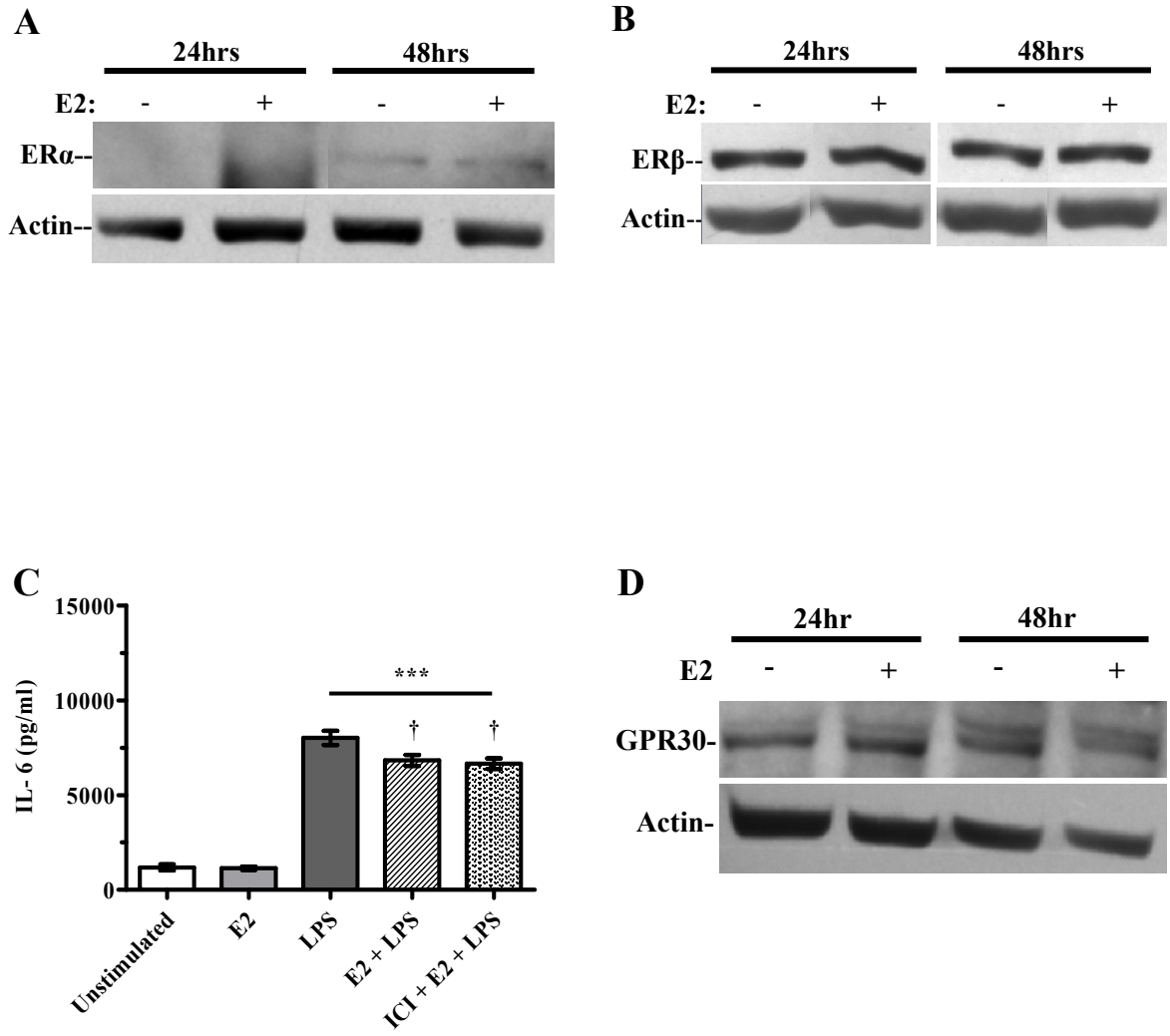


Figure 4.

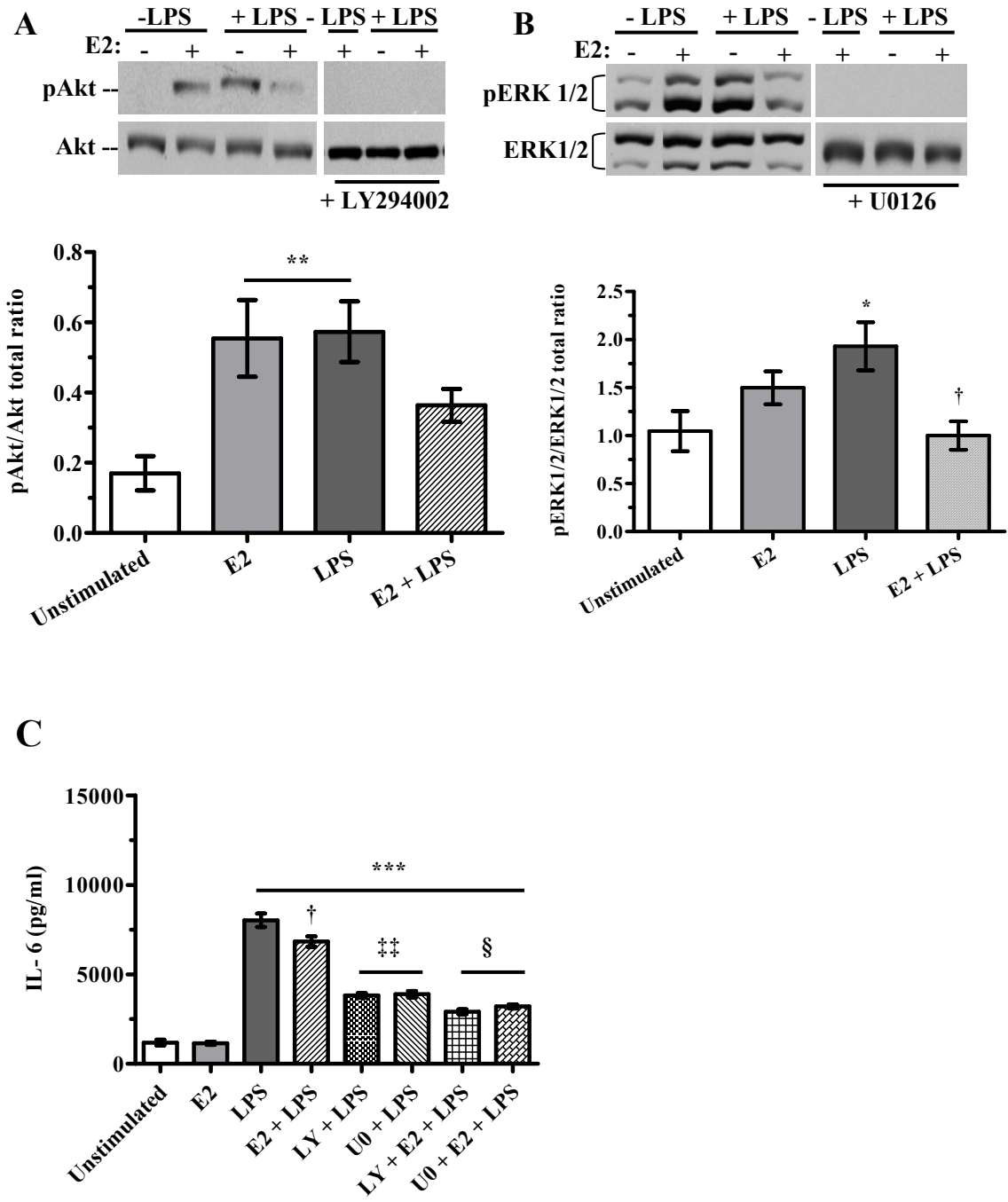


Figure 5.

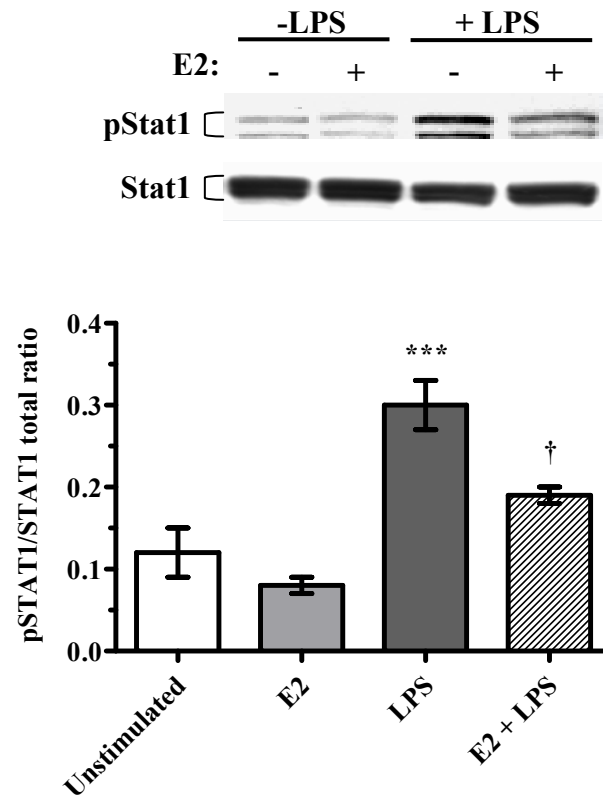
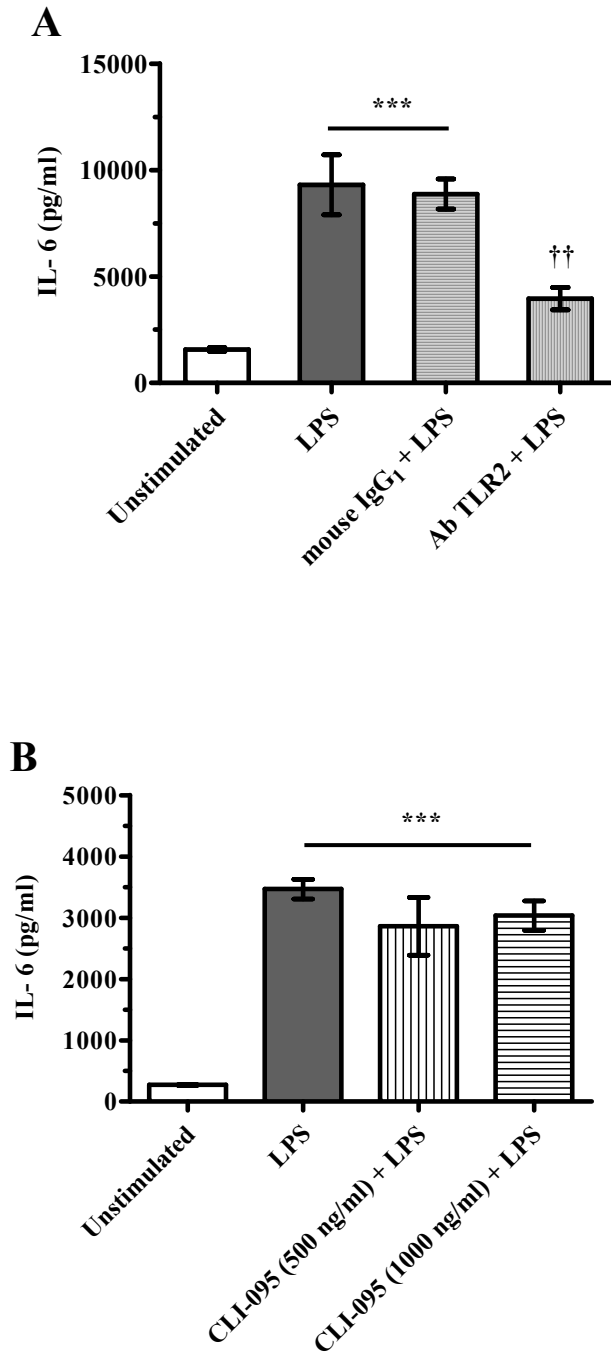


Figure 6.



3. Discussion

Le but principal de ces travaux de maîtrise était de déterminer si les œstrogènes pouvaient influencer la sensibilité des CE aux signaux pro-inflammatoires en modulant l'expression et l'activité du TLR2; contribuant ainsi à la réduction du développement de l'athérosclérose.

Tel que présenté à la section 1.4.3, l'E2 possède plusieurs effets cardioprotecteurs empêchant le développement de la dysfonction endothéliale à l'origine de l'athérosclérose. Il favorise entre autre un meilleur profil lipidique en abaissant le taux de LDL circulants et inhibe l'oxydation de ces particules au niveau de l'intima par ses propriétés anti-oxydantes. Ensemble, ces effets ont pour conséquence de réduire le développement de la strie lipidique et donc, de la plaque athéroscléreuse. L'E2 augmente également la biodisponibilité en NO ce qui favorise une meilleure vasodilatation et empêche l'agrégation plaquettaire à l'origine d'un thrombus. De plus, les recherches antérieures de l'équipe du Dr. Jean-François Tanguay ont démontré qu'une livraison locale d'E2 réduisait la formation de resténose due à l'implantation d'une endoprothèse vasculaire en diminuant l'infiltration de cellules inflammatoires au site de lésion ¹⁸⁷. Ces recherches ont aussi permis d'identifier les mécanismes intracellulaires impliqués dans la guérison vasculaire par lesquels l'E2 maintient cette intégrité endothéliale ^{161, 162}. Nous avons également examiné la modulation par l'E2 de la niche fonctionnelle des cellules progénitrices endothéliales puisque ces cellules permettent la régénération de l'endothélium natif et inhibent l'hyperplasie néo-intimale. Les travaux de Lemieux et al. ont ainsi démontré l'influence du cycle menstruel sur le niveau et le degré de maturité des CEP ¹⁸¹. Ils ont également confirmé que l'E2 est un agent actif capable de moduler certains processus biologiques des CEP tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, l'adhésion cellulaire et la chimiotaxie; influençant ainsi l'organisation fonctionnelle de la niche de cellules progénitrices ²⁰⁵.

L'inflammation est considérée comme étant un mécanisme clé dans le développement de l'athérosclérose et la modulation de son activation par l'E2 au niveau des CE vasculaires est au cœur de ces travaux de maîtrise. Des études *in vivo* ont démontré que l'E2 à concentration physiologique réduisait la réponse inflammatoire en atténuant le

recrutement et l'adhésion des neutrophiles dans un modèle de blessure vasculaire et ce, en réduisant l'expression des molécules d'adhésion et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que la MCP-1 et l'IL-6²⁰⁷. De plus, *in vitro*, l'E2 chez les CE diminue l'expression et l'activation du CD40-CD40L¹⁸⁷ ainsi que l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1¹⁸⁵. Toutefois, la régulation du TLR2 par l'E2 n'a jamais été démontrée au niveau des CE vasculaires. Ainsi, dans un modèle de CE vasculaire de souris, les EOMA (pour *endothelial mouse cell derived from a hemangioendothelioma*), nous avons démontré la modulation de la réponse inflammatoire par l'E2 attribuable à la diminution de l'expression génique et de l'activité du TLR2 suite à un prétraitement œstrogénique à concentration physiologique. Nous avons également déterminé l'influence du prétraitement œstrogénique sur le profil de la réponse inflammatoire activée par ce récepteur en mesurant les potentiels endothéliaux de migration et d'adhésion. De plus, nous avons caractérisé les voies de signalisation impliquées en démontrant l'influence négative d'un prétraitement œstrogénique sur la phosphorylation des kinases activées par le TLR2; illustrant ainsi l'interaction entre l'E2 et la signalisation de ce récepteur.

3.1 Modulation de la réponse inflammatoire activée par le TLR2

3.1.1 L'activation pro-inflammatoire du TLR2

Les études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'activation endothéliale ainsi que celle du système immuno-inflammatoire contribuent toutes les deux au développement de la strie lipidique à l'origine de la dysfonction endothéliale. Toutefois, les éléments déclencheurs de l'inflammation responsable de cette activation ne sont pas encore entièrement connus mais il est généralement établi que l'augmentation de la migration et de l'adhésion des monocytes à l'endothélium sont en soi les premiers éléments impliqués dans le développement de la dysfonction endothéliale. Tel que démontré à la section 1.3.2, le TLR2 et le TLR4 participent à l'évolution de la dysfonction endothéliale en favorisant l'activation des cellules endothéliales. Ces récepteurs de la réponse immunitaire innée contribuent d'abord à la reconnaissance des pathogènes du non-soi et diminuent ainsi les risques d'infection. Par contre, ces récepteurs reconnaissent et s'activent également face à certains facteurs de risque athérosclérotiques endogènes. Ainsi, la production par les CE de cytokines pro-inflammatoires activées via le TLR2 ou le TLR4 entraîne la surexpression de molécules d'adhésion par ces cellules et favorise le recrutement des monocytes au site de lésion. Les monocytes sécrètent à leur tour plus de cytokines amplifiant ainsi l'activation inflammatoire des CE; d'où l'importance de contrôler l'activité de ces récepteurs. Depuis quelques années, le rôle pro-athérosclérotique du TLR4 au niveau endothélial et au niveau des monocytes a été démontré chez la souris et l'humain ²⁰⁸. Par contre, l'activation spécifique du TLR2, son implication dans l'athérosclérose et sa modulation sont moins bien définies *in vitro* chez les CE vasculaires et méritent selon nous une étude plus approfondie.

Nos résultats démontrent que l'activation du TLR2 par son agoniste, le LPS de *P. gingivalis*, induit une réponse inflammatoire chez les EOMA traduite par l'augmentation de l'expression génique et protéique du TLR2, par l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 ainsi que par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1.

Nos résultats concordent ainsi avec les études sur l'activation inflammatoire du LPS, démontrant qu'il augmente l'expression du TLR2, de ICAM-1 et de VCAM-1 dans les CE d'aorte humaines ainsi que dans la lignée monocyttaire THP-1, ^{82, 100, 209}. Par contre, il existe des différences entre la souris et l'humain dans l'expression et dans l'activation du TLR2. Les CE de souris expriment constitutivement le TLR2 à leur surface cellulaire comparativement aux CE humaines qui elles, doivent être d'abord pré-stimulées par des cytokines pro-inflammatoires telles que les TNF- α/β . Les CE de souris répondent ainsi plus rapidement et plus facilement aux agonistes du récepteur que les CE humaines ²¹⁰. Cette étude révèle également que les CE humaines provenant de veines (HUVEC pour *human umbilical vein endothelial cell*) ne répondent pas aux agonistes des TLR versus les CE d'artères. Ceci est en lien avec le fait que les artères sont plus susceptibles au développement de l'athérosclérose que les veines puisque les CE artérielles répondent à un plus large éventail de PAMP activant les TLR ²¹¹. Chez les EOMA, nous avons observé une expression basale du TLR2, tant au niveau génique que protéique, et cette expression augmente significativement après 4 h de stimulation au LPS. Elles répondent aisément au LPS et ainsi, sont un bon modèle dans l'étude de l'activation du TLR2.

3.1.2 L'influence de l'E2

L'influence négative de l'E2 sur l'activation des TLR, en particulier sur le TLR2 et le TLR4, a largement été démontrée dans les monocytes et les macrophages ^{212, 213}. Le même type d'influence a également été présenté dans d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales utérines ^{214, 215}. Ces études démontrent que le cycle menstruel régule l'expression épithéliale du TLR2; son expression diminue en phase *estrus*, là où la concentration d'E2 est la plus élevée et contrôle ainsi les risques d'infection. Toutefois, les résultats de notre étude sont les premiers, dans les CE vasculaires, à démontrer qu'un prétraitement œstrogénique de 1 h à concentration physiologique de 10^{-9} M diminue l'expression génique et l'activation du TLR2 induites par le LPS de *P. gingivalis*. Pour bien caractériser le type de mécanisme d'activation pouvant être utilisé par l'E2, soit la voie

classique génomique ou la voie rapide non-génomique, nous avons également testé un temps de prétraitement de 24 h. Nos résultats nous indiquent qu'il n'y a pas de différence entre les deux; l'expression génique du TLR2 diminue au même niveau peu importe le temps du prétraitement utilisé. Nous avons également démontré qu'un prétraitement œstrogénique de 1 h diminuait l'expression de ICAM-1 ainsi que la sécrétion de l'IL-6 induites par le LPS comparativement aux EOMA sans prétraitement. L'expression des molécules ICAM-1 et VCAM-1 ainsi que la sécrétion d'IL-6 n'ont pas été négativement affectées par le prétraitement de 24 h; confirmant ainsi l'implication de la voie rapide non-génomique dans l'influence anti-inflammatoire de l'E2.

À l'instar de son rôle anti-inflammatoire, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence les effets pro-inflammatoires de l'E2 au niveau vasculaire. Ces études ont démontré, chez des macrophages stimulés au LPS, l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de l'expression du TLR4 suite à une exposition chronique à l'E2 *in vivo*¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Elles ont également mis en évidence le rôle primordial de l'E2 endogène qui semble nécessaire à la bonne réponse immunitaire du cerveau en démontrant que les souris ovariectomisées répondent moins bien face à un traitement aux LPS et présentent plus de dommages neuronaux. Ces effets immuno-stimulateurs de l'E2 permettraient de faire le lien plus rapidement entre la réponse immunitaire innée avec celle adaptative, et expliquerait ainsi les différences dans les capacités de défense immunitaire entre les hommes et les femmes. Nous considérons que les hommes sont plus enclins aux infections et aux septicémies que les femmes et par conséquent, ont plus de risques d'hospitalisation, de sévérité et de mortalité dus à certaines maladies comme la grippe²¹⁶. Les femmes ont plus d'anticorps circulants que les hommes et ont une meilleure immunisation²¹⁷. Par contre, les femmes ont un taux beaucoup plus élevé que les hommes de maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux²¹⁸.

De plus, les études randomisées *in vivo* sur l'hormonothérapie ont également fait état de ce double effet de l'E2, à savoir anti-inflammatoire et pro-inflammatoire, selon la voie d'administration et également, selon la dose d'hormone utilisée. Ainsi, une

hormonothérapie par voie orale augmente le taux de marqueurs pro-inflammatoires comme la CRP alors qu'une livraison locale d'E2 réduit le développement de resténose en diminuant l'infiltration de cellules inflammatoires au site de lésion^{219, 220}. Selon la Nurse's Health study, une augmentation significative du nombre d'accidents vasculaires cérébraux a été mesurée chez les femmes soumises à des doses élevées d'hormonothérapie²²¹. Une faible dose d'E2, soit à concentration physiologique, serait plus protectrice au niveau vasculaire.

Notre étude n'a pas démontré d'effet pro-inflammatoire par un prétraitement œstrogénique de 24 h. L'hypothèse pourrait être qu'une exposition de 24 h *in vitro* des CE vasculaires ne soit pas assez longue pour induire les effets pro-inflammatoires et que ce prétraitement serait un temps transitoire entre les effets anti-inflammatoires de ceux pro-inflammatoires. Il faudrait ainsi explorer la possibilité de faire des temps de prétraitement plus long en combinaison avec le LPS pour vérifier cette hypothèse. Toutefois, il faut prendre en considération que les effets pro-inflammatoires vasculaires de l'E2 proviennent en général d'études sur les cellules du système immunitaire telles que les macrophages et les lymphocytes T et non sur les CE. Ainsi, les effets des œstrogènes sur la réponse inflammatoire peuvent être différents dépendamment de la cible visée et/ou du degré d'avancement de l'athérosclérose.

3.2 Influence de l'E2 sur le profil de la réponse inflammatoire

3.2.1 Le recrutement et la transmigration des monocytes

Tel que décrit à la section 1.3.2.1, les facteurs de risque cardiovasculaires activent le TLR2 des CE et augmentent ainsi la sécrétion de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6. Cette cytokine participe normalement dans la différenciation des neutrophiles, protège contre la mort dû à un choc toxique, favorise la résorption osseuse et peut agir comme facteur de croissance tumorale²²². Toutefois, l'IL-6 augmentent le recrutement des monocytes en circulation, qui à leur tour s'activent et sécrètent d'autres cytokines. Ceci entretient la réponse inflammatoire des CE qui expriment plus fortement les molécules d'adhésion responsables du roulement, de l'adhésion et de la transmigration des leucocytes. Nos résultats ont démontré que l'E2, en réduisant la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS, a la capacité de modifier le profil de la réponse inflammatoire activée via le TLR2. L'E2 est connu pour réduire l'expression génique de l'IL-6 des ostéoblastes, prévenant ainsi l'activation des ostéoclastes et la résorption osseuse^{223, 224}. En outre, la régulation négative de l'IL-6 par l'E2 affecte le profil de la réponse inflammatoire en modifiant le développement de l'immunité acquise puisque cette cytokine stimule la production d'anticorps par les lymphocytes B, régule la réponse des lymphocytes T face à l'infection et participe à la différenciation des macrophages⁴⁶. En diminuant la sécrétion d'IL-6 par les CE vasculaires, l'E2 peut également réduire le recrutement des monocytes au site de blessure.

Le roulement, l'adhésion et la transmigration des leucocytes sont des étapes clés du développement de la dysfonction endothéliale et ces processus, tels qu'expliqués à la section 1.1.2.3, sont finement régulés par l'expression coordonnée des molécules d'adhésion. Selon nos résultats de cytométrie de flux, l'expression basale des molécules ICAM-1 et VCAM-1 chez les EOMA est significativement augmentée après stimulation aux LPS. Alors que ICAM-1 est fortement induite après 24 h de stimulation, VCAM-1 est

exprimée de façon constitutive dans nos cellules et pourrait contribuer à expliquer pourquoi nous n'avons pas observé la diminution de son expression par le prétraitement œstrogénique comme avec ICAM-1. Toutefois, l'expression de ces molécules est maintenue jusqu'à 48h et corrèle ainsi avec leur cinétique d'expression établie dans d'autres types de CE vasculaires tels que les CE d'aorte de bœuf (BAEC)^{78, 225}. De plus, la littérature démontre, qu'après activation endothéliale, ICAM-1 est plus fortement induite que VCAM-1, qui reconnaît plutôt les intégrines exprimées par les leucocytes activés et agirait plus tardivement dans les processus d'adhésion et de transmigration⁸.

Ainsi, en régulant la sécrétion de cytokines et l'expression des molécules d'adhésion, l'E2 modifie le profil inflammatoire des CE en affectant le recrutement et l'adhésion des leucocytes. Pour répondre à nos objectifs, nous avons donc voulu démontrer si l'E2 pouvait moduler le profil inflammatoire du récepteur TLR2 chez les EOMA.

3.2.1.1 Essais fonctionnels de migration et d'adhésion

Pour réaliser cet objectif, nous avons procédé à des essais fonctionnels de migration et d'adhésion de cellules inflammatoires en utilisant des macrophages péritonéaux de souris. Ces cellules présentent un certain désavantage : elles sont déjà activées. Les monocytes sont les cellules normalement recrutées à l'endothélium et ce n'est qu'une fois à l'intérieur de l'intima qu'ils matureront en macrophages incorporant les oxLDL. Par contre, dans le but d'approfondir l'étude, nous voulions d'abord 1) démontrer l'influence de l'E2 sur le profil inflammatoire des CE activée par le TLR2, mais nous voulions également 2) définir l'influence de l'E2 endogène sur l'activation des macrophages. Tel qu'expliqué précédemment, il y a des différences importantes dans les capacités de défense immunitaire entre les sexes; les femmes étant plus sensibles à la réponse inflammatoire que les hommes. Ainsi, nous pouvons envisager que les macrophages de souris femelles auraient un potentiel d'adhésion et de migration plus important que ceux des souris mâles. C'est pourquoi nous avons ainsi utilisé ces cellules puisque, comparativement à une lignée commerciale de monocytes murins (habituellement les RAW 264), nous pouvions choisir le sexe des souris.

Tout d'abord, puisque la sécrétion d'IL-6 induite par le TLR2 chez les EOMA diminue par le prétraitement œstrogénique, notre hypothèse était que le même prétraitement réduirait le recrutement des macrophages à une monocouche de EOMA activées via le TLR2. Nous voulions également démontrer que les macrophages femelles s'adhèreraient en plus grand nombre comparativement aux mâles. La première étape des essais fonctionnels de migration a d'abord été la réalisation d'une courbe standard en utilisant la protéine recombinante MCP-1, connue pour être une chemokine impliquée dans le recrutement des monocytes et des macrophages. Nous avons accompli ce premier essai par système Transwell® de 5µm de porosité, ce qui est normalement conseillé avec ce type cellulaire. En plus des macrophages non-stimulés, nous avons stimulé des macrophages au LPS de *P. gingivalis* pendant 24 h. Via l'augmentation de nombreux récepteurs de la réponse inflammatoire dont ceux de la famille des CXCR (pour *CXC chemokine receptors*) reconnaissant les chemokines sécrétées par les CE, les macrophages stimulés au LPS seraient ainsi recrutés en plus grand nombre que ceux non-stimulés. Au microscope, ces macrophages étaient plus gros, plus étendus et présentaient des pseudopodes comparativement à leurs confrères non-stimulés. Le temps de migration a été de 5 h et les cellules ayant migré étaient ensuite colorées à l'hématoxyline/éosine.

Dans ce premier essai, aucune cellule n'a migré. Puisque nous utilisons des macrophages et non des monocytes, la porosité du système Transwell® pouvait en partie expliquer ces résultats. Nous avons refait le même essai mais avec un système de 8 µm de porosité sans toutefois obtenir une migration significative des cellules. Puisque les macrophages sont des cellules activées et qu'une fois stimulées au LPS, leurs caractéristiques inflammatoires changent, ils sont plus adhérents et prennent plus de temps à migrer qu'un monocyte. Des expérimentations futures pourront tester le même système mais avec un temps de migration plus long, soit d'au moins 12 à 18 heures.

Avec ces essais de migration, l'effet du prétraitement E2 sur la réponse inflammatoire des CE induite par le LPS pourra être déterminé. Un tel prétraitement pourrait influencer la migration des macrophages via d'autres cytokines que l'IL-6, telles

que la MCP-1, l'IL-1 β et le TNF- α qui peuvent être induites suite à une stimulation au LPS. La différence des potentiels de migration des macrophages non-stimulés versus ceux stimulés au LPS sera à évaluer puisque ces cellules ont des caractéristiques différentes via l'augmentation de nombreux récepteurs de la réponse inflammatoire.

Nous avons ensuite réalisé des essais d'adhésion de macrophages péritonéaux de souris mâles et femelles face à une monocouche d'EOMA. Nous voulions en premier lieu, démontrer la diminution de l'adhésion des macrophages par l'E2 puisque nous avons observé antérieurement la diminution de l'expression de la molécule ICAM-1 induite par le LPS suite à un prétraitement œstrogénique de 1 h. Ainsi, les premières conditions testées, soit des CE non-stimulées, stimulées au LPS pour 24 h, prétraitées 1 h avec l'E2 suivi d'une stimulation au LPS de 24 h, n'ont pas permis d'établir de différence dans l'adhésion des macrophages. Nous n'avons pas observé de différence dans l'adhésion des macrophages mâles versus ceux des femelles ni entre les macrophages non-stimulés et ceux stimulés au LPS. Pourtant, suite à une stimulation au LPS, les monocytes expriment plus fortement leur molécules d'adhésion telles que VLA-4 et Mac-1. Encore une fois, l'utilisation de macrophages comparativement aux monocytes pourrait expliquer le fort potentiel adhérent observé. Ceci ne permettant pas la détection de différences mais des expériences avec des temps d'adhésion plus court seraient nécessaires pour déterminer des différences dans le temps suite à une stimulation.

De tels essais d'adhésion auraient permis de définir la cinétique de roulement et d'adhésion des cellules inflammatoires lors d'une activation endothéliale par le TLR2 et d'y observer l'effet modulateur de l'E2. Nos résultats de cytométrie précédents ont démontré la diminution de l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 par l'E2, mais non de VCAM-1. Selon la littérature, ICAM-1 est impliquée dans l'adhésion ferme des monocytes aux CE favorisant leur transmigration à travers l'endothélium ²²⁶. VCAM-1 quant à elle, participerait d'avantage au recrutement des monocytes. Toutefois, cette molécule pourrait compenser l'absence d'expression de ICAM-1, et permettrait à son tour, l'adhésion ferme des monocytes ²²⁷. Ainsi, à l'aide d'anticorps, nous pourrions

spécifiquement inhiber leur expression et démontrer leur rôle exact dans l'adhésion des cellules inflammatoires.

3.3 L'interaction de l'E2 sur la signalisation du TLR2

3.3.1 Caractérisation de la signalisation impliquée

Pour mieux comprendre l'influence de l'œstrogène sur la réponse inflammatoire médiée par le TLR2, nous avons d'abord caractérisé les voies de signalisation pouvant être activées par ce récepteur. Tel qu'expliqué à la section 1.3.1.3, l'activation du TLR2 entraîne la phosphorylation des MAPK dont ERK1/2 ainsi que d'Akt via la PI3K. Ces kinases ont d'ailleurs été rapidement induites chez les EOMA après respectivement 5 et 30 minutes de stimulation par le LPS de *P. gingivalis*. Selon la littérature, la phosphorylation de ces kinases, suite à l'activation des TLR, donne lieu à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion ainsi que de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires via la translocation du facteur NFκB au noyau. L'activation spécifique du TLR2 par le peptidoglycan ou le LPS de *P. gingivalis* favorise la sécrétion d'IL-6 ainsi que l'expression d'ICAM-1 via la phosphorylation d'Akt^{44, 46}. D'autres études ont démontré la responsabilité de p-ERK1/2 dans l'induction des molécules ICAM-1, VCAM-1 et dans la sécrétion d'IL-8 dans les CE humaines stimulées par la bactérie *Eikenella corrodens* connue pour être impliquée dans la parodontopathie au même titre que *P. gingivalis*²²⁸. Ainsi, chez les EOMA, lorsque nous bloquons l'activation de ces kinases par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, soit le LY294002 pour Akt et le U0126 pour ERK1/2, la sécrétion d'IL-6 induite par le LPS diminue significativement lorsque comparée aux cellules n'ayant subi aucune inhibition; démontrant ainsi leur rôle dans la réponse inflammatoire activée via le TLR2. Toutefois, l'implication de ces kinases dans l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 induite par le LPS n'a pas été confirmée.

L'E2 seul active également ces kinases par la voie d'activation non-génomique dite rapide dépendante du ligand, telle qu'expliqué à la section 1.4.2.3.3. La phosphorylation de ERK1/2 par l'E2 augmente la prolifération des CE et par l'activation d'Akt, favorise la vasodilatation endothéliale par la sécrétion de NO. Cette molécule possède également des

propriétés anti-inflammatoires. En inhibant la dégradation du facteur I κ B α qui, en restant associé au facteur NF κ B empêche la translocation de ce dernier; le NO inhibe l'adhésion des leucocytes à l'endothélium en diminuant l'expression des molécules d'adhésion^{229, 230}. Il réduit également le recrutement des monocytes en diminuant la sécrétion de cytokines par les CE²³¹. De plus, la phosphorylation d'Akt et de ERK1/2 par l'E2 peut amener l'activation de facteurs de transcription habituellement induits par la voie génomique, illustrant ainsi l'interaction entre les deux types de voies d'activation¹⁴⁰. Dans la présente étude, l'E2 induit rapidement la phosphorylation d'Akt et de ERK1/2 chez les EOMA. Pour démontrer l'implication du NO dans les effets anti-inflammatoires de l'E2 au niveau des EOMA, nous avons inhibé la synthèse de NO par l'inhibiteur L-NAME (N^G-Nitro-L-arginine-methyl ester) spécifique à l'activité de toutes les NOS. Selon nos expérimentations, la sécrétion de NO n'est pas entièrement responsable des effets anti-inflammatoires observés par le prétraitement œstrogénique de 1 h puisque son inhibition par le L-NAME n'a pas rétabli complètement les niveaux d'IL-6 sécrétés après stimulation au LPS (figure 9). Ceci illustre que l'E2 influence également d'autres voies de signalisation régulant négativement l'activation du TLR2 telles que démontrées à la section 3.3.2. Toutefois, pour mieux comprendre les mécanismes de régulation utilisés par l'E2 sur la voie du TLR2, il serait intéressant de mesurer l'activité de la eNOS et la production de NO chez les EOMA avant et après le prétraitement œstrogénique.

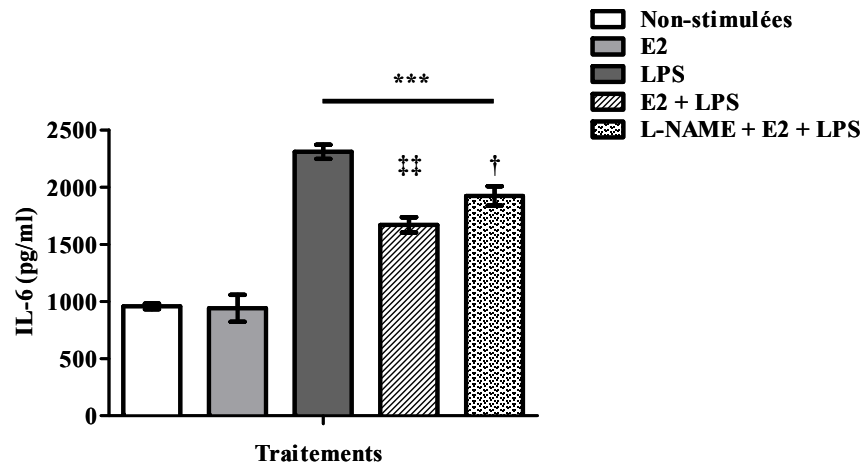


Figure 9. Implication du NO dans les effets anti-inflammatoires de l'E2. Les EOMA ont été stimulées 48 h avec l'E2 (10^{-9} M) seul ou avec le LPS (1000 ng/ml) précédé ou non d'un prétraitement œstrogénique de 1h (10^{-9} M). La synthèse de NO a d'abord été inhibée par un prétraitement au L-NAME (100 μ M) de 30 min suivi d'un prétraitement œstrogénique de 1 h (10^{-9} M) et d'une stimulation au LPS de 48 h. Après ces traitements, la sécrétion d'IL-6 a été mesurée par technique ELISA. (***) $p < 0.001$ vs non-stimulées), ($\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.001$ vs. LPS).

Nos résultats démontrent également que l'E2 influence négativement la phosphorylation d'Akt et de ERK1/2 induites par le LPS, qui diminuent suite au prétraitement œstrogénique de 1 h. Selon la littérature, l'influence rapide de l'E2 sur la signalisation intracellulaire permettrait de contrecarrer les altérations pathologiques telles que l'inflammation vasculaire²³². Pour bien définir l'implication de cette modulation au niveau des CE vasculaires, il serait intéressant d'inhiber ces kinases lors des essais fonctionnels de migration et d'adhésion. Selon les publications précédemment citées et nos résultats d'IL-6 obtenus, il est fort probable que l'inhibition spécifique d'Akt et de ERK1/2 diminuerait la migration et l'adhésion des macrophages.

3.3.2 Le rétrocontrôle négatif de la signalisation du TLR2

Tel que mentionné à la section 1.3.1.3, les cytokines, dont l'IL-6, sécrétées en grande quantité suite à l'activation du TLR2, amplifient à leur tour la réponse inflammatoire via leur liaison à leur récepteur respectif qui amène entre autre, l'activation des facteurs de transcription STATs via la voie des JAKs/STATS. Selon la littérature, l'activation spécifique du TLR2 par l'acide lipotéichoïque amène l'augmentation de la phosphorylation de Stat1 chez les macrophages ²³³, ce qui concorde avec nos résultats puisque nous avons démontré l'augmentation significative de la phosphorylation de Stat1 chez les EOMA après 24 et 48 heures de stimulation par le LPS de *P. gingivalis*.

Des études antérieures ont également révélé l'augmentation de la phosphorylation des protéines kinases Stat1 et Stat3 à la suite d'une blessure endothéliale au niveau artérielle chez des souris ²³⁴. Une observation importante a été que cette phosphorylation était moindre chez les femelles intactes comparativement aux mâles ou aux femelles ovariectomisées, suggérant le rôle de l'œstrogène dans la modulation de cette activation. Notre laboratoire a ainsi mis en évidence l'implication de l'E2 dans la diminution de la phosphorylation de Stat1 induite par l'IFN- γ et ce, chez les CE d'aorte de porc ¹⁸⁷. En lien avec cette étude, nous avons également observé qu'un prétraitement œstrogénique de 1 h diminuait la phosphorylation de Stat1 induite par 48 h de stimulation au LPS, démontrant ainsi son influence sur la signalisation du TLR2.

Toutefois, nous ne connaissons pas les mécanismes d'action de l'E2 dans l'atténuation de cette phosphorylation. Puisque l'E2 n'agit qu'après 48 h de stimulation au LPS, l'augmentation de l'expression des protéines SOCS pourrait être une des possibilités envisageables. L'expression de ces protéines, particulièrement SOCS3 induite par l'activation de Stat1 et de Stat3, est impliquée dans la régulation négative des TLR. Le rôle majeur de SOCS3 est d'inhiber la signalisation de l'IL-6 de diverses façons : par sa liaison aux protéines JAKs, en liant le récepteur de l'IL-6 (le gp130), en inhibant directement l'activité des JAKs ou en ciblant la dégradation protéosomale du complexe récepteur/JAKs

⁶³. Les études de Lemieux et al. ont démontré la surexpression génique de SOCS3 chez les CEP suite à un traitement œstrogénique ²⁰⁵. Nous pourrions évaluer si l'E2 augmente l'expression de SOCS3 chez les EOMA, expliquant la réduction des niveaux de phosphorylation de Stat1 observés suite à nos stimulations. La modulation de l'expression de SOCS3 par l'E2 est en soi une hypothèse forte intéressante puisque des études immunohistochimiques *in vivo* ont démontré la surexpression de cette protéine au niveau de la plaque athérosclérotique humaine ²³⁵. Cette surexpression de SOCS3 diminue l'expression de p-Stat1, de la MCP-1 et de ICAM-1, réduisant l'inflammation et le recrutement de monocytes à l'intima. Une autre possibilité expliquant la diminution de p-Stat1 est que la diminution de l'IL-6 par l'E2 soit attribuable à la réduction de p-Akt et de p-ERK1/2 et que conséquemment, les niveaux de phosphorylation de Stat1 diminuent puisqu'il y a moins d'activation des récepteurs gp130.

De plus, il existe une variété d'autres modulateurs négatifs de la signalisation du TLR2, tous présentés à la section 1.3.1.3, tableau II. Une étude a d'ailleurs démontré la présence du complexe TRAILR/TRAIL dans le placenta humain; système qui stabilise le facteur I κ B α et empêche la translocation de NF κ B ²³⁶. L'E2, dans un modèle de cellules provenant de cancer du sein, augmente l'expression du facteur A20/TNFAIP3, un inhibiteur de NF κ B normalement induit par le LPS chez les macrophages ²³⁷. Ainsi, l'E2 pourrait moduler, chez les CE vasculaires, l'activation du TLR2 de multiples façons.

A la lumière de ces résultats, des études futures évalueront la spécificité et l'implication de chaque récepteur aux œstrogènes dans l'induction et la modulation de la réponse inflammatoire afin de préciser les mécanismes d'interaction de l'E2 et de ses récepteurs sur la signalisation du TLR2.

3.3.3 La spécificité des récepteurs et leur implication

3.3.3.1 Le TLR2

Les LPS sont des PAMP provenant généralement de bactéries Gram négatif reconnus pour activer le TLR4 et non le TLR2. Certaines études ont par contre démontré que le LPS de *P. gingivalis* était spécifique au TLR2^{98, 238}. En inhibant l'activation du TLR2 par un anticorps spécifique, l'IL-6 induite par le LPS de *P. gingivalis* diminue sensiblement au même niveau que les EOMA non-stimulées, démontrant ainsi la spécificité de cet agoniste pour le TLR2 dans nos expérimentations. D'un autre côté, puisque certaines études ont conclu que ce même LPS pouvait activer *in vitro* le TLR4 des CE humaines et des macrophages de souris^{102, 239}, nous avons inhibé spécifiquement ce récepteur par l'antagoniste CLI-095. Suite à une stimulation au LPS de *P. gingivalis*, l'IL-6 sécrétée des EOMA ne diminue pas suite à l'inhibition du TLR4, suggérant ainsi qu'il n'est pas impliqué dans l'induction de la réponse inflammatoire.

La spécificité du TLR2 dans l'expression des molécules d'adhésion ainsi que celles de p-Akt, p-ERK1/2 et de p-Stat1 devront être démontrées et ce, pour mieux comprendre les mécanismes de signalisation de ce récepteur. Également, l'inhibition du TLR2 au niveau des essais fonctionnels de migration et d'adhésion des macrophages péritonéaux de souris permettront de comprendre de façon plus approfondie l'implication de ce récepteur et du LPS de *P. gingivalis* dans la réponse inflammatoire des CE. Selon les résultats d'IL-6 obtenus, nous croyons que l'inhibition du TLR2 aurait diminué l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 ainsi que celles de p-Akt, p-ERK1/2 et de p-Stat1, réduisant l'inflammation des EOMA ainsi que la migration et l'adhésion des macrophages.

3.3.3.2 Les récepteurs œstrogéniques

La signalisation de l'E2 responsable des réponses anti-inflammatoires n'est pas totalement comprise encore aujourd'hui. *In vivo*, dans un modèle de souris ApoE^{-/-}, le REα est considéré comme étant le récepteur principal impliqué dans la réduction de

l'athérosclérose²⁴⁰. Les études de Geraldès et al. ont également démontré la spécificité de chaque RE dans la modulation des kinases p38 et p-ERK1/2 au niveau des CE et des CMLV de porc¹⁶². Tel qu'expliqué à la section 1.4.3.3, l'E2 augmente l'activité de ces kinases chez les CE via le RE α et les réduit chez les CMLV via le RE β . Ainsi, pour mieux comprendre la modulation de la signalisation du TLR2 par l'E2, nous devons démontrer l'implication des RE dans la réduction de la réponse inflammatoire. Tout d'abord, nous avons analysé l'expression protéique des RE au niveau des EOMA puisque selon certaines études, l'E2 augmente l'expression du RE α chez les CE et diminue celle du RE β après 48h de stimulation²⁴¹. Cette double modulation serait responsable des différents effets de l'E2 observés au niveau vasculaire. Nos résultats confirment l'expression des deux types de récepteurs sans toutefois observer de modulation par l'E2 après 24 et 48h de stimulation. Par la suite, nous avons inhibé l'activation de chaque RE par l'ICI 182780, appelé également le fulvestrant. Cet antagoniste est un analogue de l'E2 qui n'a aucune activité agoniste. Son affinité de liaison est à 89% de celle de l'E2 et empêche ainsi sa liaison aux RE. Le fulvestrant inhibe également la dimérisation des RE, empêche leur translocation nucléaire et favorise leur dégradation sans toutefois affecter leur expression génique²⁴². Selon nos expérimentations, les RE ne sont pas responsables des effets anti-inflammatoires observés par le prétraitement œstrogénique de 1 h et il existe une voie RE-indépendant puisque leur inhibition par le fulvestrant n'a pas rétabli les niveaux d'IL-6 sécrétés après stimulation au LPS.

Il a été démontré que l'E2 pouvait agir directement et rapidement sur les canaux calciques, indépendamment des RE, permettant ainsi une entrée rapide de calcium via un mécanisme dépendant de la phospholipase C et de l'activation de la protéine kinase C^{143, 144}. Au niveau des CMLV, l'E2 peut stimuler la protéine kinase G dépendante de l'AMP cyclique, promouvant ainsi la sortie de potassium pour l'entrée de calcium¹³⁷. Toutefois, ces kinases sont normalement activées suite à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G ou d'un récepteur à résidus tyrosines kinases et, encore aujourd'hui nous ne connaissons pas l'identité de ce récepteur capable de lier l'E2. Par contre, certains groupes

de recherche ont démontré que même en absence de RE α , l'E2 pouvait médier l'expression de ses gènes illustrant ainsi la présence d'un autre type de récepteur pouvant lier cette hormone. Tel qu'expliqué à la section 1.4.2.1.2, le récepteur membranaire GPR30 couplé aux protéines G lie l'E2 et est responsable de ses effets rapides tels que la phosphorylation de ERK1/2. Nous avons ainsi démontré l'expression de ce récepteur chez les EOMA sans toutefois observer de modulation par l'E2. Éventuellement, il serait intéressant de démontrer l'implication de ce récepteur dans la modulation de la signalisation du TLR2 et ainsi mieux caractériser les mécanismes anti-inflammatoires utilisés par l'E2 chez les EOMA.

4. Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent pour la première fois l'influence *in vitro* de l'E2 sur la sensibilité des EOMA aux signaux pro-inflammatoires via son interaction envers le récepteur TLR2. Nous avons confirmé la réduction de l'expression génique et de l'activité du TLR2 par le prétraitement œstrogénique de 1h. Puisque nous n'avons pas observé d'effets anti-inflammatoires par le prétraitement œstrogénique de 24h, nos résultats suggèrent que l'E2 agit chez les EOMA via la voie non-génomique rapide dépendante du ligand. En influençant rapidement l'expression génique et la signalisation du TLR2, l'E2 contribue à diminuer l'activité de ce récepteur traduite par la sécrétion d'IL-6 et l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1. Nous avons également confirmé la spécificité du TLR2 dans l'induction de la réponse inflammatoire par le LPS de *Porphyromonas gingivalis*. Toutefois, nos résultats suggèrent la présence d'un mécanisme de signalisation rapide autre que via l'activation classique des RE α et RE β membranaires par l'E2, tel que le récepteur couplé aux protéines G soit le GPR30. Ces travaux apportent donc de nouvelles connaissances moléculaires et biochimiques de la régulation endothéliale du TLR2 et mettent en lumière les effets anti-inflammatoires et cardioprotecteurs rapides de l'E2.

Pour la suite de ces travaux, une démonstration de l'influence de l'E2 sur le profil inflammatoire du TLR2 pourra être approfondie. Les essais fonctionnels de migration et d'adhésion des cellules inflammatoires ainsi que l'implication de l'E2, du TLR2 et de sa signalisation permettront de mieux comprendre le rôle exact des œstrogènes au niveau vasculaire. À la suite de ces essais, l'exploration *in vivo* de la régulation œstrogénique du TLR2 pourrait être une avenue possible et ferait ainsi la lumière sur le rôle des œstrogènes dans la réduction du développement de la dysfonction endothéliale induite par le TLR2. De plus, la caractérisation des conséquences d'un prétraitement œstrogénique de 24 heures chez les EOMA, de l'implication du GPR30 ainsi que l'influence de l'E2 sur les mécanismes de rétrocontrôle négatif du TLR2 serviront à la compréhension des effets régulateurs des œstrogènes sur les processus de formation de l'athérosclérose.

5. Bibliographie

1. http://www.chelationhealthproducts.com/endothelium_heavy_toxic_metals.php
2. <http://webiologie.free.fr/animal/anatomie/vasculaire/vaisseaux.html>
3. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100:158-173.
4. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 2003;196:430-443.
5. Russo-Marie F. L'inflammation. Éditions John Libbey Eurotext. 1998, 565p.
6. Steeber DA, Tedder TF. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res.* 2000;22:299-317.
7. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand.* 2001;173:35-43.
8. Langer HF, Chavakis T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1211-1220.
9. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88:3259-3287.
10. Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:722-726.
11. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
12. Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:259-269.
13. Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Jr., Mensah GA, Lenfant C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation.* 2002;106:1602-1605.
14. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86:515-581.
15. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:299-309.
16. Morozova S, Suc-Royer I, Auwerx J. [Cholesterol metabolism modulators and the future of atherosclerosis therapy]. *Med Sci (Paris).* 2004;20:685-690.
17. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002;105:1541-1544.
18. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Komuro I. The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenesence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:141-148.
19. Meyer MR, Haas E, Barton M. Gender differences of cardiovascular disease: new perspectives for estrogen receptor signaling. *Hypertension.* 2006;47:1019-1026.
20. Frangos SG, Gahtan V, Sumpio B. Localization of atherosclerosis: role of hemodynamics. *Arch Surg.* 1999;134:1142-1149.

21. Glorian M, Limon I. L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. *RFL - Revue Francophone des Laboratoires*. 2007;37:43-48.
22. Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5:276-292.
23. Laufs U, Wassmann S, Czech T, Munzel T, Eisenhauer M, Bohm M, Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:809-814.
24. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84:489-497.
25. Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Dean RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. Formation of modified and oxidized particles. *Eur J Biochem*. 2003;270:3572-3582.
26. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3:853-876.
27. Ward JR, Wilson HL, Francis SE, Crossman DC, Sabroe I. Translational mini-review series on immunology of vascular disease: inflammation, infections and Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Clin Exp Immunol*. 2009;156:386-394.
28. Gibson FC, 3rd, Yumoto H, Takahashi Y, Chou HH, Genco CA. Innate immune signaling and Porphyromonas gingivalis-accelerated atherosclerosis. *J Dent Res*. 2006;85:106-121.
29. Nalbone G, Peiritti F, Canault M, Alessi M. Lipides peroxydés et réaction immuno-inflammatoire dans l'athérosclérose. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 2006;13:337-342.
30. Arnal JF, Gourdy P, Garmy-Susini B, Delmas E, Bayard F. [Usefulness of experimental models to understand the vascular effects of estrogens]. *Med Sci (Paris)*. 2003;19:1226-1232.
31. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:456S-460S.
32. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
33. Giuriato L, Scatena M, Chiavegato A, Zanellato AM, Guidolin D, Pauletto P, Sartore S. Localization and smooth muscle cell composition of atherosclerotic lesions in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:347-359.
34. Gourdy P, Bayard F, Arnal JF. Oestrogènes et risque cardiovasculaire. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2005;17:155-161.
35. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;104:365-372.
36. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:2131-2137.
37. Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51:148-157.

38. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996;86:973-983.
39. Hoffmann JA, Reichhart JM, Hetru C. Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:8-13.
40. McCurdy JD, Lin TJ, Marshall JS. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol*. 2001;70:977-984.
41. Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, Bahrn U, Kouro T, Akira S, Takatsu K, Kincade PW. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*. 2006;24:801-812.
42. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, Cohen IR, Zipori D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 2007;109:1422-1432.
43. Sawa Y, Tsuruga E, Iwasawa K, Ishikawa H, Yoshida S. Leukocyte adhesion molecule and chemokine production through lipoteichoic acid recognition by toll-like receptor 2 in cultured human lymphatic endothelium. *Cell Tissue Res*. 2008;333:237-252.
44. Harokopakis E, Albzreh MH, Martin MH, Hajishengallis G. TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac1- and PI3K-mediated inside-out signaling in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Immunol*. 2006;176:7645-7656.
45. Boehme KW, Compton T. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol*. 2004;78:7867-7873.
46. Chiu YC, Lin CY, Chen CP, Huang KC, Tong KM, Tzeng CY, Lee TS, Hsu HC, Tang CH. Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1- dependent pathway. *J Immunol*. 2009;183:2785-2792.
47. Blair P, Rex S, Vitseva O, Beaulieu L, Tanriverdi K, Chakrabarti S, Hayashi C, Genco CA, Iafrati M, Freedman JE. Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ Res*. 2009;104:346-354.
48. Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003;15:5-11.
49. Hajishengallis G, Wang M, Liang S. Induction of distinct TLR2-mediated proinflammatory and proadhesive signaling pathways in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J Immunol*. 2009;182:6690-6696.
50. Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51:188-197.
51. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 2000;164:5998-6004.
52. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301.

53. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11:373-384.
54. Arditi M, Zhou J, Torres M, Durden DL, Stins M, Kim KS. Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells. *J Immunol*. 1995;155:3994-4003.
55. Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:12-19.
56. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999;11:115-122.
57. Takeishi Y, Kubota I. Role of Toll-like receptor mediated signaling pathway in ischemic heart. *Front Biosci*. 2009;14:2553-2558.
58. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:823-835.
59. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:446-458.
60. O'Neill LA. TAMpering with toll-like receptor signaling. *Cell*. 2007;131:1039-1041.
61. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007;131:1124-1136.
62. O'Neill LA. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity*. 2008;29:12-20.
63. Wormald S, Hilton DJ. The negative regulatory roles of suppressor of cytokine signaling proteins in myeloid signaling pathways. *Curr Opin Hematol*. 2007;14:9-15.
64. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293:306-311.
65. Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL. Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit Care Med*. 2006;34:219-222.
66. Curtiss LK, Tobias PS. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S340-345.
67. Liu Y, Yu H, Zhang Y, Zhao Y. TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target. *Med Hypotheses*. 2008;70:314-316.
68. Erridge C. The roles of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18:52-56.
69. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*. 2000;71:1554-1560.
70. Rosenfeld ME, Blessing E, Lin TM, Moazed TC, Campbell LA, Kuo C. Chlamydia, inflammation, and atherogenesis. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 3:S492-497.

71. Tobias P, Curtiss LK. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Paying the price for pathogen protection: toll receptors in atherogenesis. *J Lipid Res.* 2005;46:404-411.
72. Erridge C, Spickett CM. Oxidised phospholipid regulation of Toll-like receptor signalling. *Redox Rep.* 2007;12:76-80.
73. Pasini AF, Anselmi M, Garbin U, Franchi E, Stranieri C, Nava MC, Boccioletti V, Vassanelli C, Cominacini L. Enhanced levels of oxidized low-density lipoprotein prime monocytes to cytokine overproduction via upregulation of CD14 and toll-like receptor 4 in unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1991-1997.
74. Boullier A, Friedman P, Harkewicz R, Hartvigsen K, Green SR, Almazan F, Dennis EA, Steinberg D, Witztum JL, Quehenberger O. Phosphocholine as a pattern recognition ligand for CD36. *J Lipid Res.* 2005;46:969-976.
75. Walton KA, Cole AL, Yeh M, Subbanagounder G, Krutzik SR, Modlin RL, Lucas RM, Nakai J, Smart EJ, Vora DK, Berliner JA. Specific phospholipid oxidation products inhibit ligand activation of toll-like receptors 4 and 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1197-1203.
76. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126.
77. Landsman D, Bustin M. A signature for the HMG-1 box DNA-binding proteins. *Bioessays.* 1993;15:539-546.
78. van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis.* 2008;11:91-99.
79. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:279-289.
80. Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa AK, Farber JM, Segal DM, Oppenheim JJ, Kwak LW. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science.* 2002;298:1025-1029.
81. Gibson FC, 3rd, Ukai T, Genco CA. Engagement of specific innate immune signaling pathways during *Porphyromonas gingivalis* induced chronic inflammation and atherosclerosis. *Front Biosci.* 2008;13:2041-2059.
82. Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson FC, 3rd, Genco CA. Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cell Microbiol.* 2006;8:738-757.
83. Norata GD, Garlaschelli K, Ongari M, Raselli S, Grigore L, Benvenuto F, Maggi FM, Catapano AL. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J Intern Med.* 2005;258:21-27.
84. Ward JR, Francis SE, Marsden L, Suddason T, Lord GM, Dower SK, Crossman DC, Sabroe I. A central role for monocytes in Toll-like receptor-mediated activation of the vasculature. *Immunology.* 2009;128:58-68.

85. Qi M, Miyakawa H, Kuramitsu HK. Porphyromonas gingivalis induces murine macrophage foam cell formation. *Microb Pathog.* 2003;35:259-267.
86. Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 2007;75:753-759.
87. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res.* 2001;89:244-250.
88. Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin Chim Acta.* 2007;375:36-42.
89. Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, Foxwell BM, Davies AH, Feldmann M. Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation.* 2009;120:2462-2469.
90. Aslam R, Speck ER, Kim M, Crow AR, Bang KW, Nestel FP, Ni H, Lazarus AH, Freedman J, Semple JW. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood.* 2006;107:637-641.
91. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13:463-469.
92. Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 2004;25:489-495.
93. Blann AD, Nadar SK, Lip GY. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2003;24:2166-2179.
94. Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, 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;93:1266-1274.
95. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest.* 1994;93:1172-1178.
96. Curtiss LK, Tobias PS. The toll of Toll-like receptors, especially toll-like receptor 2, on murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 2007;8:1230-1238.
97. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* 2001;69:1477-1482.
98. Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to Porphyromonas gingivalis: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *J Immunol.* 2006;177:8296-8300.

99. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol.* 2000;165:5780-5787.
100. Zhang D, Chen L, Li S, Gu Z, Yan J. Lipopolysaccharide (LPS) of Porphyromonas gingivalis induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of Escherichia coli LPS. *Innate Immunity.* 2008;14:99-107.
101. Satta N, Kruithof EK, Reber G, de Moerloose P. Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. *Mol Immunol.* 2008;46:145-157.
102. Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to P. gingivalis lipopolysaccharide. *J Dent Res.* 2009;88:741-745.
103. Duzendorfer S, Lee HK, Tobias PS. Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity. *Circ Res.* 2004;95:684-691.
104. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105:1158-1161.
105. Shinohara M, Hirata K, Yamashita T, Takaya T, Sasaki N, Shiraki R, Ueyama T, Emoto N, Inoue N, Yokoyama M, Kawashima S. Local overexpression of toll-like receptors at the vessel wall induces atherosclerotic lesion formation: synergism of TLR2 and TLR4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2384-2391.
106. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest.* 2005;115:3149-3156.
107. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:10679-10684.
108. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, Hawn TR, Raines EW, Schwartz MW. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res.* 2007;100:1589-1596.
109. Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC, 3rd, Genco CA. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis.* 2008;196:146-154.
110. Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA, 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med.* 2008;205:373-383.
111. Madan M, Amar S. Toll-like receptor-2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings. *PLoS One.* 2008;3:e3204.
112. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 2002;346:340-352.
113. Czubyrt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B. The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84:93-109.

114. Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond)*. 2006;111:107-118.
115. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:335-376.
116. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-292.
117. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*. 2008;6:e003.
118. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 1997;45:607-617.
119. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF, Jr., George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998;47:310-313.
120. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1649-1660.
121. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;308:32-38.
122. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004;279:27008-27016.
123. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146:624-632.
124. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307:1625-1630.
125. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82:4258-4265.
126. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol*. 1998;156:R1-7.
127. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function. *Cardiovasc Res*. 2002;53:709-719.
128. Bird MD, Karavitis J, Kovacs EJ. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. *Cell Immunol*. 2008;252:57-67.

129. Prossnitz ER, Barton M. Signaling, physiological functions and clinical relevance of the G protein-coupled estrogen receptor GPER. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2009;89:89-97.
130. Hazell GG, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AM, Lolait SJ. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol.* 2009;202:223-236.
131. Haas E, Meyer MR, Schurr U, Bhattacharya I, Minotti R, Nguyen HH, Heigl A, Lachat M, Genoni M, Barton M. Differential effects of 17beta-estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension.* 2007;49:1358-1363.
132. Mendelsohn ME. Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol.* 2002;90:3F-6F.
133. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001;276:36869-36872.
134. Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology.* 1996;137:1735-1744.
135. Kim KH, Bender JR. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308:3-8.
136. Fu XD, Cui YH, Lin GP, Wang TH. Non-genomic effects of 17beta-estradiol in activation of the ERK1/ERK2 pathway induces cell proliferation through upregulation of cyclin D1 expression in bovine artery endothelial cells. *Gynecol Endocrinol.* 2007;23:131-137.
137. Leung SW, Teoh H, Keung W, Man RY. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:822-826.
138. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol.* 2008;70:165-190.
139. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19:833-842.
140. Dos Santos EG, Dieudonne MN, Pecquery R, Le Moal V, Giudicelli Y, Lacasa D. Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology.* 2002;143:930-940.
141. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 1995;270:1491-1494.

142. Meyer MR, Haas E, Prossnitz ER, Barton M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;308:9-16.
143. 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):71-77.
144. Arjmandi BH, Salih MA, Herbert DC, Sims SH, Kalu DN. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. *Bone Miner.* 1993;21:63-74.
145. Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J.* 1986;111:383-390.
146. Barrett-Connor E, Stuenkel C. Hormones and heart disease in women: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study in perspective. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:1848-1853.
147. Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA.* 1991;265:1861-1867.
148. Freudenberger T, Oppermann M, Heim HK, Mayer P, Kojda G, Schror K, Fischer JW. Proatherogenic effects of estradiol in a model of accelerated atherosclerosis in ovariectomized ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol;*105:479-486.
149. Klouche M. Estrogens in human vascular diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1089:431-443.
150. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340:1801-1811.
151. Hodgin JB, Maeda N. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology.* 2002;143:4495-4501.
152. Keaney JF, Jr., Shwaery GT, Xu A, Nicolosi RJ, Loscalzo J, Foxall TL, Vita JA. 17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. *Circulation.* 1994;89:2251-2259.
153. Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation.* 1997;95:1378-1385.
154. Arnal JF, Clamens S, Pechet C, Negre-Salvayre A, Allera C, Girolami JP, Salvayre R, Bayard F. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4108-4113.
155. Cheng DY, Feng CJ, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Effects of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in female rat aorta. *Life Sci.* 1994;55:PL187-191.
156. Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. *Circulation.* 1994;90:1964-1968.

157. Binko J, Majewski H. 17 beta-Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS. *Am J Physiol*. 1998;274:H853-859.
158. Mendelsohn ME. Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res*. 2000;87:956-960.
159. Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*. 2003;278:2118-2123.
160. Elhage R, Bayard F, Richard V, Holvoet P, Duverger N, Fievet C, Arnal JF. Prevention of fatty streak formation of 17beta-estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1997;96:3048-3052.
161. 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.
162. Geraldes 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.
163. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation*. 1997;95:1505-1514.
164. Razandi M, Pedram A, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1434-1447.
165. Chandrasekar B, Sirois MG, Geoffroy P, Lauzier D, Nattel S, Tanguay JF. Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost*. 2005;94:1042-1047.
166. 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.
167. Chen SJ, Li H, Durand J, Oparil S, Chen YF. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation*. 1996;93:577-584.
168. 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.
169. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, Abizaid AS, Staico R, Feres F, Mattos LA, Sousa AG, Moses J, Kipshidize N, Roubin GS, Mehran R, New G, Leon MB, Sousa JE. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1118-1121.

170. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108:457-463.
171. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*. 2003;108:2710-2715.
172. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1185-1189.
173. Hristov M, Zernecke A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost*. 2007;98:274-277.
174. Xu Q. Progenitor cells in vascular repair. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:534-539.
175. Chironi G, Walch L, Pernollet MG, Garipey J, Levenson J, Rendu F, Simon A. Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007;191:115-120.
176. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003;107:3059-3065.
177. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, Hanley A, Kearney M, Aikawa R, Isner JM, Asahara T, Losordo DW. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003;108:3115-3121.
178. Hamada H, Kim MK, Iwakura A, Ii M, Thorne T, Qin G, Asai J, Tsutsumi Y, Sekiguchi H, Silver M, Wecker A, Bord E, Zhu Y, Kishore R, Losordo DW. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:2261-2270.
179. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006;113:1605-1614.
180. Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cell senescence--is there a role for estrogen? *Ther Adv Cardiovasc Dis*. 2010;4:55-69.
181. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection? *Int J Cardiol*. 2009;136:200-210.
182. Fadini GP, de Kreutzenberg S, Albiero M, Coracina A, Pagnin E, Baesso I, Cignarella A, Bolego C, Plebani M, Nardelli GB, Sartore S, Agostini C, Avogaro A.

- Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:997-1004.
183. Medina KL, Garrett KP, Thompson LF, Rossi MI, Payne KJ, Kincade PW. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol.* 2001;2:718-724.
 184. Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:289-295.
 185. 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.
 186. Gao H, Liang M, Bergdahl A, Hamren A, Lindholm MW, Dahlman-Wright K, Nilsson BO. Estrogen attenuates vascular expression of inflammation associated genes and adhesion of monocytes to endothelial cells. *Inflamm Res.* 2006;55:349-353.
 187. Geraldes P, Gagnon S, Hadjadj S, Merhi Y, Sirois MG, Cloutier I, Tanguay JF. Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ERalpha-mediated pathway. *Cardiovasc Res.* 2006;71:566-573.
 188. Nilsson BO. Modulation of the inflammatory response by estrogens with focus on the endothelium and its interactions with leukocytes. *Inflamm Res.* 2007;56:269-273.
 189. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev.* 2007;28:521-574.
 190. 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.
 191. Demyanets S, Pfaffenberger S, Kaun C, Rega G, Speidl WS, Kastl SP, Weiss TW, Hohensinner PJ, Dietrich W, Tschugguel W, Bochkov VN, Awad EM, Maurer G, Huber K, Wojta J. The estrogen metabolite 17beta-dihydroequilenin counteracts interleukin-1alpha induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells in vitro via NF-kappaB pathway. *Thromb Haemost.* 2006;95:107-116.
 192. Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA. Estradiol suppresses NF-kappaB activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages. *J Immunol.* 2010;184:5029-5037.
 193. Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MD. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol.* 1997;38:46-54.
 194. Arnal JF, Laurell H, Fontaine C, Billon A, Calippe B, Lenfant F, Gourdy P. Estrogen receptor actions on vascular biology and inflammation: implications in vascular pathophysiology. *Climacteric.* 2009;12 Suppl 1:12-17.
 195. Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V, Pipy B, Guery JC, Bayard F, Arnal JF, Gourdy P. Chronic estradiol administration in vivo

- promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol.* 2008;180:7980-7988.
196. Calippe B, Douin-Echinard V, Delpy L, Laffargue M, Lelu K, Krust A, Pipy B, Bayard F, Arnal JF, Guery JC, Gourdy P. 17 β -Estradiol Promotes TLR4-Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor α Signaling in Macrophages In Vivo. *J Immunol.* 2010;185:1169-1176.
 197. Soucy G, Boivin G, Labrie F, Rivest S. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *J Immunol.* 2005;174:6391-6398.
 198. Rettew JA, Huet YM, Marriott I. Estrogens augment cell surface TLR4 expression on murine macrophages and regulate sepsis susceptibility in vivo. *Endocrinology.* 2009;150:3877-3884.
 199. Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor α expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33:512-521.
 200. Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, Leite-de-Moraes M, Dy M, Arnal JF, Bayard F, Herbelin A. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN- γ production by invariant natural killer T cells. *Blood.* 2005;105:2415-2420.
 201. Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996;335:453-461.
 202. 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.
 203. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, Writing Group for the Women's Health Initiative I. 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.
 204. Gourdy P, Calippe B, Laurell H, Tremollieres F, Douin-Echinard V, Lenfant F, Bayard F, Guery JC, Arnal JF. Role of inflammatory cytokines in the effect of estradiol on atheroma. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35:396-401.
 205. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Estrogen-induced gene expression in bone marrow c-kit⁺ stem cells and stromal cells: identification of specific biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche. *Stem Cells Dev.* 2008;17:1153-1163.
 206. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, Griffin GE, Ferrara P, Schiffrin EJ, Morgan BP, Labeta MO. Soluble forms of Toll-

- like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol.* 2003;171:6680-6689.
207. Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S. Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation.* 2004;110:1664-1669.
 208. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001;104:3103-3108.
 209. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol.* 2001;166:2018-2024.
 210. Shuang C, Wong MH, Schulte DJ, Arditi M, Michelsen KS. Differential expression of Toll-like receptor 2 (TLR2) and responses to TLR2 ligands between human and murine vascular endothelial cells. *J Endotoxin Res.* 2007;13:281-296.
 211. Erridge C, Burdess A, Jackson AJ, Murray C, Riggio M, Lappin D, Milligan S, Spickett CM, Webb DJ. Vascular cell responsiveness to Toll-like receptor ligands in carotid atheroma. *Eur J Clin Invest.* 2008;38:713-720.
 212. Ghisletti S, Meda C, Maggi A, Vegeto E. 17beta-estradiol inhibits inflammatory gene expression by controlling NF-kappaB intracellular localization. *Mol Cell Biol.* 2005;25:2957-2968.
 213. Vegeto E, Ghisletti S, Meda C, Etteri S, Belcredito S, Maggi A. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17beta-estradiol in macrophage cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;91:59-66.
 214. Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Takemura Y, Koga K, Yoshino O, Tajima T, Hasegawa A, Yano T, Taketani Y. Expression of toll-like receptors 2, 3, 4, and 9 genes in the human endometrium during the menstrual cycle. *J Reprod Immunol.* 2007;74:53-60.
 215. Yao XD, Fernandez S, Kelly MM, Kaushic C, Rosenthal KL. Expression of Toll-like receptors in murine vaginal epithelium is affected by the estrous cycle and stromal cells. *J Reprod Immunol.* 2007;75:106-119.
 216. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol.* 2004;113:224-230.
 217. Marriott I, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms. *Immunol Res.* 2006;34:177-192.
 218. Aulock SV, Deininger S, Draing C, Gueinzius K, Dehus O, Hermann C. Gender difference in cytokine secretion on immune stimulation with LPS and LTA. *J Interferon Cytokine Res.* 2006;26:887-892.
 219. Tanguay JF. Vascular healing after stenting: the role of 17-beta-estradiol in improving re-endothelialization and reducing restenosis. *Can J Cardiol.* 2005;21:1025-1030.

220. 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.
221. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med.* 1991;325:756-762.
222. Barton BE. The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev.* 1996;16:87-109.
223. Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagas SC. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinology.* 1993;133:822-828.
224. Stein B, Yang MX. Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol.* 1995;15:4971-4979.
225. Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Yee E, Rosa M, Osborn L, Chi-Rosso G, Newman B, Lobb R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood.* 1990;76:965-970.
226. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, 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;156:2558-2565.
227. Van Kampen C, Mallard BA. Regulation of bovine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) on cultured aortic endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;79:129-138.
228. Yumoto H, Yamada M, Shinohara C, Nakae H, Takahashi K, Azakami H, Ebisu S, Matsuo T. Soluble products from *Eikenella corrodens* induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22:36-45.
229. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9114-9119.
230. Spiecker M, Peng HB, Liao JK. Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of IkappaBalpha. *J Biol Chem.* 1997;272:30969-30974.
231. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995;96:60-68.
232. Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK, Genazzani AR. Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids.* 2002;67:935-939.

233. Liljeroos M, Vuolteenaho R, Rounioja S, Henriques-Normark B, Hallman M, Ojaniemi M. Bacterial ligand of TLR2 signals Stat activation via induction of IRF1/2 and interferon-alpha production. *Cell Signal*. 2008;20:1873-1881.
234. Liu HW, Iwai M, Takeda-Matsubara Y, Wu L, Li JM, Okumura M, Cui TX, Horiuchi M. Effect of estrogen and AT1 receptor blocker on neointima formation. *Hypertension*. 2002;40:451-457; discussion 448-450.
235. Ortiz-Munoz G, Martin-Ventura JL, Hernandez-Vargas P, Mallavia B, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Munoz-Garcia B, Fernandez-Vizarra P, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:525-531.
236. Chen L, Liu X, Zhu Y, Cao Y, Sun L, Jin B. Localization and variation of TRAIL and its receptors in human placenta during gestation. *Life Sci*. 2004;74:1479-1486.
237. Vendrell JA, Ghayad S, Ben-Larbi S, Dumontet C, Mechti N, Cohen PA. A20/TNFAIP3, a new estrogen-regulated gene that confers tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene*. 2007;26:4656-4667.
238. Triantafilou M, Gamper FG, Lepper PM, Mouratis MA, Schumann C, Harokopakis E, Schifferle RE, Hajishengallis G, Triantafilou K. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol*. 2007;9:2030-2039.
239. Kumada H, Haishima Y, Watanabe K, Hasegawa C, Tsuchiya T, Tanamoto K, Umemoto T. Biological properties of the native and synthetic lipid A of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:60-69.
240. 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.
241. 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.
242. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*. 2004;90 Suppl 1:S2-6.