

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

La durée d'une privation estrogénique induite par chirurgie avant
réintroduction hormonale influe sur la fonctionnalité des récepteurs
estrogéniques carotidiens de la souris

Par

Stéphanie Gagnon

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître es Science (M.Sc.)

En sciences biomédicales

Août 2007

© Stéphanie Gagnon



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

La durée d'une privation estrogénique induite par chirurgie avant
réintroduction hormonale influe sur la fonctionnalité des récepteurs
estrogéniques carotidiens de la souris

Présenté par

Stéphanie Gagnon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jocelyn Dupuis

Président-rapporteur

Dr Jean-François Tanguay

Directeur de recherche

Dre Céline Fiset

Membre du jury

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier le Dr Jean-François Tanguay de m'avoir permis de faire partie de son équipe. Ces quelques années passées au sein de votre laboratoire m'auront permis d'acquérir de nombreuses connaissances théoriques et pratiques en cardiologie, mais m'auront aussi permis de grandir sur le plan personnel.

Merci au Dr Jocelyn Dupuis et au Dre Céline Fiset de prendre sur leur temps pour corriger ce mémoire.

Merci au Dre Isabelle Cloutier pour son soutien et ses nombreux conseils relatifs à mon projet et à la rédaction de mon mémoire et article scientifique.

Merci particulier à Caroline Lemieux, l'image même de ce qui définit passion et science. Merci de m'avoir encouragée, donné de nombreux conseils et réfléchi avec moi tout au long de ce parcours. Je te souhaite de belles années en recherche.

Un énorme merci à Sandra Gilligan, Pascale Geoffroy et Julie Lebel qui m'ont beaucoup aidé avec les manipulations techniques. Sans vous, il m'aurait été impossible de considérer ce projet, ni même de le terminer.

J'aimerais aussi remercier Vikie Lamontagne, ma stagiaire d'été, qui m'a procuré son aide et qui m'a aussi permis de m'accomplir d'une autre façon, soit celle d'apprendre à former les autres.

De même, j'aimerais remercier les autres membres du laboratoire. Un merci particulier à Pedro Geraldès, qui a été mon mentor et m'a donné le goût de faire une maîtrise. Merci aussi à Souhad el Akoum, Kim Tardif, Marie-Hélène Clavet et Dominique Lauzier pour leur présence et la mise en place de l'agréable atmosphère qui régnait au laboratoire.

Enfin, j'aimerais remercier Marc Jolicoeur pour son écoute, ses encouragements et ses suggestions lors de la rédaction de mon mémoire.

Le savant n'est pas
l'homme qui fournit
les vraies réponses;
c'est celui qui pose les
vraies questions.

Claude Lévi-Strauss

RÉSUMÉ

Plusieurs études randomisées sur l'hormonothérapie de remplacement (HTR) n'ont pas confirmé les effets bénéfiques des estrogènes sur la réduction des maladies cardiovasculaires. Dans ces études, les femmes étaient ménopausées depuis en moyenne 10 ans, un paramètre ayant pu influencer l'expression et les voies de signalisation des récepteurs estrogéniques (RE). Afin d'évaluer l'impact d'une privation estrogénique sur la voie des RE, des souris ont été euthanasiées 3, 7,5 et 15 semaines après l'ovariectomie. L'expression du RE α dans les carotides a augmenté de 114% trois semaines suivant l'ovariectomie, puis a diminué progressivement de 72% jusqu'à 15 semaines. Par la suite, l'impact d'un traitement estrogénique suite à une privation hormonale a été évalué chez des souris ovariectomisées depuis 3 et 15 semaines, soumises à une injection ou une HTR au 17-bêta-estradiol (17 β E). De façon intéressante, l'activité des MAPK p42/44 a varié selon les modes et temps de traitement. Une dose de 17 β E injectée 3 semaines après l'ovariectomie, mais non après 15 semaines, a permis une augmentation de l'activité kinase de 393% comparativement au contrôle. À l'inverse, une HTR soutenue pendant 28 jours n'a pas influencé l'activité kinase des souris ovariectomisées de 3 semaines alors qu'elle en a permis l'augmentation de 574% chez celles de 15 semaines. L'expression post-traitement du RE α et des MAPK p42/44 n'a pu expliquer les variations de l'activité kinase. Cette étude démontre que l'expression du RE α et la voie des MAPK p42/44 sont modifiées de façon temps-dépendent après la ménopause induite chirurgicalement. Ces altérations pourraient expliquer l'absence d'effet cardioprotecteur des estrogènes des études cliniques randomisées.

Mots-clé : Ménopause, Traitements estrogéniques, Activité signalétique

ABSTRACT

Numerous experimental evidences and observational studies have suggested cardioprotective effects of estrogens. However, randomized controlled trials studying hormone replacement therapy (HRT) in menopausal women failed to show clinical benefits. This apparent contradiction could be at least partially explained by the average 10-years menopause-to-HRT treatment delay in women enrolled in these studies. Long-term estrogen deprivation could have a deleterious impact on estrogen receptors (ER) expression and signaling pathways. In the current study, we tested the influence of estrogen depletion on ER protein expression of 3, 7.5 and 15 weeks C57BL/6 ovariectomized mice. Then, we investigated MAPK p42/44 signaling pathway and ER expression on three and fifteen weeks ovariectomized mice after either a 17-beta-estradiol ($17\beta\text{E}$) injection or HRT. Analyses of carotid tissues demonstrated a 114% increase of ER α expression shortly after estrogen deprivation, followed by a linear decrease of 72% over time. Interestingly, MAPK p42/44 activity varied according to treatment modes and length. MAPK p42/44 activity was upregulated by 393% after a $17\beta\text{E}$ injection 36h prior to euthanasia in mice ovariectomized for three weeks, an increment that was no longer detectable in mice treated 15 weeks after ovariectomy. However, in the later group, an HRT of 28 days was found to improve MAPK p42/44 pathway activation by 574% when compared to vehicle. The post-treatment expression of MAPK p42/44 or ER α alone could not explain the increases of MAPK p42/44 activity. These findings suggest that a long-term estrogen deprivation prior to HRT may explain the absence of cardioprotective benefits observed in the randomized clinical trials.

Keywords: Menopause, Estrogen treatments, Signaling activity

TABLE DES MATIÈRES

1.0	INTRODUCTION	1
1.1	La maladie cardiaque athérosclérotique	2
1.1.1	Définition générale	2
1.1.2	Mortalité	2
1.1.3	Facteurs de risque	3
1.2	L'athérosclérose	5
1.2.1	Définition	5
1.2.2	Structure de l'artère.....	6
1.2.3	Formation de l'athérosclérose	8
1.2.3.1	<i>Dysfonction endothéliale</i>	8
1.2.3.2	<i>Formation de la strie lipidique</i>	11
1.2.3.3	<i>Progression de la plaque</i>	12
1.2.3.4	<i>Rupture de la plaque</i>	13
1.3	Avenue de prévention possible : les estrogènes.....	15
1.3.1	L'estrogène	15
1.3.1.1	<i>Synthèse de l'estrogène</i>	16
1.3.1.2	<i>Effets physiologiques des estrogènes</i>	18
1.3.2	Les récepteurs aux estrogènes	19
1.3.2.1	<i>Localisation cellulaire</i>	19
1.3.2.2	<i>Structure du gène</i>	20
1.3.2.3	<i>Structure protéique des récepteurs</i>	22
1.3.2.4	<i>Modifications des récepteurs</i>	23
1.3.3	Mécanisme d'activation des récepteurs aux estrogènes	24
1.3.4	Voies signalétiques régulant l'expression et l'activité des récepteurs aux estrogènes.....	25
1.3.4.1	<i>Voies de signalisation des MAPK</i>	27
1.3.5	Effets des estrogènes.....	30
1.3.5.1	<i>Effets in vitro</i>	30
1.3.5.2	<i>Effets in vivo</i>	31
1.3.5.3	<i>Études cliniques</i>	33
1.4	But du travail de recherche.....	44
2.0	ARTICLE SCIENTIFIQUE	46
2.1	Abstract	49

2.2	Introduction	50
2.3	Material and Methods	53
2.4	Results	57
2.5	Discussion	61
2.6	Acknowledgments	66
2.7	Grants	67
2.8	Disclosures	68
2.9	References	69
2.10	Figure Legends	74
2.11	Figures	77
2.12	Table	83
3.0	DISCUSSION	84
3.1	Altérations physiologiques suite à une privation estrogénique	87
3.1.1	Prise de poids	87
3.1.2	Atrophie de l'utérus	89
3.1.3	Redistribution du tissu adipeux	89
3.1.4	Activité des récepteurs aux estrogènes	90
3.1.5	Méthylation des récepteurs aux estrogènes	92
3.1.6	Implication des autres voies de signalisation	93
3.2	Développements futurs de l'hormonothérapie de remplacement	95
3.2.1	Dosages et voies d'administration de l'estrogène	95
3.2.1.1	<i>Dosages</i>	95
3.2.1.2	<i>Voies d'administration</i>	97
3.2.2	Effets potentiels de la progestérone	98
3.2.2.1	<i>Études cliniques et in vivo</i>	98
3.2.2.2	<i>Effets in vitro</i>	100
3.3	Conclusion	103
4.0	BIBLIOGRAPHIE	104

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'une artère. L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et est responsable du maintien de l'homéostasie vasculaire. La média est formée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire permettant la contraction/relaxation de l'artère. L'adventice, formant la couche externe, est composée de terminaisons nerveuses et est responsable de la nutrition de la média par ses 'vasa vasorum'.

Figure 2 : Évolution de la plaque athérosclérotique. (A) Première étape de la formation de l'athérosclérose: adhésion et migration des leucocytes. **(B)** Formation de la strie lipidique représentant le premier stade d'athérosclérose. **(C)** Progression de la plaque: migration des cellules musculaires lisses et formation du corps nécrotique. **(D)** Rupture de la plaque menant à l'angine instable et l'infarctus du myocarde.

Figure 3 : Synthèse de l'estradiol. L'estradiol est un dérivé du cholestérol et sa synthèse comporte des intermédiaires parmi lesquels l'androstenedione, l'estrone et la testostérone. L'aromatase est l'enzyme permettant la conversion de ces précurseurs en estradiol.

Figure 4 : Structure et domaines fonctionnels identifiés dans le gène codant pour le RE α .

Figure 5 : Structure et domaines fonctionnels identifiés dans le gène codant pour le RE β .

Figure 6 : Représentation simplifiée des voies de signalisation possibles des estrogènes. Lors de la liaison de l'estrogène (E) à ses récepteurs (RE), il y a activation du complexe E / RE et activation de diverses voies de signalisation telles que **(1)** la voie des protéines MAPK et **(2)** la voie de la protéine Akt/PKB. L'estrogène peut aussi diffuser dans le cytoplasme et se lier aux RE cytoplasmiques. Le complexe E / RE est alors transloqué au noyau et, en présence de co-activateurs (co-A) ou co-répresseurs (co-R), permettra ou non la transcription de différents gènes impliqués entre autres dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire **(3)**. Les RE peuvent aussi être activés de façon indépendante des estrogènes **(4)**. La liaison des facteurs de croissance (FC) à leurs récepteurs (RFC) permet l'activation des protéines MAPK. Celles-ci, à leur tour, activeront les RE par phosphorylation de leurs domaines kinases.

Figure 7 : Variation dans le temps du poids corporel des souris C57BL/6 selon le type de chirurgie. Des souris C57BL/6 ont été soumises à une chirurgie blanche ou une OVX et le poids a été mesuré pendant 15 semaines avant le sacrifice (n=18 souris /groupe).

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Niveaux de production et de concentrations sériques d'estrogènes au cours du cycle menstruel chez la femme

Tableau 2 : Effets de l'hormonothérapie combinée sur la santé globale des femmes de l'étude WHI par rapport au placebo.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

17 β E	17-bêta-estradiol
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	Domaine d'activité fonctionnelle 1
AF-2	Domaine d'activité fonctionnelle 2
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ApoE ^{-/-}	Représente déficience en apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
AT1	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
CEE	Conjugué équin d'estrogène
CML	Cellules musculaires lisses
Co-A	Co-activateur
Co-R	Co-répresseur
E	Estrogène
E ₁	Estrone
E ₂	Estradiol
E ₃	Estriol
EGF-1	Facteur de croissance de l'épiderme 1
ELITE	Early versus Late Intervention Trial with Estradiol
eNOS	Enzyme endothéliale de synthèse du monoxyde d'azote
ERA	Estrogen Replacement on the Progression of Coronary-Artery Atherosclerosis
ERE	Éléments de réponse des estrogènes
ERK1/ERK2	Extracellular regulated kinase 1 et 2
ET-1	Endothéline 1
ET-3	Endothéline 3

ET _A	Récepteur A de l'endothéline
ET _B	Récepteur B de l'endothéline
FC	Facteur de croissance
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HERS	Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
Hsp	Heat shock protein
HTR	Hormonothérapie de remplacement
ICAM-1	Molécule d'adhésion intracellulaire 1
IGF-1	Facteur de croissance de l'insuline 1
IGF-1R	Récepteur du facteur de croissance de l'insuline 1
IL-6	Interleukine-6
INF- γ	Interféron gamma
IRSC	Instituts de Recherche en Santé du Canada
JNK	Kinase c-Jun
KEEPS	Kronos Early Estrogen Prevention Study
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LXR	Récepteur X du foie
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MAPKK	Protéines kinases kinases activées par les mitogènes
M-CSF	Facteur de stimulation colonial des macrophages
MCP-1	Protéine chémotactique des monocytes 1
MPA	Médroxyprogestérone acétate
NIH	Institut National de la Santé
NO	Monoxyde d'azote
P450 _{scc}	Enzyme de clivage du cytochrome P450
PEPI	Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention
PKB ou AKT	Protéine kinase B
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-phosphate
PPAR α	Récepteur activé du péroxisome prolifératif alpha

RE	Récepteur à l'estrogène
RE α	Récepteur à l'estrogène alpha
RE β	Récepteur à l'estrogène bêta
RFC	Récepteur de facteur de croissance
Src	Protéine co-activatrice des récepteurs stéroïdiens
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
TNF- α	Facteur de croissance tumorale alpha
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial

1.0 INTRODUCTION

1.1 La maladie cardiaque athérosclérotique

1.1.1 Définition générale

La maladie cardiaque athérosclérotique est caractérisée par le développement d'une lésion qui touche les artères coronaires, responsables d'irriguer le myocarde. L'athérosclérose peut également atteindre d'autres organes du corps tel que les jambes, les reins ou le cerveau. Tandis qu'un défaut d'irrigation myocardique peut engendrer l'angine de poitrine ou l'infarctus du myocarde, un trouble relatif à l'irrigation sanguine cérébrale peut provoquer une ischémie cérébrale transitoire, voir un accident vasculaire cérébral, considérés comme des formes de maladies cardiovasculaires.¹

1.1.2 Mortalité

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité au pays.² Selon les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC), en 2002, 34% des décès enregistrés chez les femmes étaient reliés aux maladies cardiovasculaires, comparativement à 32% chez les hommes.² L'insuffisance coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux, les troubles électriques du cœur, les infections d'origine virale, les maladies du muscle cardiaque ainsi que l'hypertension et la calcification des artères font partie des causes pouvant provoquer ces décès.¹

1.1.3 Facteurs de risque

Tel que mentionné dans la *Déclaration de Victoria*,

« Les maladies cardio-vasculaires (*sic*) peuvent être prévenues dans la grande majorité des cas. Nous disposons des connaissances scientifiques nécessaires pour créer un monde dans lequel la plupart des maladies cardiaques et des accidents cérébro-vasculaires (*sic*) pourraient être éliminés. »³

L'absence ou la diminution des facteurs de risque cardiovasculaires chez l'individu contribue fortement à la prévention primaire des maladies cardiovasculaires. Ainsi, alors que l'âge, le sexe et les antécédents familiaux sont non modifiables, nous pouvons, dans une certaine mesure, éviter ou diminuer l'impact de tous les autres facteurs de risque. Le contrôle de l'hypertension artérielle, de la dyslipidémie et du diabète, la réduction de l'excès de poids et de la sédentarité, de même que l'arrêt du tabagisme peuvent collectivement contribuer à améliorer la santé de l'appareil circulatoire.

Âge et Sexe

L'âge est directement lié à l'apparition des maladies cardiovasculaires. En effet, bien qu'il existe une disproportionnalité d'âge quant à son apparition entre les deux sexes – l'apparition semble retardée d'environ dix ans chez la femme – les maladies cardiovasculaires se développent rapidement dans la soixantaine.⁴ Ainsi, bien que l'amélioration des traitements médicaux et chirurgicaux des dernières décennies ait permis une régression de la prévalence des maladies cardiovasculaires dans la population, les projections démographiques des prochaines années permettent de prédire que le traitement des maladies cardiovasculaires demeurera un important défi dans le futur. En effet, une augmentation de 49% du nombre de Québécois

sexagénaire est prévue dans les dix prochaines années. Selon la fondation des maladies du cœur du Canada, cette population sera moins en santé que la génération précédente, entre autre à cause de leur plus forte propension à la sédentarité et à l'obésité.^{4, 5} En accord avec ces prédictions, il est prévu que les maladies cardiovasculaires demeurent la principale cause de mortalité dans les quinze prochaines années dans les pays industrialisés.^{5, 6} Il va donc sans dire que tous les efforts devront être mis de façon individuelle et collective afin de faire régresser les facteurs de risque modifiables des maladies cardiovasculaires au sein de notre population. De même, les recherches scientifiques devront se poursuivre afin de mieux comprendre et de mieux traiter les maladies cardiovasculaires.

Sédentarité et Obésité

La carence en activité physique est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires. En effet, un mode de vie sédentaire est plus propice à l'obésité, ce qui conduit à une mauvaise santé cardiovasculaire. Une période d'activité physique d'une durée de 30-60 minutes par jour permet de réduire le poids corporel, d'améliorer le ratio des lipoprotéines de haute densité (HDL) sur celles de faible densité (LDL), d'amoindrir la tension artérielle et de contrôler la glycémie, permettant ainsi collectivement de réduire le risque de développer une maladie cardiovasculaire.⁴

Alimentation et Dyslipidémie

La dyslipidémie se diagnostique généralement par la présence d'un niveau sanguin élevé de LDL. En raison de leur tropisme particulier pour l'endothélium artériel, les LDL favorisent la progression des plaques athéromateuses responsables de la maladie cardiaque athérosclérotique. Les niveaux sériques de lipides sont fortement régulés par les gènes d'un

individu. Cependant, une alimentation saine, exempte de gras saturés et trans-, permet d'amoindrir et parfois même de corriger la dyslipidémie.

Tabagisme

Le tabagisme, responsable de plus de décès par maladies cardiovasculaires que par le cancer, est la principale cause de mortalité évitable au Canada.⁴ Ainsi, l'abandon du tabagisme est une mesure efficace pour prévenir les maladies cardiovasculaires.

1.2 L'athérosclérose

1.2.1 Définition

L'athérosclérose a d'abord été définie comme une accumulation lipidique à la paroi vasculaire d'une artère résultant, par occlusion partielle ou complète, en une réduction de la lumière vasculaire et conséquemment du débit sanguin. De nombreux travaux de recherche effectués par Alexander Ignatovski et Nikolai Anitschkov semblaient par ailleurs confirmer cette définition. En effet, dans la première décennie du vingtième siècle, ces derniers ont démontré par plusieurs expérimentations animales qu'une alimentation composée de jaune d'œufs et de cholestérol induisait la formation de l'athérosclérose.^{7, 8} Aujourd'hui, le développement de l'athérosclérose par processus inflammatoire s'ajoute à ce modèle (voir section 1.2.3). L'évolution de la plaque athéromateuse est maintenant perçue comme une bataille entre les actions pro-inflammatoires et anti-inflammatoires des systèmes cellulaires; seulement 50% des patients athérosclérotiques présentant une dyslipidémie.⁹⁻¹¹

L'athérosclérose commence à se développer dès le jeune âge, mais peut demeurer asymptomatique pendant des décennies avant d'entraîner des complications tels que l'ischémie du myocarde (manifestée par l'angine de poitrine) ou l'infarctus du myocarde. Elle se développe au niveau des artères de moyenne à large tailles telles que les artères carotidiennes ou coronariennes et est une maladie complexe qui nécessite la compréhension structurelle de l'artère.^{11, 12}

1.2.2 Structure de l'artère

L'artère est principalement composée de trois couches : l'intima, la média et l'adventice (figure 1). Ces trois couches sont rassemblées entre elles pour former un tissu vivant, dynamique.

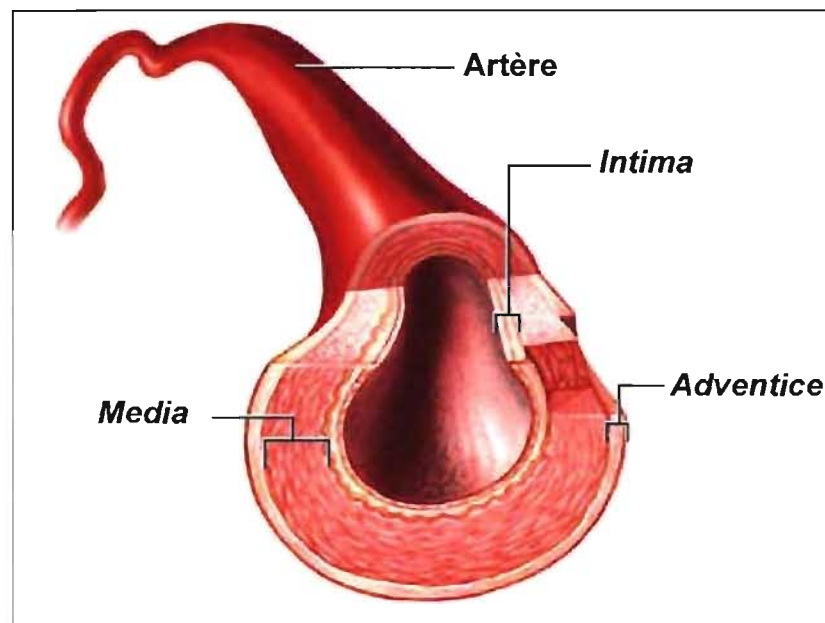


Figure 1. Structure d'une artère. L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et est responsable du maintien de l'homéostasie vasculaire. La média est formée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire permettant la contraction/relaxation de l'artère. L'adventice, formant la couche externe, est composée de terminaisons nerveuses et est responsable de la nutrition de la média par ses 'vasa vasorum'. (Adapté de [en ligne] www.lifespan.org)¹³

Intima

L'intima est la tunique interne de l'artère. Elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales qui entre directement en contact avec le sang. De l'autre côté, cette monocouche repose sur une membrane composée de collagène, laminine, fibronectine et autres molécules de la matrice extracellulaire. Avec le vieillissement des artères, cette membrane se complexifie, provoquant un épaississement de l'intima, même en l'absence de maladie. Le principal rôle de l'intima est de maintenir l'homéostasie vasculaire. En présence d'un dérèglement, elle peut constituer la porte d'entrée au développement d'une maladie coronarienne.¹²

Média

La face interne élastique de l'intima délimite la média; la tunique inférieure. Cette dernière est constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses où s'intercale une matrice extracellulaire. Dans les artères saines, ces cellules musculaires sont capables de prolifération cellulaire. De même, elles ont la capacité d'emmagasiner l'énergie cinétique et ainsi, de participer à la constriction et vasodilatation de l'artère. Quant à la matrice extracellulaire, en condition normale, un équilibre se crée entre sa formation et sa dissolution. Enfin, la lame élastique, dernière couche de la média, délimite la couche inférieure : l'adventice.¹²

Adventice

L'adventice est composé de cellules plus dispersées tels que les fibroblastes et mastocytes. Elle contient aussi du collagène, toutefois moins dense que dans l'intima, et l'on y retrouve aussi certaines terminaisons nerveuses ainsi que les 'vasa vasorum', artérioles permettant la nutrition de la média.¹²

1.2.3 Formation de l'athérosclérose

1.2.3.1 Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est caractérisée par une réaction inflammatoire à l'endothélium due à une perte de l'homéostasie vasculaire. En effet, le premier rôle de l'endothélium est de maintenir un équilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction de l'artère, l'inhibition et la prolifération des cellules musculaires lisses de la média, la prévention et la stimulation de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire, ainsi que la thrombogénèse et la fibrinolyse.¹⁴ Le déséquilibre de l'un de ces balanciers mène à une dysfonction endothéliale, permettant l'infiltration des LDL ainsi que des monocytes et lymphocytes T dans l'artère.¹⁵ Le premier stade de formation de l'athérosclérose se crée : celui de la genèse de la strie lipidique.

Plusieurs facteurs peuvent engendrer la dysfonction endothéliale. Parmi ceux-ci, mentionnons d'abord une variation négative des forces de cisaillement, i.e. « de la force mécanique induite par le flux sanguin sur la paroi vasculaire qui se traduit en un signal biochimique et qui provoque certains changements sur la paroi endothéliale ».^(16, traduit de l'anglais) Lorsqu'elles sont modifiées à la baisse, par exemple aux sites d'embranchements vasculaires, ces forces de cisaillement induisent des signaux biochimiques anormaux sur l'endothélium vasculaire.^{16, 17} Ces signaux sont présumés responsables d'une diminution des fonctions de guérison et de tonus vasculaire au site de lésion.^{16, 18} En effet, ces dérèglements de l'endothélium provoquent des changements d'expression génique telle que, par exemple, une inhibition de la synthèse de l'enzyme endothéliale de synthèse du monoxyde d'azote (eNOS). L'inhibition de cette enzyme provoque une diminution de la synthèse du monoxyde d'azote (NO),

molécule impliquée dans le processus de vasodilatation artérielle. De même, il y a augmentation de la production de radicaux libres, de la perméabilité endothéliale aux lipoprotéines, de l'adhésion des leucocytes, de l'apoptose, de la prolifération des cellules musculaires lisses et du dépôt de collagène, ensemble conduisant au premier stade de formation de la plaque athéromateuse.^{16, 18}

D'autre part, les facteurs de risques cardiovasculaires mentionnés plus tôt à la section 1.1.3 contribuent individuellement et de façon additive à la dysfonction endothéliale. En effet, la dyslipidémie a un effet délétère sur l'endothélium, surtout par sa forte teneur en LDL et spécialement lorsque ceux-ci sont sous forme modifiée (oxydés par exemple). Une fois les LDL internalisés dans l'intima, ils sont oxydés, conduisant à l'induction d'un signal inflammatoire. L'expression des molécules d'adhésion et le recrutement de cytokines pro-inflammatoires et autres médiateurs de l'inflammation par les cellules endothéliales et macrophages contribuent alors à renforcer la dysfonction endothéliale et à permettre la progression de l'athérosclérose.¹⁹

L'endothéline 1 (ET-1), un puissant agent vasoconstricteur artériel²⁰, est augmenté lors d'une dysfonction endothéliale. En effet, il a été démontré que les LDL oxydés et les macrophages contribuent à augmenter le relâchement de l'ET-1 à l'endothélium.^{21, 22} Cette hausse de la production de l'ET-1 conduit à une vasoconstriction artérielle, mais permet aussi la prolifération des cellules musculaires lisses et endothéliales vasculaires. Il a été démontré que la liaison de l'ET-1 et l'ET-3 à leurs récepteurs (ET_A et ET_B) accroît la production du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) dans les cellules musculaires lisses.²³ *In vitro*, ce relâchement de VEGF dans le milieu de culture permet la prolifération des cellules endothéliales, suggérant un effet thérapeutique de l'ET-1 dans la réendothélialisation.²³ Cependant, l'ET-1 permet aussi la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de

la média vers l'intima.²⁴ De même, il contribue à maintenir le processus inflammatoire, d'une part en induisant le recrutement de cytokines, tels que l'interleukine 6 (IL-6)²⁵ et la protéine chimiotactique des monocytes 1 (MCP-1)²⁶, et d'autre part, en augmentant le stress oxydatif²⁷ dans les vaisseaux artériels. Ainsi, le rôle de l'ET-1 dans la pathologie de l'athérosclérose demeure controversé puisqu'il peut d'une part contribuer au processus de régénération de l'endothélium, mais permet aussi de maintenir le signal pro-inflammatoire qui promeut la dysfonction endothéliale.

De la même manière, la production accrue de l'agent vasoconstricteur *angiotensine II* en état pathologique d'hypertension augmente l'activité lipoxigénase, qui se traduit par une recrudescence de l'inflammation et de l'accumulation de LDL oxydés. L'angiotensine II accroît aussi la formation de radicaux libres tels que les anions superoxydes dans le plasma.²⁸ Ces produits dérivés de l'inflammation inhibent la formation du NO et augmentent l'adhésion leucocytaire et la résistance périphérique, ce qui contribue aussi à promouvoir la dysfonction endothéliale.¹⁹ Le tabagisme provoque également cette augmentation de radicaux libres et les effets s'y rattachant.¹¹

Les tissus adipeux liés à l'obésité peuvent eux aussi synthétiser des cytokines pro-inflammatoires, tels que le facteur de croissance tumorale alpha (TNF- α) et l'IL-6, qui activent les lymphocytes T et font ainsi évoluer le processus athérogénique.²⁹

Enfin, il a également été démontré expérimentalement chez le porc rendu diabétique que l'hyperglycémie et le diabète augmentent la production de cytokines, chemokines et molécules d'adhésion dans les parois vasculaires.³⁰ Cette réaction inflammatoire de l'endothélium conduit à l'infiltration des lymphocytes dans l'intima et, de cette façon, contribue au développement de la plaque d'athérome.

Ainsi, les variations des forces de cisaillement, la dyslipidémie, l'hypertension, le tabagisme, l'obésité et le diabète contribuent seul ou collectivement à la dysfonction endothéliale, porte d'entrée de la formation de la plaque athérosclérotique.

1.2.3.2 Formation de la strie lipidique

Nous avons vu dans la section précédente que lorsque l'endothélium est dysfonctionnel, il devient perméable aux LDL, les laissant s'infiltrer et s'accumuler dans l'intima, avant d'être modifiés sous forme oxydée. En réponse à cette agression, les plaquettes sont les premières recrutées au site de lésion et elles induisent l'expression des molécules d'adhésion permettant le recrutement leucocytaire à l'endothélium.³¹

Ce processus nécessite en premier lieu l'induction de l'expression des sélectines (L-sélectine, E-sélectine et P-sélectine) à l'endothélium afin de permettre le roulement et la capture initiale des leucocytes. Par la suite, les monocytes et cellules T activés se lient aux molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines telles que la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1). Cette liaison assure une adhérence ferme des leucocytes à la paroi endothéliale. Enfin, les cellules endothéliales et musculaires lisses sous-jacentes, de même que les LDL oxydés, produiront certaines molécules chemoattractantes telles que la MCP-1 et l'ostéopontine, qui permettront la diapédèse des lymphocytes T et des monocytes. À leur tour, les monocytes, toujours en combinaison avec les cellules endothéliales et musculaires lisses, produiront aussi ces molécules, permettant d'accroître l'infiltration leucocytaire dans la paroi vasculaire.¹¹

1.2.3.3 Progression de la plaque

À l'intérieur de l'intima, les monocytes parviennent à maturité en se différenciant en macrophages sous l'influence du facteur de stimulation colonial des macrophages (M-CSF). Devenues macrophages, ces cellules ingèrent les LDL modifiés à l'aide des récepteurs de phagocytose présents à leur surface, provoquant l'accumulation des molécules de cholestérol estérifié dans leur cytoplasme. Ces cellules sont alors dites spumeuses, trait fort caractéristique des premiers stages de l'athérosclérose.³²

De même, les macrophages, accompagnés par les cellules T, sont reconnus pour leur prolifération et la libération de plusieurs facteurs de croissance et cytokines qui entretiennent le signal pro-inflammatoire et la complexification de la plaque.³² L'endothélium, en réponse aux stimuli inflammatoires lymphocytaires, peut alors, lui aussi, contribuer à maintenir l'activité pro-inflammatoire en sécrétant des molécules tels que le TNF- α , le TNF- β , l'IL-1 et l'IL-6.³²

À cette étape, l'épaississement de la plaque provoque une réduction de la lumière de l'artère et empêche un flux sanguin continu. L'angine de poitrine stable peut alors en résulter. Par la suite, il est fréquent de voir progresser la plaque ou d'assister à une déstabilisation du corps fibreux avant de constater des événements plus complexes tels l'angine instable ou l'infarctus du myocarde.³²

1.2.3.4 Rupture de la plaque

Lorsque les signaux inflammatoires persistent et que les cellules lymphocytaires continuent de sécréter certaines cytokines, tels le TNF- α et l'interféron gamma (INF- γ), la stabilité de la plaque diminue.⁵ En effet, ces cytokines inhibent la production de collagène par les cellules musculaires lisses.³² L'activation des macrophages permet l'expression de certaines métalloprotéinases et cystéines protéases qui dégradent également le collagène et les composants de la matrice extracellulaire.⁵ Il s'ensuit alors un affaiblissement du corps fibreux, qui protège le sang des lipides thrombogéniques retrouvés au cœur de la plaque. La plaque, qui devient alors trop fragile, se rompt et un thrombus se forme. Celui-ci est responsable des complications aiguës de l'athérosclérose.³²

Contrairement à ce que l'on croyait, le degré d'inflammation de la plaque, et non son pourcentage d'occlusion, déterminerait son état d'instabilité. Cela augmenterait donc aussi le risque d'être atteint par un syndrome coronarien aigu.^{10, 33}

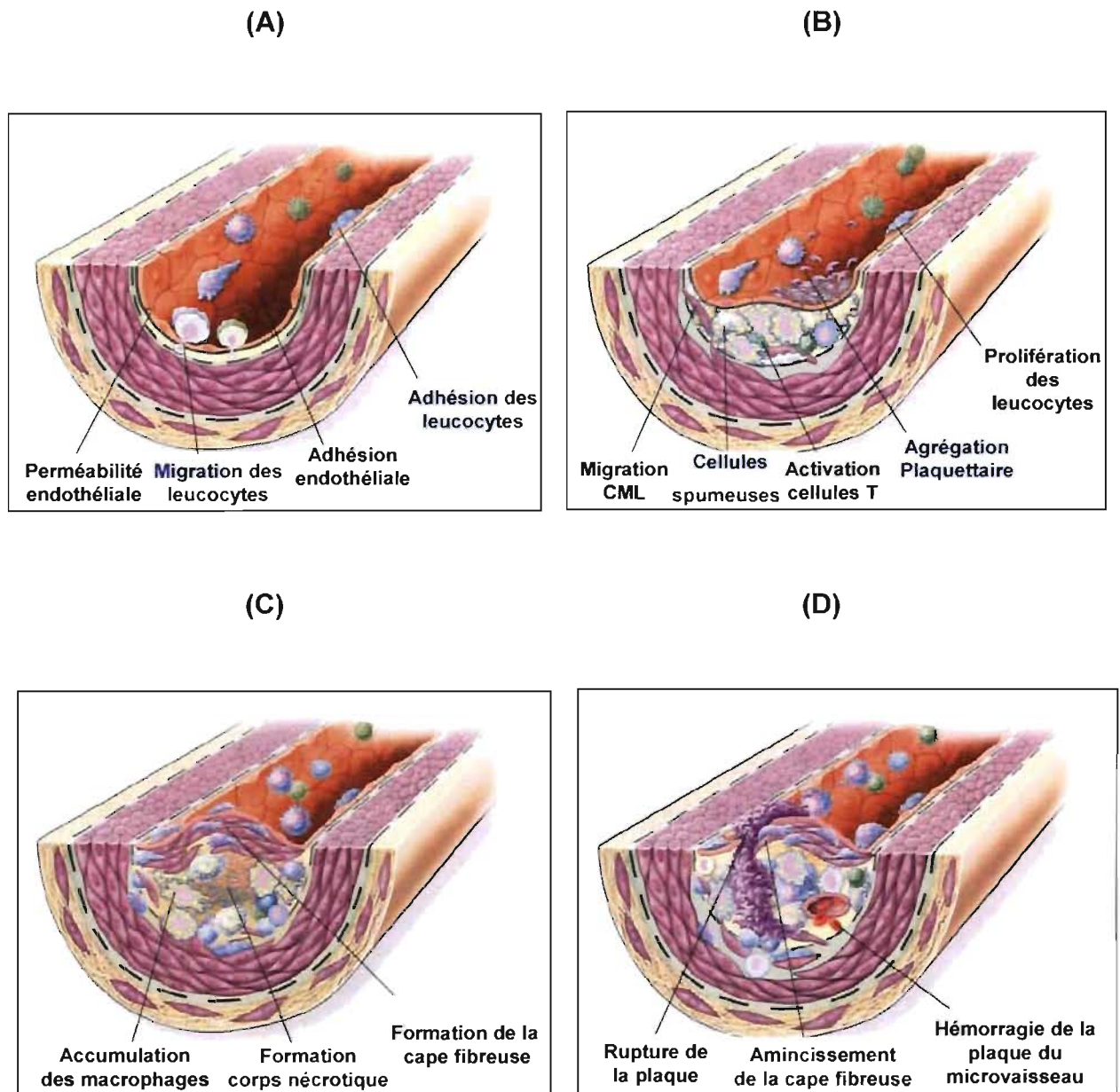


Figure 2. Évolution de la plaque athérosclérotique. (A) Première étape de la formation de l'athérosclérose: adhésion et migration des leucocytes. **(B)** Formation de la strie lipidique représentant le premier stade d'athérosclérose. **(C)** Progression de la plaque: migration des cellules musculaires lisses et formation du corps nécrotique. **(D)** Rupture de la plaque menant à l'angine instable et l'infarctus du myocarde. (Adapté de Ross, R. (1999) *New Engl J Med.*)¹¹

1.3 Avenue de prévention possible : les estrogènes

Chez les Canadiennes, les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de décès et d'invalidité. Selon Santé Canada, de tous les décès rapportés chez les Canadiennes, 40% sont dus aux maladies cardiaques et accidents vasculaires cérébraux. Ainsi, huit fois plus de femmes décèdent de maladies cardiovasculaires que de cancers du sein. De plus, le risque de décès par maladie cardiaque chez la femme est multiplié par quatre après la ménopause.³⁴ Cette dernière observation porte à croire que la baisse du niveau d'estrogène suite à la ménopause pourrait accélérer le développement des maladies cardiovasculaires chez la femme. L'hormonothérapie a donc été proposée comme traitement de prévention des maladies cardiovasculaires chez la femme.

1.3.1 L'estrogène

L'estrogène est une hormone synthétisée en majorité par les ovaires chez la femme préménopausée.³⁵ Cependant, il semblerait que l'activité aromatique permettant la synthèse de l'estrogène soit aussi présente dans le sein³⁶, le muscle squelettique³⁷, le tissu adipeux³⁸ et le cerveau.³⁹

Les estrogènes, c'est-à-dire le 17-bêta-estradiol (17 β E ou E₂), l'estrone (E₁) et l'estriol (E₃), sont des dérivés stéroïdiens du cholestérol. Chez l'humain, l'estradiol est la forme dominante avant la ménopause, mais l'estrone et l'estriol sont aussi présents, surtout au niveau du foie. À la ménopause, les niveaux d'estradiol sont grandement diminués et l'estrone devient alors la forme dominante des estrogènes dans l'organisme (table 1).⁴⁰

1.3.1.1 Synthèse de l'estrogène

Tel que mentionné, les estrogènes sont des dérivés stéroïdiens du cholestérol (figure 3). Lorsque le cholestérol se lie au récepteur de lipoprotéines, il est entreposé et déplacé aux sites de synthèse des stéroïdes dans la cellule qui l'a pris en charge. Au moment de synthétiser les différents précurseurs des molécules stéroïdiennes, le cholestérol est transféré à la membrane interne des mitochondries. Les enzymes du cytochrome P450 (*side-chain clivage system (P450scc)*) permettront alors de catalyser la réaction de clivage des carbones présents sur ses chaînes latérales (réduction de 27 à 18 carbones). Dès lors, s'en suit le processus d'aromatisation; l'étape ultime de la formation de l'estrogène. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique de l'aromatase monooxygénase P450 (cyp19). Trois réactions consécutives d'hydroxylation ont lieu afin de produire l'estrone et l'estradiol, en plus de leurs précurseurs respectifs, soit l'androstènedione et la testostérone.⁴⁰

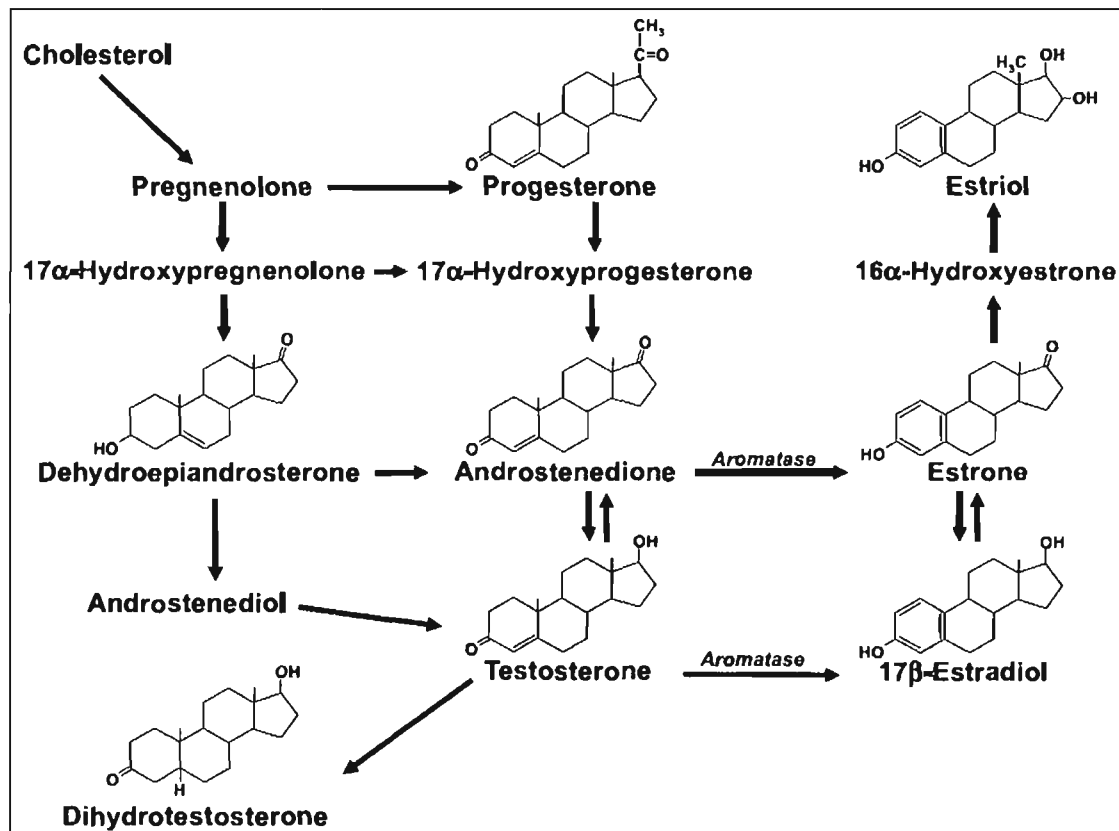


Figure 3. Synthèse de l'estradiol. L'estradiol est un dérivé du cholestérol et sa synthèse comporte des intermédiaires parmi lesquels l'androstenedione, l'estrone et la testostérone. L'aromatase est l'enzyme permettant la conversion de ces précurseurs en estradiol. (Adapté de Czubryt, MP. (2006) *Can J Physiol Pharmacol.*)⁴¹

Chez les femmes, les niveaux d'estrogène dans le sérum varient au cours du cycle menstruel (tableau 1). La ménopause engendre cependant une diminution considérable de ces niveaux; la femme aura alors des niveaux d'estrogènes similaires à l'homme et parfois même, sous ce seuil.⁴²

Tableau 1. Niveaux de production et de concentrations sériques d'estrogènes au cours du cycle menstruel chez la femme

Phase	17 β -Estradiol		Estrone		Estriol	
	Concentration sérique	Production journalière	Concentration sérique	Production journalière	Concentration sérique	Production journalière
	pg/ml	μ g	pg/ml	μ g	pg/ml	μ g
Folliculaire	40-200	60-150	30-100	50-100	3-11	6-23
Pré-ovulatoire	250-500	200-400	50-200	200-350	—	—
Lutéale	100-150	150-300	50-115	120-250	6-16	12-30
Pré-menstruelle	40-50	50-70	15-40	30-60	—	—
Ménopause	< 20	5-25	15-80	30-80	3-11	5-22

(Adapté de Gruber, C.J. (2002) *New Engl J Med.*)⁴⁰

1.3.1.2 Effets physiologiques des estrogènes

Les molécules d'estrogène sont lipophiles et peuvent pénétrer la membrane cytoplasmique afin de se lier à leurs récepteurs nucléaires, cytoplasmiques ou membranaires, et induire leurs effets.⁴³ Parmi ceux-ci, mentionnons la croissance et le développement des glandes et du système urogénital chez la femme. Elles agissent aussi sur les os, le système immunitaire, cardiovasculaire et nerveux central.⁴³ Enfin, elles régulent aussi la physiologie de l'homme tel que la prostate et le colon.⁴⁴

De même, les estrogènes sont impliqués dans le développement et/ou la progression de plusieurs maladies tels que plusieurs cancers (sein, endomètre, colon). D'autre part, des études soulignent que l'estrogène permet d'améliorer ou de prévenir les effet cliniques d'autres maladies tels l'ostéoporose, la dégénérescence nerveuse, les maladies cardiovasculaires et la résistance à l'insuline.⁴⁵

1.3.2 Les récepteurs aux estrogènes

En 1966, le groupe de Jensen fut le premier à conclure en l'existence véritable d'un récepteur à l'estrogène, membre de la superfamille des récepteurs nucléaires.⁴⁶ Ce n'est toutefois qu'en 1985 que l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) du récepteur à l'estrogène alpha (RE α) a été isolé et séquencé.⁴⁷ Cet isoforme est constitué de 595 acides aminés et possède un poids moléculaire de 66 kDa. Enfin, un deuxième isoforme a été cloné chez le rat par Kuiper en 1996.⁴⁸ Il s'agit du récepteur à l'estrogène bêta (RE β). Mosselman a démontré son existence chez l'humain⁴⁹ et la forme complète de 530 acides aminés, d'un poids moléculaire de 54 kDa, a été rapportée en 1998 par Ogawa.⁵⁰ Plusieurs variants des isoformes du RE α et du RE β ont par la suite été identifiés.⁵¹⁻⁵⁴

1.3.2.1 Localisation cellulaire

Dans la cellule, les récepteurs estrogéniques sont situés à la membrane cytoplasmique, dans le cytoplasme et à la membrane nucléaire.⁵⁵⁻⁶¹ Les deux types de récepteurs peuvent être co-localisés, par exemple dans les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses, les neutrophiles⁶² et les ostéoblastes^{63, 64} chez les deux sexes. Cependant, il semblerait que la localisation des deux types de récepteurs varie d'un organe à l'autre.⁶⁵ Le RE α est majoritairement présent dans les cellules de l'endomètre, les cellules cancéreuses du sein ainsi que les cellules stromales de l'ovaire. Quant au RE β , il est majoritairement présent dans les cellules granulocytaires des ovaires et les testicules.⁶⁶ En moins grande concentration, il est aussi présent dans la muqueuse intestinale, la moelle épinière, les os, les poumons, les spermatozoïdes en développement, la vessie, le cerveau, l'utérus et la prostate.⁶⁶ Ces différences de localisation nous mènent à poser l'hypothèse

selon laquelle les deux types de récepteurs aux estrogènes pourraient jouer des rôles différents dans l'organisme et contribuer aux actions tissu-spécifiques des estrogènes.

1.3.2.2 Structure du gène

Le RE α et le RE β sont les produits de deux gènes distincts, soit ESR1 et ESR2, respectivement. ESR1 se trouve sur le chromosome 6q, alors que ESR2 est présent sur le chromosome 14q.^{66, 67} ESR1 et ESR2 possèdent chacun huit exons où s'intercalent sept introns d'une longueur de 140 kb et 40 kb respectivement (figures 4 et 5).

Cinq régions sont délimitées dans les exons : A/B et C-F.^{48, 68-70} L'exon 1 code principalement pour la région A/B de la protéine. L'exon 2 et 3 codent pour la région C. L'exon 4 code pour une partie de la région C, la région D et une partie de la région E. Les exons 5-7 codent pour la région E et, finalement, l'exon 8 code pour une partie de la région E et la région F.

La comparaison des séquences d'ADNc du RE α à travers différentes espèces (poulet, rat, souris) démontre une forte homologie avec l'ADNc de l'espèce humaine, à l'exception de la terminaison en 5'.⁷¹⁻⁷³

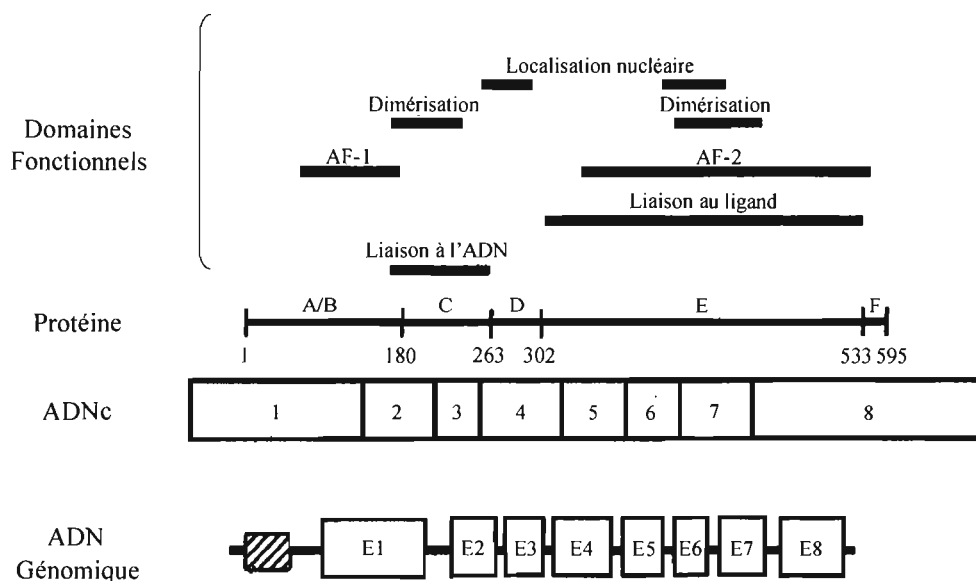


Figure 4. Structure et domaines fonctionnels identifiés dans le gène codant pour le RE α . (Adapté de Gennari, L. (2005) *Am J Epidemiol.*)⁷⁴

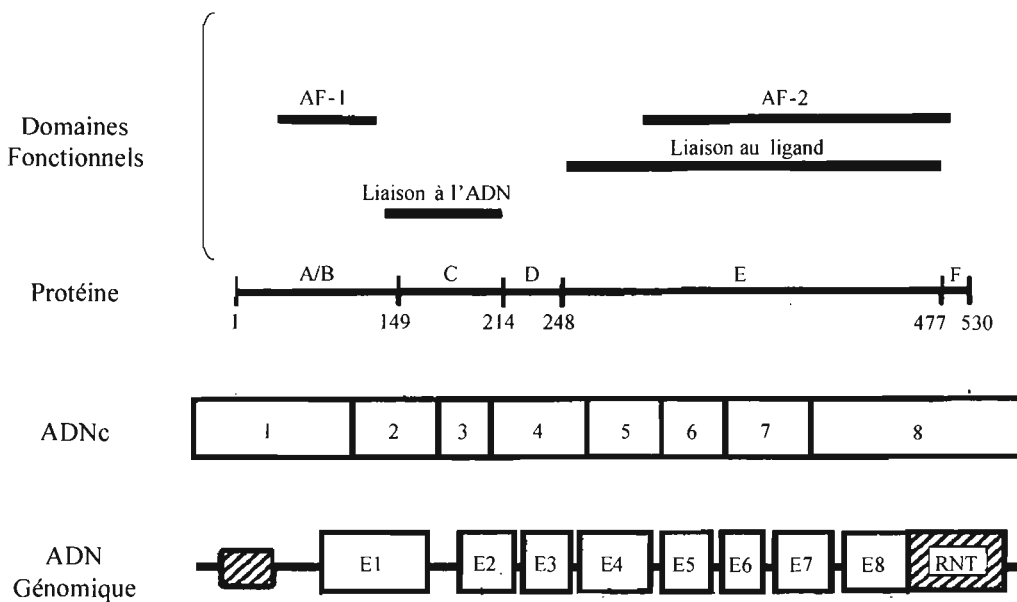


Figure 5. Structure et domaines fonctionnels identifiés dans le gène codant pour le RE β . (Adapté de Gennari, L. (2005) *Am J Epidemiol.*)⁷⁴

1.3.2.3 Structure protéique des récepteurs

Tel que mentionné à la section précédente, les protéines du RE α et du RE β partagent des régions communes nommées A/B, C, D, E et F. Ces régions participent à la formation de différents domaines ayant chacun un rôle à jouer dans la signalisation des estrogènes. Ces domaines sont respectivement les domaines de transactivation en N-terminal, de liaison à l'ADN, de dimérisation, de localisation nucléaire et de liaison au ligand.^{49, 75, 76}

Le domaine de transactivation en N-terminal de la protéine est formé de la région A/B. Il s'agit de la région la moins conservée entre les deux récepteurs. Elle est impliquée dans les interactions protéiques⁷⁷⁻⁷⁹ ainsi que dans les activités transcriptionnelles des gènes cibles.^{77, 80, 81} Cette région, exposée au cytoplasme, contient un domaine d'activation fonctionnelle (AF-1) ainsi que plusieurs sites de phosphorylation et de sulmoylation. Le site AF-1 se lie de façon directe ou indirecte à la machinerie transcriptionnelle^{75, 82} – par interaction sur des protéines co-activatrices ou co-répressives – et varie beaucoup entre les deux isoformes des RE. La longueur et la composition en acides aminés de sa séquence sont très variées; l'AF-1 du RE β étant plus court et son activité étant négligeable. Le rôle de l'AF-1 demeure donc toujours à clarifier pour le RE β .⁸¹

La région C comprend le domaine de liaison à l'ADN et est fortement conservée entre les deux types de récepteurs. Ce domaine de liaison joue un rôle prépondérant dans la dimérisation des récepteurs à l'ADN ainsi que dans la liaison de ceux-ci aux séquences spécifiques de l'ADN, c'est-à-dire aux éléments de réponse des estrogènes (ERE). Les ERE sont des palindromes répétés (5' – GGTCAnnnT – GACC – 3' (n étant n'importe lequel des nucléotides)) bordés de séquences déterminant l'affinité de la liaison du RE au ERE.⁸³⁻⁸⁸

Très mal connue, la région D de la protéine se présente comme la région charnière. Elle contient la séquence de localisation nucléaire et différents sites permettant des modifications post-transcriptionnelles, telles que l'acétylation et la sulmoylation.^{89, 90}

Enfin, les régions E et F, placées en position C-terminale de la protéine, contiennent une partie de la séquence de localisation nucléaire ainsi que le domaine de liaison au ligand. Elle comprend aussi les domaines d'activation fonctionnelle 2 (AF-2) et de dimérisation des récepteurs. Les régions E et F sont aussi impliquées au niveau de la liaison des protéines chaperonnes des récepteurs, soit les « *Heat Shock Protein* » (Hsp) 70 et 90.^{75, 91, 92}

1.3.2.4 Modifications des récepteurs

Plusieurs modifications post-transcriptionnelles peuvent avoir lieu sur les récepteurs aux estrogènes. Parmi celles-ci, mentionnons l'acétylation, la glycosylation, la méristoylation, la nitrosilation, la palmytoylation, la sulmoylation, l'ubiquitination et la phosphorylation. Ces modifications permettent d'assurer une régulation des fonctions des RE. (Pour revue, voir ⁴⁴)

La phosphorylation des RE sur les domaines kinases est la plus courante, car elle permet de moduler l'activité des RE. Ainsi, lors de la liaison de l'estradiol au RE α , les sérines 118, 104 et 106 présentes dans le domaine A/B sont phosphorylées par transactivation de leurs domaines kinases. Le RE α peut aussi être phosphorylé en absence de ligand, par exemple lors de l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) tel que nous le verrons à la section 1.3.4.1. Dans ce cas, les sérines principalement phosphorylées sont celles en position 167 et 118.^{44, 93-96} Bien que les RE β

soit aussi la cible de phosphorylation, ses sites d'activité kinases demeurent inconnus pour le moment.

1.3.3 Mécanisme d'activation des récepteurs aux estrogènes

Lorsque l'estrogène diffuse à travers la cellule, il se lie au domaine de liaison du ligand du récepteur, ce qui permet la dissociation des protéines chaperonnes (*Hsp70* et *Hsp90*) et la dimérisation des récepteurs entre eux. Des homodimères ($RE\alpha/RE\alpha$; $RE\beta/RE\beta$) ou hétérodimères ($RE\alpha/RE\beta$) se forment, contribuant ainsi à complexifier la réponse cellulaire. Les complexes sont ensuite transloqués vers le noyau afin de lier les ERE situés sur l'ADN et de permettre la transcription génique.⁹⁷ La translocation nucléaire des complexes estrogènes / RE est mal connue, mais il semblerait que la protéine cytosolique cavéoline-1 stimulerait la translocation par interaction directe sur le récepteur.^{98, 99}

Certaines protéines régulatrices interagissent avec les ERE afin d'accroître ou inhiber la transcription génique. La protéine co-activatrice des récepteurs stéroïdiens (src) de 160 kDa et la protéine de liaison à l'élément de réponse adénosine monophosphate cyclique (AMPC) p300 sont deux protéines qui permettent d'accroître l'activité transcriptionnelle.^{100, 101} Les protéines de co-activation fonctionnent principalement de deux façons : 1) elles recrutent des protéines permettant la transcription de l'ADN en acide ribonucléique (ARN) ou 2) elles ont elles-mêmes une activité enzymatique qui facilite la formation d'ARN, par exemple en facilitant le déroulement de la double hélice de l'ADN.¹⁰² Les co-répresseurs quant à eux, s'attachent au récepteur afin d'inhiber la transcription.¹⁰² Ces protéines régulatrices sont spécifiques à certains tissus ainsi qu'aux conditions physiologiques.

D'autres mécanismes, telle que la méthylation de l'ADN, permettent le contrôle de la transcription génique. En effet, l'ajout de groupements *méthyl* sur la portion 5' riche en îlots nucléotidiques CpG, là où se retrouvent 60% des promoteurs géniques, empêche l'activation des gènes.^{103, 104} La régulation négative de l'expression du RE α a déjà été associée à la méthylation de l'ADN dans plusieurs tissus, incluant le cœur.^{105, 106} Post et al. ont aussi démontré que les niveaux de méthylation génique du RE α dans le cœur sont d'une part, plus importants chez les sujets âgés comparativement au plus jeunes, et d'autre part, augmentés dans les lésions athérosclérotiques.¹⁰⁶ Ces résultats suggèrent donc une importance particulière du processus de méthylation dans la régulation des effets estrogéniques dépendant des récepteurs aux estrogènes.

1.3.4 Voies signalétiques régulant l'expression et l'activité des récepteurs aux estrogènes

Plusieurs voies signalétiques des estrogènes existent, ce qui augmente la variété de réponses cellulaires possible. La voie classique des estrogènes est mentionnée ci-haut (Section 1.3.3). Brièvement, lors de la liaison de l'estrogène à son récepteur α ou β , il se produit une dimérisation des RE, leur permettant de se lier à l'ERE du promoteur du gène cible et d'induire une action génomique. Des protéines régulatrices agissent de concert avec ces complexes afin de réguler la transcription génique.

Les estrogènes peuvent aussi agir de façon non génomique. En effet, ils peuvent interagir avec leurs récepteurs membranaires et induire des effets cellulaires rapides telle que, par exemple, la vasodilatation artérielle. Cette voie, régulée par les protéines phosphatidyl-inositol-3-phosphate (PI3K) et kinase B (PKB ou Akt), permet la stimulation de la eNOS, elle-même agissant sur la libération du NO, un vasodilatateur artériel puissant.

Les voies non génomiques peuvent aussi converger vers la voie génomique par l'activation d'une suite de facteurs de transcription, telle que la voie des MAPK, qui sera décrite à la section 1.3.4.1.

Outre ces voies, la signalisation peut aussi être indépendante des estrogènes. En effet, plusieurs hormones de croissance tels que le facteur de croissance de l'insuline (IGF-1) et de l'épiderme (EGF-1) sont en mesure d'activer les voies estrogéniques.¹⁰⁷ La liaison de ces hormones à leur récepteur respectif permet d'activer certains facteurs de transcriptions, telles que les MAPK, qui permettront l'activation des REs. Ce mécanisme peut se produire lorsque les concentrations de facteurs de croissance sont très élevées et que le taux d'estrogène dans le sérum est faible, par exemple chez les hommes ou chez les femmes ménopausées.⁴² De même, il existe aussi des voies croisées qui permettent aux voies de différentes hormones stéroïdiennes, par exemple la progestérone, d'interagir entre elles.

Finalement, le complexe estrogènes/récepteurs peut aussi réguler l'activité de récepteurs nucléaires non stéroïdiens tels que le récepteur activé du péroxysome prolifératif alpha (PPAR- α) ainsi que les récepteurs X du foie (LXR).¹⁰⁸

1.3.4.1 Voies de signalisation des MAPK

Faisant partie d'une voie rapide de signalisation non génomique, la voie des MAPK est responsable de plusieurs phénotypes cellulaires. Parmi ceux-ci, mentionnons la différenciation, la prolifération et la migration cellulaire. Lors de la liaison de l'estrogène au RE, celui-ci s'active et peut phosphoryler certaines protéines kinases (MAPK). À leur tour, celles-ci en phosphoryleront d'autres. Cette cascade peut s'effectuer jusqu'à six fois et permet d'amplifier et de spécifier les signaux cellulaires qui induiront les processus cellulaires ci-haut mentionnés.

Faisant partie de la famille des MAPK, les protéines ERK1/ERK2 (ou p42/44) sont reconnues pour jouer un rôle dans le processus de prolifération cellulaire, alors que la p38 est plutôt associée à la migration cellulaire.¹⁰⁹ Leur activation s'effectue de façon très rapide. En effet, Improta-Brears et son équipe ont démontré une activité maximale des MAPK p42/44 dans les cinq minutes suivant un traitement au 17 β E des cellules MCF-7. De même, ces chercheurs ont aussi visualisé la translocation des MAPK p42/44 du cytoplasme vers le noyau, leur permettant ainsi d'interagir avec leurs cibles.¹¹⁰

Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré qu'un traitement au 17 β E inhibe la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires de porc via une inhibition de la phosphorylation des MAPK p42/44 et p38, médiée par le RE β .^{111, 112} Contrairement, chez les cellules endothéliales vasculaires de porc, le 17 β E induit via le RE α une activation par phosphorylation de ces deux MAPK, conduisant à la prolifération et la migration de ces cellules.^{111, 112} Ainsi, appliqués dans un modèle d'athérosclérose ou de resténose, ces résultats pourraient permettre d'expliquer le potentiel d'amélioration de la fonction et de la régénération

endothéliale induite par les estrogènes. De même, l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses induite par l'inhibition de l'activité des MAPK *in vitro* suggère une capacité des estrogènes à limiter l'athérosclérose à des stades précoces et à diminuer la formation de resténose.

Il est bien connu que les deux récepteurs aux estrogènes, soit le RE α et le RE β , induisent une activité enzymatique sur les MAPK. Cependant, il semblerait que la cible de chacun des récepteurs soit différente. En effet, Razandi a démontré dans des cellules d'ovaires de hamster que le RE α et le RE β permettent la phosphorylation des MAPK p42/44. Cependant, le RE β agirait préférentiellement par la kinase c-Jun (JNK).⁶¹

Voies estrogéniques indépendantes du ligand

Les MAPK peuvent aussi agir inversement et remonter jusqu'au récepteur estrogénique afin de lui permettre d'induire ses effets au noyau. En effet, lorsque la concentration du 17 β E, ou autre ligand naturel ou pharmacologique, est trop faible, le récepteur peut être activé par des mécanismes croisés.¹¹³ Ainsi, certains facteurs de croissance interagissent sur leurs propres récepteurs et permettent la phosphorylation des MAPK.¹¹⁴ Celles-ci se déplacent alors et activent les récepteurs estrogéniques par une phosphorylation de leurs sites à activité sérine kinase.

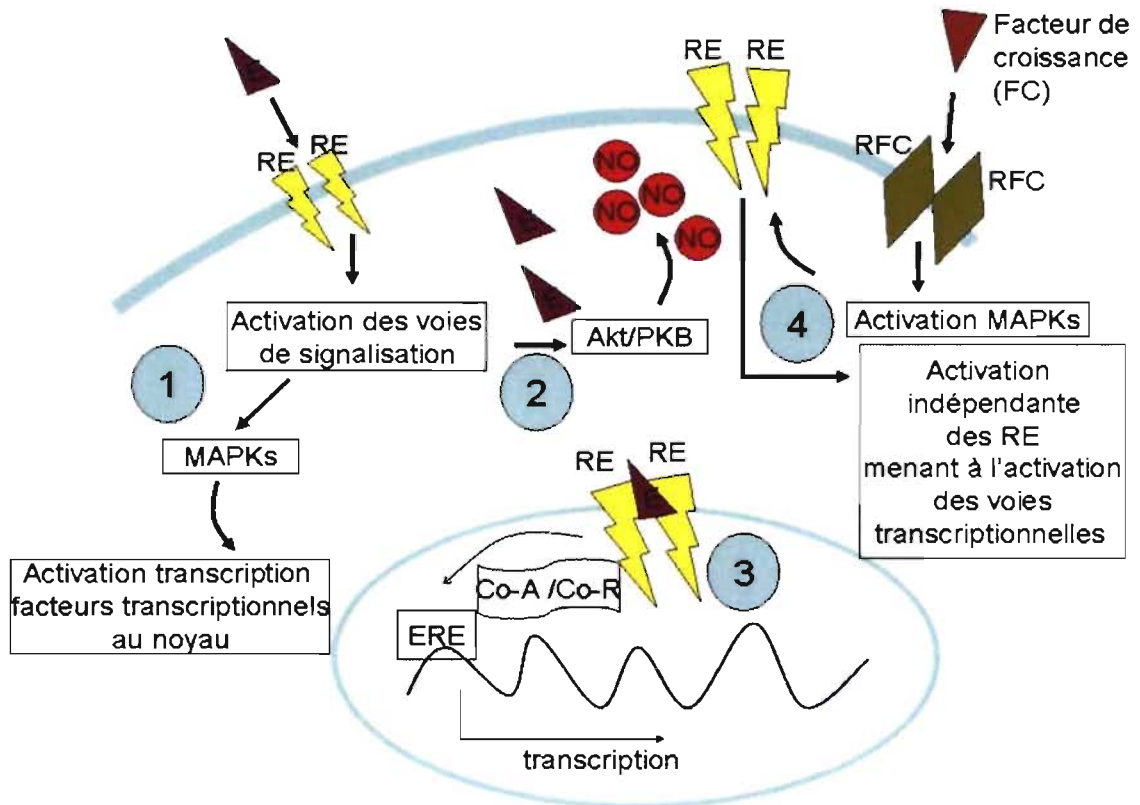


Figure 6. Représentation simplifiée des voies de signalisation possibles des estrogènes. Lors de la liaison de l'estrogène (E) à ses récepteurs (RE), il y a activation du complexe E / RE et activation de diverses voies de signalisation telles que (1) la voie des protéines MAPK et (2) la voie de la protéine Akt/PKB. L'estrogène peut aussi diffuser dans le cytoplasme et se lier aux RE cytoplasmiques. Le complexe E / RE est alors transloqué au noyau et, en présence de co-activateurs (co-A) ou co-répresseurs (co-R), permettra ou non la transcription de différents gènes impliqués entre autres dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (3). Les RE peuvent aussi être activés de façon indépendante des estrogènes (4). La liaison des facteurs de croissance (FC) à leurs récepteurs (RFC) permet l'activation des protéines MAPK. Celles-ci, à leur tour, activeront les RE par phosphorylation de leurs domaines kinases. (Illustration originale)

1.3.5 Effets des estrogènes

1.3.5.1 Effets *in vitro*

In vitro, l'estrogène agit de manière favorable sur plusieurs facteurs de risque de la maladie cardiaque athérosclérotique. Dans un premier temps, l'estrogène inhibe l'expression des molécules d'adhésion, tel que la E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1, sur les cellules endothéliales stimulées par une molécule inflammatoire.¹¹⁵ Reliée à l'athérosclérose, cette inhibition permettrait de limiter l'infiltration des leucocytes vers la média et ainsi préviendrait le développement précoce de la plaque athéromateuse.

L'estrogène étend ses effets cardioprotecteurs à d'autres molécules inflammatoires. En effet, sur une population de neutrophiles provenant d'hommes et de femmes, l'estrogène induit une régulation à la hausse de l'enzyme neuronal NOS, qui permet de réduire l'adhésion des neutrophiles à la paroi endothéliale.¹¹⁶ Selon Ito, ce processus d'inhibition de chimiotactisme leucocytaire est régulé par un mécanisme dépendant des RE.¹¹⁷ À cet effet, nous avons démontré qu'un traitement au 17 β E dans des cellules endothéliales vasculaires inhibe la régulation positive de l'expression de CD40 / CD40L (ligand), deux protéines impliquées dans le recrutement leucocytaires. Cette inhibition est modulée par le RE α et permet la prévention de l'adhésion des neutrophiles à la surface des cellules.¹¹⁸ *In vivo*, cela pourrait empêcher cette population de cellules inflammatoires de pénétrer la paroi vasculaire et ainsi réduire la réaction inflammatoire menant à l'évolution de la plaque athérosclérotique.

De même, il a aussi été démontré *in vitro* et *in vivo* que les estrogènes régulent à la hausse le ligand Fas (FasL), impliqué dans les voies d'apoptose

cellulaire.¹¹⁹ En condition pathologique, par exemple en hypercholestérolémie, la molécule FasL est régulée à la baisse, provoquant l'infiltration des monocytes/macrophages à l'endothélium. La restauration à la hausse du niveau de FasL par les estrogènes permet de limiter l'infiltration leucocytaire à l'endothélium, réduisant la réaction inflammatoire et la formation de l'athérosclérose. *In vitro*, il a également été démontré que ce mécanisme est dépendant des RE et passerait par la voie du NO.¹¹⁹

Outre ces effets sur les molécules inflammatoires, des essais de culture cellulaire ont aussi démontré une prolifération de cellules endothéliales suite à un traitement aux estrogènes.¹²⁰ Contrairement, un traitement au 17 β E provoque une inhibition de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses.^{121, 122} Ainsi, la prolifération des cellules endothéliales pourrait favoriser la réendothélialisation et éviter une réaction inflammatoire prolongée suite à une lésion endothéliale causée par exemple par les forces de cisaillement ou encore par un ballonnet ou une endoprothèse coronarienne lors de l'angioplastie. Quant à l'inhibition de la prolifération et migration des cellules musculaires lisses suite à un traitement estrogénique, elle peut signifier l'inhibition de la progression de la plaque athérosclérotique à des stades plus avancés.

1.3.5.2 Effets *in vivo*

Plusieurs études sur des modèles animaux ont démontré des effets bénéfiques des estrogènes quant à la prévention de l'athérosclérose ou de la resténose. En effet, des études effectuées chez le porc et le singe *cynomolgus* ont démontré des effets vasodilatateurs de l'estradiol sur les artères coronaires.^{123, 124} Il est bien connu que ces effets régis par les estrogènes sont dus à une augmentation de la production de NO, facteur

relâché par l'enzyme eNOS.¹²⁵ Ce relâchement de NO pourrait être un joueur primordial quant aux effets positifs procurés par l'estrogène sur le système vasculaire. En effet, une surproduction de NO permet d'inhiber la contraction des cellules musculaires lisses dans la média, favorisant une vasodilatation et ainsi une meilleure circulation sanguine. De même, le NO contribue à diminuer l'expression des molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium et à inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses, deux processus anti-athérosclérotiques.¹²⁶ Dans un autre modèle, celui de resténose induit par blessure vasculaire, un traitement à l'estradiol favorise aussi la production de NO et la réendothélialisation vasculaire deux semaines suivant la blessure comparativement au groupe témoin.¹²⁷ Notre laboratoire a également démontré une réduction de la resténose suite à une livraison locale de 17 β E dans un modèle porcin ayant subi une angioplastie avec implantation d'une endoprothèse coronarienne.¹²⁸ En effet, le traitement au 17 β E a permis une réduction de l'inflammation et de la prolifération et migration des cellules musculaires lisses vers l'intima, alors qu'il a favorisé une meilleure réendothélialisation comparativement aux animaux traités avec le véhicule seulement.¹²⁸

En contrepartie, il a aussi été démontré chez le lapin qu'un traitement aux estrogènes réduit la production de collagène au niveau de l'aorte.¹²⁹ Cette inhibition de production de collagène pourrait contribuer à l'instabilité de la plaque et favoriser l'apparition d'événements cliniques tels l'angine instable et l'infarctus du myocarde. Ainsi, l'estradiol pourrait être favorable à la prévention de l'apparition de la plaque athérosclérotique, mais risquée à des stades avancés de la maladie.

Enfin, il serait incomplet de terminer sans mentionner les études provenant de modèles *knockout*, où l'un des deux récepteurs est absent ou non fonctionnel. Le laboratoire de Mendelsohn a travaillé à partir d'un modèle de

souris ovariectomisées dont le gène codant pour le RE α était non fonctionnel. Son équipe a induit une blessure vasculaire dans une carotide (modèle de resténose), puis a traité les souris par HTR au 17 β E pendant 14 jours. Par la suite, l'épaisseur de la média, le dépôt de protéoglycans et la prolifération des cellules musculaires lisses ont été mesurées. Le traitement à l'estradiol des souris *knockout* pour le RE α n'a induit aucun effet sur les paramètres étudiés en comparaison aux souris traitées au véhicule, suggérant l'importance du RE α dans la médiation des effets cardioprotecteurs des estrogènes.¹³⁰ Une expérience similaire a été répétée dans un modèle de souris *knockout* pour le RE β . Les résultats ont été tels que l'estradiol a prévenu l'épaississement de la média et la prolifération des cellules musculaires lisses dans une même proportion chez les souris *knockout* pour le RE β et les souris normales.¹³¹ Ainsi combinés, ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la présence du RE α est nécessaire afin de bénéficier d'une protection estrogénique contre la formation de l'athérosclérose et de la resténose suite à une blessure vasculaire. L'implication du RE β ou d'un autre isoforme demeure cependant envisageable.

1.3.5.3 Études cliniques

Les traitements aux estrogènes chez la femme ménopausée ont d'abord été conçus afin de réduire les symptômes liés à la ménopause (bouffées de chaleur, insomnie, léthargie, humeur dépressive et sécheresse vaginale), de traiter l'atrophie du système utérin et de prévenir l'ostéoporose.¹³² En 1975, l'ajout d'un progestatif au comprimé d'estrogènes a été réalisé afin de prévenir le cancer de l'endomètre, en croissance suite à un traitement aux estrogènes seuls.¹³³

Dans les années subséquentes, plusieurs études d'observation ont suggéré des effets bénéfiques des estrogènes sur le système cardiovasculaire.^{134, 135} Ces études ont ouvert une porte à la prescription d'estrogènes dans un cadre de prévention des maladies cardiovasculaires et déjà en 1996, l'organisation mondiale de la santé publiait un bilan positif de l'hormonothérapie de remplacement (HTR). Ce rapport suggérait que les femmes sous HTR présentaient un risque réduit d'infarctus du myocarde ou de mort par maladies coronariennes de 44% par rapport à celles ne suivant aucun traitement.¹³⁶ D'après les études des équipes de Grady et Barrett Connor, cette réduction se retrouvait entre 30 et 35%.^{134, 135}

D'autres études de cas proposaient aussi un rôle des hormones sexuelles, tel que l'estrogène, dans le contrôle du développement de la maladie cardiaque athérosclérotique.¹³⁷ En effet, les cas de cinq hommes déficients au niveau de l'action de leurs estrogènes, soit par une résistance due à une mutation de leur RE α ou encore de la synthèse de l'hormone, ont démontré la présence d'athérosclérose très tôt dans leur vie. Associé à l'augmentation de la masse de leurs tissus adipeux viscéraux et du syndrome métabolique, la formation de plaques athérosclérotiques pouvaient mener à l'infarctus du myocarde.¹³⁸⁻

142

Finalement, plusieurs études cliniques randomisées telles que la *Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention (PEPI)* et la *Nurses' Health Study* semblaient indiquer une voie prometteuse des estrogènes quant à la prévention et/ou la régression de la maladie cardiaque athérosclérotique. Cependant, d'autres études qui ont suivi n'ont pas démontré d'effet bénéfique des estrogènes, remettant en question son rôle de prévention primaire ou secondaire des maladies cardiovasculaires.

Postmenopausal Estrogen/Progestin Intervention (PEPI) ¹⁴³

L'étude *PEPI* est l'une des premières études effectuées visant à déterminer les effets cliniques de l'estrogène seul ou en combinaison avec un progestatif. Cette étude, d'une durée de trois ans, incluait 875 femmes ménopausées traitées soit au placebo, aux estrogènes seuls (conjugué équivalent d'estrogène (CEE)), aux estrogènes combinés à un progestatif cyclique [soit la médroxyprogestérone acétate (CEE + MPA) ou la progestérone micronisée (CEE + MP)] ou aux estrogènes combinés avec un progestatif administré de façon continue (CEE + MPA). L'équipe de chercheurs avait pour objectif de mesurer quatre paramètres : **(1)** le niveau de molécules de cholestérol HDL, **(2)** la pression artérielle, **(3)** la concentration d'insuline présente dans le sérum et **(4)** le niveau de fibrinogène. Ces paramètres font tous partie des facteurs de risque de la maladie cardiaque athérosclérotique.

Dans le cadre de cette étude, il a été démontré que les traitements aux estrogènes seuls ainsi que les traitements combinés aux estrogènes et à un progestatif, toutefois de façon moindre, augmentait le niveau de HDL et diminuait le niveau de LDL par rapport au groupe traité au placebo. D'autre part, le groupe ayant été traité au placebo présentait une augmentation du niveau de fibrinogène par rapport aux groupes traités aux estrogènes avec ou sans progestatif. Aucune différence entre les groupes n'a été observée pour la pression artérielle et la concentration d'insuline dans le sérum. Ces résultats suggèrent que l'HTR réduirait certains facteurs de risque de la maladie cardiaque athérosclérotique. En effet, une augmentation du niveau de HDL et une diminution du niveau de LDL pourraient diminuer le processus inflammatoire menant à la plaque athérosclérotique. De même, une réduction du niveau de fibrinogène par rapport au placebo suite à l'HTR pourrait permettre une meilleure stabilisation de la plaque et une réduction du risque

d'événements cardiaques majeurs tels que l'angine instable ou l'infarctus du myocarde.

Nurses' Health Study^{144, 145}

La *Nurses' Health Study* a débuté en 1976. Cette étude avait pour objectif de mesurer le risque de maladies cardiovasculaires reliées à l'HTR par estrogène seul. Cette étude, déroulée pendant 10 ans, incluait 48 470 femmes ménopausées (par chirurgie ou naturellement) de 30 à 63 ans sans histoire de maladie cardiovasculaire. Par la suite, un deuxième volet a été créé afin d'évaluer le risque de propension de maladies cardiovasculaires chez des femmes ménopausées de 30 à 55 ans sous HTR aux estrogènes combinés à un progestatif (n= 50337, suivies pendant 16 ans).

Les résultats de la *Nurses' Health Study* démontrent que le risque de développer une maladie coronarienne est plus faible chez les femmes suivant une HTR aux estrogènes seuls. De même, la mortalité causée par une maladie cardiovasculaire est diminuée chez ces femmes. Enfin, l'incidence relative de présenter une maladie vasculaire cérébrale ne varie pas suite à un traitement par HTR aux estrogènes seuls. Quant aux effets du progestatif dans une HTR combinée avec estrogènes, il ne semblerait pas en atténuer les effets cardioprotecteurs.

Enfin, les auteurs concluent aussi que la cessation de l'HTR chez la femme ménopausée provoque, trois ans plus tard, une réduction quasi totale des effets bénéfiques jadis engendrés par l'estrogène.

The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)¹⁴⁶

L'étude *HERS* a été l'une des premières à contredire les études précédentes, qui affirmaient un rôle bénéfique des estrogènes sur la réduction du risque de développer une maladie coronarienne.

HERS a été conçue afin d'évaluer les effets cardiovasculaires d'une combinaison hormonale d'estrogène et de progestérone (prémarin 0,625 mg + médroxyprogestérone acétate (MPA) 2,5 mg une fois par jour) administré par voie orale sur une population de femmes déjà atteintes de maladies coronariennes. En effet, la majorité d'entre elles avaient alors déjà subi une angioplastie (45%) ou un pontage (42%) afin de permettre une meilleure irrigation sanguine au cœur. 2763 femmes de moins de 80 ans – moyenne de 67 ± 7 ans – ont été inscrites dans l'étude et ont été suivies pendant environ 4,1 ans. Pendant le traitement, plusieurs de ces femmes étaient sous seconde médication : aspirine (78%), β -bloqueurs (33%), médication de réduction de lipides (45%), bloqueurs de canaux calciques (55%), inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (17%), diurétiques (28%) et multi-vitamines (29%).

Les résultats n'ont démontré aucune différence significative entre le nombre d'infarctus du myocarde ou de mort attribuable à une maladie coronarienne chez les femmes traitées à l'HTR ou au placebo. Cependant, les événements cardiaques ont suivi un modèle de temps différent. En effet, plus d'événements cardiaques se sont produits dans la première année chez le groupe de femmes traitées par HTR comparativement à celles traitées au placebo, alors que moins d'événements se sont produits dans les années quatre et cinq. De même, bien qu'aucune différence du nombre d'événements n'ait été observée au total, les femmes ayant été traitées par HTR ont démontré une diminution de 11% de leurs LDL et une

augmentation de 10% de leurs HDLs, diminuant ainsi leur profil de risque d'hypercholestérolémie.

Une augmentation d'événements thrombotiques a été observée chez les femmes traitées par HTR alors qu'aucune différence notable entre les deux groupes n'a été observée concernant les fractures, les cancers et la mortalité globale.

En conclusion, les investigateurs de cette étude ont déterminé qu'une HTR orale aux CEE + MPA ne réduisait pas le risque d'événements cardiovasculaires secondaires chez les femmes ayant une maladie coronarienne pré-établie. Cependant, ils ont émis l'hypothèse que ce traitement puisse être favorable à long terme étant donné la baisse d'événements cardiaques observés aux années quatre et cinq de traitement avec HTR.

*HERS II*¹⁴⁷

Suite aux conclusions de *HERS*, le groupe de recherche a tenté de déterminer si la réduction du nombre d'événements cardiaques observée aux années quatre et cinq de *HERS* persisterait dans le temps et réduirait le pourcentage de risque d'événements cardiaques. La majorité des patientes (93%) toujours suivies au bout de 4,1 ans ont accepté de se faire suivre pour 2,7 ans supplémentaires.

Suite à ce délai, les chercheurs n'ont pu observer de réduction significative d'événements cardiaques comparativement au placebo, tel que ce fût le cas aux années quatre et cinq de *HERS*. Ainsi, après 6,8 ans de traitement, les chercheurs ont conclu qu'une HTR par prévention secondaire ne réduisait

pas le risque d'événements cardiaques et/ou de mortalité dû à la maladie coronarienne à long terme.

Plusieurs hypothèses quant à la faible efficacité de l'HTR ont été soulevées. Parmi celles-ci, mentionnons les effets inhibiteurs que la MPA pourrait avoir sur ceux des estrogènes.¹⁴⁸ Cette hypothèse a conduit à l'étude *Estrogen Replacement on the Progression of Coronary-Artery Atherosclerosis (ERA)*, qui cherchait à savoir si un traitement à l'estrogène seul réduirait le risque d'événements cardiaques chez les femmes en prévention secondaire.

*Estrogen Replacement on the Progression of Coronary-Artery Atherosclerosis (ERA)*¹⁴⁹

Cette étude, qui consistait à évaluer la progression de la plaque athérosclérotique chez des patientes souffrant de maladie coronarienne, a rassemblé 309 femmes. Elles ont été randomisées selon trois groupes de traitements oraux : CEE seul (0,625 mg), CEE (0,625 mg) + MPA (2,5 mg) ou placebo. Une angiographie fut réalisée $3,2 \pm 0,6$ ans plus tard afin d'évaluer la progression de la plaque athérosclérotique. Tout comme dans l'étude *HERS* (I et II), la moyenne d'âge des femmes soumises à l'étude (66 ans) était supérieure à l'âge moyen d'apparition de la ménopause chez les femmes, qui est de 51 ans.¹⁵⁰ De même, une majorité de femmes était aussi traitées avec une seconde médication.

Les résultats ont démontré que des traitements aux estrogènes seuls ou aux estrogènes et à la progestérone pendant $3,2 \pm 0,6$ ans ne réduisaient pas la progression de la plaque athérosclérotique chez des femmes ayant une maladie coronarienne pré-établie. Les événements cardiovasculaires n'étaient pas différents comparativement au groupe de femmes traitées au placebo. L'équipe n'a cependant pas réussi à confirmer l'observation du

groupe *HERS*, qui soutenait une augmentation des événements cardiaques dans la première année de traitement. Toutefois, elle a aussi démontré une réduction des niveaux de LDL et une amélioration des niveaux de HDLs.

Bien que le nombre de sujets et la durée de l'étude aient été peu élevés, les résultats semblent s'accorder avec ceux des études *HERS* I et II. Ainsi, la capacité des estrogènes à réduire le risque de maladie cardiaque athérosclérotique pourrait résider dans la prévention du développement de la plaque plutôt que dans sa régression. En effet, il est reconnu que le vieillissement et l'athérosclérose sont associés à une plus grande dysfonction endothéliale.¹⁵¹ Ainsi, une fois le processus inflammatoire de l'endothélium menant à la formation de la plaque athérosclérotique enclenché, il pourrait être plus difficile pour les estrogènes d'induire leurs effets bénéfiques. Cependant, ceux-ci pourraient être favorables dans des cas de prévention primaire de maladies coronariennes.

The Women Health Initiative (WHI)^{152, 153}

L'étude *WHI* comportait plusieurs bras de recherche, dont deux portant sur les effets bénéfiques et les risques cardiovasculaires et globaux que comportent **1)** une hormonothérapie combinée sous estrogènes et progestatif (1 capsule de CEE 0,625 mg + MPA 2,5 mg par jour) comparativement au placebo et **2)** une hormonothérapie par estrogènes seuls (1 capsule de CEE 0,625 mg par jour) comparativement au placebo sur des femmes en santé (relativement à leur tranche d'âge). Un total de 16 608 patientes avec un utérus intact a été admis dans le premier volet de recherche devant durer 8,5 ans. La moyenne d'âge de ces femmes était de 63 ans.

Après 5,2 ans de suivi, l'étude fut arrêtée en raison de risques accrus que présentait une hormonothérapie combinée sur la santé générale des femmes

par rapport aux effets bénéfiques potentiels. L'augmentation du nombre de cancers du sein invasif, d'événements cardiaques reliés à une maladie coronarienne, d'accidents vasculaires cérébraux et d'embolies pulmonaires ont contribué à la cessation prématurée de cette étude, dont les effets bénéfiques (réduction de fractures de la hanche et autres fractures, cancers du colon) ne pouvaient en aucun cas compenser les conséquences négatives (tableau 2). Toutefois, suite à cette période de temps (5,2 ans), le volet de l'étude où l'hormonothérapie aux estrogènes seuls était administrée demeurait toujours en cours, mais sous surveillance étroite, puisque les effets bénéfiques versus les risques pour la santé n'avaient toujours pas été déterminés.

Tableau 2. Effets de l'hormonothérapie combinée sur la santé globale des femmes de l'étude WHI par rapport au placebo.

Effets cliniques	Augmentation (en %)	Diminution (en %)	Aucune différence
Événements cardiaques (infarctus non fatal)	29		
Mortalité par maladie cardiovasculaire			X
Procédure de revascularisation (angioplastie / pontage)			X
Accident vasculaire cérébral	41		
Thromboembolie veineuse	100		
Cancer du sein	26		
Cancer du colon		37	
Cancer de l'endomètre			X
Cancer du poumon			X
Fracture de la hanche		33	

(Adapté du Women's Initiative Group. (2002) *Jama*)¹⁵³

Ce volet, constitué de 10 739 femmes âgées de 50-79 ans – moyenne de 64 ans – ayant déjà eu recours à l'hystérectomie, ont reçu 0,625 mg de CEE ou de placebo. Suite à 6,8 ans de suivi, l'Institut National de la Santé (NIH) a décidé, tout comme pour le premier volet, de cesser l'étude d'une durée prévue de 8,5 ans. Toutefois, contrairement aux résultats provenant de l'étude par hormonothérapie combinée, l'estrogène seul ne semblait pas affecter le risque de présenter une maladie cardiovasculaire par rapport au placebo. Il y avait cependant une augmentation du risque d'accidents vasculaires cérébraux semblable à celui rapporté dans le premier volet de l'étude. L'incidence de cancer du sein était inférieure de 23% dans le groupe traité au CEE comparativement au placebo, sans toutefois être statistiquement significatif.

Ainsi, l'étude *WHI* n'a pu valider les effets bénéfiques d'une hormonothérapie telles que les études d'observation le suggéraient. Cependant, elle suit la lignée des études *HERS* (I et II) et *ERA*, qui tendent à démontrer qu'une hormonothérapie aux estrogènes seuls ou combinés à un progestatif, par prévention primaire ou secondaire, n'apporte aucun effet bénéfique sur la santé cardiovasculaire et peut même, selon les études, y nuire.

Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux résultats contradictoires des études randomisées. Parmi celles-ci, mentionnons la formulation des drogues utilisées (CEE et MPA), leurs concentrations (0,625mg et 2,5 mg respectivement) et voie d'administration (voie orale), qui ne sont pas forcément des conditions optimales de traitement. Enfin, le temps écoulé depuis le début de la ménopause a aussi pu jouer un rôle considérable sur ces résultats. En effet, bien que les femmes ayant participé à l'étude étaient en bonne santé, la biologie vasculaire de l'endothélium n'est pas la même chez une femme en périménopause que chez une femme plus âgée.¹⁰⁸ L'incidence et l'épaisseur de la plaque athéromateuse augmentent

significativement de cinq à huit ans après la ménopause.¹⁵⁴ De même, les niveaux de LDL sont accrus dans les trois ans suivant le début de la ménopause, contribuant ainsi à renforcer le signal pro-inflammatoire menant à la formation de la plaque.¹⁵⁴ Comme les femmes sous traitements dans ces études avaient en moyenne 64 ans – donc en ménopause depuis en moyenne 13 ans – ces effets cliniques auraient pu se manifester avant même le début de ces études. Cela permettrait d'expliquer l'absence d'effet bénéfique des estrogènes sur le système cardiovasculaire, si l'on émet l'hypothèse que les estrogènes pourraient prévenir, mais non réduire la formation d'athérosclérose une fois la maladie développée. À cet effet, une analyse secondaire des données provenant de l'étude *WHI* conclue que l'initiation d'une HTR peu de temps après le début de la ménopause permet de réduire, toutefois de façon non significative, le risque de maladies cardiovasculaires comparativement aux femmes traitées tardivement.¹⁵⁵ Une tendance similaire a été observée quant à la mortalité totale, cependant le risque de présenter un accident vasculaire cérébral demeurait le même peu importe le délai d'initiation du traitement suivant la ménopause. De nouvelles données provenant des études *Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS)* et *Early versus Late Intervention Trial with Estradiol (ELITE)* présentement en cours nous amèneront une meilleure compréhension de cette question.

Ainsi, malgré une réduction des niveaux de LDL et une amélioration des niveaux de HDLs, la plupart de ces études n'ont pas démontré d'effets bénéfiques des estrogènes à court et à long terme sur les maladies cardiovasculaires, en particulier la maladie cardiaque athérosclérotique. Les mécanismes estrogéniques régulant l'activité cardiovasculaire doivent être ré-étudiés afin de mieux comprendre les résultats observés dans les études randomisées et permettre un traitement plus optimal.

1.4 But du travail de recherche

À la lumière des études randomisées *WHI*, *HERS I* et *II* ainsi que *ERA*, notre laboratoire a cherché à comprendre l'absence d'effets cardioprotecteurs des estrogènes, pourtant présents dans plusieurs modèles animaux et études *in vitro*. Tel que mentionné précédemment, plusieurs facteurs pourraient expliquer ces résultats contradictoires tels que la formulation des drogues utilisées, la voie d'administration et l'intervalle de temps écoulé depuis le début de la ménopause des sujets avant le traitement d'une hormonothérapie. Ainsi, il est possible d'envisager que l'absence d'estrogène pour une période prolongée, c'est-à-dire pendant la ménopause, entraîne une modification du niveau d'expression des RE exprimés par les cellules vasculaires et/ou une défaillance de leurs voies de signalisation. De même, ces modifications pourraient aussi survenir chez des femmes présentant déjà une maladie cardiaque athérosclérotique, expliquant l'absence d'effet par prévention secondaire des maladies cardiovasculaires. À cet effet, une étude a déjà démontré une réduction du niveau de RE α chez des femmes préménopausées avec maladie cardiaque athérosclérotique en comparaison avec des femmes préménopausées ayant des artères saines.¹⁵⁶

Les deux objectifs de mon étude étaient donc (1) d'étudier l'expression des récepteurs à l'estrogène suite à une privation à long terme d'estrogène dans un modèle de souris ménopausées. Par la suite, (2) nous voulions vérifier la capacité de réponse des récepteurs à l'estrogène et de leurs voies de signalisation suite à une stimulation ponctuelle ou à une hormonothérapie soutenue aux estrogènes dans le modèle de ménopause chez la souris.

Ces études avaient pour but de nous permettre de mieux comprendre l'impact vasculaire de la privation de l'estrogène sur ses voies de signalisation, de même que la capacité d'une hormonothérapie à les rétablir. Les résultats de ces travaux pourraient aider à optimiser ces traitements chez les patients avec maladie coronarienne.

2.0 ARTICLE SCIENTIFIQUE

Short-Term Versus Long-Term Estrogen Depletion Differentially Modulates Estrogen Receptor Expression and MAPK p42/44 Signaling Pathway in Mice Carotid Artery

Stéphanie Gagnon^{1, 2}, Vikie Lamontagne^{1, 2}, Caroline Lemieux^{1, 2},
Isabelle Cloutier¹, Jean-François Tanguay^{1, 2, 3}

Running Head: Hormone Replacement Therapy, Aging and Estrogen Pathway

¹From the Montreal Heart Institute Research Center (S.G., V.L., C.L., I.C., J-F.T.); ²Department of Biomedical Sciences (S.G., V.L., C.L., J-F.T.) and ³Department of Medicine (J-F.T), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence; Dr Jean-François Tanguay, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3250; Fax: (514) 593-2596;

E-mail: 

2.1 Abstract

Numerous experimental evidences and observational studies have suggested cardioprotective effects of estrogens. However, randomized controlled trials studying hormone replacement therapy (HRT) in menopausal women failed to show clinical benefits. This apparent contradiction could be explained by the average 10-years menopause-to-HRT treatment delay in women enrolled in these studies. Long-term estrogen deprivation could have deleterious impacts on estrogen receptors (ER) expression and signaling pathways. In the current study, we tested the influence of estrogen depletion on ER protein expression of 3, 7.5 and 15 weeks C57BL/6 ovariectomized mice. Then, we investigated MAPK p42/44 signaling pathway and ER expression on 3 and 15 weeks ovariectomized mice after a 17-beta-estradiol (17 β E) injection or an estrogen replacement therapy (ERT). Analyses of carotid tissues demonstrated a 114% increase of ER α expression shortly after estrogen deprivation, followed by a 72% linear decrease over time. Interestingly, MAPK p42/44 activity varied in function of treatment modes and length. MAPK p42/44 activity was upregulated by 393% after a 17 β E injection 36h prior to sacrifice in mice ovariectomized for three weeks, an increment that was no longer detectable in mice treated 15 weeks after ovariectomy. However, in the later group, an ERT of 28 days activated MAPK p42/44 pathway by 574%. The post-treatment expression of MAPK p42/44 and ER α alone could not explain the increase in MAPK p42/44 activity. This study demonstrates that ER expression and MAPK p42/44 signaling pathway are modified during menopause and after hormone reintroduction. These alterations could partially explain the absence of cardiovascular benefits in the HRT clinical trials.

Keywords: Menopause, Estrogen treatments, Signaling activity

2.2 Introduction

For decades, the increased prevalence of cardiovascular diseases observed among postmenopausal women has been attributed to plasma estrogen deprivation following menopause.(23) In the early 1990's, clinical observations have suggested that HRT could reduce by 30 to 45% the risk of cardiovascular events in postmenopausal women.(3, 6, 17, 32) Indeed, in several animal models, 17-beta-estradiol ($17\beta\text{E}$), the active estrogenic agent of HRT, was shown to reduce atherosclerosis progression.(7, 11, 24, 33, 36) Furthermore, estrogens also demonstrated their capacity to increase nitric oxide (NO) bioavailability, and to reduce both the level of atherogenic LDL and the expression of adhesion molecules at the endothelium surface.(10, 18, 20, 21, 25, 28, 34, 35) Taken together, these findings suggest that estrogens may exert a protective effect on the coronary endothelium and prevent atherosclerosis progression.

However, randomized-controlled trials such as the Women's Health Initiative (WHI), the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS) and the Estrogen Replacement on the Progression of Coronary-Artery Atherosclerosis (ERA) failed to demonstrate positive effects of HRT on primary and secondary prevention of coronary artery disease.(1, 16, 20, 21) For instance, in the WHI and HERS studies, estrogens were even associated with a significant increase in the risk of stroke during the first year of treatment.(1, 21) In most of these trials, the delay between menopause and the initiation of an HRT has been proposed to explain some of the discrepancies between clinical and experimental evidences.(1, 12, 16, 20, 21) Recent data analyses from the WHI study support the importance of treatment delay as a reduced trend in the risk of presenting a cardiovascular disease was observed if HRT was initiated early as compared to later after menopause.(31) Accordingly, we

hypothesize that estrogen receptors (ER) expression and signaling pathways may be disturbed in long-term estrogen deficient organisms, contributing to explain the lack of response to estrogens in cardiovascular patients.

In the current study, we examine the impact of short- and long-term estrogen deprivation on ER protein expression and MAPK p42/44 cascade of carotid tissues in a surgical menopause mice model. The MAPK p42/44 cascade is a predominant estrogenic signaling pathway that could be implicated in coronary artery disease. Dual phosphorylations of tyrosine and threonine residues on MAPK p42/44 are responsible for the integration and transmission of molecular signals leading to cellular growth and differentiation.(4, 29) In addition, activated MAPK p42/44 can also be liable for the increase expression of inflammatory molecules such as the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), the transforming growth factor-beta 1 (TGF β -1) and the plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1).(37) With aging, both the activation of MAPK p42/44 and the proliferation rate of vascular smooth muscle cells (VSMC) increase, contributing to atherosclerosis disease development.(13)

It has already been shown in a rabbit vascular balloon injury model that VSMC proliferation and neointimal formation is abrogated after treatments with a MAPK p42/44 inhibitor.(14) Since estrogens also demonstrated an inhibition of MAPK p42/44 phosphorylation in VSMC, associated with a decrease of cellular proliferation and migration *in vivo* (26) and *in vitro* (15), emphasis was drawn on the adequacy of estrogen treatments to prevent the progression of atherosclerosis. Thereafter, we hypothesize that long-term estrogen deprivation could lead to a sustained activation of the MAPK p42/44 pathway. The length of hormonal depletion and the type of replacement therapy (acute versus chronic) could influence the activation state of this particular pathway after hormonal reintroduction. To this end, we assessed

the capacity of estrogens to modulate the sensitivity of the MAPK p42/44 signaling cascade after either short estrogen stimulation or estrogen replacement therapy (ERT). To our knowledge, this is the first paper to evaluate time-dependent alterations of the ER and MAPK p42/44 pathway in vascular tissues before and after $17\beta\text{E}$ treatments in ovariectomized animals. Alteration of the estrogen-dependent MAPK p42/44 pathway could partially explain the failure of estrogen-based hormonal therapies to demonstrate cardiovascular benefits in the WHI, HERS and ERA trials.

2.3 Material and Methods

Experimental Animals

For all experiments, C57BL/6 sexually mature (6 weeks old) female mice were used (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA). Mice were housed 4 per cage on a 12:12 h light-dark cycle and maintained on a phytoestrogen free/low protein diet (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad, Wilmington, DE) with water available *ad libitum*. Body weight was monitored weekly.

Four days after arrival, animals were bilaterally ovariectomized (OVX) or sham-operated under anesthesia (2% isoflurane for a 500 ml oxygen volume) via a dorsal incision. Buprenorphin (0.05 mg/kg) was injected subcutaneously after anesthesia. Blood samples were collected prior to ovariectomy, before treatment (when applicable) and at sacrifice. When required, sacrifices were performed using a 0.3 ml intraperitoneal injection of ketamin combined to xylazin NaCl solution (10 mg ketamin: 1 mg xylazin: 1 ml NaCl solution). The Montreal Heart Institute Animal Care and Use ethic committee approved all procedures.

Experimental Design

Effects of Estrogen Depletion Induced by Ovariectomy on ER α and ER β Expression

Tissue and plasma samples were obtained 3, 7.5 and 15 weeks after either a sham-procedure or an ovariectomy surgery. Plasma samples were stored frozen at -80 °C. Carotid arteries were quickly removed from all animals, frozen in 2-methylbutane and subsequently stored at -80 °C. Uteri were collected and fixed in buffered 10% formaldehyde. Estrogen receptor α and β

protein expression was measured by Western blot analyses on carotid protein extracts.

Effects of 17 β E Challenges on MAPK p42/44 Signaling Pathway and ER Expression after Short-Term or Long-Term Estrogen Depletion

C57BL/6 mice ovariectomized for 3 or 15 weeks were injected subcutaneously with either 17 β E (1 μ g/mice, Xenex, Coquitlam, BC) or with vehicle (1:1000 ethanol: NaCl) on the posterior aspect of the neck 6h or 36h prior to sacrifice depending on experimental group. All animals were treated with a second dose of 17 β E or vehicle 10 min. prior to sacrifice. Blood samples, carotid arteries and uteri were collected as previously described. MAPK p42/44 protein activity and expression as well as ER expression were measured by Western blot analyses on carotid protein extracts.

Effects of 17 β E ERT on MAPK p42/44 Signaling Pathway and ER Expression after Short-Term or Long-Term Estrogen Depletion

Three or 15 weeks after ovariectomy, continuous release pellet (Innovative Research of America, Sarasota, FL) containing 17 β E or placebo were subcutaneously implanted in mice at the level of the throat. Pellets were implanted for either 7 days (0.033 mg) or 28 days (0.133 mg). At sacrifice, plasma samples, carotid arteries and uteri were collected and analyzed as previously described.

Protein Extraction

Frozen carotids were rapidly plunged in a 4°C Radioimmuno-Precipitation Assay (RIPA) buffer and grinded with a polytron (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) twice for 15 sec. Tissues were kept in lysis buffer for 30 min at 4°C, and subsequently centrifuged at 4000 rpm for 15 min. at 4°C. Protein dosage of supernatants (total proteins) was performed by Bradford analyses.

Western Blot Analyses

For Western blot analyses, equal amount of total proteins (50 μ g) were migrated on 10% SDS-PAGE gels under reducing conditions and were

transblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. The membranes were incubated overnight with one of the following antibodies: rabbit polyclonal anti-ER α (MC-20, diluted 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit monoclonal anti-ER β (diluted 1:500, Alexis Biochemicals, Switzerland), anti-phospho-MAPK p42/44 (diluted 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-rabbit polyclonal MAPK p42/44 (diluted 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Visualization of protein bands was achieved with an anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (diluted 1:10 000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and a chemiluminescent reagent (Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Pierce, Rockford, IL). Membranes were stripped with Re-blot Plus (Chemicon International, Temecula, CA) and total protein expression was determined with a rabbit polyclonal anti-actin (I-19, diluted 1:10 000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Results are presented as the relative expression of ER α , ER β and MAPK p42/44 proteins normalized with the expression of actin. MAPK p42/44 activity is expressed as a phospho-MAPK p42/44 over MAPK p42/44 total protein expression ratio. Quantification was made using digital image densitometry (BioRad 4000, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON).

Determination of Plasmatic Estradiol Concentration

Blood samples (300 μ l) were collected from the saphenous vein prior to ovariectomy and treatments. Intracardiac puncture was made at sacrifice. Sera were separated by centrifugation (1000 rpm, 20 min., 4°C), and then 17 β E was extracted from plasma for quantification by ELISA (Neogen Corporation, Lexington, KY) following manufacturer's instruction. For each assay performed, positive control samples with known concentrations of estradiol were included as a standard curve to assess performance and reliability.

Statistical Analyses

Descriptive statistics (number of animals, mean, standard error to the mean (SEM), minimum and maximum) are presented by group for each parameter. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to study the parameters between intervention (Sham vs. OVX) and time before sacrifice (3 wks vs. 7.5 wks vs. 15 wks). The two-way ANOVA was applied to determine if there was an interaction between the two main effects (Intervention vs. Time). In case of a significant interaction, contrasts were used to compare intervention groups (Sham vs. OVX) at each time (3 wks vs. 7.5 wks vs. 15 wks). Otherwise, global conclusions were drawn based on the main intervention and the different time points of the model. The same method was used to study the effects between treatments (OVX vs. OVX + VHC vs. OVX + 17 β E) and pretreatment delay since ovariectomy (3 wks vs. 15 wks). Increases and reductions are expressed as absolute variations. All analyses were done using the SAS version 9.1 statistic program (SAS Institute Inc., Cary, NC) and conducted at the 0.05 significance level.

2.4 Results

Effects of Estrogen Deprivation Induced by Ovariectomy on ER Expression

We first assessed the effects of estrogen deprivation on ER α and ER β expression of carotid tissues. As expected, ER α expression did not vary significantly with time in sham-operated mice. However, in ovariectomized mice, ER α expression momentarily increased 3 weeks after surgery (114% vs. sham-operated control, $P = 0.0145$) to subsequently decline by 72% 12 weeks later (vs. 3 weeks OVX mice) and reach a lower level than age-matched sham-operated mice (80% decrease vs. sham-operated control, $P = 0.0333$) (Figure 1). Estrogen receptor β expression was also investigated for each animal group but its expression was below the detection level of the specific assay.

Effects of Estrogen Deprivation Induced by Ovariectomy on MAPK p42/44 Signaling Pathway

The activation of both ER isotypes can result from ligand-dependent interactions or independently of any ligand through activated-protein interactions, such as the MAPK.(9) Once activated, both ER maintain a tight association with the MAPK signaling cascade, a pathway they activate to induce estrogen effects.(22) Therefore, we postulated that the MAPK p42/44 signaling pathway would follow the same variation trends observed with the ER α expression late after ovariectomy. To verify this hypothesis, we compared MAPK p42/44 expression and activity on carotid protein extracts harvested 3 and 15 weeks after ovariectomy. For both the expression and the activity of MAPK p42/44, there was no interaction between the groups ($P = 0.1494$ and $P = 0.1023$, respectively), meaning that MAPK p42/44 signaling cascade varied in a similar manner between ovariectomized and sham-operated mice. Thereby, global conclusions were drawn based on the

interventional groups and the different time points of the model. MAPK p42/44 expression was found to be significantly lower at 15 weeks as compared to 3 weeks indifferently of the interventional group (OVX vs. sham) ($P = 0.0305$), with globally lower expression in the ovariectomized group ($P = 0.0119$) (Figure 2A). No statistical difference in the MAPK p42/44 activity was observed between ovariectomized and sham-operated animals (Figure 2B). However, MAPK p42/44 activity was higher 15 weeks after surgery indifferently of the interventional group (OVX vs. sham) ($P = 0.0398$).

Effects of 17 β E Treatments on MAPK p42/44 Protein Activity after Short-term or Long-Term Estrogen Depletion

After observing the effects of estrogen deprivation and ageing on MAPK p42/44 signaling pathway, we sought to evaluate its response to acute versus chronic 17 β E administration in short- versus long-term estrogen-depleted mice.

Challenges

Three weeks after ovariectomy, a 17 β E stimulation for 6h increased MAPK p42/44 activity by 156% and 392% as compared to non-treated and vehicle-treated ovariectomized animals, respectively (Figure 3A). However, at 15 weeks post-ovariectomy, the acute 17 β E stimulation could no longer enhance MAPK p42/44 activity (Figure 3A). Comparable results were obtained after a 36-hour 17 β E stimulation. In the 3 weeks ovariectomized mice, a 17 β E challenge enhanced MAPK p42/44 activity by 204% and 393% as compared to non-treated and vehicle-treated ovariectomized mice, respectively (Figure 3B). Fifteen weeks after ovariectomy, a 36-hour 17 β E challenge resulted in a significantly reduced MAPK p42/44 activity when compared to non-treated or to vehicle-treated ovariectomized control mice (reduction of 76% and 74%, respectively) (Figure 3B).

Estrogen Replacement Therapy

In our model, a 17 β E therapy for 7 days had no significant effect on MAPK p42/44 activity in neither 3- nor 15 weeks ovariectomized mice carotid tissues when compared to control groups (data not shown). A prolonged administration of 17 β E for 28 days had no effect on MAPK p42/44 activity levels in mice ovariectomized for three weeks (Figure 4). However, when administered 15 weeks after ovariectomy, a 28-day ERT led to an important increase of MAPK p42/44 activity when compared to non-treated and vehicle-treated ovariectomized mice (680% and 574%, respectively) (Figure 4).

Effects of 17 β E Challenges and ERT on MAPK p42/44 and ER Expression after Short-Term or Long-Term Estrogen Depletion

The post-estradiol expression level of MAPK p42/44 was assessed in an attempt to explain the variations in MAPK p42/44 activity after hormone treatments in carotid protein extracts from challenged- or ERT-treated animals. Interestingly, MAPK p42/44 expression and activity did not correlate after 17 β E treatments. When compared to non-treated and vehicle ovariectomized mice, a 6-hour or 36-hour 17 β E challenge did not seem to affect MAPK p42/44 expression. Similarly, neither 7- nor 28 days of 17 β E therapy affected MAPK p42/44 expression in 3 and 15 weeks ovariectomized mice (data not shown).

In the absence of variation in the expression of MAPK p42/44, we compared the effect of both 17 β E challenge and prolonged ERT on ER expression from carotid tissues of ovariectomized mice. Analyses of ER α expression from challenged- and ERT-treated mice did not reveal any significant difference either between 17 β E and vehicle-treated ovariectomized animals or 17 β E-treated and non-treated ovariectomized animals (data not shown). On the other hand, ER β expression was detected for the first time throughout the entire study. Its expression was upregulated 6h after a 17 β E injection in

3 weeks ovariectomized mice as compared to non-treated or vehicle-treated ovariectomized animals (Figure 5A). However, 36h after the $17\beta\text{E}$ challenge, ER β expression could no longer be detected, suggesting a transient induction of this ER in carotid tissues (Figure 5B). Similarly, ER β expression could not be detected after 28 days of ERT (Figure 5C) or in any other groups.

Estradiol Plasmatic Concentrations and Uteri Morphometry

To confirm the menopausal-like status, measures of $17\beta\text{E}$ plasmatic concentrations and uteri morphometry were performed. Differences in basal estradiol plasma concentrations between pre-OVX and ovariectomized mice could not be detected using an ELISA assay kit. Conceivable for human hormone detection, concentrations of estradiol quantified in plasma of sham-operated and ovariectomized mice may have been below the detection limit of the kit. The menopausal status was instead confirmed by uteri atrophy in ovariectomized mice as compared to normal size uteri in sham-operated mice (Figure 6). Injections of $17\beta\text{E}$ in ovariectomized mice resulted in higher estradiol plasma concentrations as compared to vehicle groups (Table 1). Again, in $17\beta\text{E}$ ERT-treated mice, uteri hypertrophy was the indicated reference of a successful $17\beta\text{E}$ treatment as compared to the atrophic uteri of vehicle-treated mice (Figure 6).

2.5 Discussion

In this study, we first demonstrate that long-term estrogen deprivation downregulates ER α and MAPK p42/44 expression, but not MAPK p42/44 activity, which increases with ageing. Secondly, we observed that acute estrogenic treatments administered shortly after menopause increases MAPK p42/44 signaling activity, an observation that is no longer valid with hormonal reintroduction late after estrogen depletion. Finally, chronic treatments with 17 β E did not modify MAPK p42/44 activity after 7 days of treatment in the 3 weeks- or 15 weeks ovariectomized mice. However, a longer term ERT of 28 days significantly increased MAPK p42/44 activity in the later group. To our knowledge, this is the first translational study to provide experimental data supporting the importance of HRT timing after menopause for the recuperation of non genomic estrogen receptor actions.

Modulations of ER α expression following ovariectomy or natural menopause have been previously characterized.(8, 27) However, the effect of estrogen stimulation on ER α signaling pathway following a long-term menopause has not been measured in vascular tissues. In this study, the expression of ER α was momentarily greater in carotid artery tissues of recently ovariectomized mice, but declined progressively over time. Similar temporal pattern in the expression of ER α expression has been reported in peripheral blood leucocytes of women recently menopausal.(8) These findings suggest that systemic estrogen depletion appears to trigger only a temporary upregulation of ER α expression.

In our study, the upregulation of ER α expression was associated with a decrease of MAPK p42/44 protein expression. This result partially confirms our initial hypothesis whereby baseline MAPK p42/44 protein expression 15

weeks after ovariectomy could be lower than age-matched sham-operated controls. However, ageing also appears to have an effect on MAPK p42/44 pathway since both the expression, and the activity, followed the same direction in the ovariectomized- and the sham-operated group during the 12-week interval study. However, inversely to expression, MAPK p42/44 activity increased regardless of the experimental groups (OVX and sham surgery).

Since estrogens were shown to reduce VSMC proliferation and migration *in vivo* through the inhibition of the MAPK p42/44 signaling cascade, one could expect a similar response after hormonal reintroduction in estrogen depleted organism. Accordingly, $17\beta\text{E}$ challenge administered 15 weeks after the ovariectomy resulted in the stabilization or diminution of MAPK p42/44 activity. Such recuperation in the $17\beta\text{E}$ inhibition of MAPK p42/44 activity in VSMC was not observed with a shorter 3-weeks challenge. Furthermore, an ERT for 7 days had no effect on MAPK p42/44 activity after 3- or 15 weeks ovariectomy, whereas the activity was greater with a 28-day ERT after 15 weeks ovariectomy as compared to 3 weeks. Because of the proliferation role of active MAPK on VSMC, this higher level of activity could partially explain the faster progression of atherosclerosis with ageing. Our best interpretation of these data would suggest that the treatment formulation and/or peak dose of $17\beta\text{E}$ might influence estrogenic effects on the cardiovascular system. Indeed, such as presented here in an early post-menopausal stage, a lower and continuous-release dose of $17\beta\text{E}$ (ERT) could be more effective to protect the cardiovascular system than a higher dose (as referred herein as a challenge). The later could be more beneficial after long-term estrogen depletion. However, even if the route of administration was identical (subcutaneous) for both the challenge injections and the ERT, we cannot exclude an impact of the treatment form (liquid vs. pellet) in regards to $17\beta\text{E}$ distribution in carotid artery tissues.

The MAPK p42/44 response to $17\beta\text{E}$ treatments in long-term ovariectomized mice parallels to a certain extent the clinical events observed in the WHI trial.(1) In the chronically (15 weeks) ovariectomized mice, short-term challenges or ERT led to stabilization or inhibition of the MAPK p42/44 activity whereas a longer ERT of 28 days increased it. This observation first suggests that $17\beta\text{E}$ could act as a negative regulator of the MAPK p42/44 activity during the acute phase response in long-term menopause organisms. Second, it also implies that estrogen-mediated increases of MAPK p42/44 activity could partially be responsible for the lack of cardioprotection of ERT in a long-term use. Inversely, stabilization of the MAPK p42/44 activity after short- and long-term ERT in recently ovariectomized mice implies better odds for ERT when administered early after menopause.

Another important observation realized in the course of our study was the lack of detectable $\text{ER}\beta$ protein expression in carotid tissues in every experimental group, except for the group of 3 weeks ovariectomized mice challenged with $17\beta\text{E}$ for 6h. This group of mice presented a marked increase of MAPK p42/44 activity, associated with a maximum initial $\text{ER}\alpha$ expression which was no further induced by $17\beta\text{E}$ challenges. Negative regulation of $\text{ER}\alpha$ by $\text{ER}\beta$ has been observed in breast cancer models and demonstrated that positive expression of *ER β 2* (a subtype of $\text{ER}\beta$) correlates with $\text{ER}\alpha$ downregulation.(38) Thereafter, in our estrogen-depleted model, we postulate that both the ratio of $\text{ER}\alpha/\text{ER}\beta$ expression and the role of ER isotypes could be modified to affect the acute response to estrogenic stimulation. The specific effects of $\text{ER}\beta$ overexpression on vascular tissues remain to be quantified since estrogen actions may vary throughout tissues.(5) However, as $\text{ER}\beta$ expression has been proven to be necessary for estrogen-induced prevention of hypertension (39), its overexpression shortly after menopause could exerts favorable effects on the cardiovascular system. Further vascular

studies will be necessary to examine these hypotheses and to obtain a better understanding of ER β actions in hormonal-deprived environments.

This first experimental study on the menopause-to-ERT treatment delay brings novel insights on possible alterations of estrogenic signaling pathways after menopause. However, we recognize the limitations of this study which include the young age of mice utilized for experimentations (6 weeks old). In the HRT randomized clinical trials, the mean age of women was approximately 63-67 years-old.(1, 12, 16, 20, 21) Thus, not only estrogen-depletion, but also aging, could have affected women's metabolic response to HRT. In addition, the next step of this initial study would certainly include the quantification of ER α activity in our model to better discriminate the impact of ER α on MAPK p42/44 activity. Based on the downregulation of MAPK p42/44 activity triggered by the 17 β E challenge 15 weeks after ovariectomy, we postulate that long-term estrogen deprivation could lead to downregulation and/or to specific phosphorylation pattern on ER α and ER β . These ER modifications could alter their reciprocal regulation with the MAPK p42/44 pathway, and thereby compromise others MAPK p42/44-dependent signaling pathways. Therefore, evaluation of other estrogen signaling pathways in our model, such as the phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3K)/ PKB and the MAPK p38, would certainly help to get a better comprehension of estrogen effects after menopause. Finally, evaluation of ER signaling activity on other tissues and vessels such as the aorta and the heart would also procure additional insights on estrogen mechanisms after hormone depletion.

In conclusion, this study shows that the response of vascular cells to 17 β E is strongly affected by the menopause-to-treatment delay and the modes of estrogen therapy. Indeed, we demonstrate for the first time that these two factors could have deleterious impacts on ER expression and their MAPK p42/44 signaling pathway activity. All together, these findings provide a

possible explanation for the apparent lack of efficacy of ERT to prevent atherosclerosis progression, and reinforce the importance to further evaluate the formulation and length of estrogen-based therapies for patients with coronary artery disease. The Kronos Early Estrogen Prevention Study (KEEPS) and the Early versus Late Intervention Trial with Estradiol (ELITE) are two important trials currently in progress that should provide additional insights on the ideal timing relative to menopause to introduce HRT to prevent cardiovascular diseases.(2, 19)

2.6 Acknowledgments

We gratefully thank Pascale Geoffroy, Sandra Gilligan and Julie Lebel for technical assistance and Mariève Cossette for statistical analyses.

2.7 Grants

Stéphanie Gagnon is recipient of the Montreal Heart Institute Research Center studentship.

Dr Jean-François Tanguay is a senior researcher supported by the 'Fond de la Recherche en Santé du Québec' (FRSQ), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), and the 'Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal'.

2.8 Disclosures

This work was fully supported by Estracure Inc. (Montreal, Quebec, Canada), whose mission is to develop and commercialize novel and safe estradiol-based therapeutic products to improve the treatment and clinical outcomes of patients suffering from coronary heart disease as well as other vascular diseases.

2.9 References

1. Effects of Conjugated Equine Estrogen in Postmenopausal Women Having Undergone Hysterectomy: The Women's Health Initiative Randomized, Controlled Trials. *Obstet Gynecol Surv* 59: 599-600, 2004.
2. ELITE: Early Versus Late Intervention Trial with Estradiol (NCT00114517). Clinical Trial gov.
3. Research on the Menopause in the 1990's., edited by Organization WH. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1996, p. 107p.
4. **Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, and Sturgill TW.** Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343: 651-653, 1990.
5. **Ascenzi P, Bocedi A, and Marino M.** Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 27: 299-402, 2006.
6. **Barrett-Connor E and Grady D.** Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 19: 55-72, 1998.
7. **Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Alexandersen P, Kauffman RF, and Christiansen C.** Raloxifene and estrogen reduces progression of advanced atherosclerosis--a study in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 154: 97-102., 2001.
8. **Bonomo SM, Rigamonti AE, Giunta M, Galimberti D, Guaita A, Gagliano MG, Muller EE, and Cella SG.** Menopausal transition: A possible risk factor for brain pathologic events. *Neurobiol Aging*, 2007.
9. **Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, and Picard D.** Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* 15: 2174-2183, 1996.
10. **Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, and Bender JR.** Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 98: 36-42, 1996.

11. **Chandrasekar B and Tanguay JF.** Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 36: 1972-1978., 2000.
12. **Dubey RK, Imthurn B, Barton M, and Jackson EK.** Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res* 66: 295-306, 2005.
13. **Gennaro G, Menard C, Giasson E, Michaud SE, Palasis M, Meloche S, and Rivard A.** Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 204-210, 2003.
14. **Gennaro G, Menard C, Michaud SE, Deblois D, and Rivard A.** Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in injured arteries by a novel, oral mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase inhibitor. *Circulation* 110: 3367-3371, 2004.
15. **Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, and 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* 22: 1585-1590, 2002.
16. **Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, and Wenger N.** Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama* 288: 49-57, 2002.
17. **Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, and Cummings SR.** Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 117: 1016-1037, 1992.

18. **Guo X, Razandi M, Pedram A, Kassab G, and Levin ER.** Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 280: 19704-19710, 2005.
19. **Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR, Miller VM, Naftolin F, and Santoro N.** KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study. *Climacteric* 8: 3-12, 2005.
20. **Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, and Waters D.** Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med* 343: 522-529, 2000.
21. **Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, and 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* 280: 605-613, 1998.
22. **Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, and McDonnell DP.** Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4686-4691, 1999.
23. **Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, and Gordon T.** Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 85: 447-452, 1976.
24. **Kauffman RF, Bean JS, Fahey KJ, Cullinan GJ, Cox DA, and Bensch WR.** Raloxifene and estrogen inhibit neointimal thickening after balloon injury in the carotid artery of male and ovariectomized female rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 459-465., 2000.

25. **Koh KK, Bui MN, Mincemoyer R, and Cannon RO, 3rd.** Effects of hormone therapy on inflammatory cell adhesion molecules in postmenopausal healthy women. *Am J Cardiol* 80: 1505-1507, 1997.
26. **Liu HM, Zhao XF, Guo LN, Tan Z, and Wang TH.** Effects of caveolin-1 on the 17beta-estradiol-mediated inhibition of VSMC proliferation induced by vascular injury. *Life Sci* 80: 800-812, 2007.
27. **Mohamed MK and Abdel-Rahman AA.** Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol* 142: 307-314, 2000.
28. **Oger E, Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Mennen L, Cambillau M, Guize L, Pujol Y, and Scarabin P.** Association of circulating cellular adhesion molecules with menopausal status and hormone replacement therapy. Time-dependent change in transdermal, but not oral estrogen users. *Thromb Res* 101: 35-43, 2001.
29. **Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, and Pouyssegur J.** Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8319-8323, 1993.
30. **Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, and Mendelsohn ME.** Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 90: 1087-1092, 2002.
31. **Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, and Stefanick ML.** Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Jama* 297: 1465-1477, 2007.
32. **Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, and Hennekens CH.** Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 325: 756-762, 1991.

33. **Sullivan TR, Jr., Karas RH, Aronovitz M, Faller GT, Ziar JP, Smith JJ, O'Donnell TF, Jr., and Mendelsohn ME.** Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest* 96: 2482-2488, 1995.
34. **Thompson LP, Pinkas G, and Weiner CP.** Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation* 102: 445-451., 2000.
35. **Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, and Sacks FM.** Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 325: 1196-1204, 1991.
36. **Williams JK and Suparto I.** Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: lessons from a monkey model of postmenopausal women. *Ilar J* 45: 139-146, 2004.
37. **Zhan Y, Kim S, Izumi Y, Izumiya Y, Nakao T, Miyazaki H, and Iwao H.** Role of JNK, p38, and ERK in platelet-derived growth factor-induced vascular proliferation, migration, and gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 795-801, 2003.
38. **Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Strom A, Toresson G, Lam EW, Cheng G, Gustafsson JA, and Dahlman-Wright K.** Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer Res* 67: 3955-3962, 2007.
39. **Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, and Mendelsohn ME.** Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295: 505-508, 2002.

2.10 Figure Legends

Figure 1 **Effect of estrogen deprivation induced by ovariectomy on ER α expression.** C57BL/6 female mice were ovariectomized or sham-operated and sacrificed 3, 7.5 or 15 weeks later. Carotid tissues were isolated and total proteins were extracted for western blot analyses. ER α expression was normalized over actin (ER α /actin ratio). * $P < 0.05$ as compared to sham-operated group. § $P < 0.05$ as compared to 15 weeks OVX. Values are mean \pm SEM. (n= 4-6 mice/group.)

Figure 2 **Effect of estrogen deprivation induced by ovariectomy on MAPK p42/44 activity and expression.** C57BL/6 female mice were ovariectomized or sham-operated for 3 or 15 weeks before sacrifice. Carotid tissues were isolated and total proteins were extracted for western blot analyses. **(A)** MAPK p42/44 expression was normalized over actin (MAPK p42/44/actin ratio) whereas **(B)** MAPK p42/44 activity was determined by the ratio of phospho-p42/44 level over total p42/44 expression. * $P < 0.05$ at 15 weeks as compared to 3 weeks in both groups. § $P < 0.05$ in sham-operated mice as compared to OVX mice at both times. Values are mean \pm SEM. (n= 5-6 mice/group)

Figure 3 **Effect of 17 β E challenges on MAPK p42/44 activity on 3 and 15 weeks ovariectomized mice.** C57BL/6 female mice were ovariectomized and 3 or 15 weeks later went under **(A)** a 6h or **(B)** a 36h 17 β E challenge. Then, mice were sacrificed and carotid tissues were isolated. Total proteins were extracted for western blot analyses. Ratios were calculated as phospho-p42/44 / total p42/44 expression. # $P < 0.05$ as compared to 3 weeks OVX + 17 β E, ** $P < 0.05$ as compared to 3 weeks OVX + vehicle, § $P < 0.05$ as compared to non-treated OVX, * $P < 0.05$ as compared to OVX + vehicle. Values are mean \pm SEM. (n=5-6 mice/group.)

Figure 4 **Effect of a 28-day 17 β E ERT on MAPK p42/44 activity on 3 or 15 weeks ovariectomized mice.** C57BL/6 female mice were ovariectomized and 3 or 15 weeks later were implanted with a 17 β E ERT pellet for 28 days. Then, mice were sacrificed and carotid tissues were isolated. Total proteins were extracted for western blot analyses. Ratios were calculated as phospho-p42/44 / total p42/44 expression. # $P < 0.05$ as compared to 3 weeks OVX + 17 β E, § $P < 0.05$ as compared to non-treated OVX, * $P < 0.05$ as compared to OVX + vehicle. Values are mean \pm SEM. (n=4-6 mice/group.)

Figure 5 **Effect of 17 β E on ER β expression in 3 weeks ovariectomized mice.** C57BL/6 female mice were ovariectomized and 3 weeks later underwent **(A)** a 6h 17 β E challenge, **(B)** a 36h 17 β E challenge or **(C)** a 28-day 17 β E ERT (n=6 mice/group). Then, mice were euthanized and carotid tissues were isolated. Total proteins were extracted for western blot analyses. Each row is constituted of 3 wells, respectively the intern control of the experiment (ER β expression in ovaries), carotid tissue extracts from vehicle-treated mice (vhc) and 17 β E-treated mice.

Figure 6 **Effects of estrogen depletion and 17 β E ERT on mice uterus morphology.** C57BL/6 female mice were **(a)** sham-operated or **(b)** ovariectomized for 3 weeks. In **(c)**, 3 weeks ovariectomized mice were implanted with a vehicle pellet for 7 days as compared to **(d)** 17 β E ERT. Representative uterus from a mouse of the 3 weeks ovariectomized group treated for 28 days with a vehicle pellet is presented in **(e)** as compared to **(f)** 17 β E ERT. Same morphology was observed at 15 weeks after ovariectomy (data not shown).

2.11 Figures

Figure 1

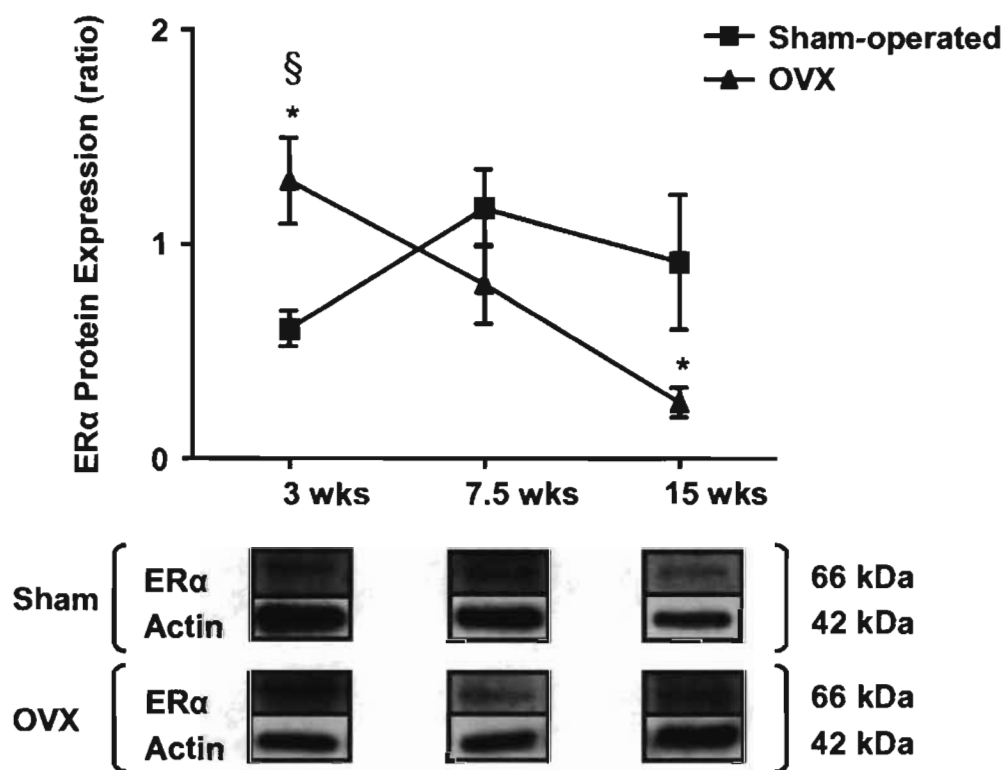


Figure 2

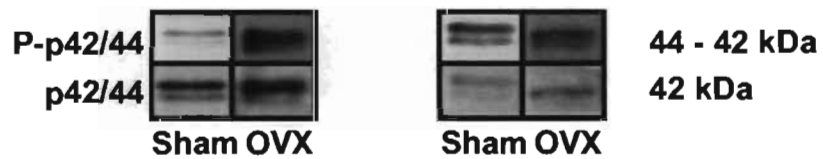
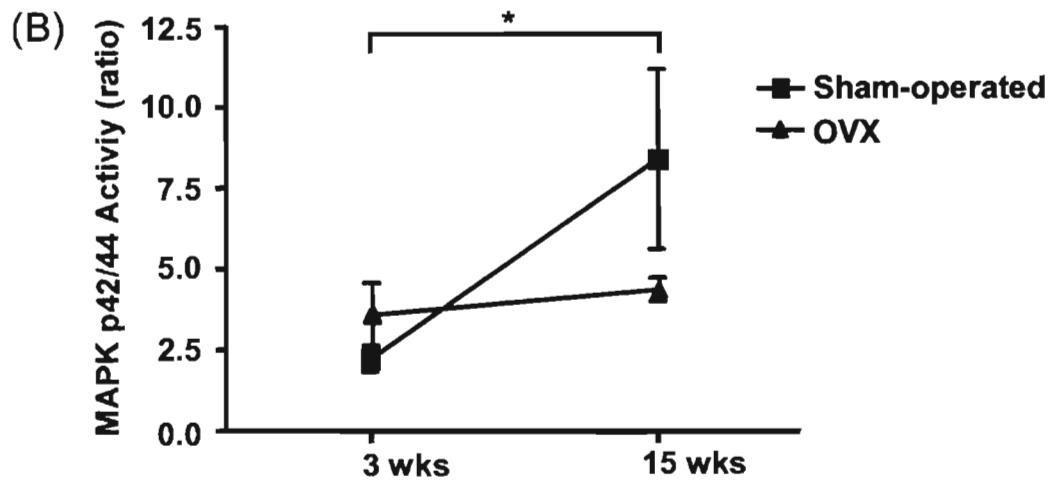
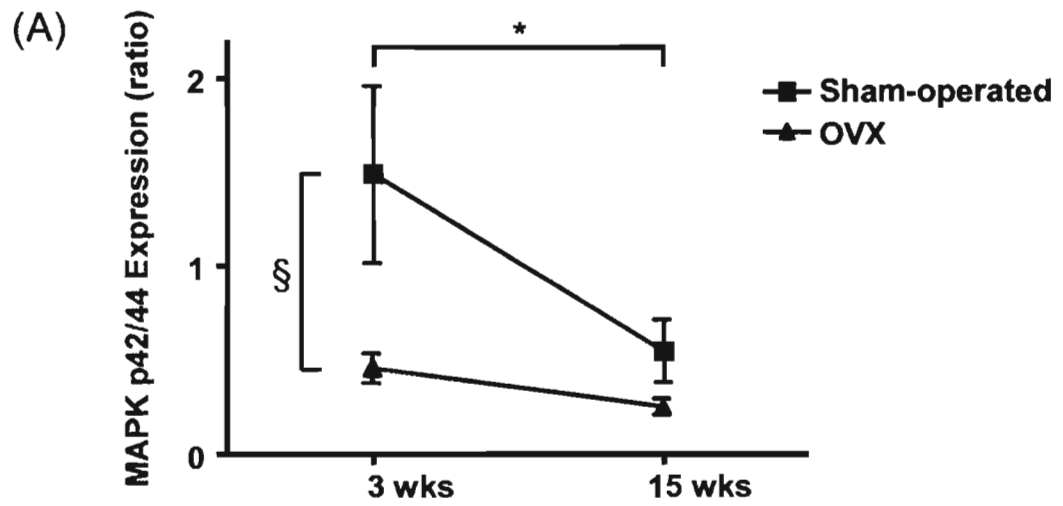


Figure 3

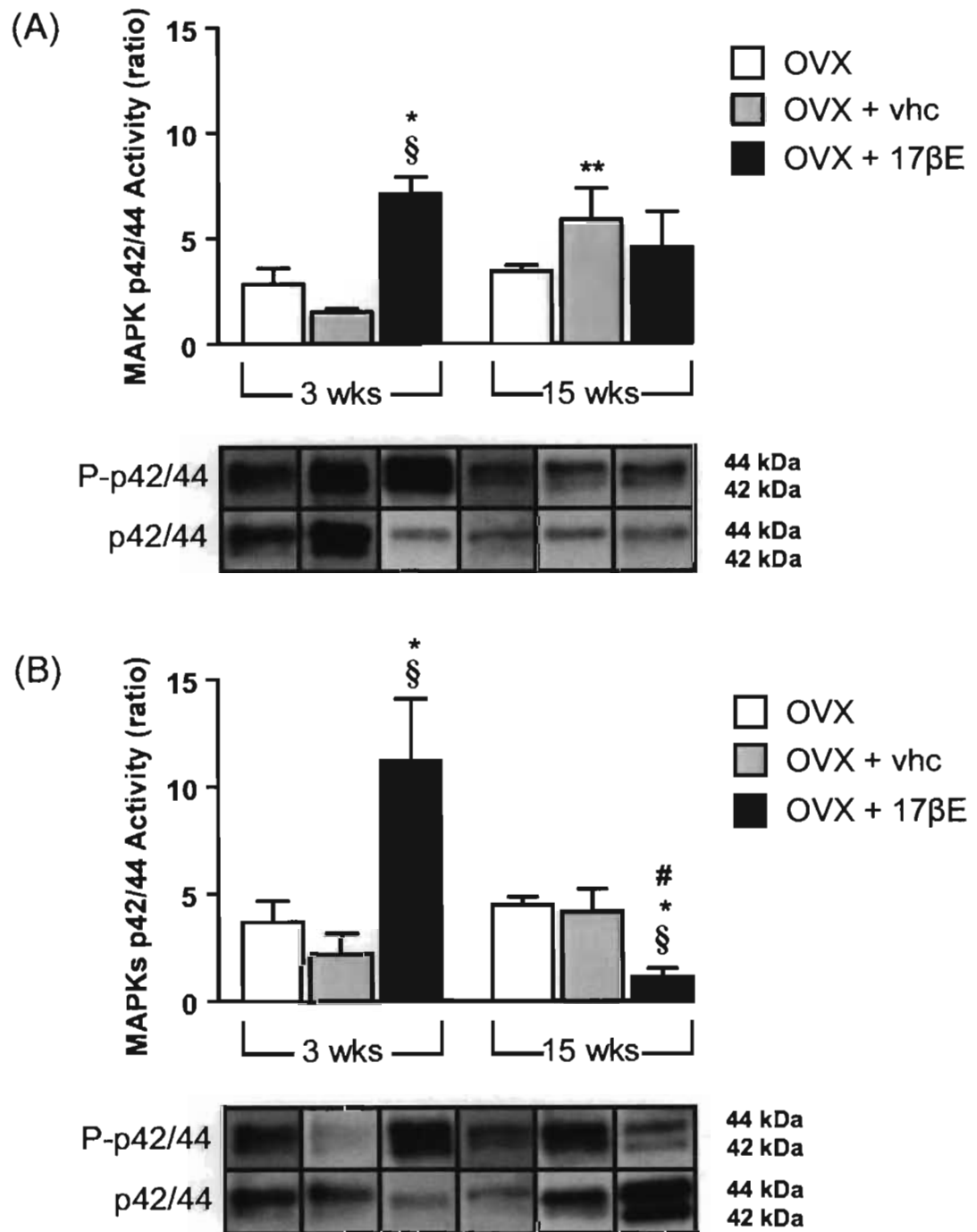


Figure 4

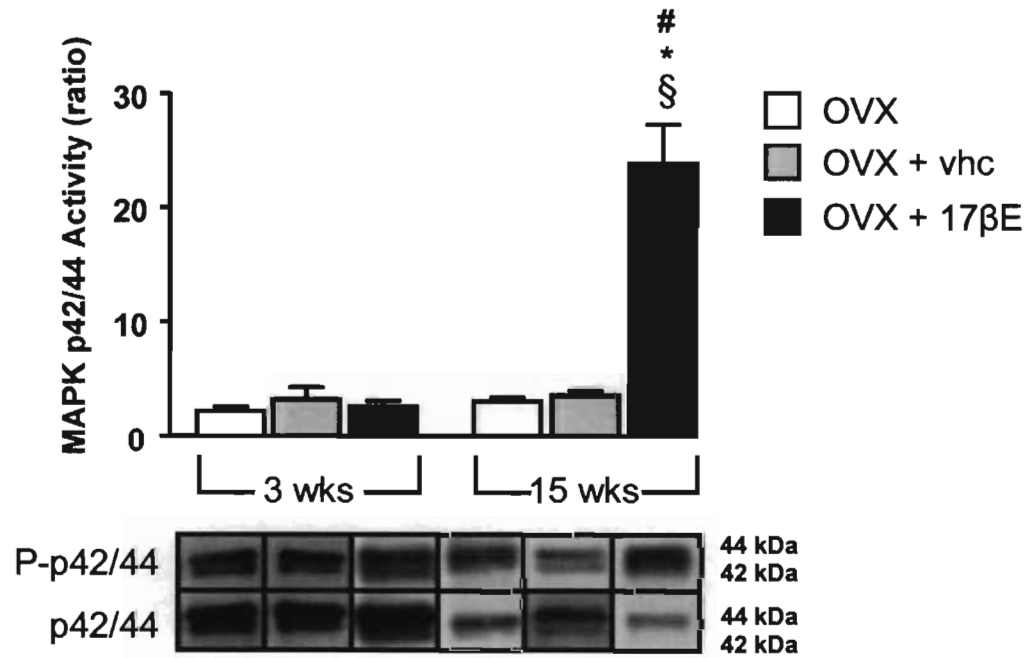


Figure 5

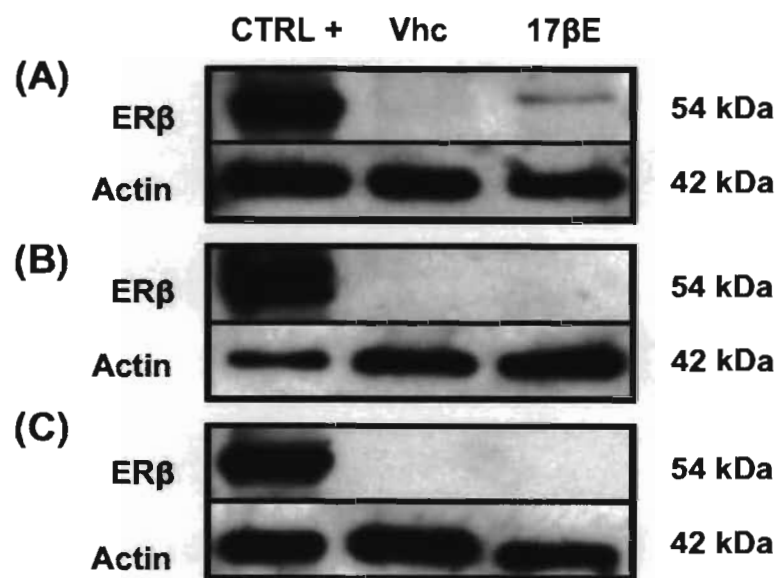


Figure 6



2.12Table

Table 1. Plasma estradiol levels at pretreatment and sacrifice in experimental mice groups.

Groups (n=3-4)	Pretreatment (ng/ml)	Sacrifice (ng/ml)	<i>P</i> -value
3 wks OVX + Vhc 6h	0.931 ± 0.245	0.427 ± 0.094	<i>P</i> = 0.2000
3 wks OVX + 17βE 6h	0.974 ± 0.177	7.961 ± 0.887*	<i>P</i> = 0.0286
3 wks OVX + Vhc 36h	1.460 ± 0.114	0.537 ± 0.171*	<i>P</i> = 0.0286
3 wks OVX + 17βE 36h	0.735 ± 0.154	6.817 ± 0.827*	<i>P</i> = 0.0286
15 wks OVX + Vhc 6h	0.929 ± 0.198	0.769 ± 0.068	<i>P</i> = 0.6857
15 wks OVX + 17βE 6h	1.462 ± 0.059	8.092 ± 0.725*	<i>P</i> = 0.0286
15 wks OVX + Vhc 36h	0.840 ± 0.126	0.639 ± 0.056	<i>P</i> = 0.3429
15 wks OVX + 17βE 36h	0.590 ± 0.098	6.345 ± 1.210*	<i>P</i> = 0.0286

Values are mean ± SEM; * *P* < 0.05 vs. pretreatment.

3.0 DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons d'abord voulu déterminer l'impact d'une privation estrogénique induite par une ovariectomie sur l'expression des récepteurs estrogéniques vasculaires dans un modèle de souris. Par la suite, notre second objectif consistait à mesurer la réponse des récepteurs aux estrogènes et de leur voie signalétique des MAPK p42/44 suite à un traitement estrogénique chez des souris ménopausées à court ou à long terme.

Pour la première fois, nous avons démontré que l'intervalle de temps entre le début de la ménopause et l'initiation d'un traitement aux estrogènes est un facteur déterminant de l'expression du RE α et de l'activité signalétique de l'une de ses plus importantes voies de signalisation, soit celle des MAPK p42/44. Nous avons d'abord établi que l'expression du RE α augmente peu de temps après l'induction de la ménopause. Par contre, ce phénomène ne serait que transitoire vu la diminution linéaire du RE α de 3 à 15 semaines suivant l'ovariectomie des souris. Cette diminution du niveau basal de RE α pourrait contribuer à induire les variations de l'activité des MAPK p42/44 suite aux traitements hormonaux. En effet, nos études ont démontré une variation de réponse des MAPK p42/44 au 17 β E selon la période de temps précédant l'initiation des traitements (3 ou 15 semaines suivant l'OVX). De même, les types de traitement (injection ou HTR soutenue) et leurs durées (6h vs. 36h; 7 jours vs. 28 jours) ont aussi contribué aux différences d'activité des MAPK p42/44.

Ces résultats soutiennent un parallèle avec les résultats de certaines études randomisées telles que la *WHI* et la *HERS*. Nous proposons qu'une augmentation de la voie des MAPK p42/44 suite aux traitements estrogéniques aigus à 3 semaines d'ovariectomie puisse en partie expliquer l'augmentation des événements cardiaques observés dans les premières années d'HTR chez les femmes dont la moyenne d'âge était d'environ 63-67

ans avant le début des traitements hormonaux.^{146, 152, 153} Selon les résultats de notre étude, le délai d'initiation et la durée d'une HTR après la ménopause serait aussi des facteurs non négligeables quant à l'efficacité d'une telle thérapie dans la prévention des événements cardiaques. Le mode de traitement et le dosage pourraient également affecter la réponse vasculaire.

Cette première étude nous a permis de pousser plus loin notre compréhension des mécanismes régulés par l'estrogène suite à la ménopause. Cependant, certains aspects, parmi lesquels les altérations physiques résultants de l'absence d'estrogènes systémiques suite à la ménopause, nous sont apparus au cours de l'étude et méritent notre attention. De même, l'utilisation de notre modèle afin d'étudier les différentes voies de signalisation de l'estrogène, par exemple la voie de la PI3K/AKT qui mène à la production de NO et les voies croisées qui, en l'absence du ligand, permettent d'activer les voies estrogéniques, pourrait être complémentaire à notre étude. En dernier lieu, l'impact de la progestérone dans ces traitements (l'HTR aux estrogènes y est souvent combinée), mais aussi les dosages et les voies d'administrations sont autant de points importants à ne pas négliger dans les futures études.

3.1 Altérations physiologiques suite à une privation estrogénique

3.1.1 Prise de poids

Sans être un objectif primaire de notre étude, nous nous sommes intéressés à vérifier l'impact de l'ovariectomie sur le poids des souris par rapport aux animaux ayant subi une chirurgie blanche sur une période de 15 semaines. Les souris étaient soumises à une diète faible en teneur protéique (14%) et sans phytoestrogènes disponible *ad libitum*. Le poids des souris de chacun des groupes a été mesuré à chaque semaine, pour toute la durée des expériences. Nos résultats démontrent une bifurcation entre les deux groupes dès la deuxième semaine suivant la chirurgie (* $P < 0.001$). Une prise de poids importante est observée chez les souris ovariectomisées comparativement aux souris témoins du même âge. Par la suite, la charge pondérale augmente graduellement dans les deux groupes (** $P < 0.001$), mais l'écart demeure important entre ces derniers (* $P < 0.001$; Figure 7). Ces observations confirment ceux de Couse et Kovack, qui démontrent une augmentation du poids chez les rongeurs ovariectomisés.¹⁵⁷

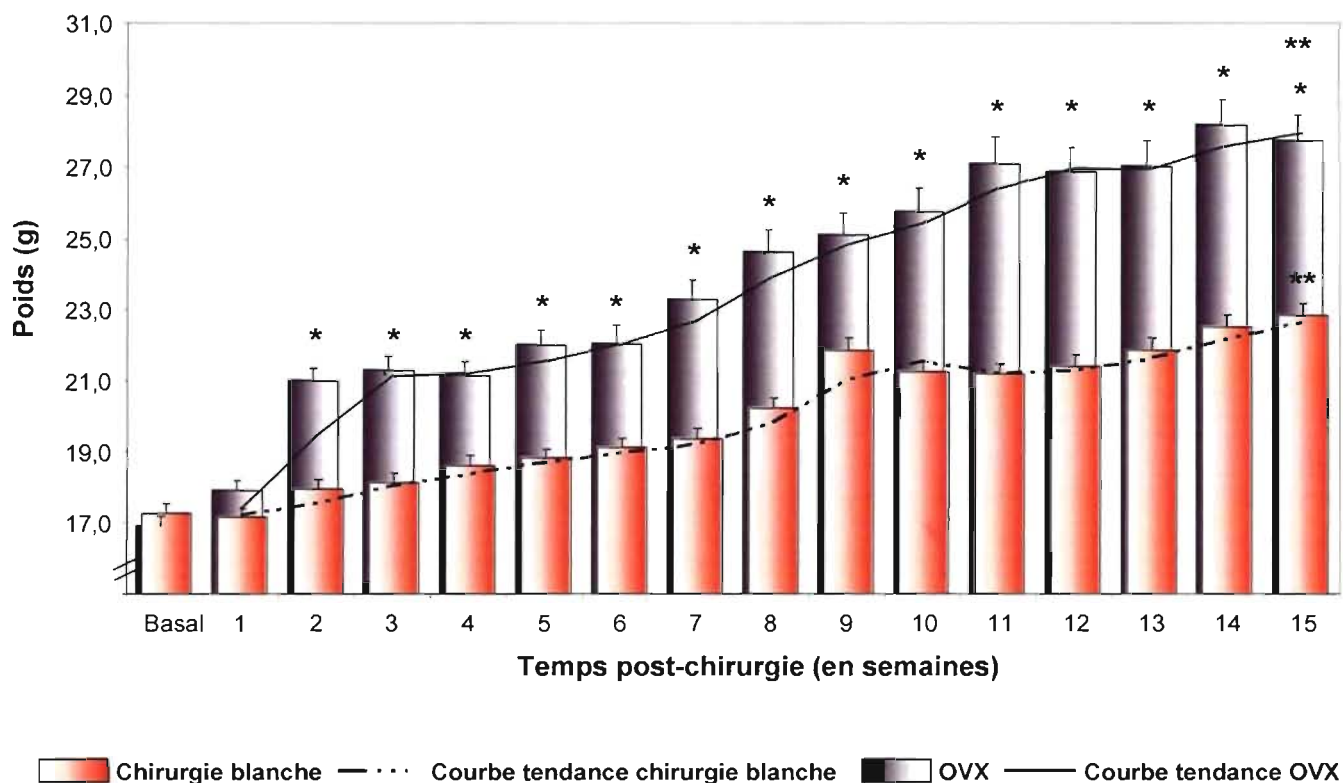


Figure 7. Variation dans le temps du poids corporel des souris C57BL/6 selon le type de chirurgie. Des souris C57BL/6 ont été soumises à une chirurgie blanche ou une OVX et le poids a été mesuré pendant 15 semaines avant le sacrifice. * $P < 0.001$ versus chirurgie blanche au même temps, ** $P < 0.001$ versus poids basal du même groupe d'intervention. (n=18 souris /groupe).

Cette augmentation du poids du groupe de souris ovariectomisées s'effectue en parallèle avec la diminution des niveaux d'estrogène systémique suite à l'ablation des ovaires. Les variations précises des niveaux d'estrogène n'ont cependant pas été déterminées par test ELISA. En effet, la trousse utilisée (Neogen Corporation, Lexington, KY) – conçue pour l'évaluation des concentrations d'estradiol chez l'Homme – n'a pas été suffisamment sensible et/ou a présenté une réactivité croisée à d'autres substances que l'estradiol (ex. l'estrone) dans nos échantillons chez la souris. Ces variations ont toutefois pu être validées par les changements de morphologie du système utérin.

3.1.2 Atrophie de l'utérus

Tel que mentionné dans l'article scientifique présenté à la section 2, nous avons validé la réussite de l'ovariectomie et des traitements hormonaux prolongés par les changements de morphologie de l'utérus. L'atrophie de l'utérus suite à l'ovariectomie, observée par plusieurs groupes scientifiques, est une mesure généralement acceptée dans la littérature afin de reconnaître la réussite de la chirurgie.¹³² Par ailleurs, il a également été démontré que des traitements estrogéniques suite à l'ovariectomie induisaient une hyperplasie du système utérin, telle que celle observé lors de notre étude. En effet, des traitements à l'estrone chez des femmes présentant un endomètre atrophié résulte en une hyperplasie de ce dernier chez 71% des patientes 10 à 25 jours suivant le début des traitements.¹⁵⁸ Cette observation a été confirmée dans plusieurs modèles animaux ovariectomisés sous traitement de $17\beta\text{E}$, incluant la nôtre.^{159, 160} D'autre part, ces équipes ont aussi démontré un rôle prépondérant du $\text{RE}\alpha$ dans l'augmentation de la masse utérine et la diminution du pourcentage de gras chez les souris soumises à des traitements estrogéniques.

3.1.3 Redistribution du tissu adipeux

Chez l'humain, l'insuffisance estrogénique suite à la ménopause provoque un changement de profil lipidique¹⁶¹, causant un accroissement de la masse des gras viscéraux.¹⁶² De plus, une augmentation des niveaux de LDL et triglycérides, associée à une diminution des niveaux de HDL, est rapidement observée suite à la ménopause^{163, 164} Paradoxalement, les tissus gras possèdent une activité aromatasase qui permet une synthèse secondaire d'estrogène.¹⁶⁵ Cette synthèse de novo pourrait constituer une stratégie défensive de l'organisme à la privation rapide d'estrogène induite par

l'ovariectomie ou la ménopause. À cet effet, il a été démontré que l'augmentation de la masse du tissu adipeux chez les femmes en ménopause s'accompagne d'une plus grande concentration d'estradiol sérique chez les sujets plus âgées.^{166, 167} Encore une fois, le rôle du RE α semble être essentiel dans ce processus de prise de poids. En effet, les niveaux d'estrogènes circulants permettent de réduire/prévenir l'accumulation de gras. Cependant, si le RE α est inactivé ou absent, les estrogènes ne permettent plus cette diminution d'accumulation de tissus adipeux, ce qui facilite le développement de l'obésité.^{168, 169} Ainsi, il est possible que sa baisse d'expression dans les carotides de souris 3 à 15 semaines suivant l'ovariectomie soit d'une part, non limité à ce tissu et d'autre part, puisse contribuer à expliquer certaines altérations du système cardiovasculaire, mais aussi des systèmes utérin et adipeux. Par ailleurs, des variations de l'activité des récepteurs estrogéniques pourraient aussi provoquer certains changements cellulaires/tissulaires.

3.1.4 Activité des récepteurs aux estrogènes

Notre étude était un premier pas vers l'identification des mécanismes cellulaires reliés à une privation estrogénique. Cependant, l'activité intrinsèque des récepteurs, non étudié jusqu'à présent dans notre modèle, pourrait être déterminante des réponses estrogéniques dans les tissus vasculaires lors de la réintroduction d'une HTR après la ménopause. Dans ce contexte, il aurait été intéressant de déterminer plus à fond les variations d'activité des RE et leurs impacts sur les mécanismes de fonctions cellulaires. In vitro, Montague et ses collègues rapportent dans des cellules musculaires lisses d'aortes humaines qu'une augmentation de l'expression et de l'activité du RE α provoque une réduction de la phosphorylation de la protéine Smad2, une protéines impliquée dans le processus de

différenciation cellulaire.¹⁷⁰ De même, une augmentation de l'activité du RE α favoriserait aussi le clivage de la caspase 3, induisant ainsi le processus d'apoptose des cellules musculaires lisses.¹⁷⁰ Ces mécanismes d'action pourraient jouer un rôle important dans la diminution de la prolifération et migration des cellules musculaires lisses dans les artères des patients atteints d'athérosclérose et/ou de resténose. D'autre part, l'augmentation de l'activité du RE α pourrait aussi contribuer à favoriser l'instabilité de la plaque athérosclérotique, conclusion à laquelle parviennent les auteurs de cette étude.

Dans le cadre de notre projet, l'augmentation des niveaux d'expression du RE α trois semaines suivant l'ovariectomie pourrait s'expliquer par un mécanisme compensatoire activé par la réduction de concentration hormonale stéroïdienne. De la même manière, ce mécanisme compensatoire pourrait conduire à une augmentation de l'activité basale des récepteurs estrogéniques à court terme dans les cellules vasculaires. Ainsi, si la conclusion à laquelle parviennent Montague et al. est juste, l'instabilité de la plaque causée par l'augmentation de l'activité du RE α pourrait contribuer à expliquer l'augmentation des événements cardiaques chez les femmes ménopausées non traitées par HTR. Ce risque d'événements cardiaques, qui ne cesse d'augmenter avec le temps, serait toutefois difficilement explicable selon la reproduction de cette courbe puisque l'activité relative à l'expression du RE α est diminuée à long terme et concorderait alors plutôt avec un rétablissement à la normale de ce risque.

Ainsi, les variations de l'activité du RE α pourraient ne pas concorder avec celles de son expression. Il serait par conséquent intéressant d'étudier *in vitro* la réponse des RE (sites et niveaux de phosphorylation) dans des cellules vasculaires ayant différents profils de stimulation hormonale, c'est-à-dire en condition de privation estrogénique, avec ou sans traitement à l'estradiol, à la

progestérone seule ou combinée à l'estradiol. De même, l'association de l'activité des RE à l'expression et l'activité des métalloprotéinases, protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, pourrait nous procurer une meilleure connaissance de l'effet de l'estrogène sur les mécanismes cellulaires responsables de la vulnérabilité de la plaque athérosclérotique.

3.1.5 Méthylation des récepteurs aux estrogènes

La méthylation de l'ADN, qui influence l'activité transcriptionnelle et l'expression des REs, permet aussi une modulation des réponses estrogéniques. En effet, il a déjà été démontré que l'ajout d'îlots CpG sur l'ADN du promoteur du gène codant pour le RE α est responsable de l'inhibition de son expression dans des cellules cancéreuses du sein.¹⁷¹ Puisque l'estrogène induit ses effets à travers une majorité de voies de signalisation dépendantes des REs¹⁷², une diminution de leur expression peut conférer une résistance partielle des cellules à l'estrogène.¹⁷³ Dans le système cardiovasculaire, Post et al. ont démontré dans l'oreillette droite une augmentation de la méthylation du RE α avec l'âge.¹⁰⁶ D'autre part, la présence d'îlots CpG apparaissait plus importante dans les plaques d'athérosclérose provenant d'artères coronaires versus d'artères mammaires saines ou de l'aorte proximale. Enfin, lorsque cultivés in vitro, les cellules musculaires lisses présentaient une plus grande proportion de méthylation en comparaison avec les cellules endothéliales. Puisque la méthylation de l'ADN des RE provoque une diminution de leur expression, mais aussi une baisse du nombre de transcrits d'autres gènes, il serait intéressant de développer des outils de pharmacogénomique permettant de détecter ces méthylations dans divers tissus et types cellulaires chez les patients. Des marqueurs de méthylation génique pourraient permettre un meilleur usage de l'estrogène,

en ciblant avec l'hormone les patients dont le profil de méthylation de l'ADN est compatible. Chez les autres, des traitements permettant une déméthylation afin de renverser l'inhibition de l'expression des RE pourrait s'appliquer préalablement aux traitements par HTR.¹⁷⁴

3.1.6 Implication des autres voies de signalisation

Les estrogènes sont impliqués dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, parmi lesquelles la voie du NO, molécule impliquée dans le processus de vasodilatation artérielle. Plusieurs études récentes effectuées sur des cultures cellulaires ont démontré que des traitements aigus et chroniques à l'estrogène provoquent la phosphorylation des protéines AKT et eNOS, menant à la production de NO dans le milieu.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Stirone et collègues ont par ailleurs démontré que ces phosphorylations sont médiées via l'activité d'un récepteur estrogénique membranaire sur la PI3K.¹⁷⁷ En effet, en présence d'inhibiteurs des récepteurs estrogéniques et de la PI3K, l'aval de la voie est bloqué de toute phosphorylation possible par les estrogènes. Ainsi, nous pourrions penser qu'une diminution d'expression du RE α , telle qu'observée en condition de privation estrogénique prolongée dans les cellules de carotides de souris ovariectomisées, souscrirait à une réduction de la voie du NO chez les femmes ménopausées n'étant pas soumises à une HTR. Comme les précurseurs activés de cette voie, c'est-à-dire la PI3K et l'AKT, sont impliqués à divers degrés dans les cellules vasculaires : expression de plusieurs gènes, survie cellulaire et angiogénèse¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, nous suggérons qu'une inhibition, même partielle, de cette voie puisse avoir des effets marqués sur le système cardiovasculaire. Des études approfondies devraient être effectuées afin de vérifier ces hypothèses et déterminer l'effet d'une réintroduction brutale des estrogènes sur cette voie de signalisation suite à une privation estrogénique prolongée.

D'autre part, même si l'expression du RE α diminue en absence d'estrogène systémique dans les carotides de souris, il pourrait en être autrement de son niveau d'activité. En effet, il existe des voies croisées qui permettent en l'absence du ligand, en l'occurrence l'estrogène, d'activer les RE. Il a déjà été démontré dans des modèles animaux que la concentration d'IGF-1 dans le sérum augmente 30-35 jours suivant l'ovariectomie, alors que l'EGF atteint un niveau maximal 4-6 semaines après la chirurgie.^{181, 182} Ces facteurs de croissance peuvent activer le site AF-1 des RE lorsque la concentration du ligand est trop faible dans le milieu.¹¹³ Cependant, il est connu que la phosphorylation du domaine AF-1 des RE ne permet pas à elle seule l'induction d'une réponse des voies estrogéniques en l'absence du ligand, requérant des phosphorylations sur d'autres sites d'activation.¹¹⁴ L'activation synergique des MAPK p42/44, de la PI3K et de la PKB par le complexe IGF-1 / IGF-1R (récepteur) permet de compenser l'absence de l'hormone stéroïdienne en augmentant d'une part les interactions du RE α avec ses protéines co-activatrices et d'autre part, en activant les domaines AF-1 et AF-2 des REs.^{183, 184} Ainsi, ce mécanisme permettrait le maintien physiologique des différentes voies de signalisation estrogéniques, telles que les voies du NO et des MAPK, et de leurs effets cellulaires dans des systèmes où les niveaux d'estrogène et d'expression des REs sont diminués. Puisque l'efficacité de ces voies croisées et leurs durées suite à une privation estrogénique à long terme, puis lors d'une réintroduction des estrogènes par HTR, demeurent peu connues, l'étude de ces voies dans notre modèle figure parmi les perspectives futures.

3.2 Développements futurs de l'hormonothérapie de remplacement

Suite aux résultats désolants des études cliniques randomisées quant à la prévention primaire ou secondaire des maladies cardiovasculaires, plusieurs remises en question autour de l'hormonothérapie ont dû et doivent continuer de se faire. Peu d'études de premières phases ont été effectuées avant d'approuver les traitements hormonaux dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Ainsi, aujourd'hui, nous devons songer à déterminer et examiner les causes provenant des échecs des études cliniques randomisées. Notre étude a démontré que le délai entre le début de la ménopause et l'initiation d'une HTR a un impact important sur la voie signalétique des MAPK p42/44 des estrogènes. D'autres études devront toutefois être effectuées afin d'optimiser à la fois le dosage et la voie d'administration de l'estrogène. De même, une meilleure connaissance des effets de la progestérone sur ceux de l'estrogène est nécessaire.

3.2.1 Dosages et voies d'administration de l'estrogène

3.2.1.1 Dosages

Des études ont démontré que la concentration hormonale prescrite dans le cadre d'une HTR peut influencer sur les effets cardioprotecteurs des estrogènes. En effet, dans la *Nurses' Health Study* [voir section 1.3.5.3 pour rappel], une dose située entre 0,3 et 0,625 mg de CEE était associée à un risque similaire d'événements cardiaques comparativement aux femmes non traitées.¹⁸⁵ Cependant, une augmentation significative du nombre d'accidents vasculaires cérébraux a été mesurée chez les femmes soumises à des doses

plus élevées. Appuyant ces observations, des chercheurs ont démontrés une réduction des marqueurs d'inflammation, tels que la ICAM-1 et la VCAM-1 solubles ainsi que la P-sélectine, dans le sérum des femmes ménopausées soumises à une faible dose d'HTR. De même, d'autres études ont établi que des traitements estrogéniques (aigus et chroniques) à des niveaux physiologiques permettent une vasodilatation artérielle de la circulation coronaire et systémique, favorisant un meilleur flux sanguin.^{186, 187} D'autre part, une étude a démontré qu'un traitement aigu par forte dose d'estrogène chez des femmes ménopausées présentant une maladie coronarienne réduisait la vasoconstriction paradoxale induite par l'acétylcholine, ce qui n'était toutefois pas le cas lorsque le traitement était administré aux hommes.¹⁸⁸ Ainsi, il serait plausible de pouvoir observer des effets similaires sur le système cardiovasculaire peu importe la dose d'estrogène administrée lorsqu'il s'agit de traitements aigus. Cependant, à plus long terme, une faible dose d'estrogène serait plus recommandée afin de prévenir certains événements vasculaires.

D'autre part, les dosages d'HTR pourraient aussi varier en fonction du sexe de l'individu, de sa vitesse à métaboliser la drogue en question et de la voie d'administration de l'HTR. En effet, il est bien connu que certaines personnes présentent des métabolismes rapides, alors que d'autres, non. Les gens présentant un métabolisme plus rapide, par une activité accrue du cytochrome P450 au foie, pourraient nécessiter de plus fortes doses d'HTR que les gens ayant un métabolisme rejoignant la normale. À l'inverse, la dose devrait être inférieure pour ceux qui présentent un métabolisme plus lent. Ces hypothèses s'appuient sur l'existence de polymorphismes connus des gènes codant du cytochrome P450, cruciaux pour la métabolisation des estrogènes.¹⁸⁹ Ainsi, des équipes ont démontré que les niveaux endogènes d'estrogènes diffèrent chez les femmes ménopausées en fonction de certains polymorphismes du cytochrome P450. Ces variations pourraient influencer sur la

dose d'HTR à administrer chez les femmes ménopausées. En effet, il a été démontré qu'un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) présent dans la région codante proximale en 5' du gène de l'aromatase (Cyp19A1) conduit à des niveaux endogènes d'estradiol de 10-20% supérieurs chez les femmes ménopausées.¹⁹⁰ De même, la présence de polymorphismes alléliques homozygotes A2/A2 ou hétérozygotes A1/A2 pour le gène codant pour le cytochrome P450c17 α (Cyp17) – comparativement aux femmes présentant deux allèles A1 – est associé à de plus hauts niveaux d'estradiol endogène dans le sérum chez les jeunes femmes et les femmes ménopausées.^{191, 192} Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre les effets du dosage de l'HTR sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la maladie athérosclérotique. De même, le criblage génétique des individus pour les polymorphismes pourrait permettre de mieux cibler les traitements d'HTR chez les femmes ménopausées.

3.2.1.2 Voies d'administration

Jusqu'à maintenant, deux principales voies d'administration étaient utilisées pour les traitements hormonaux visant à réduire le risque de maladies cardiovasculaires, soit la voie orale et transdermale. Tel que mentionné à la section 1.4.5.3, les études *HERS*, *ERA* et *WHI* n'ont pas démontré d'effet bénéfique d'une HTR par voie orale sur la réduction des événements cardiovasculaires et/ou la régression de la maladie athérosclérotique. Cependant, une amélioration du ratio LDL/HDL était observable dans toutes ces études. Pour le moment, peu d'études cliniques se sont penchées sur les effets d'une HTR par voie transdermale et les résultats sont parfois contradictoires. Ainsi, le groupe de Vehkavaara a démontré que l'administration par voie transdermale des estrogènes ne permettait pas d'améliorer la fonction vasculaire, alors que c'était le cas lorsque la voie orale

était choisie.¹⁹³ À l'inverse, Zegura et al. ont rapporté que des traitements d'HTR par voie orale et transdermale amélioreraient de façon similaire la fonction endothéliale chez les femmes ménopausées par chirurgie.¹⁹⁴ Également, certaines études d'HTR par voie transdermale ont démontré des effets positifs sur le profil lipidique^{195, 196}, alors que d'autres ont plutôt rapporté des effets neutres.^{197, 198} Une des raisons proposées pour expliquer les effets moins prononcés sur le profil lipidique d'un traitement par voie transdermale comparativement à orale implique la métabolisation de l'hormone au niveau du foie. En effet, un traitement par voie transdermale serait moins efficace pour améliorer le profil lipidique puisque qu'il passe directement dans la circulation systémique et ne transite pas par la circulation porte-hépatique.

Encore une fois, la route vers l'optimisation d'une voie d'administration demeure longue. Plusieurs autres études devront être effectuées afin de mieux déterminer les impacts de chacune de ces voies – orale et transdermale – sur le système cardiovasculaire. De même, d'autres voies pourraient aussi être envisagées, telle que la voie sublinguale, qui montre des résultats prometteurs sur la vasodilatation artérielle et les effets anti-ischémiques chez des femmes âgées avec maladie coronarienne.^{199, 200}

3.2.2 Effets potentiels de la progestérone

3.2.2.1 Études cliniques et in vivo

Outre les facteurs liés à l'administration de l'HTR, c'est-à-dire le dosage, la voie d'administration et le temps initial de traitement, l'existence d'une controverse autour de la progestérone, lorsque combinée aux estrogènes dans un traitement d'HTR, est bien connue. En effet, alors que les études WHI et HERS démontrent des effets nocifs sur la santé cardiovasculaire des

patientes suite à une HTR combinée au CEE et à la MPA^{146, 153} [voir section 1.3.5.3], une étude publiée par Rosano démontre, quant à elle, un effet additif de la progestérone sur les estrogènes²⁰¹. Ce groupe de chercheurs affirme que la progestérone naturelle agit en synergie avec l'estrogène afin d'améliorer la vasodilatation artérielle et diminuer l'ischémie du myocarde, ce qui n'est pas observé avec une combinaison à la MPA.

Plusieurs groupes ont démontré des effets bénéfiques de la progestérone dans différents modèles animaux, alors que d'autres ont vu des effets neutres ou inhibiteurs sur l'action estrogénique dans le système cardiovasculaire. Parmi ces études figure un modèle de lapin ovariectomisé chez lequel il a été démontré qu'une dose élevée de progestatif atténuait les effets bénéfiques des estrogènes sur le système cardiovasculaire.²⁰² De même, Adams et Williams ont aussi démontré une inhibition des effets cardioprotecteurs de l'estrogène par la MPA sur le développement de l'athérosclérose et la vasodilatation artérielle dans un modèle de macaque *cynomolgus*.^{124, 148, 203} En effet, alors qu'un traitement aux CEE seuls diminue les lésions athérosclérotiques de 72% chez les singes nourris avec une diète athérogénique, l'ajout de MPA au traitement hormonal n'a aucun effet versus le groupe témoin.¹⁴⁸ Enfin, à l'inverse, une expérience menée chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) n'a démontré aucune différence significative de la taille des lésions athérosclérotiques en réponse à l'estrogène seule ou en combinaison avec différents types et dosages de progestatifs.²⁰⁴ Les raisons de ces effets contradictoires observés dans plusieurs modèles animaux ainsi que chez l'humain sont encore loin d'être élucidés. Par contre, plusieurs études *in vitro* nous permettent maintenant de mieux comprendre les mécanismes d'action de la progestérone.

3.2.2.2 Effets *in vitro*

In vitro, certains effets de la progestérone semblent corrélés avec les effets cardioprotecteurs des estrogènes. En effet, tout comme l'estrogène²⁰⁵, la progestérone, mais non la MPA, diminue l'adhésion leucocytaire sur les cellules endothéliales par une régulation négative de l'expression de la VCAM-1.²⁰⁶ Dans les deux cas (estrogène, progestérone), ce mécanisme serait régulé par une incapacité du facteur de transcription NF-κB à reconnaître sa séquence de reconnaissance génique.^{205, 207} *In vivo*, cela pourrait se traduire par un arrêt ou un ralentissement du développement de lésions athérosclérotiques, dû à une réduction de la réaction inflammatoire à l'endothélium artériel.

Un second effet de la progestérone en ligne avec ceux de l'estrogène est l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses *in vitro*. Ce mécanisme serait régulé par une inhibition de différentes protéines de la voie de signalisation des MAPK telles que les protéines MAPK, MAPK kinases (MAPKK) ainsi que c-fos et c-myc.²⁰⁸ Ainsi, cette réponse laisse entrevoir une répression du développement de la plaque athérosclérotique à des stades plus avancés de la maladie [section 1.2.3.4, figure 2C].²⁰⁹ Toutefois, le groupe de Karas n'a pu confirmer cette inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses *in vivo*.²¹⁰

D'autre part, bien qu'une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses soit importante dans le contrôle du développement de lésions athérosclérotiques, la régulation positive de certains récepteurs à la surface de ces cellules pourrait provoquer un retour de balancier critique. Pour illustrer ce propos, prenons l'exemple du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1). Il est bien connu que le récepteur AT1 joue un rôle important dans l'hypertension et l'athérosclérose. L'estradiol réduit

l'expression du récepteur AT1 à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires. Cependant, à l'inverse, la progestérone induit sa surexpression via une activation de la voie de signalisation de la PI3K.²¹¹

Enfin, contrairement à l'estradiol qui favorise une prolifération des cellules endothéliales *in vitro*¹²⁰ et une réendothélialisation dans plusieurs modèles *in vivo*^{127, 128}, la progestérone les inhibe.²¹² De même, il a aussi été démontré que la progestérone prévient l'expression de certains gènes induits par l'estrogène, tels que les gènes responsable de la prolifération cellulaire.²¹³ La progestérone pourrait aussi agir tel un antagoniste envers les RE, en compétitionnant avec les estrogènes pour les sites de liaison disponibles de ses récepteurs.²¹⁴ La régulation négative par la progestérone sur la prolifération cellulaire des cellules endothéliales artérielles pourrait s'avérer critique lors du développement de plaques athérosclérotiques. En effet, l'endothélium, qui est la première porte d'entrée à une lésion, ne pourrait alors jamais rétablir sa condition saine, c'est-à-dire une barrière mécanique efficace et un équilibre inflammatoire.

Suite à cette revue des effets de la progestérone, deux principaux constats peuvent en être tirés, à savoir que le type de molécules utilisées comme progestatif semble être capital quant à la réponse obtenue aux traitements. La MPA, l'hormone habituellement utilisée dans les études cliniques randomisées, et qui a démontré des effets néfastes sur la santé cardiovasculaire, pourrait ne pas s'avérer un choix optimal dans un but d'amélioration de la maladie athérosclérotique. À cet effet, plusieurs études précédemment présentées ont semblé démontrer des effets plus intéressants avec la progestérone naturelle. En deuxième lieu, nous reconnaissons *in vitro* plusieurs effets cardioprotecteurs de la progestérone quant à la diminution des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium et de la prolifération des cellules musculaires lisses.^{206, 208} Toutefois, une interrogation demeure :

ces effets bénéfiques de la progestérone *in vitro* demeurent-ils valables *in vivo* sachant que celle-ci inhibe la prolifération des cellules endothéliales et ne permet pas le rétablissement d'un endothélium sain, même en présence d'estrogène? Le dysfonctionnement de l'endothélium et l'absence de barrière mécanique sont les premiers signaux menant à la formation de lésions athérosclérotiques. Nous pourrions donc envisager que, même en palliant des niveaux plus avancés de la maladie, la progression de la maladie ne puisse s'arrêter s'il y a une incapacité à rétablir ou maintenir la première ligne. Des études supplémentaires sur les mécanismes d'actions de différents progestatifs à divers stades de la maladie d'athérosclérose sont nécessaires avant de reconsidérer la combinaison estrogène / progestatif dans le cadre d'une HTR en prévention des maladies cardiovasculaires.

3.3 Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que l'activité des MAPK p42/44, protéines faisant partie d'une des plus importantes voies de signalisation des estrogènes, varie selon le délai d'initiation d'une hormonothérapie aux estrogènes suite à la ménopause chez la souris. Cette variation de l'activité des MAPK p42/44 pourrait s'expliquer par le niveau d'expression basal du RE α trois à 15 semaines suivant la privation estrogénique induite par l'ovariectomie. L'augmentation de son expression suivant une privation estrogénique à court terme (3 semaines) pourrait être associée à l'accroissement de la réponse des MAPK p42/44 suite à l'injection d'une dose de 17 β E dans des carotides de souris ovariectomisées depuis 3 semaines. Cette activation de la voie des MAPK p42/44 permettrait d'expliquer en partie l'absence d'effet bénéfique des estrogènes sur le système cardiovasculaire des femmes ménopausées lors des premières années de traitement à une HRT.

Plusieurs autres facteurs peuvent aussi influencer les réponses estrogéniques. Dans un modèle semblable au nôtre, il serait intéressant de vérifier l'activité des autres voies de signalisation des estrogènes, de même que celle des voies croisées. De plus, il est certain que l'ajout de la progestérone à une HTR, les voies d'administration et les dosages utilisés jouent un rôle important sur les voies estrogéniques. De toute évidence, plusieurs possibilités d'optimisation de l'HTR demeurent à vérifier dans le cadre d'une prévention des maladies cardiovasculaires. Le développement de futurs marqueurs de polymorphisme et de méthylation des RE à l'aide de la pharmacogénomique nous permettra sûrement de mieux cibler les traitements aux estrogènes chez les patients avec maladie coronarienne.

4.0 BIBLIOGRAPHIE

1. Le taux des maladies cardiovasculaires. *Fondation des maladies du coeur du Canada*. 2002-04-02. Available at:
<http://ww2.fmcoeur.ca/Page.asp?PageID=907&ArticleID=1077&Src=news&From=SubCategory>.
2. La recherche en santé, ça rapporte 2005-2006: IRSC-CIHR; 2006:p.27-28.
3. Farquhar JW MDea. La déclaration de Victoria sur la santé cardio-vasculaire. *Conférence internationale sur la santé cardio-vasculaire*. Victoria, Canada; 1992.
4. Est-on septuagénaire avant l'heure? *Fondation des maladies du coeur du Canada*. Available at:
<http://ww2.fmcoeur.ca/Page.asp?PageID=907&ArticleID=4639&Src=news&From=SubCategory>.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. Apr 21 2005;352(16):1685-1695.
6. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. May 17 1997;349(9063):1436-1442.
7. Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes by N. Anitschkow and S. Chalatow, translated by Mary Z. Pelias, 1913. *Arteriosclerosis*. Mar-Apr 1983;3(2):178-182.
8. Gotlieb AI. Atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Cardiovasc Pathol*. Jul-Aug 2005;14(4):181-184.
9. EUROASPIRE. A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. EUROASPIRE Study Group. European Action on Secondary Prevention through Intervention to Reduce Events. *Eur Heart J*. Oct 1997;18(10):1569-1582.
10. Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW. Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg*. Jan 2005;19(1):130-138.

11. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. Jan 14 1999;340(2):115-126.
12. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. *Braunwalds*. Vol 1. 7th ed; 2005:921-938.
13. Lifespan's A - Z Health Information Library. Available at: <http://www.lifespan.org/adam/indepthreports/10/000003.html>. Accessed 2007-08-24, 2007.
14. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. Jun 15 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
15. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Sep 2006;291(3):H985-1002.
16. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest*. Jan 2005;85(1):9-23.
17. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol*. Apr 2003;81(3):177-199.
18. Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, et al. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. May 2000;902:230-239; discussion 239-240.
19. Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, et al. Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Apr 2006;31(4):386-393.
20. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl*. Dec 1988;6(4):S188-191.
21. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, et al. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*. Jun 1992;70(6):1191-1197.

22. Martin-Nizard F, Houssaini HS, Lestavel-Delattre S, et al. Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett.* Nov 18 1991;293(1-2):127-130.
23. Pedram A, Razandi M, Hu RM, et al. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem.* Jul 4 1997;272(27):17097-17103.
24. Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, et al. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31 Suppl 1:S84-89.
25. Browatzki M, Schmidt J, Kubler W, et al. Endothelin-1 induces interleukin-6 release via activation of the transcription factor NF-kappaB in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol.* Apr 2000;95(2):98-105.
26. Luft FC, Mervaala E, Muller DN, et al. Hypertension-induced end-organ damage: A new transgenic approach to an old problem. *Hypertension.* Jan 1999;33(1 Pt 2):212-218.
27. Duerrschmidt N, Wippich N, Goettsch W, et al. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 24 2000;269(3):713-717.
28. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens.* Mar 1998;16(3):291-303.
29. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Apr 1999;19(4):972-978.
30. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, et al. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation.* Jul 29 2003;108(4):472-478.
31. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* Dec 2005;115(12):3378-3384.

32. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* Feb 2006;83(2):456S-460S.
33. Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med.* Aug 18 1994;331(7):468-469.
34. Les femmes et la santé cardiovasculaire. *Santé Canada.* 2006-08-15.
Available at: http://www.hc-sc.gc.ca/hl-vs/pubs/women-femmes/heart-cardiovasculaire_f.html.
35. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol.* Apr 1994;100(1-2):51-54.
36. Miller WR. Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Nov 1991;39(5B):783-790.
37. Matsumine H, Hirato K, Yanaihara T, et al. Aromatization by skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* Sep 1986;63(3):717-720.
38. Burger HG. Physiological principles of endocrine replacement: estrogen. *Horm Res.* 2001;56 Suppl 1:82-85.
39. Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, et al. The formation and metabolism of estrogens in brain tissues. *Adv Biosci.* 1975;15:105-121.
40. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, et al. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* Jan 31 2002;346(5):340-352.
41. Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, et al. The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* Jan 2006;84(1):93-109.
42. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* Jun 10 1999;340(23):1801-1811.
43. Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA. Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics.* 2004;4(1):19-28.
44. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* Aug 2006;27(4):299-402.

45. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* Mar 2006;116(3):561-570.
46. Jensen EV. Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc Can Cancer Conf.* 1966;6:143-165.
47. Walter P, Green S, Greene G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1985;82(23):7889-7893.
48. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 11 1996;93(12):5925-5930.
49. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* Aug 19 1996;392(1):49-53.
50. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta α : a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(15):3505-3512.
51. Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res.* Jan 15 2001;61(2):632-640.
52. Kos M, Denger S, Reid G, et al. Down but not out? A novel protein isoform of the estrogen receptor alpha is expressed in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *J Mol Endocrinol.* 2002;29(3):281-286.
53. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 9 1998;247(1):75-78.
54. Scobie GA, Macpherson S, Millar MR, et al. Human oestrogen receptors: differential expression of ER alpha and beta and the identification of ER beta variants. *Steroids.* Nov 2002;67(12):985-992.
55. Gorski J, Welshons W, Sakai D. Remodeling the estrogen receptor model. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 1984;36(1-2):11-15.

56. Jensen EV, DeSombre ER. Estrogen-receptor interaction. *Science*. Oct 12 1973;182(108):126-134.
57. King WJ, Greene GL. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*. Feb 23-29 1984;307(5953):745-747.
58. Levin ER. Cellular Functions of the Plasma Membrane Estrogen Receptor. *Trends Endocrinol Metab*. Nov 1999;10(9):374-377.
59. O'Malley BW, Means AR. Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science*. Feb 15 1974;183(125):610-620.
60. Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*. Jan 6 1977;265(5589):69-72.
61. Razandi M, Pedram A, Greene GL, et al. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13(2):307-319.
62. Molero L, Garcia-Duran M, Diaz-Recasens J, et al. Expression of estrogen receptor subtypes and neuronal nitric oxide synthase in neutrophils from women and men: regulation by estrogen. *Cardiovasc Res*. Oct 2002;56(1):43-51.
63. Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, et al. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*. Nov 1997;138(11):5067-5070.
64. Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, et al. Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology*. Oct 1997;138(10):4509-4512.
65. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. Mar 1997;138(3):863-870.
66. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):4258-4265.

67. Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24---q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43(3-4):218-220.
68. Green S, Walter P, Greene G, et al. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem.* Jan 1986;24(1):77-83.
69. Greene GL, Press MF. Structure and dynamics of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem.* Jan 1986;24(1):1-7.
70. Kuiper GG, Gustafsson JA. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* Jun 23 1997;410(1):87-90.
71. Koike S, Sakai M, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* Mar 25 1987;15(6):2499-2513.
72. Krust A, Green S, Argos P, et al. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *Embo J.* May 1986;5(5):891-897.
73. White R, Lees JA, Needham M, et al. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* Oct 1987;1(10):735-744.
74. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* Feb 15 2005;161(4):307-320.
75. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids.* May 1999;64(5):310-319.
76. Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med.* 1995;46:443-453.
77. McInerney EM, Weis KE, Sun J, et al. Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology.* Nov 1998;139(11):4513-4522.

78. Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, et al. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*. May 15 1998;273(20):12101-12108.
79. Webb P, Nguyen P, Shinsako J, et al. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol*. Oct 1998;12(10):1605-1618.
80. McInerney EM, Tsai MJ, O'Malley BW, et al. Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 17 1996;93(19):10069-10073.
81. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1535-1565.
82. Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*. Jan 2003;17(1):1-10.
83. Claessens F, Gewirth DT. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem*. 2004;40:59-72.
84. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(14):2905-2919.
85. Klinge CM, Bodenner DL, Desai D, et al. Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Res*. May 15 1997;25(10):1903-1912.
86. Klinge CM, Jernigan SC, Smith SL, et al. Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;174(1-2):151-166.
87. Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, et al. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*. Nov 5 1993;75(3):567-578.

88. Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, et al. DNA recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. *Structure*. Nov 15 1993;1(3):187-204.
89. McEwan IJ. Sex, drugs and gene expression: signalling by members of the nuclear receptor superfamily. *Essays Biochem*. 2004;40:1-10.
90. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, et al. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*. Nov 2005;19(11):2671-2684.
91. Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, et al. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res*. 2000;2(5):353-359.
92. Webster NJ, Green S, Jin JR, et al. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*. Jul 15 1988;54(2):199-207.
93. Chen D, Pace PE, Coombes RC, et al. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*. Feb 1999;19(2):1002-1015.
94. Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*. Jan 2003;68(1):1-9.
95. Orti E, Bodwell JE, Munck A. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr Rev*. Feb 1992;13(1):105-128.
96. Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med*. Jun 1998;76(7):469-479.
97. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, et al. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. Sep 1997;11(10):1486-1496.
98. Schlegel A, Schwab RB, Scherer PE, et al. A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol Chem*. Aug 6 1999;274(32):22660-22667.

99. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, et al. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem*. Nov 19 1999;274(47):33551-33556.
100. Halachmi S, Marden E, Martin G, et al. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*. Jun 3 1994;264(5164):1455-1458.
101. Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, et al. p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15 1996;93(21):11540-11545.
102. Shibata H, Spencer TE, Onate SA, et al. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res*. 1997;52:141-164; discussion 164-145.
103. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 15 1993;90(24):11995-11999.
104. Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, et al. Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. Apr 2000;46(1):172-179.
105. Pinzone JJ, Stevenson H, Strobl JS, et al. Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol*. Jun 2004;24(11):4605-4612.
106. Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, et al. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. Sep 1999;43(4):985-991.
107. Karas RH, Gauer EA, Bieber HE, et al. Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Clin Invest*. Jun 15 1998;101(12):2851-2861.
108. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. Jun 10 2005;308(5728):1583-1587.

109. Matsumoto T, Yokote K, Tamura K, et al. Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem.* 1999;274(20):13954-13960.
110. Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, et al. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 13 1999;96(8):4686-4691.
111. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, et al. 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.* Oct 1 2002;22(10):1585-1590.
112. Geraldes P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res.* Sep 5 2003;93(5):399-405.
113. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 1995;270(5241):1491-1494.
114. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, et al. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J.* May 1 1996;15(9):2174-2183.
115. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, et al. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest.* Jul 1 1996;98(1):36-42.
116. Garcia-Duran M, de Frutos T, Diaz-Recasens J, et al. Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circ Res.* Nov 26 1999;85(11):1020-1026.
117. Ito I, Hayashi T, Yamada K, et al. Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system. *Life Sci.* 1995;56(25):2247-2253.

118. Geraldes P, Gagnon S, Hadjadj S, et al. Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: An ERalpha-mediated pathway. *Cardiovasc Res.* Aug 1 2006;71(3):566-573.
119. Amant C, Holm P, Xu Sh SH, et al. Estrogen receptor-mediated, nitric oxide-dependent modulation of the immunologic barrier function of the endothelium: regulation of fas ligand expression by estradiol. *Circulation.* Nov 20 2001;104(21):2576-2581.
120. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, et al. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation.* Feb 1 1995;91(3):755-763.
121. Dai-Do D, Espinosa E, Liu G, et al. 17 beta-estradiol inhibits proliferation and migration of human vascular smooth muscle cells: similar effects in cells from postmenopausal females and in males. *Cardiovasc Res.* Nov 1996;32(5):980-985.
122. Kolodgie FD, Jacob A, Wilson PS, et al. Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol.* 1996;148(3):969-976.
123. Bell DR, Rensberger HJ, Koritnik DR, et al. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 2):H377-383.
124. Williams JK, Honore EK, Washburn SA, et al. Effects of hormone replacement therapy on reactivity of atherosclerotic coronary arteries in cynomolgus monkeys. *J Am Coll Cardiol.* Dec 1994;24(7):1757-1761.
125. Darblade B, Pendaries C, Krust A, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res.* Mar 8 2002;90(4):413-419.
126. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* Sep 14 2000;407(6801):233-241.

127. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, et al. Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation*. Apr 1 1997;95(7):1768-1772.
128. Chandrasekar B, Sirois MG, Geoffroy P, et al. Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost*. Nov 2005;94(5):1042-1047.
129. Fischer GM, Swain ML. Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis*. Feb 1985;54(2):177-185.
130. Pare G, Krust A, Karas RH, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res*. May 31 2002;90(10):1087-1092.
131. Karas RH, Hodgins JB, Kwoun M, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 21 1999;96(26):15133-15136.
132. Estrogen and progestogen therapy in postmenopausal women. *Fertil Steril*. Jan 2004;81(1):231-241.
133. Hackley B, Rousseau ME. CEU:Managing menopausal symptoms after the women's health initiative. *J Midwifery Womens Health*. Mar-Apr 2004;49(2):87-95.
134. Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health*. 1998;19:55-72.
135. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. Dec 15 1992;117(12):1016-1037.
136. Research on the Menopause in the 1990's. In: Organization WH, ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1996:107p.
137. Phillips LS, Langer RD. Postmenopausal hormone therapy: critical reappraisal and a unified hypothesis. *Fertil Steril*. Mar 2005;83(3):558-566.

138. Carani C, Qin K, Simoni M, et al. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med*. Jul 10 1997;337(2):91-95.
139. Herrmann BL, Saller B, Janssen OE, et al. Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 2002;87(12):5476-5484.
140. Maffei L, Murata Y, Rochira V, et al. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. Jan 2004;89(1):61-70.
141. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, et al. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. Dec 1995;80(12):3689-3698.
142. Phillips GB. The GILHT-E Syndrome? *Diabetes Care*. Sep 2004;27(9):2285-2286.
143. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama*. Jan 18 1995;273(3):199-208.
144. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med*. Sep 12 1991;325(11):756-762.
145. Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*. Aug 15 1996;335(7):453-461.
146. Hulley S, Grady D, Bush T, et al. 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*. Aug 19 1998;280(7):605-613.

147. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*. Jul 3 2002;288(1):49-57.
148. Adams MR, Register TC, Golden DL, et al. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jan 1997;17(1):217-221.
149. Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, et al. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *N Engl J Med*. Aug 24 2000;343(8):522-529.
150. Manson JE, Bassuk SS. Invited commentary: hormone therapy and risk of coronary heart disease why renew the focus on the early years of menopause? *Am J Epidemiol*. Sep 1 2007;166(5):511-517.
151. Holm P, Andersen HL, Andersen MR, et al. The direct antiatherogenic effect of estrogen is present, absent, or reversed, depending on the state of the arterial endothelium. A time course study in cholesterol-clamped rabbits. *Circulation*. 1999;100(16):1727-1733.
152. Effects of Conjugated Equine Estrogen in Postmenopausal Women Having Undergone Hysterectomy: The Women's Health Initiative Randomized, Controlled Trials. *Obstet Gynecol Surv*. Aug 2004;59(8):599-600.
153. 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(3):321-333.
154. Dubey RK, Imthurn B, Barton M, et al. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res*. May 1 2005;66(2):295-306.
155. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Jama*. Apr 4 2007;297(13):1465-1477.

156. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, et al. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89(4):1501-1510.
157. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*. Jun 1999;20(3):358-417.
158. Montoneri C, Zarbo G, Garofalo A, et al. Effects of estriol administration on human postmenopausal endometrium. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1987;14(3-4):178-181.
159. Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, et al. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *J Endocrinol*. 2002;174(2):167-178.
160. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1 1993;90(23):11162-11166.
161. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun 2003;88(6):2404-2411.
162. Bjorkelund C, Lissner L, Andersson S, et al. Reproductive history in relation to relative weight and fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*. Mar 1996;20(3):213-219.
163. Bruschi F, Meschia M, Soma M, et al. Lipoprotein(a) and other lipids after oophorectomy and estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol*. Dec 1996;88(6):950-954.
164. Jensen J, Nilas L, Christiansen C. Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas*. Nov 1990;12(4):321-331.
165. Valle LD, Toffolo V, Nardi A, et al. Tissue-specific transcriptional initiation and activity of steroid sulfatase complementing dehydroepiandrosterone sulfate uptake and intracrine steroid activations in human adipose tissue. *J Endocrinol*. Jul 2006;190(1):129-139.

166. Key TJ, Allen NE, Verkasalo PK, et al. Energy balance and cancer: the role of sex hormones. *Proc Nutr Soc.* Feb 2001;60(1):81-89.
167. Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, et al. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr Rev.* Oct 2006;27(6):575-605.
168. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 7 2000;97(23):12729-12734.
169. Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, et al. Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 30 2000;278(3):640-645.
170. Montague CR, Hunter MG, Gavrilin MA, et al. Activation of estrogen receptor-alpha reduces aortic smooth muscle differentiation. *Circ Res.* Sep 1 2006;99(5):477-484.
171. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, et al. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* May 15 1994;54(10):2552-2555.
172. O'Malley BW, Tsai MJ. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol Reprod.* Feb 1992;46(2):163-167.
173. Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* Jan 1998;3(1):85-94.
174. Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, et al. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res.* Jun 1 1995;55(11):2279-2283.
175. Ho KJ, Liao JK. Nonnuclear actions of estrogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(12):1952-1961.
176. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* May 2002;67(6):471-475.

177. Stirone C, Boroujerdi A, Duckles SP, et al. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Mol Pharmacol*. Jan 2005;67(1):105-113.
178. Alvarez RJ, Gips SJ, Moldovan N, et al. 17beta-estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(2):372-381.
179. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, et al. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem*. Dec 27 2002;277(52):50768-50775.
180. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. Jun 28 2002;90(12):1243-1250.
181. Pascall JC, Saunders J, Blakeley DM, et al. Tissue-specific effects of castration and ovariectomy on murine epidermal growth factor and its mRNA. *J Endocrinol*. Jun 1989;121(3):501-506.
182. Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, et al. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner*. May 1994;25(2):135-148.
183. Atanaskova N, Keshamouni VG, Krueger JS, et al. MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene*. Jun 6 2002;21(25):4000-4008.
184. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*. Mar 30 2001;276(13):9817-9824.
185. Grodstein F, Manson JE, Colditz GA, et al. A prospective, observational study of postmenopausal hormone therapy and primary prevention of cardiovascular disease. *Ann Intern Med*. Dec 19 2000;133(12):933-941.
186. Gilligan DM, Quyyumi AA, Cannon RO, 3rd. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation*. Jun 1994;89(6):2545-2551.

187. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, et al. Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* Dec 15 1994;121(12):936-941.
188. Collins P, Rosano GM, Sarrel PM, et al. 17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation.* Jul 1 1995;92(1):24-30.
189. Long JR, Cai Q, Shu XO, et al. Genetic polymorphisms in estrogen-metabolizing genes and breast cancer survival. *Pharmacogenet Genomics.* May 2007;17(5):331-338.
190. Haiman CA, Dossus L, Setiawan VW, et al. Genetic variation at the CYP19A1 locus predicts circulating estrogen levels but not breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Res.* Mar 1 2007;67(5):1893-1897.
191. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, et al. Cytochrome P450c17alpha gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res.* Feb 15 1998;58(4):585-587.
192. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, et al. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res.* Mar 1 1999;59(5):1015-1020.
193. Vehkavaara S, Hakala-Ala-Pietila T, Virkamaki A, et al. Differential effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on endothelial function in postmenopausal women. *Circulation.* Nov 28 2000;102(22):2687-2693.
194. Zegura B, Keber I, Sebestjen M, et al. Orally and transdermally replaced estradiol improves endothelial function equally in middle-aged women after surgical menopause. *Am J Obstet Gynecol.* May 2003;188(5):1291-1296.
195. Crook D, Cust MP, Gangar KF, et al. Comparison of transdermal and oral estrogen-progestin replacement therapy: effects on serum lipids and lipoproteins. *Am J Obstet Gynecol.* Mar 1992;166(3):950-955.
196. Lindgren R, Berg G, Hammar M, et al. Plasma lipid and lipoprotein effects of transdermal administration of estradiol and estradiol/norethisterone acetate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Dec 28 1992;47(3):213-221.

197. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, et al. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* Oct 24 1991;325(17):1196-1204.
198. Whitehead MI, Fraser D, Schenkel L, et al. Transdermal administration of oestrogen/progestagen hormone replacement therapy. *Lancet.* Feb 10 1990;335(8685):310-312.
199. Lima SM, Aldrighi JM, Consolim-Colombo FM, et al. Acute administration of 17beta-estradiol improves endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women. *Maturitas.* Apr 11 2005;50(4):266-274.
200. Rosano GM, Gebara O, Sheiban I, et al. Acute administration of 17beta-estradiol reduces endothelin-1 release during pacing-induced ischemia. *Int J Cardiol.* Mar 2 2007;116(1):34-39.
201. Rosano GM, Webb CM, Chierchia S, et al. Natural progesterone, but not medroxyprogesterone acetate, enhances the beneficial effect of estrogen on exercise-induced myocardial ischemia in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* Dec 2000;36(7):2154-2159.
202. Hanke H, Hanke S, Bruck B, et al. Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* Mar 1996;121(1):129-138.
203. Williams JK, Anthony MS, Honore EK, et al. Regression of atherosclerosis in female monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul 1995;15(7):827-836.
204. Shultz JM, Zhu XD, Knopp RH, et al. Norgestimate and medroxyprogesterone acetate do not attenuate the atheroprotective effects of 17beta-estradiol in ovariectomized, apolipoprotein E-deficient mice. *Fertil Steril.* Oct 2004;82 Suppl 3:1133-1139.
205. Simoncini T, Maffei S, Basta G, et al. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res.* 2000;87(1):19-25.

206. Otsuki M, Saito H, Xu X, et al. Progesterone, but not medroxyprogesterone, inhibits vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 2001;21(2):243-248.
207. Otsuki M, Saito H, Xu X, et al. Cilostazol represses vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription via inhibiting NF-kappaB binding to its recognition sequence. *Atherosclerosis.* Sep 2001;158(1):121-128.
208. Morey AK, Pedram A, Razandi M, et al. Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology.* 1997;138(8):3330-3339.
209. Lee WS, Harder JA, Yoshizumi M, et al. Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat Med.* Sep 1997;3(9):1005-1008.
210. Karas RH, van Eickels M, Lydon JP, et al. A complex role for the progesterone receptor in the response to vascular injury. *J Clin Invest.* Aug 2001;108(4):611-618.
211. Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, et al. Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102(15):1828-1833.
212. Vazquez F, Rodriguez-Manzaneque JC, Lydon JP, et al. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem.* Jan 22 1999;274(4):2185-2192.
213. Meyer ME, Gronemeyer H, Turcotte B, et al. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell.* May 5 1989;57(3):433-442.
214. Colburn P, Buonassisi V. Estrogen-binding sites in endothelial cell cultures. *Science.* Sep 1 1978;201(4358):817-819.