

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

**Les cellules de la moelle osseuse: une cible réelle des
estrogènes dans la protection cardiovasculaire?**

par

Caroline Lemieux

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophia Doctor (Ph.D.)
en sciences biomédicales

mars, 2008

© Caroline Lemieux, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Les cellules de la moelle osseuse : une cible réelle des
estrogènes dans la protection cardiovasculaire?

présentée par :
Caroline Lemieux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Rousseau, président-rapporteur
Dr Jean-François Tanguay, directeur de recherche
Dr Christian F. Deschepper, membre du jury
Dr Jacques Galipeau, examinateur externe
Dr Daniel Lajeunesse, représentant du doyen de la FES

Résumé

Il est généralement bien accepté que les cellules endothéliales progénitrices dérivées de la moelle osseuse exercent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système cardiovasculaire. Dernièrement, la découverte qu'un traitement aux estrogènes peut moduler le nombre et la fonctionnalité des cellules endothéliales progénitrices et ainsi améliorer la réparation cardiovasculaire est venue susciter un vif intérêt. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a clairement démontré que chez la femme non ménopausée, les cellules endothéliales progénitrices représentent une réelle cible des estrogènes. Une mobilisation périodique des cellules endothéliales progénitrices par les estrogènes pourrait nous permettre de mieux comprendre le paradoxe d'incidents cardiovasculaires qui existe entre les genres. De plus, malgré le fait que dans bien des modèles les estrogènes agissent directement sur les cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse pour moduler leur fonctionnalité, peu d'informations nous permettent de déterminer si les estrogènes exercent une protection cardiovasculaire en agissant plus globalement sur l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches.

Ce projet visait donc : I) à étudier, *in vivo*, l'influence des changements hormonaux subis au cours du cycle menstruel sur les niveaux circulants et la maturité des différentes populations de cellules endothéliales progénitrices chez des femmes saines non ménopausées et si cela pouvait révéler des différences entre les genres et II) à déterminer, *in vitro*, l'influence du 17β -estradiol sur les processus biologiques modulant l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches de la moelle osseuse.

Nos travaux démontrent que les niveaux circulants et la maturité des différentes populations de cellules endothéliales progénitrices sont significativement influencés par les phases du cycle menstruel chez la femme. Les augmentations se perçoivent au moment où les niveaux de 17β -estradiol sont élevés ce qui, basé sur une compréhension des effets du 17β -estradiol, suggère un rôle actif de ce dernier dans la mobilisation de ces populations

chez la femme. De plus, plusieurs populations de cellules endothéliales progénitrices sont présentes à un niveau significativement plus élevé chez la femme que chez l'homme. Cette différence entre les genres a permis d'identifier le 17β -estradiol comme un facteur prédictif du niveau de certaines populations de cellules endothéliales progénitrices chez l'humain.

Il s'avère que le 17β -estradiol est aussi capable d'altérer l'expression génique des cellules souches et des cellules stromales de la moelle osseuse. Parmi les gènes dont l'expression a été modulée, nous avons identifié plusieurs facteurs clés impliqués au niveau des processus signalétiques et d'interactions cellulaires qui régulent l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches. Ainsi, nous pouvons affirmer que le 17β -estradiol, par son action directe sur les cellules souches et indirecte via les cellules stromales, influence la survie, l'auto-renouvellement, la différenciation, la prolifération et la mobilité des cellules souches de la moelle osseuse. Ceci contribuant certainement aux bénéfices des estrogènes sur le système cardiovasculaire.

L'ensemble de nos travaux suggère une action directe des estrogènes sur les cellules endothéliales progénitrices et l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches de la moelle osseuse. Une action qui gagnera certainement à être exploitée cliniquement dans le développement d'outils thérapeutiques visant à prévenir et traiter les maladies cardiovasculaires.

Mots-clés: estrogènes, cellules endothéliales progénitrices, niche des cellules souches, moelle osseuse et système cardiovasculaire.

Abstract

It is generally well accepted that endothelial progenitor cells derived from the bone marrow exert an important regulatory role in the maintenance of cardiovascular homeostasis. Recently, the discovery of the implication of endothelial progenitor cells in estrogens-induced cardiac repair has generated a great interest. Still, it remains unknown if estrogens naturally modulate level of circulating endothelial progenitor cells in women. Such regulation could partially explain the lower prevalence of cardiovascular events in women at middle age compared to men. In addition, even if in several models, estrogens were able to act directly on endothelial progenitor cells to increase their mobilisation and their functionality; it remains unclear if estrogens modulate only endothelial progenitor cells or whether they can act more broadly to protect the cardiovascular system by regulating processes involved in the functional organization of the stem cell niche.

This project was thus designed to I) evaluate, *in vivo*, if menstrual cycle influences circulating levels and maturity of endothelial progenitor cells in normally menstruating women and if this could underline gender differences and II) determine, *in vitro*, the influence of 17β -estradiol on biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche.

Our results suggest a physiological regulation of the availability and the maturity of endothelial progenitor cell subpopulations in premenopausal women throughout menstrual cycle. This regulation occurs in parallel with 17β -estradiol blood level which, based on a comprehensive analysis of 17β -estradiol action, suggests an active role for this molecule on the mobilization of endothelial progenitor cells in women. In addition, greater mean global number of several endothelial progenitor cell subpopulations was found in women compared to men. This particularity helped us identifying 17β -estradiol as a predictive factor for the gender differences perceived.

It appears that 17β -estradiol treatment alters the genome expression pattern in both stem cells and stromal cells of the bone marrow. Among the genes modulated, we were able to identify key factors involved in signalling processes and cellular interactions by which 17β -estradiol regulates the functional organisation of the bone marrow stem cell niche. It is now evident that 17β -estradiol, by direct actions on stem cells and indirect actions via stromal cells, influences biological processes involved in mediating and balancing the quiescence, self-renewal, commitment, proliferation and mobilisation of stem cells certainly contributing to its reparative benefits on the cardiovascular system.

Our work thus proposes a direct action of estrogens on endothelial progenitor cells and the functional organisation of the bone marrow. This action will certainly be beneficial to the development of novel therapeutics in the prevention and treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: estrogens, endothelial progenitor cells, stem cell niche, bone marrow and cardiovascular system.

Table des matières

1. Introduction	21
1.1. L'endothélium vasculaire.....	22
1.1.1. Fonctions homéostasiques.....	22
1.1.2. Dysfonction endothéliale et athérosclérose.....	23
1.2. Athérosclérose.....	24
1.2.1. Lésion athérosclérotique	24
1.2.2. Évolution de la lésion athérosclérotique	26
1.2.2.1. Initiation : activation de l'endothélium vasculaire.....	26
1.2.2.2. Progression :	27
1.2.2.2.1. Processus inflammatoire	27
1.2.2.2.1.1. Recrutement des cellules inflammatoires	27
1.2.2.2.1.2. Rôle des monocytes.....	28
1.2.2.2.1.3. Rôle des lymphocytes T	29
1.2.2.2.1.4. Facteurs anti-inflammatoires.....	31
1.2.2.2.1.5. Facteurs métaboliques	31
1.2.2.2.1.6. Diètes	32
1.2.2.2.2. Épaississement de l'intima.....	33
1.2.2.3. Rupture : formation de thrombus et occlusion.....	34
1.3. Cellules endothéliales progénitrices.....	36
1.3.1. Homéostasie de l'endothélium vasculaire et cellules endothéliales progénitrices	36
1.3.2. Origine et caractérisation des cellules endothéliales progénitrices.....	38
1.3.2.1. Origine	38
1.3.2.2. Caractérisation.....	38
1.3.3. Athérosclérose et cellules endothéliales progénitrices.....	41
1.3.4. Cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices.....	42

1.3.4.1. La niche des cellules souches : maintien et mobilisation des cellules endothéliales progénitrices.....	44
1.3.4.2. Circulation périphérique : survie des cellules endothéliales progénitrices .	46
1.3.4.3. Paroi vasculaire : recrutement et différenciation des cellules endothéliales progénitrices.....	47
1.3.4.3.1. Recrutement	47
1.3.4.3.2. Différenciation	47
1.3.5. Facteurs de risque cardiovasculaire et cellules endothéliales progénitrices	48
1.3.5.1. Hyperlipidémie.....	48
1.3.5.2. Hypertension	49
1.3.5.3. Diabète	49
1.3.5.4. Tabagisme	50
1.3.5.5. Sédentarité.....	51
1.4. Estrogènes	53
1.4.1. Biologie des estrogènes.....	53
1.4.1.1. Biosynthèse des estrogènes	53
1.4.1.2. Récepteurs aux estrogènes	55
1.4.1.2.1. Structure	55
1.4.1.2.2. Distribution	56
1.4.1.2.3. Activation.....	57
1.4.1.2.3.1. La voie classique dépendante du ligand.....	57
1.4.1.2.3.2. La voie indépendante du ligand	58
1.4.1.2.3.3. La voie non-génomique dépendante du ligand	58
1.4.1.2.4. Déterminants moléculaires de l'activité transcriptionnelle.....	58
1.4.1.2.4.1. Cofacteurs transcriptionnels.....	59
1.4.1.2.4.2. Caractéristiques du promoteur	59
1.4.2. Athérosclérose et estrogènes	60
1.4.2.1. Profil lipidique	60

1.4.2.2. Processus inflammatoire	61
1.4.2.3. Biodisponibilité du NO	62
1.4.2.4. Facteurs vasoactifs	63
1.4.2.5. Cellules vasculaires	63
1.4.3. Cellules endothéliales progénitrices et estrogènes	64
1.4.3.1. Processus de réendothélialisation	65
1.4.3.2. Sénescence des cellules endothéliales progénitrices	65
1.4.3.3. Processus de néovascularisation	66
1.5. Problématique et but du projet de recherche	68
2. Articles scientifiques	70
2.1. Menstrual cycle influences on endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection?	71
2.1.1. Accord des coauteurs et permission de l'éditeur	72
2.1.2. Structured abstract	74
2.1.3. Introduction	75
2.1.4. Materials and methods	77
2.1.4.1. Volunteers	77
2.1.4.2. Data collection	77
2.1.4.3. Peripheral blood collection	77
2.1.4.4. Measurement of hormone levels	78
2.1.4.5. Flow cytometry analysis of circulating PC, EPC and aEPC subpopulations	78
2.1.4.6. Statistical analysis	79
2.1.5. Results	80
2.1.5.1. Circulating levels of PC and EPC subpopulations are influenced by menstrual cycle phases	80
2.1.5.2. Maturation of PC and EPC subpopulations is influenced by the menstrual cycle	81

2.1.5.3. Gender differences in mean global circulating levels of PC, EPC and aEPC subpopulations	82
2.1.5.4. Maturation of PC and EPC subpopulations differs between men and women	83
2.1.6. Discussion	85
2.1.7. Acknowledgments.....	90
2.1.8. References	91
2.1.9. Tables	95
2.1.9.1. Table 1. Volunteer's clinical characteristics	95
2.1.9.2. Table 2. Phenotypical characteristics of PC subpopulations and their corresponding EPCs or aEPCs.....	97
2.1.10. Figure legends.....	98
2.1.10.1. Figure 1: Menstrual cycle influences circulating levels of PC and EPC subpopulations.	98
2.1.10.2. Figure 2: Menstrual cycle influences PC and EPC maturation.....	98
2.1.10.3. Figure 3: Mean global circulating level of PCs differs between sexes.....	98
2.1.10.4. Figure 4: Mean global circulating level of EPCs and aEPCs differs between sexes.....	98
2.1.10.5. Figure 5: Gender influences PC and EPC maturation.....	99
2.1.11. Figures.....	100
2.1.11.1. Figure 1	100
2.1.11.2. Figure 2	101
2.1.11.3. Figure 3	102
2.1.11.4. Figure 4	103
2.1.11.5. Figure 5	104
2.1.11.6. Figure S1	105

2.2. Estrogen-induced gene expression in bone marrow c-kit ⁺ stem cells and stromal cells: identification of specific biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche.....	106
2.2.1. Accord des coauteurs et permission de l'éditeur.....	107
2.2.2. Abstract	109
2.2.3. Introduction	110
2.2.4. Materials and methods	113
2.2.4.1. Isolation and culture of c-kit ⁺ SCs and CD44 ⁺ StroCs	113
2.2.4.2. Quantification and purification of c-kit ⁺ SCs and CD44 ⁺ StroCs by flow cytometry cell sorting.....	113
2.2.4.3. Microarray analysis	114
2.2.4.4. Quantitative real-time PCR	114
2.2.4.5. Statistical analysis	115
2.2.5. Results	116
2.2.5.1. 17 β E modulation of whole BM culture system is cell type dependent.....	116
2.2.5.2. 17 β E influences gene expression profiles in c-kit ⁺ SCs and CD44 ⁺ StroCs	116
2.2.5.3. Genes modulated by 17 β E in c-kit ⁺ SCs and CD44 ⁺ StroCs are involved in biological processes regulating the functional organization of the SC niche	117
2.2.5.4. The reliability of the microarray data is confirmed by Q-PCR evaluation	118
2.2.6. Discussion	119
2.2.7. Acknowledgments.....	124
2.2.8. References	125
2.2.9. Tableaux	131
2.2.9.1. Table I. Primer pairs designed for Q-PCR.....	131
2.2.9.2. Table II. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in c-kit ⁺ SCs (> 1.5 fold; <i>P</i> value < 0.05)	132

2.2.9.3. Table III. Highly represented Gene Ontology biological processes involved in 17 β E action in c-kit ⁺ SCs	138
2.2.9.4. Table IV. Highly represented Gene Ontology biological processes involved in 17 β E action in CD44 ⁺ StroCs.....	140
2.2.10. Figure legends	142
2.2.10.1. Figure 1: Percentage of c-kit ⁺ SCs and CD44 ⁺ StroCs in the whole BM culture system under 17 β E treatment.	142
2.2.10.2. Figure 2: Expression profiles of c-kit ⁺ SCs and CD44 ⁺ StroCs under 17 β E treatment versus untreated cells.	142
2.2.10.3. Figure 3: Correlation between microarray and Q-PCR variation ratio... ..	143
2.2.11. Figures.....	144
2.2.11.1. Figure 1	144
2.2.11.2. Figure 2	145
2.2.11.3. Figure 3	146
2.2.12. Supplemental data	147
2.2.12.1. Table SI. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in CD44 ⁺ StroCs (> 1.5 fold; <i>P</i> value < 0.05)	147
2.2.12.2. Table SII. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in c-kit ⁺ SCs (> 1.5 fold; <i>P</i> value > 0.05)	157
2.2.12.3. Table SIII. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in CD44 ⁺ StroCs (> 1.5 fold; <i>P</i> value > 0.05)	164
2.2.12.4. Table SIV. Validation of microarray variation ratio by quantitative RT-PCR for c-kit ⁺ SCs	173
2.2.12.5. Table SV. Validation of microarray variation ratio by quantitative RT-PCR for CD44 ⁺ StroCs.....	174
3. Discussion	175
3.1. Les cellules de la moelle osseuse : une cible réelle des estrogènes?	179
3.1.1. Les cellules endothéliales progénitrices.....	179

3.1.2. L'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches.....	181
3.2. Les cellules de la moelle osseuse : une cible réelle des estrogènes dans la protection cardiovasculaire?.....	183
3.2.1. Observations cliniques et épidémiologiques.....	183
3.2.2. Propriétés fonctionnelles des différentes populations de progéniteurs endothéliaux.....	184
3.2.3. Cible des estrogènes dans l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches.....	185
3.2.4. Rôle possible des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse dans la pathogenèse de l'athérosclérose.....	186
3.3. Les cellules de la moelle osseuse et les estrogènes : outils de prévention et/ou de thérapie.....	189
3.3.1. Hormonothérapie de remplacement.....	189
3.3.2. Thérapies cellulaires.....	193
4. Conclusion.....	196
5. Bibliographie.....	I
6. Annexe.....	XXXIII
Annexe 1: Processus biologiques de l'Ontologie Génétique surreprésentés sous l'influence du 17 β E auprès de cellules souches c-kit+.	XXXIV
Annexe 2 : Processus biologiques de l'Ontologie Génétique surreprésentés sous l'influence du 17 β E auprès de cellules stromales CD44+.	XLV

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de risque cardiovasculaire et cellules endothéliales progénitrices.	
.....	51
Tableau 2 : Facteurs clés de l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules	
souches régulés par le 17β-estradiol.	177

Liste des figures

Figure 1 : Lésion athérosclérotique.	25
Figure 2 : Cascade de différenciation des cellules endothéliales progénitrices.	40
Figure 3 : Cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices.	43
Figure 4 : Niche des cellules souches de la moelle osseuse.	45
Figure 5 : Variation des concentrations plasmatiques des hormones hypophysaires et ovariennes au cours du cycle menstruel.	54
Figure 6 : Structure des récepteurs aux estrogènes.	56
Figure 7 : Effets des estrogènes sur le cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices.	67

Liste des abréviations

- (17 β E) : 17 β -estradiol
(apoE) : apolipoprotéine E
(CE) : cellule endothéliale
(CEP) : cellule endothéliale progénitrice
(CML) : cellule musculaire lisse
(CS) : cellule souche
(CSH) : cellule souche hématopoïétique
(CStro) : cellule stromale
(eNOS) : *endothelial nitric oxide synthase*
(ER α) : *estrogen receptor α*
(ER β) : *estrogen receptor β*
(IL) : interleukine
(LDL) : *low density lipoprotein*
(MO) : moelle osseuse
(NO) : oxyde nitrique
(SDF-1) : *stromal cell derived factor-1*
(VCAM-1) : *vascular cell adhesion molecule-1*
(VEGF) : *vascular endothelial growth factor*
(VEGFR2) : *vascular endothelial growth factor receptor 2*

*Je dédie ce travail à ce petit être en moi qui
fait en sorte que je le termine remplie d'un
immense bonheur sans nom.*

Remerciements

Merci au Dr Jean-François Tanguay pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je tiens à lui faire part de toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ces travaux de thèse.

Merci au Dr Guy Rousseau, au Dr Christian F. Deschepper, au Dr Jacques Galipeau et au Dr Daniel Lajeunesse de prendre sur leur temps pour évaluer cette thèse.

Un merci tout particulier au Dr Isabelle Cloutier pour ses précieux conseils et pour tout l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce projet. Je la remercie particulièrement pour le temps précieux qu'elle m'a accordé et pour les questions et remarques qui ont amélioré mes travaux et affuté ma réflexion.

Merci à Pascale Geoffroy pour son écoute et pour sa disponibilité. Son soutien est précieux et sa joie de vivre source d'inspiration et de motivation.

Merci à Sandra Gilligan, Julie Lebel, Dominique Lauzier et Marie-Élaine Clavet qui m'ont si souvent offert leur soutien technique et qui, de part leur gentillesse, m'ont si souvent aidée à achever ces travaux.

Merci à Pedro Geraldès, Stéphanie Gagnon, Kim Tardif, Vikie Lamontagne, et Souhad el Akoum pour le plaisir que j'ai eu, au cours de ces dernières années, à travailler dans une équipe d'étudiants merveilleux pour qui le respect, l'entraide, et le soutien ont réellement une signification.

Finalement, je remercie mes parents et mes sœurs pour leurs encouragements et la compréhension dont ils ont fait preuve toutes les fois où l'avancement de mes travaux a primé sur les précieuses réunions familiales.

Enfin, je remercie Emanuel pour son amour et son soutien tout simplement.

Avant propos

L'athérosclérose est une pathologie du système vasculaire qui préoccupe les sociétés d'aujourd'hui mais ce n'est en aucun cas une maladie des temps modernes. Le terme *athérome* du grec *athara* : « bouillie de farine ou de gruau », fut proposé pour la première fois par Albrecht von Haller en 1755 afin de désigner le processus dégénératif de l'intima des grosses artères qu'il observait. Il fallu attendre jusqu'en 1804 pour qu'Antonio Scarpa, dans son travail sur l'anévrisme artériel, décrive en détail le processus anatomopathologique dégénératif de l'intima. Pour lui, l'anévrisme de l'aorte résultait « d'une dégénérescence de la couche interne de l'artère, lente, à ulcération pathologique stéatomateuse, fongueuse et squameuse ». En 1833, le pathologiste Jean Lobstein proposa que les altérations artérielles en question ne soient pas d'origine inflammatoire, mais plutôt dues à une prolifération excessive du tissu conjonctif de l'intima et à une calcification. Un processus qu'il nomma *artériosclérose*. En 1856, le célèbre pathologiste Rudolf Virchow, revint avec le concept de l'athérome en tant que lésion inflammatoire chronique en parlant d'*endartérite déformante chronique*. C'est finalement le pathologiste Leipzig Marchand, en 1904, qui inventa le terme *athérosclérose* pour désigner le processus dégénératif de l'intima des artères. Ce terme, que l'on utilise encore aujourd'hui, reflète la dualité lésionnelle, athéromateuse et scléreuse de la maladie (Révisé dans ¹).

Les complications résultant de cette pathologie peuvent mener à de sévères événements tels les syndromes coronariens, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies artérielles périphériques. Dans nos sociétés modernes, ces complications sont responsables de la majorité de la morbidité et de la mortalité liées aux maladies cardiovasculaires. Des études épidémiologiques indiquent même que, due à une adoption d'un style de vie moderne, l'augmentation de la prévalence de l'athérosclérose dans toutes les régions du monde atteindra des proportions épidémiques dans les décennies à venir ^{2,3}. Heureusement, un avancement considérable a été réalisé au cours des 30 dernières années sur la compréhension de la pathogenèse de l'athérosclérose. Les cellules endothéliales

progénitrices sont maintenant considérées comme un facteur important du maintien de l'intégrité de l'endothélium vasculaire et donc de prévention des processus athéroscléreux et de leurs complications. Ces nouvelles données scientifiques nous permettent donc d'entrevoir le développement d'outils de prévention, de diagnostic et de traitement mieux adaptés à cette condition.

1. Introduction

1.1. L'endothélium vasculaire

1.1.1. Fonctions homéostasiques

L'endothélium vasculaire est un organe dont les fonctions homéostasiques sont essentielles au sein de l'organisme. En condition physiologique normale, il agit telle une barrière sélective et perméable entre les éléments sanguins et les tissus. Il dispose à la fois de fonctions sensorielles et exécutives lui permettant de générer des agents effecteurs impliqués dans le maintien de cette homéostasie. Ces agents permettent de soutenir la surface anti-thrombotique et anti-inflammatoire de l'endothélium, de réguler le tonus vasculaire et de prévenir le remodelage vasculaire en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses (CML).

L'action anti-adhésive et anti-agrégante plaquettaire de l'endothélium vient notamment de la synthèse de la prostacycline, de l'oxyde nitrique (NO) et de l'endothéline-1^{4,5}. Son action anti-thrombotique, quant à elle, est en grande partie liée à l'expression de surface des glycosaminoglycans et de la thrombomoduline qui lui permettent d'inactiver la thrombine ou encore de bloquer son action^{6,7}. La synthèse du NO permet aussi à l'endothélium d'entretenir un état anti-inflammatoire. Par une association directe et/ou indirecte avec certains facteurs de transcription, le NO régule négativement plusieurs gènes impliqués dans l'initiation de la réponse inflammatoire tels que les gènes codant pour la P-sélectine, la *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) et la protéine chimiotactique des monocytes-1⁸.

Encore ici, l'endothélium module le tonus vasculaire par la synthèse de substances vasorelaxantes dont les principales sont la prostacycline, le NO et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium⁹⁻¹¹. L'équilibre désiré est obtenu par la synthèse de facteurs vasoconstricteurs tel que l'endothéline-1 et par la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II¹². Lorsque l'endothélium est intègre et fonctionnel, la production de ces

substances vasoactives favorise davantage un état global de vasodilatation. En plus de moduler le tonus, les substances vasoactives de l'endothélium influencent la prolifération et la migration de différents types cellulaires de la paroi vasculaire. Le NO stimule à la fois la prolifération et la migration des cellules endothéliales (CE) et inhibe ces mêmes processus chez les CML^{13,14}. À l'inverse, l'angiotensine II promeut la prolifération et la migration des CML¹⁵.

1.1.2. Dysfonction endothéliale et athérosclérose

La position anatomique de l'endothélium le rend particulièrement vulnérable à toutes agressions provenant des facteurs de risque cardiovasculaire tels l'hyperlipidémie, l'hypertension, le diabète, et le tabagisme. Qu'elle soit physique ou biochimique, une attaque de l'endothélium se perçoit rapidement par son incapacité à maintenir ses fonctions homéostasiques; une incapacité qui vient en majeure partie d'une diminution de la biodisponibilité du NO. Au site de dysfonctionnement, il est possible de noter une augmentation de l'apoptose des CE, une irrégularité du tonus vasculaire, une agrégation plaquettaire anormale, une prolifération excessive des CML et la présence de cellules inflammatoires dans l'intima. De ce fait, la dysfonction endothéliale a rapidement été identifiée comme étant une des étapes précoces du développement de l'athérosclérose¹⁶. Le dysfonctionnement endothélial contribue à, ou encore amplifie, de nombreux processus athéroscléreux tels que la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire, l'adhésion leucocytaire et la génération de cytokines pro-inflammatoires¹⁷. Vue son étroite liaison avec l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale est également associée aux manifestations cliniques de cette pathologie telles le syndrome coronarien aigu, l'infarctus du myocarde et la mort cardiovasculaire¹⁸.

1.2. Athérosclérose

1.2.1. Lésion athérosclérotique

Il est de nos jours bien accepté que l'athérosclérose est une réponse inflammatoire chronique des artères à l'agression de la paroi par des agents physiques, chimiques, biologiques et même infectieux. Cette réponse résulte d'une étroite interaction entre les constituants cellulaires naturels de la paroi vasculaire, les lipoprotéines modifiées, les monocytes/macrophages et les lymphocytes T ¹⁷. La strie lipidique, que l'on retrouve sous l'endothélium de l'artère, est la première lésion visible du processus athéroscléreux. Elle est composée d'une accumulation de fines particules lipidiques extracellulaires disséminées, de couches de macrophages spumeux, de lymphocytes T et de CML chargées de lipides ¹⁹. Quoique asymptomatique à ce stade, on détecte déjà une vasorelaxation anormale du vaisseau affecté ²⁰. Lorsque prise en charge adéquatement, la strie lipidique peut toujours régresser jusqu'à disparaître complètement. Par contre, si aucune action n'est portée, la strie lipidique peut alors progresser jusqu'à une réelle lésion athérosclérotique.

La transition de la strie lipidique vers la lésion athérosclérotique (Figure 1) est caractérisée par la prolifération et la migration excessive des CML de la média vers l'intima. La lésion athérosclérotique se perçoit donc comme un épaississement local et asymétrique de l'intima de l'artère. Elle est constituée des cellules naturelles de la paroi vasculaire, de cellules inflammatoires, de plusieurs éléments du tissu conjonctif, de lipides et de débris divers ²¹. Dans le centre de la lésion, les particules lipidiques extracellulaires forment un noyau entouré de CML et de dépôts massifs de collagène que l'on nomme la chape fibreuse. Les macrophages et les lymphocytes T qui infiltrent la lésion sont particulièrement abondants en bordure du noyau lipidique ²¹⁻²³. Plusieurs des cellules inflammatoires présentes démontrent des signes d'activation et produisent une grande quantité de cytokines inflammatoires ²³⁻²⁶. Les lésions athérosclérotiques peuvent devenir

extrêmement complexes avec des signes de calcification, d'ulcération à la face luminale et d'hémorragies provenant des vasa vasorum irrigant la lésion.

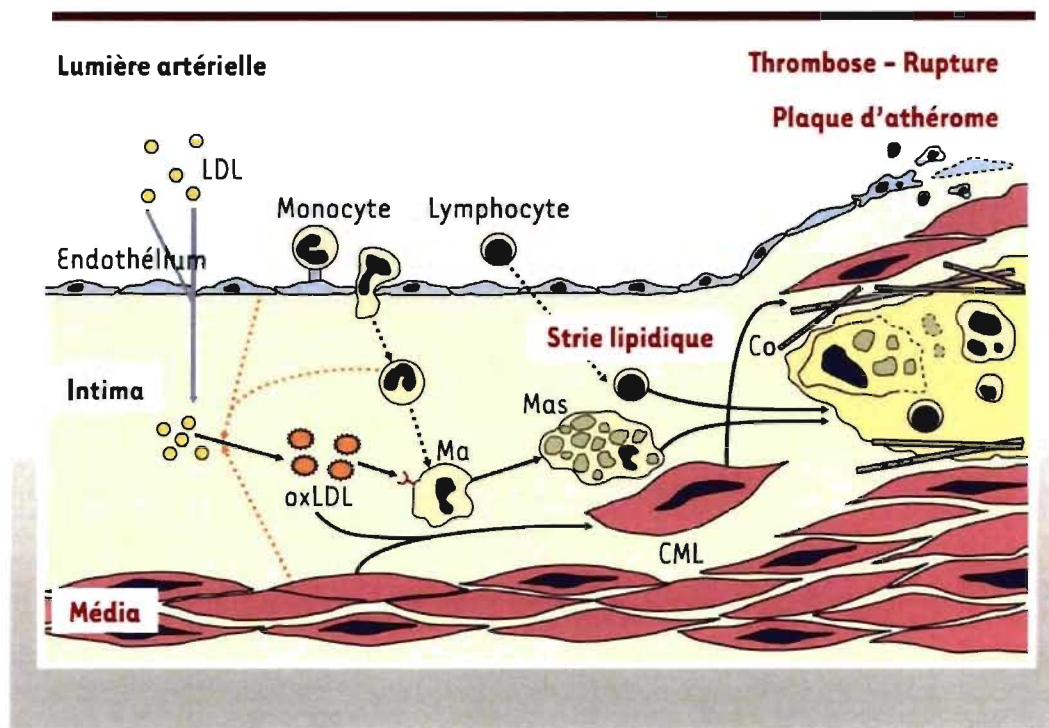


Figure 1 : Lésion athérosclérotique. La strie lipidique est d'abord caractérisée par l'accumulation de *low density lipoproteins* (LDL) sous l'endothélium vasculaire. L'oxydation des lipoprotéines (oxLDL) favorise l'activation de l'endothélium et l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires. Une fois adhérents, les monocytes migrent vers la région sous endothéliale et sont alors activés en macrophage (Ma). Lorsque la capacité des macrophages à nettoyer l'intima est dépassée, ils accumulent les lipides et deviennent alors spumeux (Mas), ce qui, combiné au recrutement des lymphocytes, contribue à la formation de la strie lipidique. La progression vers la lésion athérosclérotique se caractérise par une réaction cicatricielle des cellules musculaires lisses (CML) de la média qui migrent vers l'intima et sécrètent du collagène (Co). Le niveau d'inflammation et la solidité de la chape fibreuse conditionnent la stabilité de la lésion. La rupture expose des agents thrombogéniques à l'origine de la formation d'un thrombus (Tirée de ²⁷).

1.2.2. Évolution de la lésion athérosclérotique

1.2.2.1. Initiation : activation de l'endothélium vasculaire

La desquamation de l'endothélium n'est généralement pas un facteur de l'initiation de l'athérosclérose. Sous l'effet d'attaques biochimiques ou physiques, l'endothélium subit d'importants changements morphologiques qui affectent son phénotype anti-inflammatoire, anti-oxydant et anti-thrombotique. L'orientation usuelle des CE dans la direction du flux sanguin tend à disparaître et les jonctions endothéliales serrées sont altérées²⁸. L'apoptose des CE et le renouvellement de ces dernières en réponse aux facteurs injuriants sont aussi accélérés^{29,30}. L'endothélium se veut alors *activé*.

Au site d'activation, une élévation de l'entrée des particules lipidiques au niveau de l'intima qui s'explique, entre autres, par une augmentation de la perméabilité de l'endothélium à cet endroit, est fréquemment notée³¹. L'accumulation des lipides se perçoit surtout au niveau des bifurcations artérielles, des courbures et à l'origine des branches artérielles, et donc au niveau de toutes surfaces soumises à des forces de cisaillement faibles ou négatives (pression, turbulences, stagnation d'écoulement)^{32,33}. Les forces de cisaillement négatives seraient donc en partie responsable de l'état activé de l'endothélium parce qu'elles favorisent l'expression de gènes pro-inflammatoires et de plusieurs molécules d'adhésion³⁴. Elles contribueraient aussi à l'augmentation du stress oxydatif altérant de nombreuses fonctions de l'endothélium dont le tonus vasomoteur³³.

Chez l'humain, la majorité du cholestérol sanguin est transporté via les *low density lipoproteins* (LDL) et leur concentration plasmatique élevée, comme celle observée chez les patients hypercholestérolémiques, contribue aussi à leur accumulation dans l'intima de l'artère. Suite à leur infiltration et à leur rétention, les LDL sont soumises à des altérations oxydatives par les CE, les macrophages et les CML. L'augmentation du stress oxydatif par la production cellulaire de radicaux libres au site d'activation de l'endothélium, pourrait

être à l'origine de ce processus ³⁵. L'oxydation des LDL mène à la relâche de phospholipides capables d'activer, à leur tour, les CE et de promouvoir un état inflammatoire dans la paroi ^{36,37}. Les LDL oxydées peuvent même contribuer à accentuer la dysfonction endothéliale en réduisant l'expression de la *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) via une déstabilisation post-transcriptionnelle de son acide ribonucléique messenger et donc, par le fait même, la synthèse du NO par les CE ³⁸.

1.2.2.2. Progression :

1.2.2.2.1. Processus inflammatoire

1.2.2.2.1.1. Recrutement des cellules inflammatoires

Lorsqu'activées, les CE expriment à leur surface plusieurs types de molécules d'adhésion permettant aux cellules sanguines d'entamer le processus d'adhésion ³⁹. De plus, le dysfonctionnement de l'endothélium limite sa capacité de production de NO ce qui le prive de ses effets protecteurs sur l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire ⁴⁰. Il n'est donc pas étonnant de constater que parmi toutes les cellules sanguines, les plaquettes sont généralement les premières cellules à être recrutées à la surface de l'endothélium au cours des processus athéroscléreux. À l'aide des glycoprotéines Ib et IIb/IIIa, les plaquettes s'engagent sur la surface endothéliale et contribuent, à leur tour, à l'activation des CE ce qui promeut, subséquent, le recrutement des leucocytes sanguins. L'inhibition de l'adhésion plaquettaire permettrait d'ailleurs de réduire l'infiltration leucocytaire et la progression de la lésion athérosclérotique chez un modèle de souris hypercholestérolémiques ⁴¹.

La surexpression de la VCAM-1 est essentielle au recrutement des leucocytes, et donc à la progression de la lésion. C'est à l'aide de leur récepteur *very late antigen-4* que ces derniers interagissent avec l'endothélium activé ^{42,43}. D'autres molécules d'adhésion telles que la P-sélectine, la E-sélectine et la molécule d'adhésion intracellulaire-1 semblent

aussi contribuer au recrutement des leucocytes car une diminution de leur infiltration chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE^{-/-}) et l'un ou l'autre de ces gènes est généralement décelée ^{44,45}. Lorsque adhérents, les leucocytes migrent dans la région sous endothéliale par les jonctions de plus en plus perméables de l'endothélium dysfonctionnel. Ce processus est encouragé par la présence des LDL oxydées et de plusieurs agents chimiotactiques produits par les cellules vasculaires (protéine chimiotactique des monocytes-1, interleukine (IL) 8, CCL5 et/ou fractalkine) ⁴⁶⁻⁴⁹. Plus la lésion progresse, plus il est possible de déceler l'expression de la VCAM-1 par les CML ⁵⁰. Cette expression permettrait de retenir les leucocytes au niveau de l'intima de l'artère et d'accentuer la progression de la lésion. La délétion génétique ou le blocage pharmacologique de certains agents chimiotactiques, de leurs récepteurs et/ou des différentes molécules d'adhésion s'est, par ailleurs, avéré efficace pour réduire la progression de l'athérosclérose chez la souris ^{48,49,51-53}.

Une augmentation de l'interaction leucocyte-endothélium est généralement perçue chez les souris eNOS^{-/-} ⁵⁴. L'interprétation de ce phénomène permet de suggérer qu'encore ici, l'endothélium activé, incapable d'adéquatement synthétiser la molécule de NO, contribue à la progression de la lésion athérosclérotique. L'inhibition pharmacologique de la eNOS procure un effet semblable chez des lapins hypercholestérolémiques. Elle mène vers une augmentation marquée de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire, un effet qui peut être atténué par un apport diététique en L-arginine, le substrat de la eNOS ⁵⁵. Cette augmentation de l'adhésion leucocytaire serait due à une augmentation de l'expression de plusieurs molécules d'adhésion et de la protéine chimiotactique des monocytes-1 ^{56,57}.

1.2.2.2.1.2. Rôle des monocytes

Une fois migrés, les monocytes, sous l'influence du facteur stimulant les colonies de macrophages produit par les CE activées et les CML, prolifèrent et se différencient en

macrophages ⁵⁸. Cette étape est cruciale dans le développement de la lésion athérosclérotique ⁵⁹ et elle est étroitement liée à une surexpression de plusieurs récepteurs du système immunitaire inné tels les récepteurs éboueurs (SR-AI (SR pour *scavenger receptor*), SR-AII, CD36 et CD68) et les récepteurs *toll-like* (TLR2 (TLR pour *toll-like receptor*) et TLR4) ^{60,61}.

Les récepteurs éboueurs permettent d'internaliser les particules de LDL oxydées afin qu'elles soient détruites par une dégradation lysosomiale. Cependant, si la concentration locale en cholestérol est trop importante pour qu'il soit suffisamment mobilisé par les macrophages, il s'accumulera sous forme de vésicules cytosoliques. Ultimement, les macrophages se transforment en cellules spumeuses et finissent par mourir contribuant ainsi à accentuer le contenu lipidique et nécrotique du noyau de la lésion.

Tout comme les récepteurs éboueurs, les récepteurs *toll-like* se lient aux particules de LDL oxydées ⁶². En revanche, leur liaison engendre une cascade de signalisation intracellulaire qui mène à l'activation des macrophages ⁶¹. Les macrophages produisent alors d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires, de métalloprotéinases et de radicaux libres qui accentuent la progression de la lésion athérosclérotique. Les récepteurs *toll-like* sont aussi exprimés par les CE et leur activation par ces derniers contribuerait de façon importante au processus inflammatoire de la lésion ⁶³. Il a d'ailleurs été démontré chez la souris apoE^{-/-} que la délétion génétique de la protéine 88 associée à la réponse primaire de la différenciation myéloïde, une importante protéine adaptatrice de la réponse signalétique engendrée par les récepteurs *toll-like*, inhibe la progression de l'athérosclérose ⁶⁴.

1.2.2.2.1.3. Rôle des lymphocytes T

Tout comme pour les monocytes, la participation des lymphocytes T dans l'induction du processus inflammatoire de la lésion athérosclérotique est considérable ⁶⁵. Les lymphocytes T retrouvés au site de lésion sont principalement constitués de cellules T

CD4+. Ils interagissent avec des antigènes athérogènes, tels que les LDL oxydées, l'apolipoprotéine B, ou la protéine de choc thermique 60, présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ^{66,67}.

Lorsque le lymphocyte T se lie à son antigène, une cascade de signalisation cellulaire s'en suit afin d'augmenter sa production d'enzymes et de cytokines pro-inflammatoires. Au cours des processus athéroscléreux, les cytokines produites par les lymphocytes T favorisent une réponse de type Th1 (Th pour *T helper*) généralement associée à la défense contre les pathogènes intracellulaires et à une activation des macrophages ²⁶. Les lymphocytes T activés se différencient donc en cellules effectrices de la réponse Th1 et produisent de grandes quantités d'interféron γ , d'IL12, d'IL15, d'IL18 et du facteur de nécrose tumorale. L'interféron γ , la principale cytokine d'activation des macrophages, augmente l'efficacité de ces derniers à présenter les antigènes athérogènes au niveau de la lésion. Il favorise aussi la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires auprès des macrophages telles que le facteur de nécrose tumorale et l'IL1 ⁶⁸. De façon synergique et autocrine, ces dernières cytokines agissent à leur tour, au niveau même des macrophages qui les produisent, pour induire la production de molécules cytotoxiques ⁶⁵. Toutes ces actions tendent à promouvoir la progression de la lésion athérosclérotique comme le démontrent plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées. En effet, l'utilisation de souris hypercholestérolémiques chez qui l'on a procédé à une délétion du gène de l'interféron γ ou de son récepteur, de l'IL12, de IL18 ou encore du facteur de nécrose tumorale, permet de ralentir la progression des lésions athérosclérotiques ⁶⁹⁻⁷³.

L'action des cytokines produites par les lymphocytes T favorise donc un état inflammatoire important au niveau de la lésion. Cet état se répercute aussi de façon systémique, dans tout l'organisme, en engendrant une production d'IL6 et de protéine C-réactive. À leur tour, ces molécules, et en particulier la protéine C-réactive, contribuent au dysfonctionnement de l'endothélium en perpétuant son état activé ⁷⁴. De plus, l'exposition

des CE à la protéine C-réactive diminue leur capacité de synthèse de NO en réduisant l'expression de la eNOS via une déstabilisation de son acide ribonucléique messenger ^{75,76}.

1.2.2.2.1.4. Facteurs anti-inflammatoires

En revanche, le système immunitaire, par ses capacités d'autorégulation, induit aussi la production de facteurs anti-inflammatoires au site de lésion. Les deux principaux régulateurs négatifs de la progression de l'athérosclérose sont l'IL10 et le facteur de croissance transformant- β . Ces facteurs sont produits par la plupart des types cellulaires de la lésion incluant les plaquettes, les macrophages, les CE, les CML et les lymphocytes T. La délétion génétique ou le blocage pharmacologique de l'un ou l'autre de ces facteurs engendre des répercussions majeures sur la progression des processus athéroscléreux chez la souris ⁷⁷⁻⁷⁹.

1.2.2.2.1.5. Facteurs métaboliques

L'équilibre entre les effets des facteurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires contrôle donc de façon importante la progression de la lésion. De concert, les facteurs métaboliques peuvent aussi influencer les processus athéroscléreux. Un niveau sanguin élevé de lipoprotéines de haute densité est un élément de protection extrême contre le développement de l'athérosclérose. Les lipoprotéines de haute densité ont la capacité de vider les tissus périphériques de leur excès de cholestérol. En plus, elles semblent freiner l'accumulation de LDL oxydées par l'action d'une estérase, la paraxonase, qui possède la capacité de dégrader certains phospholipides oxydés ^{80,81}.

À l'inverse, le tissu adipeux des patients souffrant du syndrome métabolique et/ou d'obésité devient une source importante de facteurs inflammatoires tels que l'IL6, le facteur de nécrose tumorale et les adipokines (leptine, adiponectine, résistine, etc.) ce qui amplifie l'état inflammatoire global de tout l'organisme ^{82,83}. Quant à elle, l'hyperglycémie liée au diabète exerce une action délétère complexe sur la progression des lésions

athérosclérotiques. Par l'entremise d'une augmentation de la formation des produits terminaux de glycation avancée, l'hyperglycémie génère la production d'espèces réactives de l'oxygène, active la réponse inflammatoire et altère les fonctions biochimiques et structurales de plusieurs protéines (Révisé dans ⁸⁴). À titre d'exemple, l'hyperglycémie favorise l'expression des molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire ce qui augmente le recrutement des plaquettes et des leucocytes ^{85,86}. Elle induit aussi l'apoptose des CE ⁸⁷⁻⁸⁹ et inhibe la voie de signalisation de la protéine Akt associée à la production de NO, à la survie et à la prolifération des CE ⁹⁰.

1.2.2.2.1.6. Diètes

Tout comme les facteurs métaboliques, il semble que certaines diètes aient la capacité de moduler la progression des lésions athérosclérotiques. Les diètes riches en soya ont particulièrement retenu l'attention pour leurs actions anti-inflammatoires. En effet, la consommation régulière de protéines de soya aurait le potentiel de prévenir ou du moins de ralentir l'athérosclérose : 1) en réduisant le niveau circulant des LDL par une augmentation de l'activité de leur récepteur et une diminution de leur absorption, 2) en diminuant la susceptibilité des LDL aux particules oxydantes par une stimulation de l'activité des enzymes anti-oxydantes telles la catalase et la superoxyde dismutase 3) en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires 4) en réduisant l'expression des molécules d'adhésion au niveau vasculaire et 5) en prévenant l'agrégation plaquettaire (Révisé dans ⁹¹). Il fut d'abord cru que ces effets anti-athérogènes étaient liés à l'action des isoflavones, un phytoestrogènes retrouvé dans les plantes de soya. Cependant aujourd'hui, le réel potentiel thérapeutique des isoflavones est remis en question car la majorité des effets bénéfiques semble résider auprès des protéines de soya plutôt qu'aux extraits isolés de ces derniers ⁹².

1.2.2.2.2. Épaississement de l'intima

Caractéristique des lésions athérosclérotiques, l'inflammation locale s'accompagne d'un épaississement marqué de l'intima. La diminution de la biodisponibilité du NO au site de dysfonctionnement de l'endothélium et l'augmentation de la présence des radicaux libres dans l'intima en seraient les principaux responsables. En effet, ces phénomènes favorisent localement une prolifération excessive et une migration des CML de la média vers l'intima responsables de l'épaississement progressif de l'intima. Les CML entreprennent aussi un changement de phénotype passant d'un état contractile vers un état synthétique. Ce changement phénotypique initie leur production de matrice extracellulaire qui formera éventuellement la chape fibreuse de la lésion ⁹³.

Lorsque l'épaississement de l'intima atteint un seuil critique qui dépasse les limites de la diffusion d'oxygène, certaines régions de la lésion deviennent hypoxiques ce qui enclenche le processus d'angiogenèse au niveau des vasa vasorum de la paroi artérielle ^{94,95}. Les vaisseaux issus de cette angiogenèse sont composés d'une simple couche de CML surplombant une couche de CE. Cette structure leur donne la capacité de réguler leur propre tonus vasculaire et, par le fait même, de développer une dysfonction endothéliale indépendante du vaisseau mère. L'exposition systémique des CE des néovaisseaux aux facteurs de risque cardiovasculaire (hypertension, hyperlipidémie, tabagisme) peut donc mener à une dysfonction endothéliale de la microcirculation de la paroi vasculaire se percevant par une hyperperméabilité des microvaisseaux et la présence d'hémorragie locale dans certaines régions spécifiques de la lésion ⁹⁶⁻⁹⁸. Ces deux phénomènes favoriseraient la progression de la lésion athérosclérotique en amenant un influx supplémentaire de macrophages ⁹⁹. De plus, lors des hémorragies, l'accumulation locale des membranes d'érythrocytes riches en lipides représenterait un puissant stimulus athérogénique ¹⁰⁰.

1.2.2.3. Rupture : formation de thrombus et occlusion

Même si la progression de la lésion athérosclérotique peut mener à une perte de lumière suffisante pour créer une ischémie chronique, la majorité des événements cardiovasculaires qui causent un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral résulte principalement d'une rupture de la lésion et de la formation d'un thrombus occluant l'artère de façon soudaine ¹⁰¹. Les lésions sensibles à ce type de rupture sont souvent caractérisées par un amincissement de la chape fibreuse résultant, entre autres, des actions de la réponse inflammatoire.

En effet au niveau de la lésion, la chape fibreuse est constamment soumise à un renouvellement. La balance entre la production des protéines matricielles extracellulaires et la dégradation de ces dernières par les protéases déterminera sa structure. L'interféron γ , produit par les lymphocytes T, inhibe la production de collagène de type I et III par les CML, principale source de cette protéine dans la paroi vasculaire ¹⁰². L'interféron γ inhibe même la prolifération des CML, ce qui réduit d'autant plus la production des protéines de la matrice à la source ¹⁰³. Quant à eux, les macrophages produisent d'énormes quantités de protéases capables de dégrader les fibres de collagène telles que la collagénase, les gélatinases, la stromélysine et les métalloprotéinases ^{104,105}.

Du fait qu'une hyperréactivité vasculaire favorisant une vasoconstriction locale en réponse à divers stimuli est souvent constatée chez les patients souffrant d'angine instable ¹⁰⁶, il est généralement bien accepté que la vasoconstriction de l'artère contribue aussi aux risques de rupture de la lésion athérosclérotique. La diminution de la biodisponibilité du NO et l'augmentation de la relâche d'endothéline-1 au site de dysfonctionnement de l'endothélium favoriseraient cette vasoconstriction localisée et, par conséquent, les risques de rupture ^{107,108}.

Suite à la rupture, les facteurs de coagulation sanguine ont facilement accès au corps lipidique de la lésion et le processus de thrombose s'en suit. La dysfonction de l'endothélium contribue de façon importante à ce processus. Localement, il est possible de constater une augmentation de la concentration circulante du facteur de von Willebrand relâché par l'endothélium endommagé. Les CE activées se retrouvent aussi appauvries en expression de glycosaminoglycans ¹⁰⁹ et leur incapacité à synthétiser adéquatement la molécule de NO prive la paroi artérielle de son effet inhibiteur sur une protéine pro-thrombotique, l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène ¹¹⁰.

L'aspect thrombotique de la lésion dépendra aussi de la concentration du facteur tissulaire, une protéine clé dans l'initiation de la cascade de coagulation ¹¹¹. Localement, la production du facteur tissulaire par les CE et les macrophages est entre autres augmentée par la présence des LDL oxydées et par la liaison de leur récepteur CD40 à son ligand exprimé par les lymphocytes T et les plaquettes ¹¹². De plus, les LDL oxydées augmentent l'activité du facteur tissulaire et donc l'activation de la cascade extrinsèque de coagulation

1.3. Cellules endothéliales progénitrices

1.3.1. Homéostasie de l'endothélium vasculaire et cellules endothéliales progénitrices

La compréhension actuelle de la pathophysiologie de l'athérosclérose permet de suggérer que le maintien de l'intégrité physique et fonctionnelle de l'endothélium vasculaire est essentiel afin de prévenir et de limiter la progression de cette pathologie et, du même coup, de ses complications. L'homéostasie de l'endothélium est maintenue par l'équilibre qui se crée entre l'intensité des contraintes extérieures et la disponibilité et/ou l'efficacité des mécanismes de réparation. Ces mécanismes ont longtemps été attribués à la seule prolifération et migration des CE matures avoisinant le site endommagé. Cependant, comme les CE matures ont un phénotype totalement différencié associé à un potentiel de prolifération plutôt faible *in vivo*, il fut dernièrement suggéré que leur réelle aptitude à remplacer l'endothélium endommagé soit en fait assez limitée ¹¹⁴. Alors comment l'endothélium vasculaire assure-t-il son homéostasie?

Les premières évidences nous permettant de croire que l'homéostasie de l'endothélium puisse en fait résulter de l'action réparatrice de précurseurs endothéliaux circulants nous viennent d'études effectuées chez le chien. En effet, il fut constaté que des cellules circulantes, possiblement dérivées des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34+ de la moelle osseuse (MO), étaient capable de recouvrir la face luminale des prothèses de Dacron implantées chez l'animal ¹¹⁵. Chez l'humain, il fut constaté que des dispositifs d'assistance ventriculaire se retrouvaient couverts de cellules circulantes encore plus immatures coexprimant le marqueur de surface CD133 et le *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) ¹¹⁶. Ces observations ont rapidement suscité un grand intérêt auprès de la communauté scientifique. Le développement de modèles expérimentaux de blessure vasculaire chez la souris a permis à plusieurs équipes de

recherche de démontrer que des précurseurs endothéliaux circulants pouvaient en effet être recrutés aux sites de blessures artérielles ¹¹⁷⁻¹¹⁹. L'utilisation d'un modèle de transplantation de MO provenant de souris transgéniques exprimant le gène de la β -galactosidase a permis quant à lui, de démontrer que les précurseurs endothéliaux circulants recrutés étaient bel et bien des cellules dérivées de la MO. L'augmentation de l'incorporation des cellules positives pour la β -galactosidase aux sites de blessure a même été associée à une réendothélialisation accélérée de l'artère et à une diminution de la resténose ^{117,118}.

Les différents modèles de blessure vasculaire chez la souris ont aussi été de précieux outils pour réussir à démontrer que la mobilisation des précurseurs endothéliaux de la MO vers la circulation périphérique survient dans un processus visant à maintenir l'homéostasie vasculaire. Ces modèles ont en effet permis de confirmer que l'induction de la blessure vasculaire représente un stimulus suffisant pour permettre une augmentation rapide de la quantité de précurseurs endothéliaux (CD133+/VEGFR2+) en circulation ¹²⁰. Plusieurs observations cliniques sont venues appuyer ce concept. En effet, chez l'humain, la mobilisation des précurseurs endothéliaux est augmentée en conditions de stress pathologiques et/ou physiologiques tels que lors d'une ischémie du myocarde ^{121,122}, de l'apparition d'un syndrome coronarien aigu ¹²³ ou encore d'un entraînement cardiovasculaire ¹²⁴.

Devant ces récentes données, il paraît de plus en plus évident que pour maintenir son intégrité et sa fonctionnalité, l'endothélium vasculaire fait appel à un réservoir de précurseurs endothéliaux dérivés de la MO, les cellules endothéliales progénitrices (CEP). Le niveau circulant des CEP corrèlerait même avec la fonction de l'endothélium ce qui permet de croire que ce paramètre serait un meilleur indice de la fonction vasculaire qu'une évaluation au moyen des facteurs de risque identifiés à partir de la cohorte de Framingham

1.3.2. Origine et caractérisation des cellules endothéliales progénitrices

L'appellation CEP nous vient des travaux d'Asahara, T *et coll.* qui, en 1997, ont isolé, pour la première fois chez l'adulte, un angioblaste provenant de la circulation sanguine périphérique capable de se différencier *in vitro* en CE mature et de contribuer *in vivo* aux processus angiogéniques^{126,127}. Cet angioblaste, renommé CEP, fut alors défini comme une cellule dérivée de la MO capable de migrer vers un site ischémique et de se différencier en CE mature. D'abord sélectionnées par l'expression des marqueurs cellulaires de surface CD34 et VEGFR2^{126,127}, il est aujourd'hui généralement bien accepté que certaines CEP peuvent aussi exprimer le marqueur de surface CD133, représentant un groupe de CEP plus immatures^{120,128,129}.

1.3.2.1. Origine

Encore aujourd'hui, l'origine des CEP chez l'adulte est méconnue. L'angioblaste (ou ici CEP) et les CSH expriment plusieurs marqueurs de surface qui leur sont communs (CD133, CD34 et VEGFR2 chez l'humain; CD117, SCA-1, chez la souris). De ce fait, deux théories sont proposées quant à l'origine des CEP. L'une stipule que les CEP sont originaires des CSH¹³⁰ et l'autre suggère que les CEP et les CSH sont deux entités distinctes originaires d'un même précurseur, l'hémangioblaste¹¹⁶. La réalité se trouve peut-être entre les deux théories. Pour l'instant, de récentes données nous permettent de présumer qu'il existerait bel et bien un hémangioblaste chez l'adulte et que sa persistance contribuerait à la fois au maintien des lignées hématopoïétiques et endothéliales¹³¹.

1.3.2.2. Caractérisation

Tout comme les divergences entre l'hémangioblaste, les CSH, et les CEP chez l'adulte, la caractérisation des CEP demeure un sujet de débat complexe, entre autres parce qu'il n'existe à ce jour, aucun marqueur de surface spécifique pour ce type cellulaire.

Cependant, un large consensus s'est rapidement établi auprès de la communauté scientifique autour des marqueurs CD133, CD34 et VEGFR2 pour définir les CEP. La poursuite de leur caractérisation a permis de démontrer que les CEP représentent en réalité une population de cellules hétérogènes associées à différents profils d'expression de marqueurs cellulaires de la lignée endothéliale tels que CD144, CD31, le facteur de von Willebrand et/ou la E-sélectine ou même encore de la lignée myéloïde comme le marqueur CD14. Cette hétérogénéité dans l'expression des marqueurs de surface reflète peut-être différentes origines ou encore différents stages de différenciation des CEP au cours du processus de maturation de la cellule résiduelle de la MO vers la CE mature de la paroi vasculaire ¹³². Iwami, Y *et coll.* ont joliment proposé un schéma caractérisant les CEP lors du processus de maturation (Figure 2) ¹³². La différenciation des CEP y est associée à différents changements dans le profil d'expression des marqueurs de surface. Les CEP circulantes étant caractérisées par des variations dans l'expression des marqueurs CD133, CD34 et VEGFR2 retrouvés chez les CEP de la MO et les marqueurs CD144 et E-sélectine retrouvés chez les CE matures.

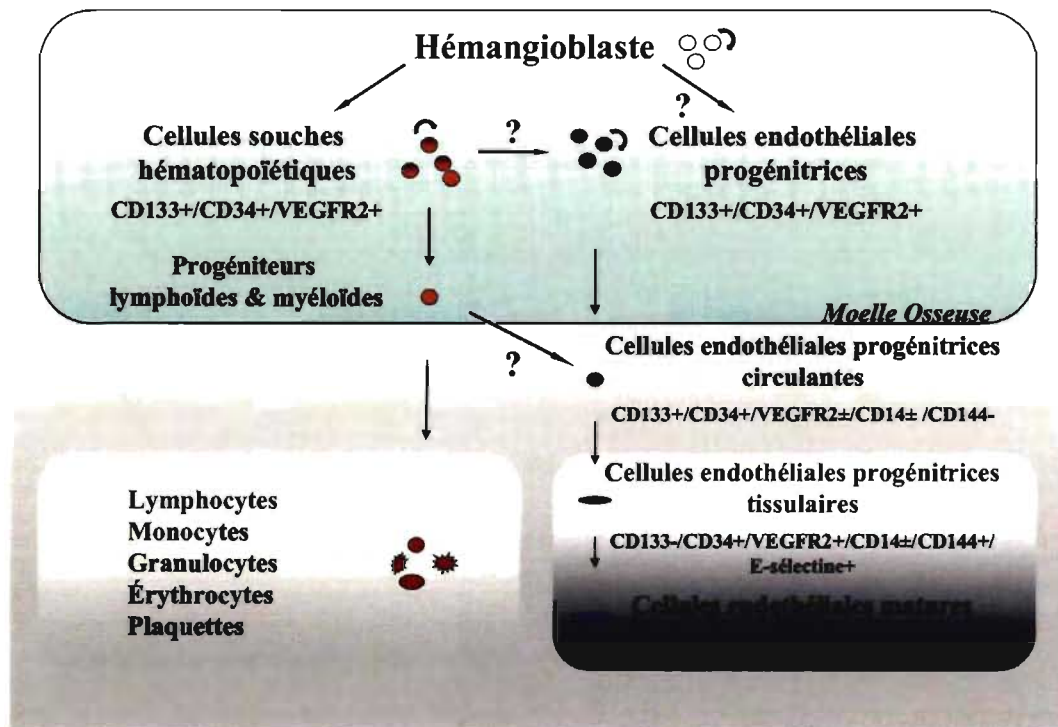


Figure 2 : Cascade de différenciation des cellules endothéliales progénitrices. La différenciation des cellules endothéliales progénitrices en cellules endothéliales matures évolue de la moelle osseuse à la paroi vasculaire. Elle se caractérise par la perte d'expression de marqueurs de cellules progénitrices (CD133, CD34, *Vascular endothelial growth factor* (VEGFR2)) et/ou le gain de marqueurs de cellules endothéliales matures (CD144, E-sélectine, *von Willebrand factor* (vWF)) (Adaptée d'après ¹³²).

La notion d'hétérogénéité dans les populations cellulaires de CEP vient aussi du fait que lorsqu'elles sont mises en culture à partir de la fraction des cellules mononuclées circulantes chez l'adulte, deux grandes classes de CEP ont été caractérisées et nommées précoces ou tardive. Ces deux types de populations cellulaires se distinguent entre autres par leur apparence, leur taux de croissance et leur habilité à sécréter différents facteurs angiogéniques ^{133,134}. Les CEP dites précoces sont d'apparence fusiforme, connaissent une poussée de croissance maximale entre la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine de culture, meurent

généralement vers la 4^{ème} semaine de culture et sécrètent une multitude de facteurs pro- et anti-angiogéniques ¹³⁴. Les CEP dites tardives adoptent une forme beaucoup plus arrondies, apparaissent de façon standard suite à deux ou trois semaines de culture, peuvent être maintenues jusqu'à 12 semaines en culture sans aucun changement de phénotype apparent et semblent se développer presque exclusivement des sous-populations cellulaires n'exprimant pas le marqueur myéloïde CD14 ¹³³⁻¹³⁵.

1.3.3. Athérosclérose et cellules endothéliales progénitrices

Quel que soient leur origine et/ou leur profil de caractérisation, l'implication des CEP dans le maintien de l'homéostasie de l'endothélium vasculaire en fait des facteurs clés dans la prévention du développement de l'athérosclérose et, par conséquent, de ses complications. Même si ce concept demeure pour l'instant spéculatif, plusieurs données récentes permettent de le supporter.

Chez l'humain, les premières évidences d'impact démontrant que les CEP possèdent une réelle action vasculoprotectrice nous viennent de l'étude *Endothelial Progenitor Cells in Coronary Artery Disease (EPCAD)* ¹³⁶. Dans cette étude, le niveau circulant des CEP CD34+/KDR+ a été mesuré chez 519 patients souffrant de maladies coronariennes documentées par angiographie. Les associations entre le niveau circulant des CEP à l'état basal et 1) la mortalité cardiovasculaire, 2) l'apparition d'un premier événement cardiovasculaire d'importance (infarctus du myocarde, hospitalisation et/ou revascularisation), 3) la nécessité d'une revascularisation, 4) la nécessité d'une réhospitalisation, et 5) toutes autres causes de mortalité dans les 12 mois du suivi, ont été évaluées. Les conclusions de l'étude ont permis d'établir que la survie sans événement cardiovasculaire augmente progressivement parmi les tertiles du niveau circulant des CEP à l'état basal (les événements étant : mortalité cardiovasculaire, première apparition d'un événement cardiovasculaire d'importance, revascularisation et/ou réhospitalisation). Suite à un ajustement pour l'âge, le genre, les facteurs de risque cardiovasculaire, les thérapies

pharmacologiques et la présence de maladies coexistantes, un niveau circulant élevé de CEP a même été indépendamment associé à une diminution du risque d'être atteint de mort cardiovasculaire, d'un premier événement cardiovasculaire d'importance, d'une revascularisation et/ou d'une réhospitalisation. Les investigateurs ont obtenu des résultats semblables lorsque le niveau circulant des CEP CD133+ ou les unités formant colonies ont été utilisés comme outil de référence ce qui renforce les conclusions de l'étude.

Conduite chez l'humain, cette étude vient grandement appuyer les travaux effectués par Rauscher, FM *et coll.* qui, à l'aide de l'utilisation d'un modèle de transfusion cellulaire, proposaient déjà, dans une étude clé effectuée chez la souris, un rôle important des CEP dans la prévention du développement de l'athérosclérose et de ses complications. Ce groupe a démontré qu'un traitement chronique par transfusion systémique de cellules dérivées de la MO provenant de jeunes souris ApoE^{-/-} ne souffrant pas d'athérosclérose prévenait la progression des lésions athérosclérotiques chez les souris ApoE^{-/-} récipiendaires et ce, en dépit d'une hypercholestérolémie sévère. Ils ont aussi constaté que les cellules transfusées réussissaient à se greffer aux sites artériels particulièrement à risques de développer des lésions athérosclérotiques. En revanche, un traitement cellulaire fait à partir de cellules dérivées de la MO provenant de souris ApoE^{-/-} âgées et déjà atteintes d'athérosclérose ne permettait pas de prévenir efficacement la progression des lésions athérosclérotiques chez les souris récipiendaires¹³⁷.

1.3.4. Cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices

Devant l'importance que les CEP semblent avoir dans la prévention de l'athérosclérose, il est plausible de croire que les maladies vasculaires se développent ou progressent parce que les CEP ne sont plus en mesure d'exercer adéquatement leur rôle d'agent vasculoprotecteur. Les facteurs affectant le fonctionnement des CEP sont certainement multiples et leurs actions délétères sur le cycle fonctionnel des CEP (Figure 3) dirigées à plusieurs niveaux, pouvant aller de la niche des cellules souches (CS) à la paroi

vasculaire, et ainsi affecter 1) la réserve des CEP dans la MO, leur détermination, leur prolifération et leur mobilisation hors de la MO, 2) la survie des CEP dans la circulation périphérique et/ou 3) l'adhésion des CEP, leur migration et leur maturation finale en CE mature au niveau de la paroi vasculaire.

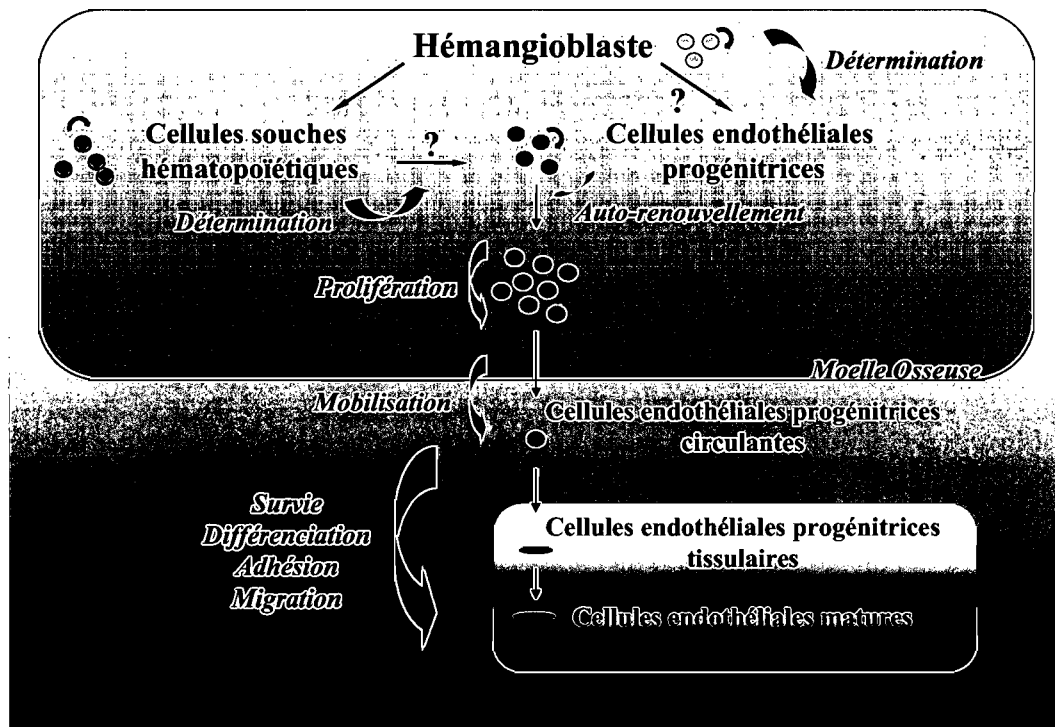


Figure 3 : Cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices. Afin d'exercer leurs fonctions vasculoprotectrices, les cellules endothéliales progénitrices doivent cheminer au cours d'un cycle fonctionnel qui régule leur réserve et leur prolifération dans la moelle osseuse, leur mobilisation dans la circulation périphérique, leur survie, leur différenciation endothéliale ainsi que leur recrutement à la paroi vasculaire.

1.3.4.1. La niche des cellules souches : maintien et mobilisation des cellules endothéliales progénitrices

La MO procure aux CSH et vraisemblablement, vue leur origine, aux CEP, le microenvironnement nécessaire à leur survie et à la rencontre de leurs différentes affectations biologiques d'auto-renouvellement, de détermination vers une lignée, de prolifération et finalement de mobilisation dans la circulation périphérique. Ce microenvironnement, nommé niche des CS (Figure 4), est structurellement formé de cellules de support, les cellules stromales (CStro), qui procurent le support physique et signalétique nécessaire afin de guider les CSH et les CEP dans leurs fonctions. Les CStro représentent un groupe de cellules qui comprend les adipocytes, les chondrocytes, les CE, les fibroblastes et les ostéoblastes de la MO. Toutes ces cellules matures semblent être dérivées d'un ancêtre commun, la CS mésenchymateuse, aussi retrouvée dans le stroma de la MO ¹³⁸⁻¹⁴⁰. C'est la finesse de l'orchestration des actions d'adhésion, de migration, de protéolyse et de signalisation qui surviennent entre les CSH et les CStro et/ou encore entre les CEP et les CStro qui influencera les capacités de survie, d'auto-renouvellement, de détermination vers une lignée et de mobilisation des CSH et/ou des CEP vers la circulation périphérique (Révisé dans ¹⁴¹).

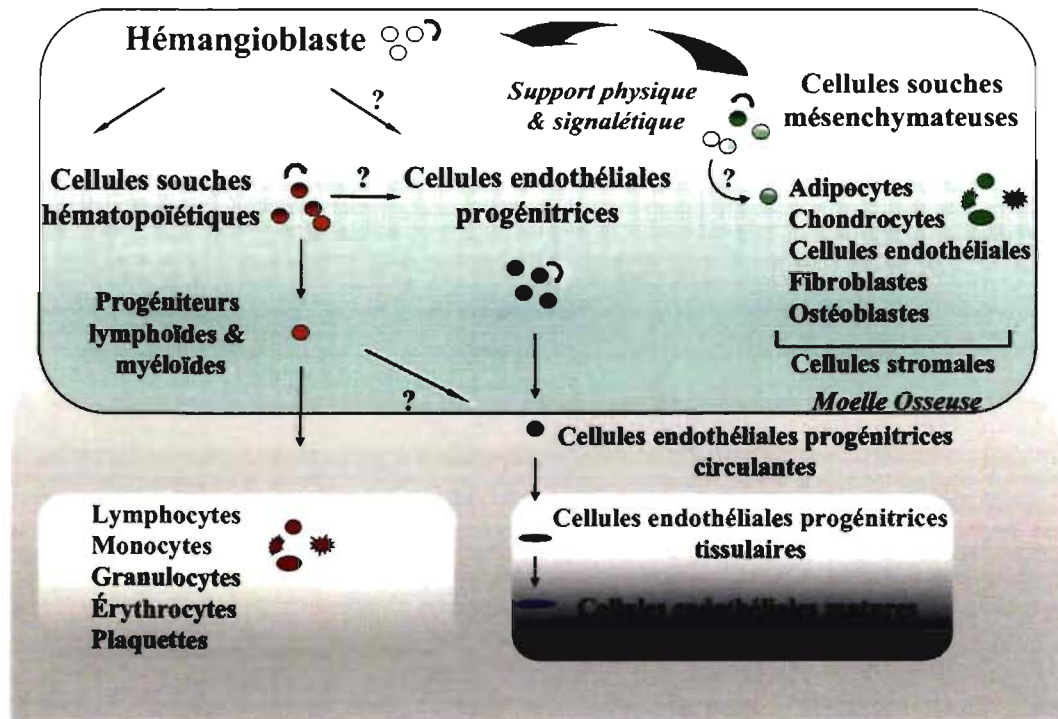


Figure 4 : Niche des cellules souches de la moelle osseuse. La niche des cellules souches de la moelle osseuse est composée de cellules de support, les cellules stromales, qui par leur soutien physique et signalétique épaulent les cellules souches hématopoïétiques et/ou les cellules endothéliales progénitrices dans leurs fonctions.

Vu l'harmonisation de l'organisation fonctionnelle de la niche des CS, toutes atteintes à son intégrité pourraient avoir des conséquences majeures sur le niveau circulant des CEP ou encore la variété des populations de CEP retrouvée chez l'adulte. Des données recueillies lors d'études sur le vieillissement ou encore auprès des souris transgéniques $eNOS^{-/-}$ viennent supporter cette hypothèse.

En effet, il semble que le vieillissement soit associé à une réduction significative de la quantité de CEP dites intermédiaires dans la MO chez des souris $ApoE^{-/-}$, sans que celles des CSH, des CEP et des CE matures ne soient affectées ¹³⁷. Chez la souris $eNOS^{-/-}$, la

capacité du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) à mobiliser les CSH et les CEP en circulation est altérée ¹⁴². Ce même phénomène est percevable suite à un entraînement physique des souris ¹²⁴. Les CEP recueillies au niveau de la MO des souris eNOS^{-/-} démontrent aussi une capacité réduite d'attachement et de vascularisation suite à une injection intraveineuse dans un modèle d'ischémique des membres inférieurs chez la souris ¹⁴². De façon intéressante, il s'avère que les cellules de la MO provenant de patients souffrant de défaillance cardiaque sont aussi affectées fonctionnellement car elles présentent, *in vitro*, une capacité migratoire réduite et, *in vivo*, une incapacité à migrer vers un site ischémique ¹⁴³.

1.3.4.2. Circulation périphérique : survie des cellules endothéliales progénitrices

La diminution du niveau circulant des CEP en partie secondaire à une augmentation de leur sensibilité à l'apoptose, un phénomène connu pour affecter la survie des CE matures de la paroi vasculaire ^{29,30}, aurait aussi des conséquences majeures sur le développement des maladies vasculaires. L'augmentation du niveau circulant des CEP par les inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (statines) serait par ailleurs associée à une réduction de leur mort par apoptose ¹⁴⁴. Un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques retrouvés dans la circulation périphérique suffirait certainement à altérer la défense des CEP. D'ailleurs, la protéine C-réactive, connue pour participer au dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire chez des patients souffrant d'athérosclérose, altère, *in vitro*, la défense anti-oxydante des CEP et favorise l'apoptose induite par les substances oxydantes ¹⁴⁵.

1.3.4.3. Paroi vasculaire : recrutement et différenciation des cellules endothéliales progénitrices

1.3.4.3.1. Recrutement

Une dérégulation du processus de recrutement des CEP dans la paroi vasculaire parviendrait également à prévenir l'action vasculoprotectrice des CEP. Encore ici, plusieurs causes sont envisageables dont la diminution de l'expression des agents chimiotactiques (VEGF, facteurs de croissance hématopoïétique, *stromal cell derived factor-1* (SDF-1)) au site de dysfonctionnement. Il a d'ailleurs été noté, dans un modèle de blessure vasculaire chez le lapin, que lors du vieillissement la diminution de l'expression artérielle du VEGF contribuerait à sa mauvaise réendothélialisation ¹⁴⁶.

Un changement d'expression et/ou une atteinte à l'intégrité des récepteurs des agents chimiotactiques à la surface des CEP pourraient aussi affecter leur recrutement. À titre d'exemple, il est possible de croire que certains récepteurs soient scindés par l'action d'une protéase, un phénomène ayant déjà été rapporté chez le récepteur CXCR4 du SDF-1 ¹⁴⁷.

Enfin, les voies de signalisation impliquées dans le processus de recrutement représentent certainement une cible de choix pour tous facteurs affectant le recrutement des CEP dans la paroi vasculaire. Cette hypothèse étant supportée par le constat qu'en conditions *in vitro*, la migration des CEP induite par le VEGF est réduite chez des patients atteints de maladies coronariennes malgré une expression normale de ces récepteurs à leur surface ¹⁴⁸.

1.3.4.3.2. Différenciation

Le processus de différenciation ou encore de maturation des CEP vers un phénotype endothélial mature représente une autre étape cruciale à leur action vasculoprotectrice. Un

dérèglement de ce processus dans la circulation sanguine et/ou au niveau de la paroi vasculaire pourrait affecter la détermination endothéliale des CEP, peut-être même au profit d'autres lignées (inflammatoire, musculaire, etc.). La plasticité des cellules CD34+ en culture illustre bien l'éventualité de ce phénomène. En effet, les cellules CD34+ peuvent être différenciées en CE lorsque cultivées en présence de VEGF, un phénomène qui, de façon intéressante, est inhibé par la présence des LDL oxydées ¹⁴⁹. En revanche, le changement des conditions de culture par l'ajout du facteur stimulant les colonies de macrophages ou d'une combinaison facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages/IL-4 génère plutôt une différenciation vers les lignées myéloïdes et dendritiques ¹³⁵.

1.3.5. Facteurs de risque cardiovasculaire et cellules endothéliales progénitrices

L'action vasculoprotectrice des CEP dépend donc d'un cycle de fonctions bien établi. Malheureusement, nous en sommes qu'au tout début d'une réelle compréhension des effets qu'exercent les facteurs de risque cardiovasculaire sur ce dernier. Cependant, il fut rapidement constaté, d'abord chez des sujets d'apparence saine puis ensuite chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires, qu'il existe une relation de corrélation inverse entre le nombre et/ou la fonctionnalité des CEP et les facteurs de risque cardiovasculaire ^{125,148}. Par conséquent, il est facilement envisageable que ces derniers aient des effets néfastes sur le cycle fonctionnel des CEP et affectent l'homéostasie de l'endothélium vasculaire.

1.3.5.1. Hyperlipidémie

Due à l'importance de ce facteur dans le développement des processus athéroscléreux, il n'est pas étonnant de voir que plusieurs études ont déjà évalué l'impact des lipides sur la biologie des CEP. Chez des patients souffrant de maladies

cardiovasculaires, une corrélation inverse existe entre les niveaux circulants de LDL et la quantité de CEP ¹⁴⁸. Le nombre de CEP, exprimé en unité formant colonies, se trouve même déjà significativement réduit chez des sujets d'apparence saine ayant un niveau élevé de cholestérol sanguin ¹²⁵. L'hypercholestérolémie affecterait aussi la prolifération, la migration, l'adhésion et la vasculogénèse *in vitro* des CEP chez les patients atteints ^{148,150}.

Lorsque ajoutées au milieu de culture, les LDL oxydées affectent de façon dose dépendante les capacités fonctionnelles des CEP, augmentent leur taux de sénescence (possiblement par une inactivation de la télomérase) et réduisent leur nombre ^{151,152}. Les LDL oxydées seraient aussi en mesure de prévenir la différenciation endothéliale des CEP induite par le VEGF via une inactivation de la voie de signalisation de la protéine Akt ¹⁴⁹.

1.3.5.2. Hypertension

Tout comme l'hyperlipidémie, il semble que l'hypertension ait un effet néfaste global sur le cycle fonctionnel des CEP. L'hypertension a d'abord été identifiée comme un élément affectant la capacité migratoire des CEP ¹⁴⁸. L'hypertension réfractaire quant à elle affecte négativement le niveau circulant de CEP, et ce indépendamment de la présence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire ¹⁵³. L'hypertension réfractaire serait même un facteur prédictif de la diminution de la prolifération des CEP *in vitro* ¹⁵³. De façon plus spécifique, il a été démontré que l'angiotensine II diminue l'activité de la télomérase chez les CEP ce qui accélère la venue de la sénescence. En augmentant la production du stress oxydatif par une surexpression de la glycoprotéine *gp91 phox* (*phox* pour *phagocyte oxidase*), l'angiotensine II aurait aussi pour conséquence de diminuer la prolifération des CEP ¹⁵⁴.

1.3.5.3. Diabète

Le diabète, un autre important facteur de risques cardiovasculaires, est une maladie bien connue pour ces affectations vasculaires ^{155,156}. Il n'est donc pas étonnant de constater

que la mobilisation des CEP dans la circulation périphérique est significativement affectée, dans un modèle expérimental de diabète murin, résultant en une vascularisation inadéquate du tissu ischémique ¹⁵⁷. Chez l'humain, le niveau circulant de CEP est aussi significativement réduit peu importe que le patient souffre d'un diabète de type I ou de type II ^{158,159}. Il fut même démontré que la quantité de CEP récoltée chez des patients atteints de diabète de type I est inversement liée au niveau circulant de l'hémoglobine A1c, soulevant la possibilité que le degré de dérégulation glycémique soit associé aux affectations pathologiques relevées chez les CEP ¹⁵⁸. *In vivo*, la capacité de réendothélialisation des CEP provenant de patients atteints de diabète de type II est sévèrement affectée par ce qui semble être le résultat d'une surproduction d'anions superoxydes par l'enzyme *NADPH* oxydase (*NADPH* pour : *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) et donc d'une diminution de la biodisponibilité du NO ¹⁶⁰. Plusieurs groupes ont aussi démontré que la prolifération, l'adhésion et les propriétés angiogéniques des CEP sont affectées par le diabète ^{158,159,161}. De plus, l'hyperglycémie serait associée *in vitro*, à une réduction du nombre de CEP en culture, à une inhibition de la production de NO et à une diminution de l'activité de la métalloprotéinase-9 ce qui, par conséquent, affecte la capacité migratoire des CEP ¹⁶².

1.3.5.4. Tabagisme

Facteur de risques non traditionnel, le tabagisme est tout de même un indice de réduction du niveau circulant des CEP ¹⁴⁸. Il semble même que le niveau circulant des CEP corrèle inversement avec la quantité de cigarettes consommées. Les CEP provenant de fumeurs dits sévères meurent aussi plus rapidement lorsque mises en culture (en 4 -5 jours). En revanche, la cessation du tabagisme est associée à un rétablissement du niveau circulant des CEP. Cet effet est rapide (en 4 semaines) et particulièrement notable chez les fumeurs dits légers. Cependant, si la cessation ne peut être maintenue, la quantité de CEP en circulation chute de nouveau ¹⁶³.

1.3.5.5. Sédentarité

Il est bien connu que la pratique régulière d'activités physiques est un indice de réduction de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaire. À l'inverse, la sédentarité est associée à une augmentation de l'apparition de plusieurs maladies cardiovasculaires, dont les maladies coronariennes. Dans plusieurs modèles expérimentaux, la sédentarité est même associée à une augmentation du stress oxydatif, à une dysfonction de l'endothélium et enfin, au développement de lésions athérosclérotiques ¹⁶⁴.

Chez la souris, la pratique régulière d'activités physiques fait augmenter le niveau circulant des CEP au-dessus de celui perçu chez les animaux soumis à un style de vie sédentaire ¹²⁴. Cette augmentation est associée à une amélioration de la réendothélialisation et à une réduction de la resténose suite à l'induction d'une blessure vasculaire. Chez l'humain, une augmentation significative du niveau circulant des CEP a été observée chez des patients souffrant de maladies coronariennes ou de défaillance cardiaque chronique ayant entrepris un programme de réhabilitation physique ^{165,166}. Le même constat fut observé chez des sujets d'apparence saine s'exerçant pour une période intensive de plus de 30 minutes ¹⁶⁷.

Par souci de synthèse, les effets des facteurs de risque cardiovasculaire sur le nombre et la fonctionnalité des CEP décrit ci-haut, ainsi que ceux de certains autres facteurs de risque, vous sont présentés sous forme d'un tableau (Tableau 1).

Tableau 1 : Facteurs de risque cardiovasculaire et cellules endothéliales progénitrices.

Facteurs de risque	Effets sur la fonctionnalité des cellules endothéliales progénitrices
Lipides	Concentration de LDL / α niveau circulant des CEP chez des patients souffrant de MC ¹⁴⁸ LDL oxydées ↓ nombre, ↓ capacités fonctionnelles et ↑ sénescence <i>in vitro</i> ^{151,152} , ↓ différenciation endothéliale induite par le VEGF ¹⁵²

	Hypercholestérolémie est associée 1) ↓ UFC chez des sujets sains ¹²⁵ , et 2) ↓ adhésion, ↓ prolifération, ↓ migration et ↓ vasculogénèse <i>in vitro</i> chez des patients souffrant de MC ^{148,150}
Hypertension	<p>Hypertension est associée ↓ migration¹⁴⁸</p> <p>Hypertension réfractaire est associée ↓ niveau circulant des CEP, ↓ prolifération <i>in vitro</i>¹⁵³</p> <p>Angiotensine II ↑ sénescence et ↓ prolifération <i>in vitro</i>¹⁵⁴</p>
Diabète	<p>Type I est associé ↓ niveau circulant des CEP, ↓ adhésion, ↓ prolifération et ↓ angiogénèse <i>in vitro</i>¹⁵⁸, Concentration d'hémoglobine A1c 1/α niveau circulant des CEP¹⁵⁸</p> <p>Type II est associé ↓ niveau circulant des CEP¹⁵⁹, ↓ adhésion, ↓ prolifération et ↓ angiogénèse <i>in vitro</i>¹⁵⁹, ↓ réendothélialisation <i>in vivo</i>¹⁶⁰,</p> <p>Hyperglycémie ↓ nombre et ↓ migration <i>in vitro</i>¹⁶²</p>
Tabagisme	Sévérité du tabagisme 1/α niveau circulant des CEP, est associée ↓ survie <i>in vitro</i> ¹⁶³
Sédentarité	Exercice physique est associé ↑ niveau circulant des CEP chez des patients souffrant de MC ¹⁶⁵ ou de DF ¹⁶⁶ et chez des sujets sains ¹⁶⁷
Vieillesse	Âge associée ↓ niveau circulant des CEP chez des patients souffrant de MC ^{148,168}
Protéine C-réactive	Protéine C-réactive ↓ nombre, ↓ adhésion, ↓ différenciation endothéliale, ↓ relâche de cytokines et ↓ angiogénèse <i>in vitro</i> ^{169,170}
Homocystéine	Homocystéine ↓ nombre et ↓ fonctionnalité <i>in vitro</i> ¹⁷¹
Diméthyl arginine asymétrique	Concentration de diméthyl arginine asymétrique 1/α niveau circulant des CEP, ↓ fonctionnalité <i>in vitro</i> ¹⁷²

1/α = inversement proportionnel; MC = maladies coronariennes; UFC = unité formant colonies; DF = défaillance cardiaque

1.4. Estrogènes

1.4.1. Biologie des estrogènes

De par l'importance que semble représenter le bon fonctionnement du cycle fonctionnel des CEP afin de prévenir le développement de l'athérosclérose, plusieurs croient qu'il représente une cible privilégiée dans le développement d'approches préventives et thérapeutiques pour cette pathologie. De ce fait, l'identification des modulateurs du cycle fonctionnel des CEP devient une étape cruciale et jusqu'à présent, plusieurs facteurs endogènes et pharmacologiques tels que le facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages ¹²¹, le VEGF ^{173,174}, l'érythropoïétine ¹⁷⁵ et les inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (statines) ¹⁷⁶ ont déjà été identifiés. Les estrogènes figurent également parmi les principaux facteurs actuellement ciblés.

1.4.1.1. Biosynthèse des estrogènes

Il existe trois principaux estrogènes en circulation: l'estrone, le 17 β -estradiol (17 β E) et l'estriol. Le 17 β E possède le plus puissant effet biologique et représente la principale forme d'estrogènes retrouvés en circulation chez la femme en âge de reproduction. Sa biosynthèse s'effectue surtout au niveau des ovaires par conversion enzymatique des androgènes. Les androgènes sont d'abord produits par les cellules thécales entourant le follicule sous l'influence de l'hormone lutéinisante hypophysaire. Ils sont ensuite convertis en 17 β E dans les cellules de la granulosa du follicule par une aromatasase dont l'activité est régulée par l'hormone folliculostimulante hypophysaire. Les concentrations sériques du 17 β E sont généralement faibles chez les jeunes filles et augmentent considérablement à la venue de la puberté. Chez la femme, elles se situent non loin de 100 μ g/ml dans la phase menstruelle du cycle et peuvent atteindre approximativement 600 μ g/ml à l'ovulation (Figure 5). Chez la femme enceinte, le niveau de 17 β E peut approcher le 20 000 μ g/ml. À la ménopause, les concentrations sériques déclinent considérablement pouvant atteindre des

niveaux aussi faibles que 5-20 pg/ml tels que ceux retrouvés chez l'homme. Le $17\beta\text{E}$ en circulation provient alors de la conversion des androgènes sécrétés par les glandes surrénales au niveau du foie, du tissu adipeux et/ou des muscles. Chez l'homme, le $17\beta\text{E}$ circulant provient à 20% d'une production testiculaire par les cellules de Sertoli et à 80% de la conversion des androgènes au niveau de différents sites périphériques¹⁷⁷.

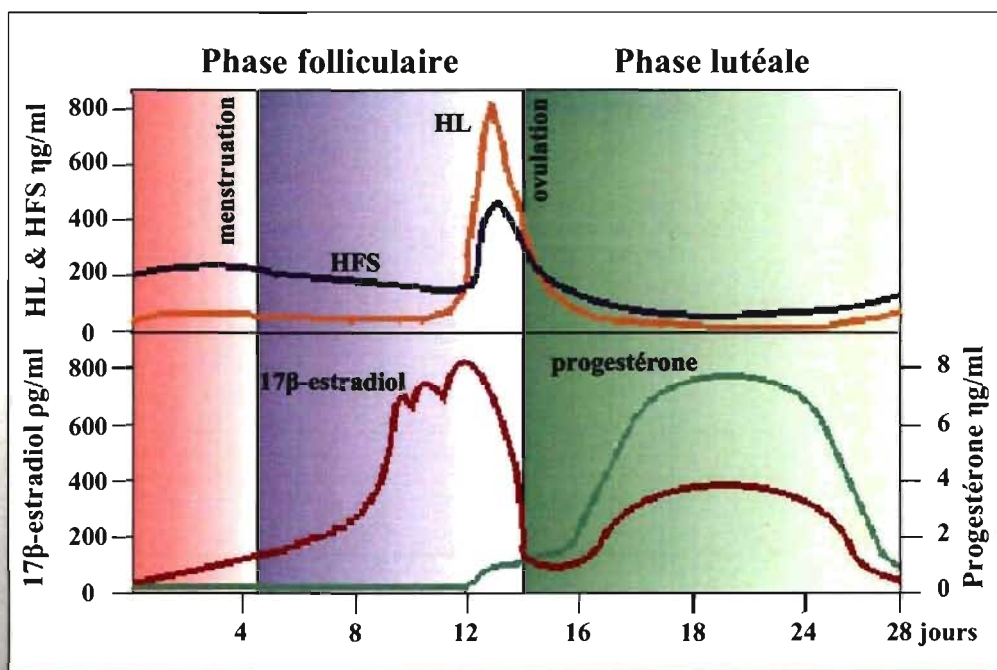


Figure 5 : Variation des concentrations plasmatiques des hormones hypophysaires et ovariennes au cours du cycle menstruel. Les phases du cycle menstruel se caractérisent par un profil hormonal distinct. Les niveaux plasmatiques de 17β -estradiol et de progestérone sont généralement bas pendant la période menstruelle. La concentration de 17β -estradiol augmente de façon marquée peu avant l'ovulation. Le niveau des hormones lutéinisantes (HL) et folliculostimulantes (HFS) atteint un sommet à l'ovulation. Enfin, les concentrations de 17β -estradiol et de progestérone sont toutes deux élevées au cours de la phase lutéale.

1.4.1.2. Récepteurs aux estrogènes

1.4.1.2.1. Structure

Les estrogènes exercent leurs actions via deux récepteurs principaux soit le récepteur *estrogen receptor α* (ER α) et le récepteur *estrogen receptor β* (ER β). ER α et ER β sont des facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires tout deux issus de gènes différents situés sur des chromosomes distincts. Le gène codant pour ER α , soit *ESR1*, est situé sur le chromosome 6q alors que celui codant pour ER β , soit *ESR2*, est localisé sur le chromosome 14q^{178,179}. ER α est une protéine de 595 acides aminés ayant un poids moléculaire de 66 kDa alors que ER β ne fait que 530 acides aminés pour un poids de 54 kDa¹⁸⁰ (Figure 6). Malgré cette différence, ces deux récepteurs partagent une structure moléculaire semblable qui est composée de six domaines fonctionnels communs (A-F). Le domaine A/B, situé en N-terminale, est de loin le domaine fonctionnel le plus variable entre les deux récepteurs avec seulement 20% d'homologie. Ce domaine contient une région d'activation transcriptionnelle indépendante de la liaison au ligand (AF-1) qui se trouve considérablement réduite chez ER β ¹⁸¹. Il est donc peu étonnant de constater que la région AF-1 joue un rôle très actif dans la réponse transcriptionnelle induite par ER α , alors que son implication est minimale dans la réponse engendrée par ER β ¹⁸². À l'inverse, le domaine de liaison à l'ADN, le domaine C/D, constitue la région où la séquence est la plus conservée entre ER α et ER β avec 95% d'homologie. Ce domaine contient une structure à doigts de zinc nécessaire à la liaison à l'ADN et à la dimérisation des récepteurs. Enfin, le domaine de liaison au ligand (E), qui se trouve dans la portion C-terminale, est relativement conservé avec 55% d'homologie entre les deux récepteurs. Ce domaine est aussi impliqué dans la dimérisation des récepteurs et contient une deuxième région d'activation transcriptionnelle (AF-2), celle-ci étant toutefois dépendante de la liaison au ligand^{183,184}.

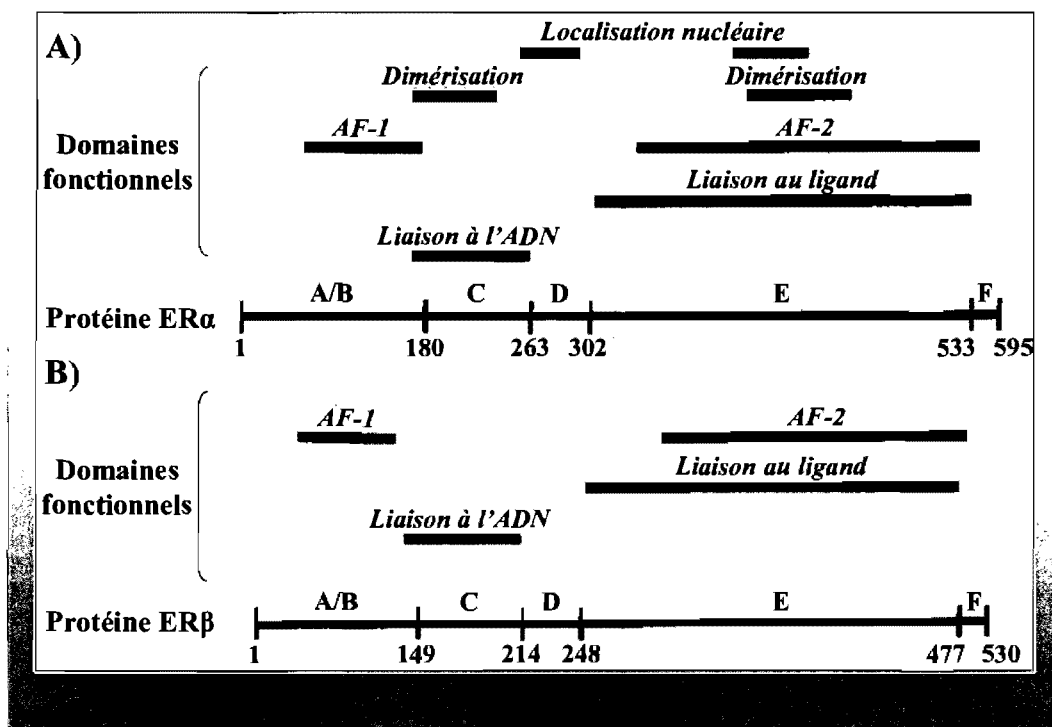


Figure 6 : Structure des récepteurs aux estrogènes. Les récepteurs aux estrogènes α (ER α) A) et β (ER β) B) sont composés de différents domaines fonctionnels tels la région d'activation transcriptionnelle AF-1 (A/B), le domaine de liaison à l'ADN (C/D) et le domaine de liaison au ligand (E) qui comprend aussi la région d'activation transcriptionnelle AF-2 (Adaptée d'après ¹⁸⁵).

1.4.1.2.2. Distribution

ER α semble être le récepteur dominant dans plusieurs organes tels les glandes mammaires, l'utérus, les ovaires, les poumons, le cerveau, la glande thyroïde, les os, le foie, les reins, l'estomac, le colon, le cœur, les vaisseaux sanguins, les testicules et la prostate. Pour sa part, ER β est présent au niveau des testicules, de la prostate, des ovaires, des reins, des vaisseaux sanguins, de certaines régions spécifiques du cerveau et dans les os (Révisé dans ¹⁸⁶). De façon intéressante il fut noté que dans certains tissus, l'expression de ER α , ou

de ER β , est restreinte à un type cellulaire. Par exemple, les ovaires expriment les deux types de récepteurs mais l'expression de ER α se limite aux cellules de la granulosa alors que ER β n'est exprimé que dans les cellules thécales ¹⁸⁷. Cette distribution spécifique des récepteurs aux estrogènes dans un même tissu fut l'une des premières observations qui suggéraient que les deux types de récepteurs puissent exercer des fonctions différentes.

1.4.1.2.3. Activation

1.4.1.2.3.1. La voie classique dépendante du ligand

En absence de ligand, les récepteurs aux estrogènes se retrouvent en équilibre entre le cytoplasme et le noyau des cellules. Ils sont généralement associés avec certains membres de la famille des protéines de choc thermique. Ces protéines exercent leur activité chaperone en stabilisant la conformation inactive des récepteurs et en masquant leur domaine de liaison à l'ADN. La diffusion intracellulaire des estrogènes permet la formation du complexe ligand/récepteur et la dissociation complète des protéines de choc thermique ¹⁸⁸. À l'aide d'un réseau de protéines impliquant la calvéoline-1, le complexe ligand/récepteur diffuse alors dans le noyau ¹⁸⁹. De cet emplacement, le complexe peut maintenant interagir sous forme d'homodimère (ER α /ER α ou ER β /ER β) ou d'hétérodimère (ER α /ER β) avec les éléments de réponse aux estrogènes, des séquences spécifiques d'ADN situées dans les différents promoteurs des gènes cibles ¹⁹⁰. Le complexe ligand/récepteur s'associe également avec des cofacteurs transcriptionnels et/ou facteurs de transcription intermédiaires qui modulent de façon additionnelle l'activité transactivatrice ou transrépressive du complexe. Les récepteurs aux estrogènes peuvent aussi réguler l'activité transcriptionnelle de gènes ne possédant pas d'éléments de réponse aux estrogènes en s'associant à d'autres protéines ou facteurs de transcription. Par exemple, la liaison des récepteurs aux estrogènes avec la protéine activatrice-1 résulte en un facteur de transcription fonctionnellement indépendant des éléments de réponse aux estrogènes ¹⁹¹.

1.4.1.2.3.2. La voie indépendante du ligand

Les récepteurs aux estrogènes sont des phosphoprotéines et leurs fonctions peuvent être altérées par des changements dans leur état de phosphorylation en absence d'un ligand ¹⁹². En effet, certains activateurs d'enzymes à activité kinase, tels les facteurs de croissance, peuvent provoquer une activation des récepteurs aux estrogènes en induisant une phosphorylation spécifique de certains résidus sérine ou tyrosine. La phosphorylation des récepteurs peut être induite directement par un récepteur à activité tyrosine kinase ou encore par l'action d'un second messenger tel que les protéines mitogéniques à activité kinase ¹⁹³. La dopamine ¹⁹⁴, le facteur de croissance épidermique, le facteur de croissance transformant- α ¹⁹⁵, l'insuline et le facteur de croissance-1 analogue à l'insuline ¹⁹⁶ figurent parmi les facteurs identifiés pouvant exercer une activité transcriptionnelle dépendante des récepteurs aux estrogènes. Il peut être envisagé que ce mode d'activation occupe un rôle important lorsque les niveaux locaux de facteurs de croissance sont élevés et/ou lorsque les concentrations sériques d'estrogènes sont faibles comme chez les femmes ménopausées et chez les hommes.

1.4.1.2.3.3. La voie non-génomique dépendante du ligand

La voie non-génomique des récepteurs aux estrogènes permet une réponse cellulaire rapide au ligand. Il est maintenant bien établi que ER α et ER β sont tous deux capables de transmettre des signaux impliquant les membres de la famille des protéines mitogéniques à activité kinase. Cependant, il semble que l'activité enzymatique induite par chacun des récepteurs soit différente selon le type cellulaire étudié ¹⁹⁷.

1.4.1.2.4. Déterminants moléculaires de l'activité transcriptionnelle

La fine régulation de l'action nucléaire spécifique des récepteurs aux estrogènes est influencée par plusieurs éléments dont la balance entre les cofacteurs transcriptionnels positifs et négatifs et les caractéristiques du promoteur du gène cible.

1.4.1.2.4.1. Cofacteurs transcriptionnels

La découverte de cofacteurs transcriptionnels pouvant moduler de façon additionnelle l'activité du complexe ligand/récepteur a permis de mieux comprendre les fines régulations de l'activité des récepteurs aux estrogènes en fonction de la cible tissulaire. Jusqu'à présent, plusieurs familles de cofacteurs ont été identifiées et classées en fonction de leur capacité à interagir avec les différents complexes ligand/récepteur et selon leur activité transactivatrice ou transrépressive. De façon générale, il peut être stipulé que les coactivateurs (ex : SCR/p106, CBP/p300) forment un complexe avec les récepteurs aux estrogènes qui favorise et stabilise la machinerie de transcription alors que l'association récepteur/corépresseur (ex : NCOR1) défavorise l'organisation protéique nécessaire à la transcription^{198,199}.

1.4.1.2.4.2. Caractéristiques du promoteur

De façon générale, les récepteurs aux estrogènes exercent leur fonction de facteurs de transcription en se liant sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère aux éléments de réponses aux estrogènes au niveau de l'ADN. Ces éléments sont localisés dans le promoteur généralement situé en 5' des gènes cibles, le plus souvent à quelques centaines de paires de base du site d'initiation de la transcription. La séquence 5'GGTCAnnnTGACC3' (n désignant n'importe lequel des nucléotides) fut d'abord reconnue comme étant la séquence consensus des éléments de réponse aux estrogènes²⁰⁰. Cependant, il fut rapidement constaté que seule une petite fraction des gènes cibles des estrogènes possédait cette séquence. Aujourd'hui, il est maintenant bien établi que la séquence des éléments de réponse aux estrogènes peut varier en fonction des gènes cibles et que les nucléotides situés dans la région centrale (nnn) influencent l'affinité des récepteurs pour la séquence^{201,202}. Il fut même démontré que dans certains cas, comme celui du gène codant pour le facteur de croissance transformant- α humain, les éléments de réponse aux estrogènes sont constitués de deux séquences séparées par plusieurs paires de base qui

agissent en combinaison afin de permettre la transcription ²⁰³. Cette combinaison de séquences, maintenant nommée unité de réponse aux estrogènes, illustre bien la fine régulation de l'action transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes.

1.4.2. Athérosclérose et estrogènes

Les effets des estrogènes sur les processus athéroscléreux font l'objet d'investigations depuis de nombreuses années. Quoique non complètement élucidée et encore sujette à de nombreuses controverses, l'action protectrice des estrogènes semble diversifiée, affectant à plusieurs niveaux le développement des lésions athérosclérotiques.

1.4.2.1. Profil lipidique

Les estrogènes, par leurs effets spécifiques sur l'expression de certaines protéines hépatiques telles que les apolipoprotéines et les récepteurs aux LDL, diminuent le niveau circulant de cholestérol et améliore le profil lipidique de la femme en âge de reproduction ^{204,205}. À la ménopause, le niveau de LDL augmente tandis que celui des lipoprotéines de haute densité diminue ce qui ramène le profil lipidique anti-athérogénique de la femme à celui normalement retrouvé chez des hommes du même âge. ER α semble être le récepteur dominant au niveau du foie ²⁰⁶. Son rôle dans la régulation de la transcription des protéines hépatiques par les estrogènes n'est pas encore complètement défini, mais il fut remarqué que chez les souris ER $\alpha^{-/-}$, le niveau hépatique de la protéine apoE est grandement diminué ^{207,208}.

Les estrogènes ont aussi des propriétés anti-oxydantes permettant d'inhiber l'oxydation des LDL et du même coup, de prévenir la progression des processus athéroscléreux ^{209,210}. Cet effet se reflète par une diminution du niveau circulant des anticorps dirigés contre les LDL oxydées chez la femme ménopausée recevant une hormonothérapie de remplacement ²¹¹. Un des mécanismes proposés pour expliquer cet

effet protecteur se tourne vers une réduction de la production des anions superoxydes ce qui, par le fait même, permet d'augmenter la biodisponibilité du NO ²¹².

1.4.2.2. Processus inflammatoire

Les estrogènes agissent aussi au niveau du processus inflammatoire de la lésion athérosclérotique. Globalement, il semble que leurs actions diminuent l'adhésion et la transmigration endothéliale des leucocytes et des monocytes ^{213,214}. À titre d'exemple, il fut rapporté, dans un modèle d'hypercholestérolémie chez le lapin, que les mâles accumulent une quantité supérieure de monocytes au niveau des lésions aortiques que les femelles. De plus, l'ovariectomie des femelles engendre une augmentation de l'adhésion et de la rétention des monocytes au niveau de l'aorte, un effet atténué par l'administration de 17 β E et relié à une diminution de l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 ²¹³. Les femmes recevant une hormonothérapie de remplacement voient aussi leurs niveaux circulants de la forme soluble de plusieurs molécules d'adhésion diminuer telles que ceux de la molécule d'adhésion intracellulaire-1, la VCAM-1 et la E-sélectine ²¹⁵. La production locale d'estrogènes au niveau de l'endothélium vasculaire, à partir de la testostérone, est aussi associée à une diminution de l'expression de la VCAM-1 ²¹⁶. De même, *in vitro*, un traitement des CE au 17 β E diminue l'expression de la VCAM-1 induite par l'IL-1 et les lipopolysaccharides ^{217,218}. L'action protectrice des estrogènes découlerait d'une régulation négative de l'activation du facteur de transcription nucléaire κ B impliqué dans le contrôle de l'expression des molécules d'adhésion au niveau des CE ²¹⁹.

De façon plus globale, l'équipe de notre laboratoire a également fait la démonstration que le 17 β E inhibe, au niveau des CE, l'expression du récepteur CD40 et de son ligand induites par l'interféron γ , un phénomène permettant de réduire l'adhésion des leucocytes à la monocouche cellulaire ²²⁰. Certains auteurs ont également démontré que l'expression de la protéine chimiotactique des monocytes-1 est diminuée par l'action du 17 β E au niveau des CE ²²¹.

1.4.2.3. Biodisponibilité du NO

La vaste majorité des actions anti-athérosclérotiques des estrogènes est certainement appuyée de leurs effets sur la biodisponibilité du NO. Les estrogènes sont en mesure d'augmenter la biodisponibilité du NO localement, ce qui se traduit par une vasodilatation locale des artères. Les études d'inactivation génique des récepteurs aux estrogènes chez la souris illustrent très bien cette propriété. L'activité vasodilatatrice des estrogènes est pratiquement abolie chez les souris $ER\alpha^{-/-}$ due à une diminution importante de la biodisponibilité du NO ²²². L'implication de $ER\alpha$ dans la relâche du NO est supportée par plusieurs études *in vitro*. En effet, il a été démontré que $ER\alpha$ est directement impliqué dans l'activation rapide de la eNOS (effet non-génomique) par les estrogènes et dans l'augmentation de son expression protéique (effet génomique) ^{223,224}. L'effet non génomique semble venir d'une activation de la eNOS sous l'influence des voies signalétiques des protéines mitogéniques à activité kinase et de la voie phosphatidylinositol-3 kinase/protéine Akt ^{223,225}. De façon intéressante, il a été constaté que les souris $ER\beta^{-/-}$ vieillissantes développent aussi des problèmes d'hypertension ²²⁶. Des études *in vitro* sont par la suite venues démontrer que $ER\beta$, tout comme $ER\alpha$, était impliqué dans l'activation rapide de la eNOS et dans l'augmentation de son expression par les estrogènes ^{224,227}. L'activation de la forme inductible de la NOS par les estrogènes a déjà été constatée et pourrait donc aussi contribuer à augmenter la biodisponibilité du NO ²²⁸.

En plus de favoriser sa production, les estrogènes agissent de telle sorte que la dégradation du NO soit aussi réduite en éliminant les espèces réactives de l'oxygène telles que les anions superoxydes. Cette action résulte d'une diminution de l'expression de la NADPH oxydase par les estrogènes, principale source des anions superoxydes ²²⁹. De plus, de récentes données démontrent que les estrogènes diminuent également le niveau circulant de l'homocystéine en modulant le métabolisme de la méthionine et en augmentant le niveau de glutathionne, ce qui stabilise la molécule de NO et accentue son effet ²³⁰.

1.4.2.4. Facteurs vasoactifs

Les estrogènes agissent aussi en tant que modulateurs des niveaux circulants de plusieurs facteurs, outre le NO, impliqués dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Globalement, cet effet semble promouvoir un état de vasodilatation du système vasculaire. En effet, l'administration d'une hormonothérapie de remplacement chez la femme semble augmenter la production de la bradykinine²³¹, de la prostacycline^{232,233} et de l'adénosine²³⁴ et diminuer les niveaux d'endothéline-1²³⁵, de rénine et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine^{236,237}.

1.4.2.5. Cellules vasculaires

Les effets des estrogènes sur les cellules vasculaires ont été grandement explorés tant *in vitro* que *in vivo*. Lorsque mise en culture, plusieurs ont démontré que les estrogènes promeuvent la prolifération et la migration des CE²³⁸⁻²⁴⁰. Notre laboratoire s'est attardé aux mécanismes impliqués dans ces processus. Ainsi, nous avons démontré que ces inductions étaient reliées à l'activation de la voie des protéines mitogéniques à activité kinase p42/44 et p38, un effet dépendant du récepteur ER α ^{241,242}. Le 17 β E semble aussi prévenir l'apoptose des CE induite entre autres, par le facteur de nécrose tumorale- α ^{243,244} et l'hypoxie²⁴⁵. L'effet anti-apoptotique des estrogènes est relativement complexe et peut être à la fois dépendant et indépendant de l'action de leurs récepteurs, avec l'implication possible de l'enzyme de conversion de l'IL-1 β , de la protéine c-myc, de la kinase d'adhésion focale pp125, des protéines mitogéniques à activité kinase telles que la p42/44, la p38 et la kinase amino-terminale c-jun, de la protéine Fas, de la protéine Bcl-2 et de la NOS¹⁷⁷.

À l'inverse, la plupart des études *in vitro* démontrent que les estrogènes inhibent la prolifération des CML induite par une stimulation chimique ou mécanique. Le 17 β E inhibe la prolifération de CML d'aorte de lapin induite par l'ajout de sérum hyperlipidémique au

milieu de culture ²⁴⁶. Cet effet inhibiteur a été reproduit dans plusieurs modèles de culture de CML humaines telles que celles provenant de la veine saphène ²⁴⁷, de la veine ombilicale ²⁴⁸, de l'artère mammaire ²⁴⁹ et de l'aorte ^{250,251} et ce, sous l'influence de différents facteurs stimulants incluant le facteur de croissance dérivé des plaquettes, le facteur de croissance-1 analogue à l'insuline, l'endothéline-1 ou le stress mécanique ²⁵². Nous avons également étudié les mécanismes impliqués dans la prévention par le 17βE de la migration et de la prolifération des CML induite par le facteur de croissance dérivé des plaquettes-ββ. Ces études ont démontré que, à l'inverse de ce qui est perçu chez les CE, le 17βE inhibe l'activation des protéines mitogéniques à activité kinase p38 et p42/44, un effet dépendant du récepteur ERβ ^{241,242}.

In vivo l'utilisation de modèles de blessures vasculaires a aussi permis de démontrer les effets des estrogènes sur les constituants cellulaires de la paroi vasculaire. Chez le lapin mâle, l'induction d'une blessure par ballon au niveau de l'aorte se traduit par la formation de néointima qui est de loin supérieure à celle perçue chez les femelles. Par ailleurs, l'ovariectomie des femelles est associée à une réponse néointimale robuste comparable à celle des mâles, un effet grandement atténué par un traitement systémique au 17βE ²⁵³⁻²⁵⁵. Il fut d'abord cru que cette protection était liée à la capacité des estrogènes à inhiber la prolifération des CML au site de blessure ²⁵⁶. Cependant, il fut par la suite démontré que la protection vasculaire des estrogènes était surtout attribuée à l'augmentation de la réendothélialisation au site de blessure, un phénomène partiellement présent chez les souris ERβ^{-/-} mais sévèrement atténué chez les souris ERα^{-/-} ²⁵⁷.

1.4.3. Cellules endothéliales progénitrices et estrogènes

Les bienfaits des estrogènes sur la prévention des processus athéroscléreux ne sont certainement pas étrangers à l'intérêt que la communauté scientifique leur porte aujourd'hui en tant que modulateurs du cycle fonctionnel des CEP.

1.4.3.1. Processus de réendothélialisation

Les premières évidences nous permettant de croire que les estrogènes sont pharmacologiquement capables d'influencer le cycle fonctionnel des CEP nous vient de deux études simultanément publiées en 2003 par Strehlow, K *et coll.* et Iwakura, A *et coll.* dans la revue *Circulation*. Collectivement, les travaux de ces auteurs ont permis de démontrer que l'administration de 17 β E chez des souris ovariectomisées augmente le niveau des CEP retrouvées à la fois, dans la MO et dans la circulation périphérique. Cette action semble être dépendante de l'activité du NO car elle est complètement abolie chez des souris eNOS^{-/-}. En utilisant différents modèles de transplantation de MO à partir de souris transgéniques (β -galactosidase, protéine fluorescente verte), ces auteurs ont aussi fait la démonstration qu'un traitement au 17 β E augmente la proportion de cellules dérivées de la MO participant à la réendothélialisation d'une blessure vasculaire, ce qui mène à une accélération de la guérison vasculaire et à une diminution de la formation de néointima. Ils ont également proposé que l'action des estrogènes permet de diminuer le taux d'apoptose des CEP, un effet dépendant de la voie de la caspase-8, et d'augmenter leur capacité de prolifération et de migration^{258,259}.

1.4.3.2. Sénescence des cellules endothéliales progénitrices

Il fut par la suite constaté que le 17 β E retarde, et ce de façon dose dépendante, l'apparition de la sénescence des CEP en culture. Le 17 β E semble ici agir au niveau de l'activité de la télomérase en induisant une augmentation de l'expression de sa sous-unité catalytique, la transcriptase inverse de la télomérase, un effet régulé par la voie de signalisation phosphatidylinositol-3 kinase/protéine Akt²⁶⁰. Cette effet protecteur permet aussi de réduire l'accélération de la sénescence des CEP induite *in vitro* par l'angiotensine II²⁶¹ et celle généralement constatée chez les CEP provenant de rats spontanément hypertendus²⁶².

1.4.3.3. Processus de néovascularisation

Suite à l'implication des CEP dans les processus de réparation vasculaire (réendothélialisation) induits par les estrogènes plusieurs se sont demandés si les CEP pouvaient aussi jouer un rôle au niveau des processus de réparation du myocarde (néovascularisation) induit par les estrogènes. Par l'utilisation d'un modèle d'infarctus du myocarde murin, il fut démontré qu'un plus grand nombre de CEP était dénombré dans les régions bordant la zone ischémique du myocarde chez les souris traitées au 17 β E, ce qui permet une meilleure préservation de l'intégrité fonctionnelle du tissu cardiaque. Encore ici, cet effet est perdu chez les souris eNOS^{-/-} et atténué chez les souris auprès desquelles le gène de la métalloprotéinase-9 a été inactivé, révélant l'implication de ces deux molécules dans la mobilisation des CEP induite par le 17 β E ²⁶³.

Afin de mieux caractériser l'action des estrogènes sur les CEP dans un contexte de protection cardiovasculaire, Hamada, H *et coll.* se sont par la suite attardés à déterminer l'implication de chacun des récepteurs aux estrogènes dans ce processus. En réponse au 17 β E, l'adhésion, la vasculogenèse et l'activité transcriptionnelle *in vitro* des CEP sont sévèrement compromises chez les cellules obtenues de souris ER α ^{-/-} et modérément affectées chez les cellules provenant de souris ER β ^{-/-}. En utilisant un modèle de transplantation de MO provenant de souris ER α ^{-/-} ou ER β ^{-/-}, les auteurs de cette étude ont également démontré qu'en réponse à un traitement au 17 β E, la mobilisation des CEP ainsi que la densité capillaire de la zone à risques étaient réduites dans les deux modèles quoique plus sévèrement dans le modèle de transplantation ER α ^{-/-}. Même si le récepteur ER α semble plus abondamment exprimé dans les CEP que ER β , les auteurs en ont conclu que l'activité des deux récepteurs aux estrogènes est essentielle au processus de régulation des CEP par le 17 β E ²⁶⁴.

Encore ici, par souci de synthèse, les effets des estrogènes sur le cycle fonctionnel des CEP décrits ci-haut vous sont représentés sous forme de figure (Figure 7).

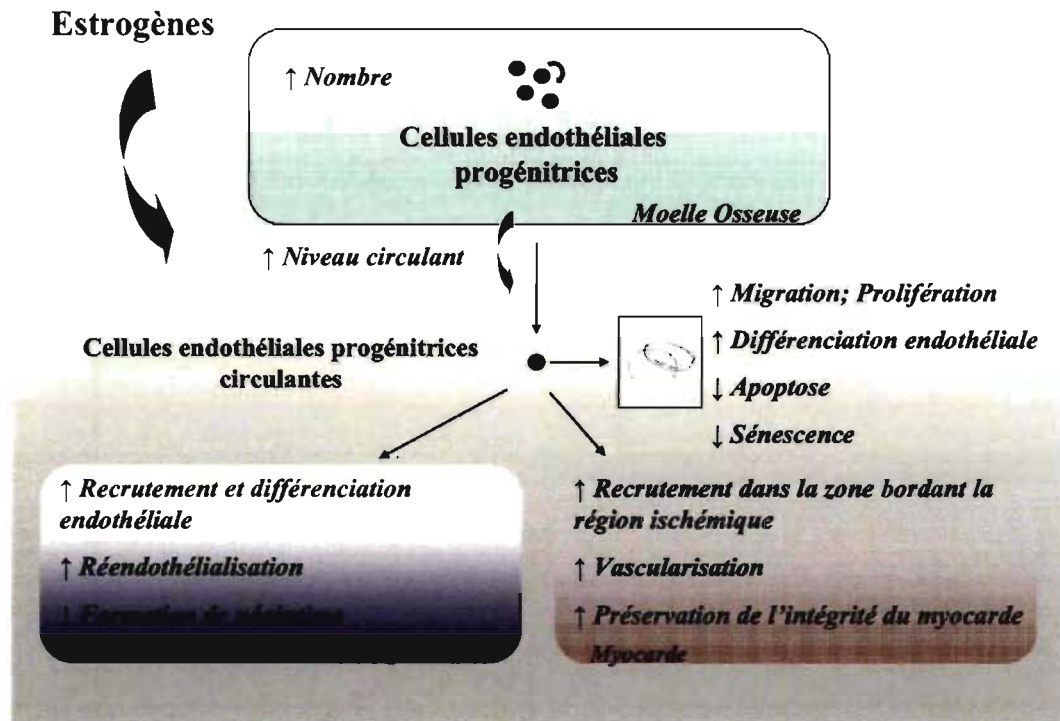


Figure 7 : Effets des estrogènes sur le cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices. Les estrogènes affectent le cycle fonctionnel des cellules endothéliales progénitrices à plusieurs niveaux. *In vivo*, ils permettent d'augmenter le nombre de cellules endothéliales progénitrices dans la moelle osseuse, leur niveau circulant, leur recrutement et leur différenciation endothéliale à la paroi vasculaire ainsi que leur participation au processus de vascularisation de la zone à risque du myocarde. *In vitro*, les estrogènes favorisent la migration et la prolifération des cellules endothéliales progénitrices ainsi que leur différenciation endothéliale, diminuent l'apoptose et retardent la venue de la sénescence par une augmentation de l'activité de la télomérase.

1.5. Problématique et but du projet de recherche

Au cours des dernières années, l'étude de l'action des estrogènes sur le cycle fonctionnel des CEP s'est donc principalement concentrée autour de modèles expérimentaux visant à reproduire les processus normalement perçus lors du développement des lésions athérosclérotiques ou d'un infarctus du myocarde. Peu de gens se sont attardés à vérifier le mode d'action physiologique des estrogènes sur les CEP, un phénomène qui pourtant figure au premier plan des mécanismes à maîtriser afin de pouvoir un jour utiliser efficacement les estrogènes en tant que modulateurs des CEP pour une thérapie préventive ou curative de l'athérosclérose et de ses complications.

De plus, malgré le fait que dans bien des modèles les estrogènes semblent agir directement sur les CEP de la MO pour favoriser leur fonctionnalité, peu d'informations nous permettent de déterminer si les estrogènes agissent plus globalement au niveau de la MO afin de moduler l'organisation fonctionnelle de la niche des CS. Face à la compréhension actuelle du rôle de la niche des CS dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, l'action bénéfique potentielle des estrogènes sur son organisation fonctionnelle pourrait avoir des conséquences majeures sur le développement d'outils de prévention et/ou thérapeutiques dans le domaine des maladies cardiovasculaires.

Ce projet de thèse visait donc, dans un premier temps, à caractériser les effets des estrogènes sur le niveau circulant et la maturité des CEP chez des femmes saines en âge de reproduction. Ce premier volet d'étude fut en plus l'occasion d'étudier les différences de niveaux circulants et de maturité des CEP qui existent entre les hommes et les femmes, un phénomène qui, face au rôle des CEP dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, pourrait permettre de mieux comprendre le paradoxe d'incidents cardiovasculaires qui existe entre les genres. Par ce projet de thèse, nous cherchions également à déterminer l'influence des estrogènes sur les processus biologiques modulant l'organisation fonctionnelle de la niche

des CS afin d'identifier de nouvelles cibles moléculaires qui permettront peut-être de mieux interpréter les bénéfices potentiels de leurs actions sur le système cardiovasculaire.

2. Articles scientifiques

2.1. Menstrual cycle influences on endothelial progenitor cell regulation: a link to gender differences in vascular protection?

2.1.1. Accord des coauteurs et permission de l'éditeur

Menstrual Cycle Influences Endothelial Progenitor Cell Regulation: a Link to Gender Differences in Vascular Protection?

Caroline Lemieux^{1,2}, MSc; Isabelle Cloutier¹, PhD; Jean-François Tanguay^{1,2,3}, MD.

¹Centre de Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal (QC), Canada;

²Département des Sciences Biomédicales, Université de Montréal, Montréal (QC), Canada;

³Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal (QC), Canada

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR: 159684 to J-F.T.) and the Heart and Stroke Foundation (to J-F.T.).

Correspondence should be addressed to:

Jean-François Tanguay

Montreal Heart Institute

5000, Belanger Street

Montreal (QC), Canada, H1T 1C8

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

2.1.2. Structured abstract

Background: The potential role of endothelial progenitor cells (EPCs) in the beneficial effects of estrogen on women's cardiovascular health is of great interest. We thus evaluated if menstrual cycle influences circulating levels of EPC subpopulations in normally menstruating women and if this could underline gender differences. **Methods and Results:** Ten women and ten men were recruited for this study. Peripheral blood samples were collected at each menstrual cycle phase in women and, three times over a one month period in men. Flow cytometry analysis revealed that, in women, the number of CD133+/CD34-, CD133+/CD34+ progenitor cells (PCs) and CD133+/CD34+/VEGF-R2+ EPCs per ml of blood fluctuated significantly throughout the cycle in synchronization with the level of circulating 17 β -estradiol (17 β E). Maturation of CD133+/VEGF-R2+ and CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPCs towards respective CD144+ advanced EPC (aEPC) subpopulations was reduced at mid-luteal phase. Greater mean global number of CD133+/CD34+ PC, CD133+/VEGF-R2+ and CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPC subpopulations was found in women and 17 β E was identified as a predictive factor for the gender differences perceived. Finally, maturation of CD133+ and CD133+/CD34- towards respective EPCs or aEPCs was increased in women compared to men. **Conclusions:** Our results suggest a physiological regulation of the availability of PC and EPC subpopulations in premenopausal women throughout menstrual cycle and reveal gender differences in the level and maturity of specific PC, EPC and aEPC subpopulations. This cyclic regulation in premenopausal women, may in part explain the lower prevalence of cardiovascular events at middle age compared with men or the timing of such events during the menstrual cycle.

Keywords: hormones, estrogen, endothelial progenitor cells, circulation, cardiovascular diseases

2.1.3. Introduction

Circulating endothelial progenitor cells (EPCs) are nicely defined by Urbich and Dimmeler as non-endothelial cells (ECs) that show clonal expression and stemness characteristics with the ability of differentiating into ECs ¹. These cells exert multifaceted regulatory roles in the adult vascular system and participate in many physiopathological functions like vascular homeostasis, ischemic tissue vasculogenesis and tumoral angiogenesis. Different populations of circulating EPCs have been identified. They are generally phenotypically and functionally characterized in human by the expression of cell surface markers such as CD133, CD34, and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGF-R2) and *in vitro* by late-outgrowth colony forming unit EC (CFU-EC) formation (², for review).

The number of CFU-EC has been identified as a predictor of endothelial function in healthy individuals ³ and the level of circulating EPCs has been inversely associated with the occurrence of cardiovascular events and death from cardiovascular causes in patients ⁴. Accordingly, to be beneficial for the vasculature, EPCs must be mobilized from the bone marrow to the circulation in response to cytokines, growth factors and/or hormones. Since premenopausal women are relatively protected from cardiovascular diseases compared to men of similar ages ⁵, it can be proposed that female hormones, like estrogen, influence EPC mobilization in women during their reproductive years.

Indeed, recently, the implication of EPCs in estrogen-induced primary and secondary cardioprotection is of great interest. In murine models, 17 β -estradiol (17 β E) delivery enhances the mobilization and proliferation of EPCs, accelerates reendothelialization and attenuates neointima formation after vascular injury ^{6,7}. 17 β E also favors recovery after myocardial infarction via an increase in EPC mobilization and incorporation at site of ischemia, a mechanism recently demonstrated to be dependent on estrogen receptors α and β (ER α , ER β) ^{8,9}. *In vitro*, 17 β E acts as a survival factor by

protecting EPCs against apoptosis induced by serum deprivation ⁷ and by decreasing EPC senescence via an increase in telomerase activity ¹⁰. Hormonal status has also been demonstrated to influence the number of circulating CD34+/VEGF-R2+ EPCs ¹¹. Their number is decreased in postmenopausal women and increased in those on hormone replacement therapy, suggesting an active role for 17 β E in this phenomenon.

Interestingly, Hamelin *et al.* demonstrated that premenopausal women having an acute coronary event do so predominantly during menses, raising the possibility that the low 17 β E level during this phase of the menstrual cycle is associated with, or perhaps contributes to, the increased risk of acute coronary events ¹². Since 17 β E treatment positively influences circulating EPC levels, it could be proposed that the increased risk of acute coronary events during menses, when 17 β E level is at the lowest, may also be related to the reduced availability of EPCs. Unfortunately, while the effect of 17 β E treatment on the kinetic and function of EPCs has been appreciably examined, the impact of 17 β E physiological fluctuations during normal menstrual cycle on circulating level of EPCs has poorly been studied.

In this study, we hypothesized that abundance of circulating EPCs, as well as their development toward mature ECs, changes significantly during the menstrual cycle, probably in synchrony with the circulating level of 17 β E. To address this hypothesis comprehensively, we quantified the number of progenitor cell (PC), EPC and advanced EPC (aEPC) subpopulations at three hormonal time points throughout menstrual cycle in healthy premenopausal women. In order to preserve the heterogeneity in cell subpopulations, we evaluated circulating CD133, CD34, VEGF-R2 and/or CD144 positive cells by flow cytometry without placing them in culture. Also, in an attempt to better understand the divergence in vascular protection between premenopausal women and men of similar ages and with similar clinical characteristics and life style, circulating levels of PC, EPC and aEPC subpopulations were determined in men.

2.1.4. Materials and methods

2.1.4.1. Volunteers

Ten normally menstruating women and ten men aged between 18 and 40 years old were recruited for this study. Volunteers were healthy, normally active (~ 3 h/week) nonsmoking (for at least three months), nonobese (body mass index < 30 kg/m²), normotensive, nonmedicated on a regular basis (including oral contraceptives or hormonal treatment for at least 4 months), and free of cardiovascular risk factors as assessed by medical history and fasting blood chemistry analyses. We excluded pregnant or breastfeeding women and those with irregular menstrual cycles or previous hysterectomy. Details of the clinical characteristics for both groups are listed in Table 1. This study was approved by the scientific and ethics committees of the Montreal Heart Institute and conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Oral and written informed consents were obtained from all volunteers before beginning the study.

2.1.4.2. Data collection

Volunteers answered a detailed questionnaire that assessed life style and family history of cardiovascular risk factors. Physiological parameters including weight, height, waist circumference and arterial blood pressure were measured. Women were asked for detailed information about hormonal status, age at onset of menarche, length and regularity of menstrual cycles and starting date of the latest cycle.

2.1.4.3. Peripheral blood collection

In women, peripheral blood samples were collected at three phases of their menstrual cycle. The phases depended on the length of the cycle and they were defined as follows: menstrual (1-3 days post-onset of menstruation), pre-ovulatory (2-4 days before ovulation) and mid-luteal phases (7-9 days post-ovulation). All menstrual cycle phases

were verified by determining circulating level of $17\beta\text{E}$, progesterone, follicle-stimulating (FSH) and luteinizing (LH) hormones. Both $17\beta\text{E}$ and progesterone levels were low during the menstrual phase. $17\beta\text{E}$ markedly increased during the pre-ovulatory phase. FSH and LH peaked at ovulation and finally both $17\beta\text{E}$ and progesterone were elevated during the mid-luteal phase. *In men*, peripheral blood samples were collected three times within a one month period, simulating women's sampling interval. All blood samples were collected in the morning using the Vacutainer (BD Biosciences, Mississauga, CA) system. Approximately 35 ml of blood was drawn to assess complete blood formula, blood chemistries, hormones and levels of PC, EPC and aEPC subpopulations.

2.1.4.4. Measurement of hormone levels

Glass tubes containing SST Gel and Clot activator were used to assay for $17\beta\text{E}$, progesterone, FSH and LH. Samples were analyzed by Centaur immunoassay system (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, N.Y) according to manufacturer's instructions.

2.1.4.5. Flow cytometry analysis of circulating PC, EPC and aEPC subpopulations

To measure PC, EPC and aEPC subpopulations, 15 ml of blood was collected into glass tubes containing citrate as an anticoagulant. Mononuclear cells were isolated by density centrifugation using Ficoll-Hypaque gradients (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Four million mononuclear cells were first incubated with normal sera and then stained according to a 4-color antibody protocol: PE anti-human CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), APC anti-human CD34 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), biotin anti-human VEGF-R2 (Alpha Diagnostic, San Antonio, Texas) with streptavidin ECD secondary antibody (Immunotech, Marseille, France) and FITC anti-human CD144 (AbD Serotec, Raleigh, NC). Corresponding isotype antibodies were used as negative controls. Data acquisition was performed using an Epics Altra cytometer and EXPOTM 32 ADC software (Beckman Coulter, Fullerton, CA). 1×10^6 events were processed for each sample.

Of these events, only low-to-medium FSC and SSC singlets were gated for analysis of PC, EPC and aEPC subpopulations (supplemental data Figure S1A). In all cases, gated singlets represented 80 to 90% of acquired events. Data analysis was performed using EXPO™ 32 analysis software (Beckman Coulter).

PC subpopulations were characterized by surface expression of CD133 and/or CD34 antigens (supplemental data Figure S1B). Subsequently, corresponding EPC and aEPC subpopulations were characterized with two additional markers: VEGF-R2 and CD144 (supplemental data Figure S1C). Phenotypical characteristics for PC, EPC and aEPC subpopulations are listed in table 2. PC, EPC and aEPC subpopulations were first quantified as a percentage of mononuclear cells and then reported as cells per ml of blood.

2.1.4.6. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM for continuous variables while frequencies are presented for categorical variables. Clinical characteristics of volunteers were compared between men and women using Fisher exact test in the case of categorical variables. Continuous variables were compared using Student *t*-test on either the raw data or the log-transformed data, when appropriate. For women, a one-way repeated analysis of variance was used to evaluate the effect of menstrual cycle phase (menstrual, pre-ovulatory, and mid-luteal). If the global F test for phases was significant at the 0.05 level, pairwise comparisons were done. The generalized estimating equation (GEE) approach was performed to compare the variables between men and women by taking into account all three measurements taken during a complete cycle for women and a one month period for men. For some markers, the same approach was performed using 17 β E as independent variable to evaluate the effect of 17 β E level. All analyses were done with SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and conducted at the 0.05 significance level.

2.1.5. Results

2.1.5.1. Circulating levels of PC and EPC subpopulations are influenced by menstrual cycle phases

We first assessed the levels of circulating PC, EPC, and aEPC subpopulations at three hormonal points during the menstrual cycle. Flow cytometry analysis revealed that the number of CD133+ PCs (Figure 1A) and their corresponding CD133+/VEGF-R2+ EPCs or CD133+/VEGF-R2+/CD144+ aEPCs (Figure 1B) does not significantly vary between phases of the menstrual cycle. However, circulating level of CD133+/CD34- PCs fluctuated significantly throughout the cycle ($P = 0.0432$) (Figure 1C). The number of CD133+/CD34- PCs tended to be higher at the pre-ovulatory (3085 ± 595 cells/ml of blood) and the mid-luteal phases (2936 ± 335) compared to the menstrual phase (2041 ± 368). Those increases were synchronized with the increase in 17 β E blood level, which was 237% ($P = 0.0263$) and 200% ($P = 0.0003$) higher during the pre-ovulatory and mid-luteal phases, respectively, as compared to the menstrual phase (Table 1). In contrast, neither CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPC nor CD133+/CD34-/VEGF-R2+/CD144+ aEPC levels were altered in response to the menstrual cycle (Figure 1D).

The number of CD133+/CD34+ PCs varied significantly during the cycle ($P = 0.0163$) (Figure 1E). During both the pre-ovulatory and the mid-luteal phases, circulating level (66 ± 17 and 56 ± 9 respectively) tended to be higher than during the menstrual phase (32 ± 8). Here, the amount of corresponding CD133+/CD34+/VEGF-R2+ EPCs was significantly modulated ($P = 0.0221$) (Figure 1F). Their quantity at the pre-ovulatory (45 ± 12) and at the mid-luteal phases (44 ± 7) tended to be superior to the amount observed at the menstrual phase (27 ± 6). Again those increases were synchronized with changes in 17 β E blood level. This modulation could no longer be detected when the analysis was further restricted to CD133+/CD34+/VEGF-R2+/CD144+ aEPCs (Figure 1F). Finally, when CD34+ PCs (Figure 1G) and corresponding CD34+/VEGF-R2+ EPCs or

CD34+/VEGF-R2+/CD144+ aEPCs (Figure 1H) were assessed, no menstrual cycle dependent fluctuation was detected. Additional analysis did not reveal any influence of the menstrual cycle on other blood cells including erythrocytes, granulocytes, lymphocytes, monocytes, and platelets (data not shown).

2.1.5.2. Maturation of PC and EPC subpopulations is influenced by the menstrual cycle

Given that the levels of specific PC and EPC subpopulations are influenced by the menstrual cycle, we hypothesized that their maturation status might also vary. To evaluate this parameter, a putative differentiation cascade towards mature ECs was established as Iwami *et al.* and Shantsila *et al.* proposed previously^{13,14}. Maturation towards EPCs was defined as the acquisition of VEGF-R2 expression by PCs whereas maturation towards aEPCs was characterized as the acquisition of CD144+ expression by EPCs. Ratios of EPCs/PCs, aEPCs/EPCs and aEPCs/PCs were then calculated at each phase of the menstrual cycle using CD133 and/or CD34 antigens as indicators of PCs.

Examination of the ratios revealed that, while the proportion of VEGF-R2+ (EPC) or VEGF-R2+/CD144+ (aEPC) cells within CD133+ PCs remained unchanged throughout the menstrual cycle, the proportion of CD144+ (aEPC) cells within CD133+/VEGF-R2+ EPCs was significantly modulated ($P = 0.0288$) (Figure 2A). A significant reduction of 16% ($P = 0.0116$) was observed at the mid-luteal phase compared to the menstrual phase. Similarly, the fraction of VEGF-R2+ (EPC) or VEGF-R2+/CD144+ (aEPC) cells within CD133+/CD34- PCs was not affected by the menstrual cycle whereas the proportion of CD144+ (aEPC) cells within CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPCs was significantly altered ($P = 0.0305$) (Figure 2B). Again, a significant reduction of 17% ($P = 0.0106$) was noted at mid-luteal phase compared to menstrual phase.

Further analysis did not reveal any influence of menstrual cycle on CD133+/CD34+ and CD34+ PC maturation as evaluated by the ratio of corresponding EPC/PC, aEPC/EPC and aEPC/PC subpopulations (Figure 2C and D respectively).

2.1.5.3. Gender differences in mean global circulating levels of PC, EPC and aEPC subpopulations

As the quantity of specific PC and EPC subpopulations are influenced by the menstrual cycle, we postulated that gender differences in circulating levels of PC, EPC and aEPC subpopulations might also exist. Because this study was not designed to interpret possible fluctuation in cell levels of men and more importantly, to avoid a menstrual phase-dependent bias in women's cell levels, the mean global values obtained from the 3 flow cytometry analyses were employed for comparison between sexes. While no gender differences were detected between CD133+, CD34+ and CD133+/CD34- PCs (Figure 3A and B), the number of CD133+/CD34+ PCs per ml of blood was 72% higher in women than in men ($P = 0.0326$) (Figure 3C). Interestingly, 17 β E was found to be a predictive factor for the gender difference detected in CD133+/CD34+ PC level ($P = 0.0271$) (data not shown).

Appreciable differences were also noticed in EPC subpopulations even while the number of total VEGF-R2+ cells was found to be equivalent between sexes (data not shown). When CD133+/VEGF-R2+ and CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPCs were investigated, they were found to be 49% ($P = 0.0289$) and 47% ($P = 0.0315$) more abundant in women (Figure 4A and B). Again, 17 β E was found to be a predictive factor for the gender difference detected in the levels of these two EPC subpopulations ($P = 0.0371$ and $P = 0.397$) (data not shown). Similarly, the number of CD133+/CD34+/VEGF-R2+ EPCs was higher in women by 110% ($P = 0.0125$) (Figure 4C) but here, 17 β E was not a predictive factor for this detected difference (data not shown). Finally, the number of classical CD34+/VEGF-R2+ EPCs did not differ between men and women (Figure 4D).

Again, although the total amount of CD144+ cells was found equivalent in both sexes (data not shown), analysis of aEPC subpopulations exposed gender differences in number. The quantity of CD133+/VEGF-R2+/CD144+ aEPCs was 67% ($P = 0.0143$) higher in women than in men (Figure 4E). Similarly, the mean numbers of CD133+/CD34-/VEGF-R2+/CD144+ and CD133+/CD34+/VEGF-R2+/CD144+ aEPCs were 65% ($P = 0.0152$) and 112% ($P = 0.0156$) higher in women (Figure 4F and G). For all these aEPC subpopulations, 17 β E could not be considered as a predictive factor for the gender differences detected (data not shown). Conversely, the number of CD34+/VEGF-R2+/CD144+ aEPCs did not differ significantly between sexes (Figure 4H).

Extend of analysis to blood cell components and hormone levels also underlined gender differences. Significantly reduced numbers of erythrocytes and lymphocytes were noted in women compared to men (-18% ($P = 0.0128$) and -17% ($P = 0.0014$), respectively) whereas the numbers of granulocytes, monocytes and platelets were comparable (Table 1). Finally, as expected, mean circulating 17 β E was significantly higher in women than in men by 328% ($P = 0.0007$) (Table 1).

2.1.5.4. Maturation of PC and EPC subpopulations differs between men and women

Since the mean global number of specific PC, EPC and aEPC subpopulations diverges between sexes, we hypothesized that gender differences might also exist at various stages in PC or EPC maturation. As described above, maturation towards EPCs was defined as the acquisition of VEGF-R2 expression by PCs whereas maturation towards aEPCs was characterized as the acquisition of CD144+ expression by EPCs. Ratios of EPCs/PCs, aEPCs/EPCs and aEPCs/PCs were then calculated using CD133 and/or CD34 as general reference markers of PCs.

Assessment of the ratios revealed that the proportions of 1) VEGF-R2+ (EPC) cells within CD133+ PCs, 2) CD144+ (aEPC) cells within CD133+/VEGF-R2+ EPCs and 3)

VEGF-R2+/CD144+ (aEPC) cells within CD133+ PCs were, respectively, 26% ($P = 0.0366$), 15% ($P = 0.0151$) and 43% ($P = 0.0041$) significantly higher in women as compared to men (Figure 5A). With respect to CD133+/CD34- PCs, the fractions of 1) VEGF-R2+ (EPC) cells within CD133+/CD34- PCs, 2) CD144+ (aEPC) cells within CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPCs and, 3) VEGF-R2+/CD144+ (aEPC) cells within CD133+/CD34- PCs were 25% ($P = 0.0420$), 14% ($P = 0.0185$) and 43% ($P = 0.0043$) significantly higher in women (Figure 5B).

In contrast, the proportions of VEGF-R2+ (EPC) or VEGF-R2+/CD144+ (aEPC) cells within CD133+/CD34+ PCs and CD144+ (aEPC) cells within CD133+/CD34+/VEGF-R2+ EPCs were comparable in both sexes (Figure 5C). Similarly, no gender-based differences were noted in regard to the proportions of VEGF-R2+ (EPC) or VEGF-R2+/CD144+ (aEPC) cells within CD34+ PCs or CD144+ (aEPC) cells within CD34+/VEGF-R2+ EPCs (Figure 5D).

2.1.6. Discussion

Cardiovascular events in middle-aged premenopausal women are relatively rare ⁵. Nevertheless, influence of the menstrual cycle on the occurrence of cardiovascular diseases has already been observed. Exercise-induced and spontaneous myocardial ischemia are associated with low estrogen level in premenopausal women with coronary artery diseases ^{15,16}. The early phase of the menstrual cycle is associated with increased vulnerability to coronary events and risk of onset of acute myocardial infarction ^{12,17}. In addition, women with irregular menstrual cycles show an increased risk for non-fatal or fatal coronary artery diseases ¹⁸. Taken together, these clinical data suggest that the low level of estrogen that occurs during menses may favor acute coronary events in premenopausal women who have pre-existing risk factors for coronary artery diseases.

Estrogen exerts beneficial effects on the cardiovascular system of women. It can i) directly target cells comprising the vascular wall to influence the bioavailability of nitric oxide (NO), ii) change gene expression in vascular tissues via ER α and ER β , or iii) act more systemically to influence serum lipid profiles or antioxidant systems (¹⁹, for review). Several of the known physiological effects of estrogen have thus been proposed to explain the phasic cardioprotective effects offered by menstrual cycle. Of these, effects on lipid profiles and antioxidant properties have been evaluated. However, neither very low-density lipoprotein-triglycerides nor apolipoproteinB-100 metabolisms are affected during menstrual cycle ²⁰. Furthermore, the physicochemical properties (particle size, alpha-tocopherol and fatty acyl composition) of low-density lipoproteins are not cyclically influenced by the menstrual cycle ²¹. On the other hand, the increase of serum estrogen concentration during menstrual cycle in healthy women results in increase coronary flow velocity reserve which is an index of healthy coronary microcirculation ²². NO is also increased at the time of ovulation in healthy women of reproductive age ²³.

Interestingly, the requirement for NO for estrogen-induced mobilization of EPCs has already been noted in murine models⁸. The present study also provides, for the first time, evidence that circulating levels of CD133+/CD34-, CD133+/CD34+ PCs, and CD133+/CD34+/VEGF-R2+ EPCs vary significantly during the menstrual cycle, in parallel with 17 β E blood level, in healthy premenopausal women. No correlation between 17 β E concentration and the abundance of PC or EPC subpopulations within the circulation could be made with our group size (data not shown). To determine if such a correlation exists, daily measurements of PCs, EPCs and 17 β E concentration during a complete menstrual cycle would be necessary. Such experimental design could reveal the need for a threshold in 17 β E concentration for PC or EPC mobilization or a delay in the kinetic of PC and EPC mobilization in regard to 17 β E action. However, based on a comprehensive analysis of 17 β E action on EPC mobilization that has been suggested previously⁶⁻⁸, it can still be proposed that 17 β E acts on the mobilization of PCs and EPCs during the menstrual cycle. Masuda *et al.* have recently demonstrated an influence of the menstrual cycle on CD133+ and CD34+ PC levels in a restricted group of 6 premenopausal women²⁴. Although our results cannot be readily compared to theirs due to major differences in the study design, data collection and definition of menstrual cycle phases, the general conclusions are corroborating each other. The effect of 17 β E could be coordinated with other known mobilizing factors, such as VEGF or granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) which have been demonstrated to be upregulated during the ovulatory phase of the menstrual cycle^{24,25}. Whether 17 β E is acting alone or in combination with other factors, it remains that menstrual cycle influences are specific to defined PC and EPC subpopulations. This may reflect precise needs for the biological properties of these subpopulations during the endometrium vascular changes occurring throughout the menstrual cycle^(26, for review).

This study also demonstrates that maturation of CD133+/VEGF-R2+ and CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPCs towards respective aEPCs is influenced by the menstrual cycle. The gradual diminution of aEPC/EPC ratios throughout phases high in 17 β E

concentration could be attributed first, to an impact of menstrual cycle phase on maturation of EPCs toward aEPCs and/or secondly, to a marked increase in aEPC recruitment to the growing endometrial vascular capillary network known to occur at the end of the menstrual cycle ²⁶.

Globally, the finely orchestrated effects of menstrual cycle on the availability and maturation of PCs, EPCs, and aEPCs during phases high in $17\beta\text{E}$ certainly have a positive impact on the vascular health of women. Clinical data support a role for PCs and/or EPCs in the prevention of cardiovascular diseases. The level of circulating EPCs is positively associated with vascular function and negatively associated with cumulative cardiovascular risk factors and the severity of coronary artery diseases ^{3,27}. In light of these data, it is reasonable to propose that low levels of circulating PC and EPC subpopulations during the phase low in $17\beta\text{E}$ (menses) influence, perhaps in conjunction with other factors, the timing of cardiovascular events in middle-aged women with pre-existing cardiovascular risk factors. This suggestion reemphasizes the close relation between endothelial dysfunction and cardiovascular disorders ²⁸. The fragile equilibrium between endothelial injury and recovery, crucial for reducing cardiovascular events ²⁹, might be affected during menses in premenopausal women suffering from atherosclerosis. Since mature ECs have limited regenerative capacity ^{30,31}, low levels of PCs and EPCs during this phase of the menstrual cycle could alter the capacity of the endothelium to maintain its function and integrity ³².

The specificity in which subpopulations are mobilized during menstrual cycle forced us to look further down at the difference in the circulating levels of PC, EPC, and aEPC subpopulations between healthy groups of men and women. To the best of our knowledge, this study is the first to demonstrate gender differences in circulating levels of PC, EPC and aEPC subpopulations in healthy young adults of comparable ages and with similar clinical characteristics and life style. Interestingly, no difference in classical circulating CD133+ and CD34+ PCs was observed. Differences were only detected with

the use of combined cell surface markers to characterize subpopulations of PCs, EPCs and aEPCs, underlining the potential usefulness for this type of comprehensive approach.

The mean number of the majority of PC, EPC and aEPC subpopulations studied here was found to be higher in woman than in men. 17 β E was even identified as a predictive factor for the gender differences observed for CD133+/CD34+ PC, CD133+/VEGF-R2+ and CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPC subpopulations. Although not all significantly modulated by the menstrual cycle, it can still be proposed that women, via 17 β E-regulated pathways, mobilize more efficiently these specific subpopulations than men. Due to their possible unique biological properties, these specific subpopulations could give to women a vascular advantage over men. Interestingly, differences in vascular regeneration potential have already been reported between different populations of PCs and EPCs and CD133+/CD34-/VEGF-R2+ EPCs identified as a subpopulation with potent vasoregenerative capacities³³. Further studies will be needed to evaluate the unique *in vivo* biological properties of each PC, EPC and aEPC subpopulation circulating in women a process that, due to the rarity of the cells, will be technically challenging.

Dissimilarities in specific PC/EPC, PC/aEPC or EPC/aEPC ratios were also noted between sexes revealing that CD133+ and CD133+/CD34- PC maturation process towards mature ECs is perhaps facilitated in women. Greater availability due to positive regulation by 17 β E and other regulatory factors, combined with differences in bioactivity of PC, EPC and aEPC subpopulations present, might therefore underlie gender differences in vascular protection. Finally, the facts that other EPC and aEPC subpopulations were highly represented in women compared to men and not related to the difference in levels of 17 β E indicate that PCs, EPCs and aEPCs regulation is fundamentally different between genders and goes probably beyond hormone regulation.

This study underlines a physiological role for the menstrual cycle in regulating the availability of specific PC and EPC subpopulations in premenopausal women. The gender differences in the abundance of PC, EPC and aEPC subpopulations demonstrate the

necessity to further investigate the specific *in vivo* bioactivities of each subpopulation. Whether the cyclic variation influences the timing of coronary events in premenopausal women deserves to be investigated as such distinction will help better understand the vascular protection observed in premenopausal women.

2.1.7. Acknowledgments

We gratefully thank all volunteers who participated in the study, Maryse Caron as well as Charbel Kassouf for nursing assistance and finally Mariève Cossette and Anna Nozza from the Montreal Heart Institute Coordinating Center for the statistical analyses. None of the authors has competing financial interests to declare.

2.1.8. References

1. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:318-322.
2. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med.* 2005;56:79-101.
3. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
4. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007.
5. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet.* 1999;353:89-92.
6. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 2003;107:3059-3065.
7. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation.* 2003;108:3115-3121.
8. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation.* 2006;113:1605-1614.
9. Hamada H, Kim MK, Iwakura A, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation.* 2006;114:2261-2270.

10. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens.* 2005;23:1699-1706.
11. Bulut D, Albrecht N, Imohl M, et al. Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:258-263.
12. Hamelin BA, Methot J, Arsenault M, et al. Influence of the menstrual cycle on the timing of acute coronary events in premenopausal women. *Am J Med.* 2003;114:599-602.
13. Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med.* 2004;8:488-497.
14. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:741-752.
15. Lloyd GW, Patel NR, McGing E, Cooper AF, Brennand-Roper D, Jackson G. Does angina vary with the menstrual cycle in women with premenopausal coronary artery disease? *Heart.* 2000;84:189-192.
16. Kawano H, Motoyama T, Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Menstrual cyclic variation of myocardial ischemia in premenopausal women with variant angina. *Ann Intern Med.* 2001;135:977-981.
17. Mukamal KJ, Muller JE, Maclure M, Sherwood JB, Mittleman MA. Variation in the risk of onset of acute myocardial infarction during the menstrual cycle. *Am J Cardiol.* 2002;90:49-51.
18. Solomon CG, Hu FB, Dunaif A, et al. Menstrual cycle irregularity and risk for future cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2013-2017.
19. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1999;340:1801-1811.
20. Magkos F, Patterson BW, Mittendorfer B. No effect of menstrual cycle phase on basal very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B-100 kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E1243-1249.

21. Ruiz-Sanz JJ, Navarro R, Martinez R, Hernandez ML, Matorras R, Ruiz-Larrea MB. No effect of menstrual cycle on LDL oxidizability and particle size. *Maturitas*. 2007;57:253-260.
22. Hirata K, Shimada K, Watanabe H, et al. Modulation of coronary flow velocity reserve by gender, menstrual cycle and hormone replacement therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1879-1884.
23. Ekerhovd E, Enskog A, Caidahl K, et al. Plasma concentrations of nitrate during the menstrual cycle, ovarian stimulation and ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod*. 2001;16:1334-1339.
24. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 2007;101:598-606.
25. Makinoda S, Mikuni M, Sogame M, et al. Erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 during the normal menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet*. 1996;55:265-271.
26. Girling JE, Rogers PA. Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis*. 2005;8:89-99.
27. Kunz GA, Liang G, Cuculi F, et al. Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J*. 2006;152:190-195.
28. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:51-60.
29. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1983-1992.
30. Caplan BA, Schwartz CJ. Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis*. 1973;17:401-417.
31. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med*. 2004;82:671-677.

32. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712.
33. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* 2006;98:e20-25.

2.1.9. Tables

2.1.9.1. Table 1. Volunteer's clinical characteristics

Characteristics	Men (<i>n</i> = 10)	Women (<i>n</i> = 10)
Age (years)	28.90 ± 1.94	30.80 ± 2.27
Age at onset of menarche (years)	NA	12.50 ± 0.61
Menstrual cycle (days)	NA	27.57 ± 0.56
17βE level (pmol/l):		
Menstrual phase	NA	195 ± 50
Pre-ovulatory phase	NA	655 ± 176 ^a
Mid-luteal phase	NA	584 ± 48 ^a
Mean Level	110 ± 12	472 ± 69 ^b
Weight (kg)	79.39 ± 2.95	58.73 ± 2.99 ^b
Height (m)	1.78 ± 0.02	1.62 ± 0.02 ^b
Body mass index (kg/m ²)	25.15 ± 0.91	22.25 ± 1.01 ^b
Waist circumference (cm)	91.80 ± 2.26	81.30 ± 2.71 ^b
Systolic blood pressure (mm Hg)	113.17 ± 2.36	102.62 ± 1.99 ^b
Diastolic blood pressure (mm Hg)	66.38 ± 1.33	64.10 ± 1.64
Erythrocytes (x10 ⁹ /ml)	5.23 ± 0.13	4.31 ± 0.05 ^b
Granulocytes (x10 ⁶ /ml)	3.57 ± 0.21	3.39 ± 0.16
Lymphocytes (x10 ⁶ /ml)	1.98 ± 0.07	1.63 ± 0.07 ^b
Monocytes (x10 ⁶ /ml)	0.46 ± 0.02	0.43 ± 0.03

Platelets ($\times 10^6/\text{ml}$)	187 ± 13	223 ± 13^b
Glucose (mmol/l)	5.13 ± 0.13	4.79 ± 0.10
Total cholesterol (mmol/l)	4.16 ± 0.19	4.01 ± 0.26
High-density lipoprotein cholesterol (mmol/l)	1.32 ± 0.04	1.42 ± 0.08
Low density lipoprotein cholesterol (mmol/l)	2.44 ± 0.18	2.32 ± 0.20
Total cholesterol/High-density lipoprotein	3.19 ± 0.19	2.86 ± 0.18
Triglycerides (mmol/l)	0.87 ± 0.09	0.60 ± 0.11^b
Physical activities (h/week)	3.50 ± 1.15	2.30 ± 0.45
Alcohol consumption (nb/week)	2.70 ± 0.96	2.33 ± 0.70
Past smoking (nb)	1	1
Family history of:		
Early coronary artery diseases (nb) ^c	3	1
Hypercholesterolemia (nb)	3	6
Hypertension (nb)	3	4
Diabetes (nb)	5	3

Values are mean \pm SEM.

NA stands for non applicable.

^a $P < 0.05$ versus menstrual phase.

^b $P < 0.05$ versus men.

^c Men < 50 years and women < 55 years.

2.1.9.2. Table 2. Phenotypical characteristics of PC subpopulations and their corresponding EPCs or aEPCs

PCs	EPCs	aEPCs
CD133+	CD133+/VEGF-R2+	CD133+/VEGF-R2+/CD144+
CD133+/CD34-	CD133+/CD34-/VEGF-R2+	CD133+/CD34-/VEGF-R2+/CD144+
CD133+/CD34+	CD133+/CD34+/VEGF-R2+	CD133+/CD34+/VEGF-R2+/CD144+
CD34+	CD34+/VEGF-R2+	CD34+/VEGF-R2+/CD144+

2.1.10. Figure legends

2.1.10.1. Figure 1: Menstrual cycle influences circulating levels of PC and EPC subpopulations.

Number of PC, EPC and aEPC was determined at each phase of the menstrual cycle: menstrual (M), pre-ovulatory (PO) and mid-luteal (ML) (A-H). Data are mean \pm SEM; $n = 10$ at each phase; $*P < 0.05$ for one-way repeated analysis of variance.

2.1.10.2. Figure 2: Menstrual cycle influences PC and EPC maturation.

Ratios were calculated at each phase of the menstrual cycle: menstrual (M), pre-ovulatory (PO), and mid-luteal (ML) (A-D). Data are ratio values of cells/ml of blood; $n = 10$ at each phase; $*P < 0.05$ for one-way repeated analysis of variance; $^{\dagger}P < 0.05$ for pairwise comparisons.

2.1.10.3. Figure 3: Mean global circulating level of PCs differs between sexes.

PC subpopulation levels were determined three times over a month period in men and women. Mean global PC subpopulation quantities were compared between sexes (A-C). Data are mean \pm SEM; $n = 30$ in each group; $*P < 0.05$ compared to men.

2.1.10.4. Figure 4: Mean global circulating level of EPCs and aEPCs differs between sexes.

EPC and aEPC levels were determined three times over a month period in men and women. Mean global subpopulation quantities (A-H) were compared between sexes. Data are mean \pm SEM; $n = 30$ in each group; $*P < 0.05$ compared to men.

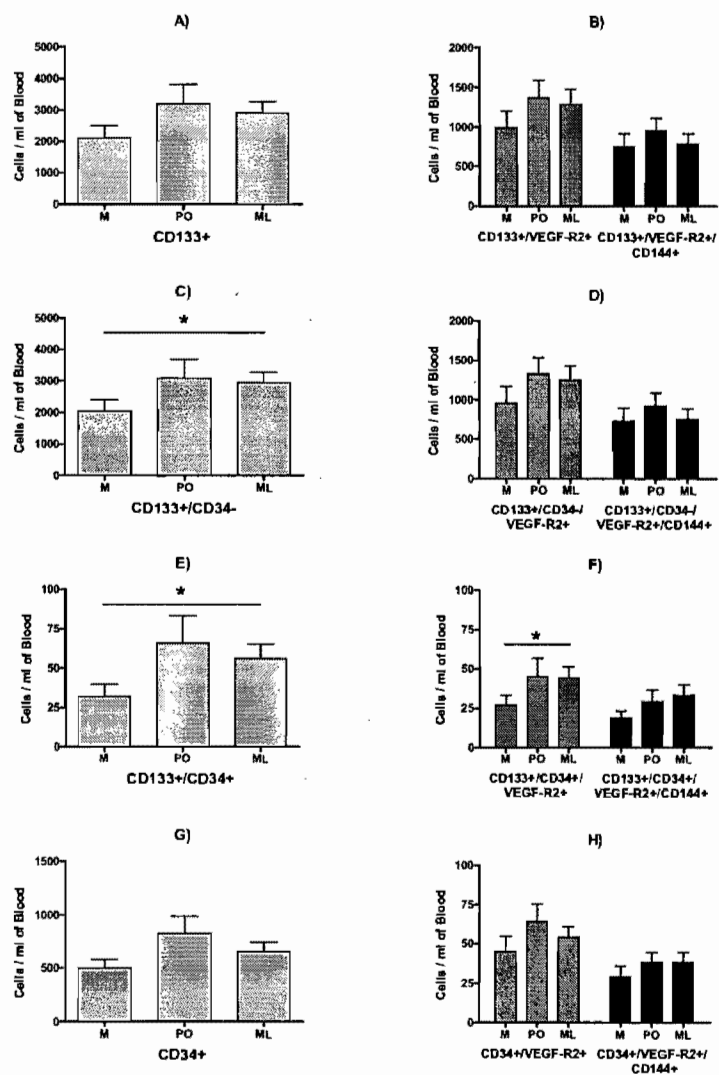
2.1.10.5. Figure 5: Gender influences PC and EPC maturation.

Ratios of EPCs/PCs, aEPCs/EPCs and aEPCs/PCs were calculated and compared between sexes (A-D). Data are ratio values of mean cell numbers /ml of blood; $n = 30$ in each group; $*P < 0.05$ compared to men.

2.1.11. Figures

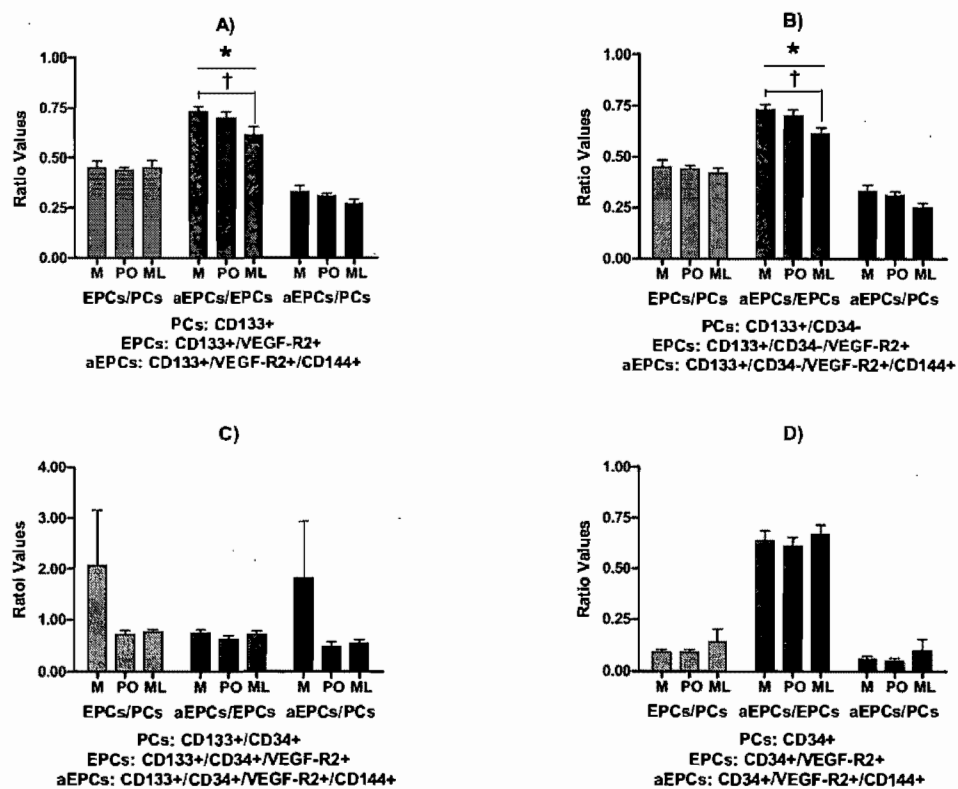
2.1.11.1. Figure 1

Figure 1

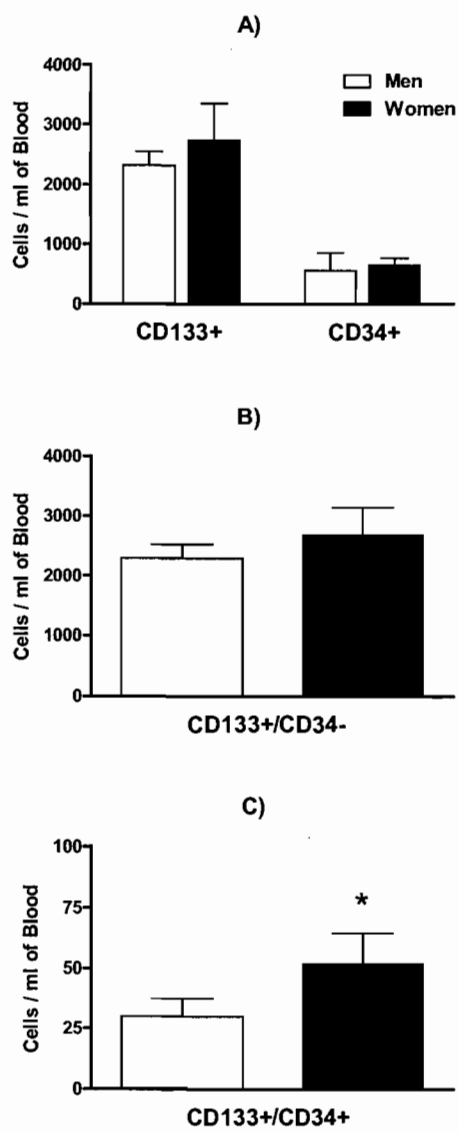


2.1.11.2. Figure 2

Figure 2

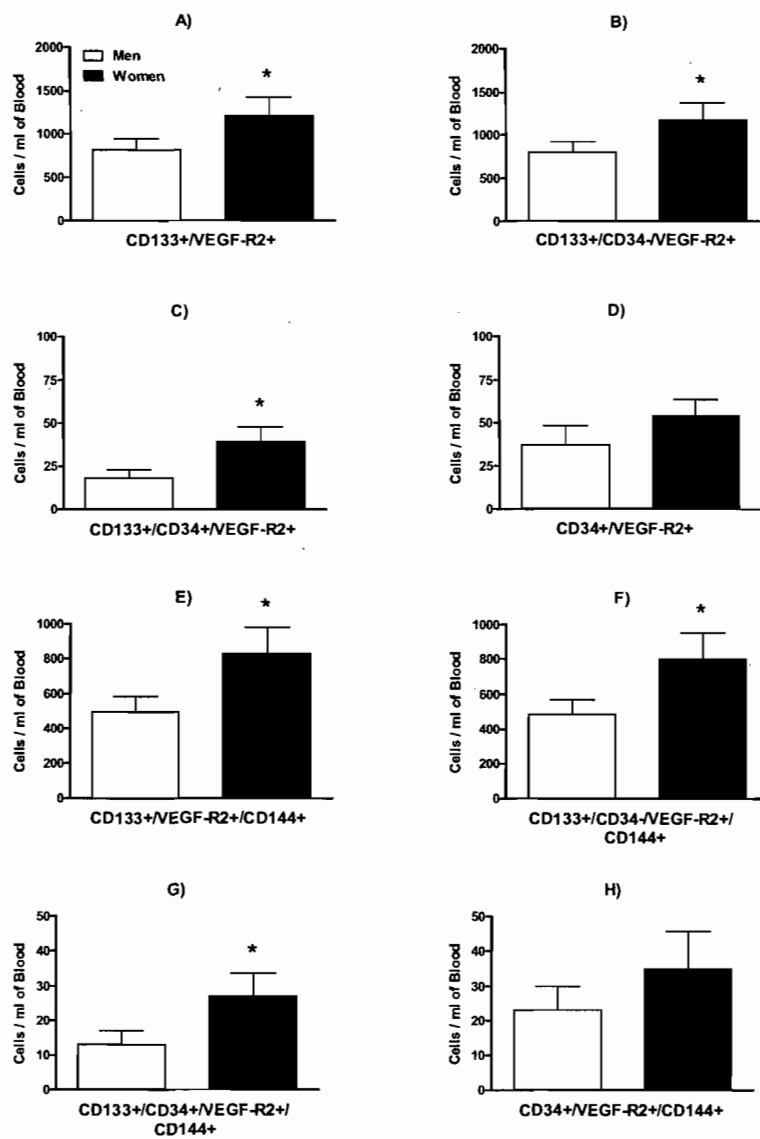


2.1.11.3. Figure 3

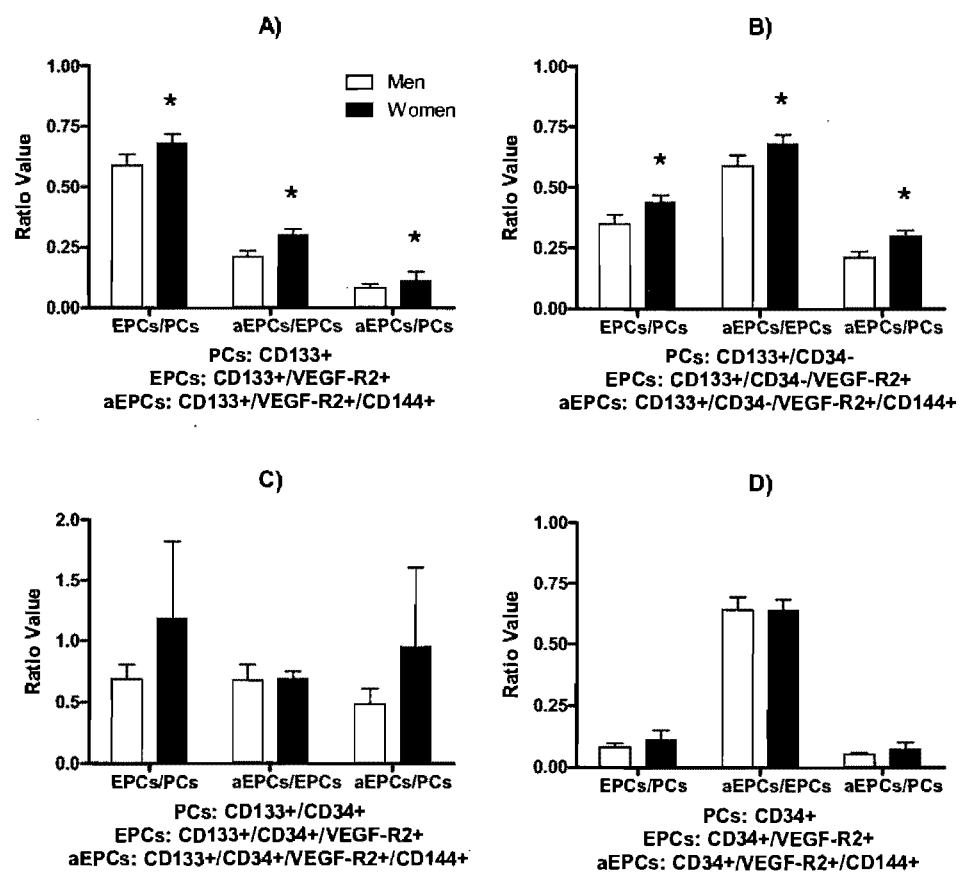
Figure 3

2.1.11.4. Figure 4

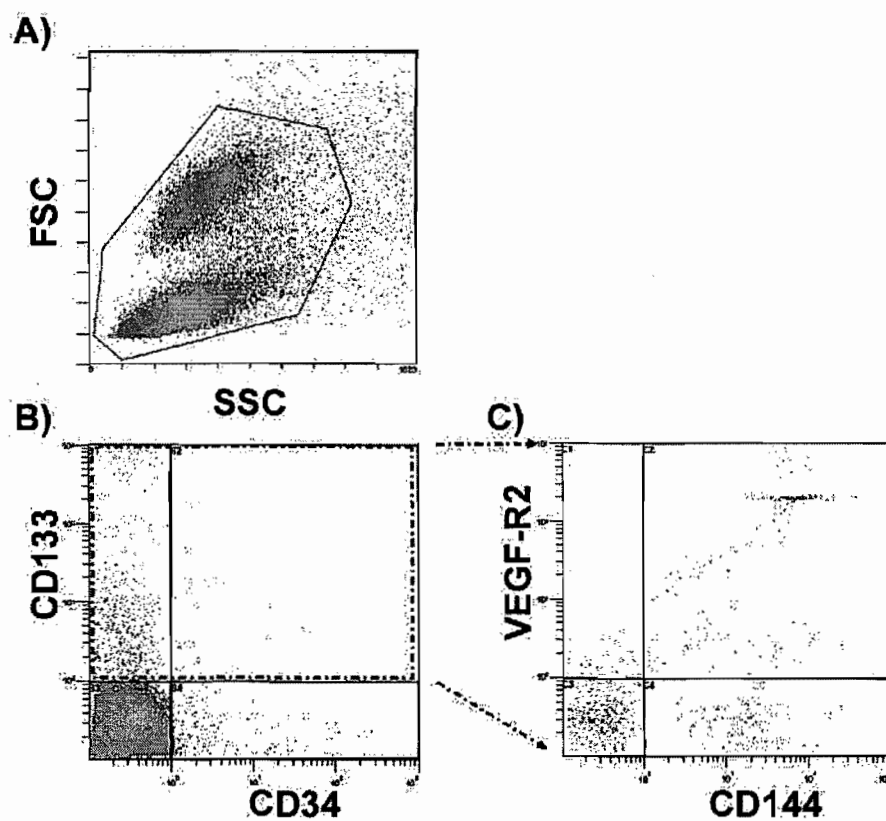
Figure 4



2.1.11.5. Figure 5

Figure 5

2.1.11.6. Figure S1

Figure S1

2.2. Estrogen-induced gene expression in bone marrow c-kit⁺ stem cells and stromal cells: identification of specific biological processes involved in the functional organization of the stem cell niche

2.2.1. Accord des coauteurs et permission de l'éditeur

**Estrogen-Induced Gene Expression in Bone Marrow c-Kit⁺ Stem
Cells and Stromal Cells: Identification of Specific Biological
Processes Involved in the Functional Organization of the
Stem Cell Niche**

Caroline Lemieux^{1,2}, MSc; Isabelle Cloutier¹, PhD; Jean-François Tanguay^{1,2,3}, MD.

¹Centre de Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal (QC), Canada;

²Département des Sciences Biomédicales & ³Département de Médecine, Université de
Montréal, Montréal (QC), Canada

In press, embargoed for publication

Running title: Estrogen regulation of bone marrow stem cell niche

Total text word count: 3,713

Abstract word count: 195

Correspondence should be addressed to:

Jean-François Tanguay

Montreal Heart Institute

5000, Belanger Street

Montreal (QC), Canada, H1T 1C8

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

2.2.2. Abstract

The recent interest in the role of bone marrow (BM) derived endothelial progenitor cells (EPCs) in the benefits of estrogen on cardiovascular health brought us to evaluate if estrogen could affect cardiac repair more broadly by regulating biological processes involved in the functional organization of the BM stem cell (SC) niche. To assess such possibility, we evaluated gene expression profiles of BM c-kit⁺ SCs and CD44⁺ stromal cells (StroCs) after exposure to a physiological concentration of 17 β -estradiol (17 β E). Data analysis showed that 17 β E altered the expression (> 1.5 fold) of 509 and 682 gene probes in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs, respectively. Among them, 199 genes in c-kit⁺ SCs and 283 in CD44⁺ StroCs were associated to biological process categories of the Gene Ontology classification. Within processes highly regulated by 17 β E, we identified key factors involved in adhesion, migration, proteolysis and signaling by which 17 β E influences physiological regulation of the functional organization of the SC niche. Together, our results demonstrate that estrogen benefits on cardiovascular health could involve other BM derived cells than EPCs and that this capacity of estrogen to influence the physiology of the BM SC niche deserves to be investigated clinically.

2.2.3. Introduction

Cardiovascular diseases account for about 50% of all deaths in industrialized countries¹. The loss of cardiomyocytes and the absence, or deficiency of the endogenous repair mechanism are the principal factors leading to heart failure after myocardial infarction. Recently, in an effort to overcome these factors, stem and progenitor cells that emerge to have the capacity to differentiate into cardiomyocytes, vascular cells and/or support endogenous cardiac repair mechanisms, have been investigated as potentially valuable approaches to the development of novel therapeutics.

Among these approaches, direct injections at sites of vascular injury and systemic delivery of autologous stem/progenitor cells have generated a great interest. However, because cardiovascular diseases affect principally the aging population, it is probable that both the number and function of their stem/progenitor cells are impaired with aging and its related pathological conditions. Improving cardiac protection and/or repair may thus reside in enhancing the function of endogenous stem/progenitor cells by regulating biological processes involved in the functional organization of the stem cell (SC) niche.

Within the bone marrow (BM), the SC niche is a specific microenvironment where SCs reside and undergo self-renewal and/or differentiation. Structurally, the BM SC niche is formed by supporting cells, the stromal cells (StroCs), which provide physical support and signaling molecules essential to guide SCs in their function. StroCs include adipocytes, chondrocytes, endothelial cells (ECs), fibroblasts and osteoblasts, and are all believed to be derived from mesenchymal stem cells (MSC) also found in BM stroma²⁻⁴. It is the finely orchestrated combination of adhesion, migration, proteolysis and signaling processes, which occurs at the interface between SCs and StroCs, that influences SC self-renewal, commitment, retention, mobilization and homing (⁵, for review). Modulating the biological processes involved in the niche regulatory system may thus be relevant for modifying stem/progenitor cell outcomes clinically.

Based on recent evidences, BM derived endothelial progenitor cells (EPCs) seem to play an important contribution to estrogen-induced cardiac repair mechanisms. Treatment with 17 β -estradiol (17 β E) enhances the mobilization and proliferation of EPCs, accelerates reendothelialization and attenuates neointima formation after vascular injury in murine models ^{6,7}. 17 β E also enhances recovery in murine myocardial infarction models by increasing EPC mobilization and incorporation at sites of ischemia, a mechanism involving estrogen receptors α and β (ER α , ER β) ^{8,9}. *In vitro*, 17 β E acts as a survival factor and protects EPCs against apoptosis induced by serum deprivation ⁷ and reduces EPC senescence by increasing the telomerase activity ¹⁰. Taken together, these data suggest that, by positively regulating BM derived EPC mobilization and function in cardiac repair mechanisms, 17 β E certainly modulates biological processes involved in the functional organization of the SC niche. Unfortunately, 17 β E physiological influences on regulatory mechanisms of the SC niche have not been investigated to date.

In this study, we hypothesized that 17 β E influences biological processes involved in the functional organization of the SC niche by regulating gene expression in BM c-kit⁺ (CD117⁺) SCs and CD44⁺ StroCs. To address this hypothesis comprehensively, we developed a whole BM culture system that allowed cohabitation of both c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs. Global gene expression profiles, in both cell populations following treatment with physiological dose of 17 β E, were then determined using gene microarrays.

We selected c-kit as a marker for SCs because in the adult BM, c-kit is expressed on hematopoietic stem cells (HSCs), EPCs and their believed common precursor, the hemangioblast ¹¹⁻¹³. In addition and maybe more importantly, c-kit⁺ SCs derived from the BM can be endogenously recruited into myocardium after infarction ¹⁴. Finally, the c-kit/stem cell factor (SCF) system has been shown to be critical for HSC mobilization into peripheral circulation ¹⁵, a mechanism also believed to be involved in EPC mobilization in response to tissue ischemia ^{16,17}. The remaining stroma was selected based on positive expression of CD44 and negativity for c-kit. CD44 is a cell-surface receptor known to be

expressed by StroCs and MSCs, and to be essential for niche structural organization by binding to extracellular matrix (ECM) component such as hyaluronan and fibronectin ¹⁸. Such a widely expressed cell-surface receptor allowed us to avoid discrimination between MSCs and StroC lineages, which are all important in the regulation of SC functions.

2.2.4. Materials and methods

2.2.4.1. Isolation and culture of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs

BM of female C57BL/6 mice (6-week old) was used to develop a whole BM culture system allowing cohabitation of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs. To do so, BM cells were isolated by flushing out the femoral and tibial bone cavities with phosphate-buffered saline (PBS). These cells were then plated onto rat fibronectin (Sigma, St Louis, MO) coated 6-well plates in complete culture medium: HPGM medium (Cambrex, East-Rutherford, NJ), 2% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 10 ng/ml of placental derived growth factor (PDGF-BB) (Peprotech), and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin; Sigma). First medium change was performed four days after plating. At day 7, complete culture medium was replaced by an incomplete culture medium: HPGM medium, 2% fetal bovine serum, and 1% antibiotics with or without 17 β E (Sigma) treatment. Subsequent incomplete medium changes and 17 β E treatments, where necessary, were performed every two or three days for another week. The experimental protocol was approved by the animal care committee of the Montreal Heart Institute.

2.2.4.2. Quantification and purification of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs by flow cytometry cell sorting

c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs were quantified and positively selected from whole BM cell cultures using flow cytometry cell sorting. Five millions cultured BM cells were first incubated with normal serums and then stained with a 2-color antibody protocol: APC anti-mouse c-kit (BD Biosciences, Mississauga, ON, CA) and FITC anti-mouse CD44 (BD Biosciences). Cells were resuspended in 500 μ l sorting buffer and sorted on FACSVantage SE sorter with DiVa option (BD Biosciences) at the Maisonneuve-Rosemont Hospital (Montreal, Qc, CA). Purity of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs was 92% to 94% by flow

The whole bone marrow of three different female C57BL/6 mice was used for microarray analysis. c-kit⁺ SC and CD44⁺ StroC total RNAs were extracted from cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Microarray procedures were performed at the McGill University and Génome Québec Innovation Center (Montreal, Qc, CA). RNAs were quantified by nanodrop technology with the Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Nanodrop technologies, Wilmington, DE) and their quality was confirmed by gel electrophoresis. Each double stranded cDNA was synthesized from 50 ng of total RNA, and *in vitro* transcription was performed to produce biotin-labeled cRNA using Affymetrix Two-Cycle Target Labeling and Control Reagent Kit (Affimetrix, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions. After fragmentation, 10 µg of cRNA was hybridized with GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affimetrix) containing 34,000 genes. Genechips were then scanned with the GeneChip Scanner 3000 (Affimetrix). Robust Multi-array Average (RMA) expression values and Gene Ontology annotations (www.geneontology.org) were obtained with R software from Bioconductor (www.bioconductor.org). The mean of the three different expression values was then calculated for each gene and genes with an expression change of more than 1.5 fold following 17βE treatment were then selected.

Quantitative real-time PCR (Q-PCR) was performed to confirm expression levels of RNA transcripts with sequence specific oligonucleotide primers listed in Table I, according to the manufacturer's instructions (Stratagene, La Jolla, CA). All reactions were performed with the Mx3000P Q-PCR System (Stratagene). The data were analysed with MxPro™ Q-PCR software version 3.00 (Stratagene). The values obtained for the target gene expression

were normalized to Cyclophilin A and were expressed relative to the expression in untreated samples.

2.2.4.5. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni test for multiple comparisons was used to compare cell type proportion in whole BM cultured system. Paired t-tests were used to compare gene expression differences between untreated and 17 β E treated cells in microarray analysis. To assess the inter-rater (microarray and Q-PCR) reliability on the variation ratios, the intraclass correlation coefficient was calculated using 10 selected genes. All analyses were done with SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and conducted at the 0.05 significance level.

2.2.5. Results

2.2.5.1. 17 β E modulation of whole BM culture system is cell type dependent

We first assessed the capacity of 17 β E to modulate the proportion of c-kit+ SCs or CD44+ StroCs in our model of whole BM culture system. Treatment of whole BM cultures with a physiological dose of 17 β E (10^{-9} M; 1 week) induced a significant 49% increase in c-kit+ SC content compared with cells cultured in incomplete medium (INC) only (Figure 1A). None of the other doses of 17 β E used (10^{-10} ; 10^{-8} and 10^{-7} M), neither culture in complete medium (COMP), modulated significantly the proportion of c-kit+ SCs in the whole BM culture system (Figure 1A). The same conditions were used to assess the influence of 17 β E treatment on the proportion of CD44+ StroCs in the system. Here, treatment with increasing dose of 17 β E (10^{-10} to 10^{-7} M) for one week or complete medium utilization did not influence the percentage of CD44+ StroCs compared with cells cultured in incomplete medium only (Figure 1B).

2.2.5.2. 17 β E influences gene expression profiles in c-kit+ SCs and CD44+ StroCs

Since a one-week treatment with a physiological dose of 17 β E (10^{-9} M) influenced positively the proportion of c-kit+ SCs in our system without changing the one of CD44+ StroCs, we then assessed its capacity to modulate gene expression in both cell types. To do so, microarray analysis was performed using total RNAs obtained from c-kit+ SCs and CD44+ StroCs treated for a one-week period with a physiological dose of 17 β E (10^{-9} M). Analysis of the results demonstrated that 509 and 689 gene probes were modulated (>1.5 fold) by treatment with 17 β E in c-kit+ SCs and CD44+ StroCs, respectively (Figure 2A). Microarray data were deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO), and are accessible through GEO series accession number GSE9098.

Focusing on genes linked to biological processes according to the Gene Ontology classification, the expression of 199 and 283 different genes has been modulated (>1.5 fold) by treatment with 17β E in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs, respectively. In c-kit⁺ SCs, the expression of 154 genes was up-regulated and the one of 45 genes was down-regulated (Figure 2B). In CD44⁺ StroCs, the expression of 263 genes was up-regulated while the one of 20 genes was down-regulated under the influence of 17β E (Figure 2B). To avoid the presentation of an exhaustive list of modulated genes, only genes with a variation ratio >1.5 fold and a *P value* < 0.05 in c-kit⁺ SCs or those mentioned in the discussion are listed in Table II. The same criteria were respected to present the genes modulated in CD44⁺ StroCs in Table SI of supplemental data. For further information, all other modulated genes (>1.5 fold) but with a *P value* > 0.05 in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs can be viewed respectively in Table SII and SIII of supplemental data.

2.2.5.3. Genes modulated by 17β E in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs are involved in biological processes regulating the functional organization of the SC niche

To better interpret the global action of 17β E in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs, genes that expression has been modulated (>1.5 fold) by treatment, were classified by biological process annotations using Gene Ontology classification. Globally, in c-kit⁺ SCs, modulated genes were implicated in 198 different biological processes while in CD44⁺ StroCs, 241 different biological processes were involved. Among biological process categories implicated in 17β E action in c-kit⁺ SCs, 23 categories were highly represented, regrouping 50% of 17β E global action (Table III). Some of these categories were concordant in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs whereas others were specific to CD44⁺ StroCs. Again here in CD44⁺ StroCs, 24 biological process categories were responsible for 50% of 17β E global action (Table IV).

2.2.5.4. The reliability of the microarray data is confirmed by Q-PCR evaluation

To confirm the reliability of the microarray data by Q-PCR, we arbitrarily selected 10 genes that were present in both c-kit+ SCs and CD44+ StroCs with different levels of transcript abundance and microarray variation ratios. The intraclass correlation coefficient for c-kit+ SCs has been found to be 0.97502 and 0.87611 for CD44+ StroCs (Figure 3). Considering that values above 0.75 or so may be taken to represent excellent reliability¹⁹, it can be stated that a strong positive relationship between microarray and Q-PCR was revealed. For further information, the variation ratios obtained for the selected genes with the Q-PCR method can be viewed in Table SIV and SV of supplemental data.

2.2.6. Discussion

The model of the SC niche, that was first proposed by Schofield in 1978²⁰, has recently received greater attention in cardiovascular research. For future clinical applications in this field, it is crucial to understand the dynamic capability of the functional organization of the niche to regulate SC fate. Peripheral signals can influence SC fate by modulating the functional organization of the niche and with this study, we are able to conclude that 17 β E is one of those regulatory signal. We demonstrate, for the first time, the ability of 17 β E to increase the proportion of c-kit⁺ SCs in a whole BM culture system without influencing the proportion of the remaining stroma. This phenomenon is related to its capacity to influence, physiologically, the dynamism of the BM SC niche by regulating gene expression in both c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs. We reveal that 17 β E action is multivalent and primarily executed via 27 different biological processes that include highly crucial processes known to influence the functional organization of the SC niche like: inflammatory response; regulation of cell cycle; apoptosis; cell proliferation; cell differentiation; cell growth and/or maintenance; cell adhesion, and finally chemotaxis. Within the Gene Ontology biological processes highly regulated by 17 β E, we were able to identify key factors involved in adhesion, migration, proteolysis and signaling by which 17 β E influences, physiologically, the regulation of the BM SC niche function.

17 β E modulated multiple signaling pathways involved in cellular interactions, contributing to diverse functions of the niche. Among them, 17 β E influenced the Notch signaling pathway by upregulating the Notch ligand, Jagged-1, in BM CD44⁺ StroCs. Notch signaling is involved in SC self-renewal and stem or progenitor cell pools expansion^{21,22}. 17 β E treatment also increased the expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) in c-kit⁺ SCs. VEGF-A is vital for HSCs as it works through an intracellular autocrine loop to promote their survival²³. VEGF-A can also support EPC mobilization and induce the release of other BM growth factors such as granulocyte-macrophage colony

stimulating factor (GM-CSF) by BM ECs ^{24,25}, a factor also found to be up-regulated by 17 β E in c-kit+ SCs. 17 β E action on whole BM cultured cells reduced the expression of angiopoietin-like 4 (Angptl4) in c-kit+ SCs. Angptl4 belongs to the angiopoietin family. Under hypoxic conditions, endogenous Angptl4 accumulates in the ECM of the ischemic tissue and negatively regulates EC adhesion and motility ²⁶. Within the BM, membrane bound Angptl4, by promoting interactions with ECM, could modulate the quiescence of SCs as angiopoietin 1 does through Tie2 on osteoblastic cells ²⁷. Based on this function, it can be proposed that, by down-regulating Angptl4 in BM c-kit+ SCs, 17 β E enhances their motility in the niche and thus reduces their quiescence. Interestingly, 17 β E increased cyclin D2 expression in c-kit+ SCs. D-type cyclins, (cyclin D1, D2, and D3) promote G1 phase transition of the cell cycle, and, when overexpressed in hematopoietic progenitor cells or other cell types, shorten the time required for cell cycling, enhance their proliferation and extend their replicative life span ²⁸⁻³¹.

Several interleukins were also up-regulated by 17 β E treatment in our whole BM culture system. Interleukin 1a (IL-1a), IL-1b, IL-6 and IL-10 were all up-regulated in c-kit+ SCs and CD44+ StroCs. IL-1a and IL-1b are recognized for their radioprotective actions on BM cells which are attributed to the release of growth factors and cytokines such as GM-CSF and IL-6 ³²⁻³⁴. IL-6 influences SC self-renewal and/or commitment when combined with other BM cell modulators such as SCF or thrombopoietin ³⁵⁻³⁷ and IL-10 has also been recently identified as a promoter of HSC self-renewal ³⁸. Other interleukin/receptor signaling pathways seem to be involved in 17 β E action. Of interest, IL-17 receptor (IL-17r) expression was up-regulated in c-kit+ SCs and CD44+ StroCs thus sensitizing these cells to IL-17 signaling. IL-17, a T-cell derived cytokine, induces StroCs to produce many cytokines and growth factors such as IL-6, IL-8 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and thus, indirectly promotes the capacity of StroCs to sustain the proliferation of CD34+ progenitor cells ³⁹. IL-17 direct signaling in hematopoietic cells involves the Janus kinase-signal transducers and activators of transcription (JAK-STAT) signaling pathway. Its complex action can promote or repress the proliferation of

hematopoietic cells depending of the maturity of the target cell and the presence of secondary induced cytokines such as IL-6⁴⁰⁻⁴².

17 β E also up-regulated the expression of the transforming growth factor beta 2 (TGF-B2) in CD44+ StroCs, a potent negative regulator of hematopoiesis⁴³. TGF-B2 is a member of the TGF-B family, a well-known anti-proliferative signaling factor. Within the BM, TGF-B signaling represses c-Myc expression which results in insufficient SC commitment and in an increase in SC BM retention through up-regulation of adhesion molecules such as N-cadherin and integrins⁴⁴. 17 β E could thus increase TGF-B2 signaling in order to oppose negative and positive regulators of hematopoiesis and finely regulate the balance between SC quiescence, self-renewal, proliferation and commitment.

In our whole BM cell culture system, 17 β E influenced the expression of multiple adhesion molecules, essential modulators of the interactions between SCs and ECM or StroCs that are crucial for SC function. Adhesion molecules are involved in SC quiescence, self-renewal, proliferation, mobilization and homing. In our system, 17 β E up-regulated integrin alpha 4 in c-kit+ SCs, which is the alpha subunit of the very late antigen 4 (VLA-4) receptor, and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) in c-kit+ SCs and CD44+ StroCs. VLA-4 interactions with VCAM1 on BM StroCs help to maintain SCs in close proximity to StroCs⁵ and both VLA-4 and VCAM1 have been implicated in SC homing to the BM⁴⁵. Also, cadherin 2 (N-cadherin) was up-regulated by 17 β E in CD44+ StroCs. N-cadherin facilitates anchoring of HSCs to osteoblasts and regulates asymmetric division of HSCs^{4,46}. By upregulating adhesion molecules, 17 β E certainly contributes to the communication at the interface between SCs and StroCs and this way, increases the capacity of CD44+ StroCs to sustain c-kit+ SCs survival in culture, as it was demonstrated by ectopic expression of N-cadherin in OP9 StroC line²⁷.

The expression of many chemokines, growth factors and proteolytic enzymes, involved in SC homing and mobilization, varied under 17 β E treatment. In our model, the expression of CXCR4, the receptor for stromal derived factor-1 (SDF-1), was increased by

17 β E in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs. SDF-1 is able to induce migration, survival and development of cells, such as HSCs, EPCs and MSCs, positive for the expression of CXCR4^{47,48}. By increasing CXCR4 expression, 17 β E could favor response of these cells to SDF-1 and indirectly influence their survival, proliferation, mobilization and homing to BM or other tissues⁴⁹. Similarly, 17 β E could also promote response to G-CSF since it increased the expression of its receptor in CD44⁺ StroCs. G-CSF is well-known to induce SC and progenitor cell mobilization and as already been widely used in clinic for SC based therapies^(50, for review). G-CSF action has been demonstrated to be dependant on induction of proteolytic enzymes such as elastase, cathepsin G, matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP2 and MMP9) that are required for SCs to penetrate the BM endothelium and leave to the peripheral circulation⁵¹. Cell-surface proteolytic enzymes have also been regulated by 17 β E in our model. The expression of MMP14, better known as membrane type 1 MMP (MT1-MMP), was increased in c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs under 17 β E treatment. Preliminary results demonstrate that MT1-MMP expressed by human CD34⁺ progenitor cells, is activated by SDF-1 and G-CSF, and is needed for SDF-1-induced migration and homing^{52,53}. The expression of MT1-MMP by MSCs is also important as it was shown to be up-regulated under hypoxic conditions and to promote their migration and capillary-tube formation⁵⁴.

Taken together, this study demonstrates an active physiological role for estrogen in regulating the functional organization of the BM SC niche, a role that has never been described before. By looking at the biological processes involved in estrogen action and further down to specific regulated genes, we were able to define that under estrogen treatment, c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs acquire a gene expression profile that favors a more alert response to physiological or pharmacological challenges. As stated earlier, the future of cardiac repair and, maybe more importantly, the future of cardioprotection may lie in cell free-treatments to enhance the function of endogenous SCs. The ability of estrogen to influence SC fate by modulating the functional organization of the SC niche demonstrated in this study is thus of major importance in cardiovascular research. Our

study also identifies specific BM molecular pathways by which estrogen most likely exerts its action on the functional organization of the SC niche. Since many of the molecular pathways involved in the functional organization of the SC niche are reiterated in the heart itself for repair mechanisms, the pathways, identified here to be regulated by estrogen in the BM, become of great significance for further studies. Whether this physiological ability of estrogen to influence the dynamism of the SC niche could be used in clinic certainly deserves to be investigated. Nevertheless, this study reiterates that estrogen benefits on cardiovascular health are more multifaceted than ever and could involve other BM derived cells than EPCs.

2.2.7. Acknowledgments

We gratefully thank Nathalie Henley from Maisonneuve-Rosemont Hospital for helping us with flow cytometry cell sorting, Maya Mamarbachi from the molecular biological service of the Montreal Heart Institute for Q-PCR training and finally Mariève Cossette and Anna Nozza from the Montreal Heart Institute Coordinating Center for the statistical analyses. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; 159684) and from the Heart and Stroke Foundation of Quebec to Dr. Tanguay. Dr. Tanguay is recipient of a scholarship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). None of the authors has competing financial interests to declare.

2.2.8. References

1. Forman D, Bulwer BE. Cardiovascular disease: optimal approaches to risk factor modification of diet and lifestyle. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2006;8:47-57.
2. Wang X, Hisha H, Taketani S, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells*. 2006;24:482-493.
3. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003;34:565-571.
4. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006;107:1878-1887.
5. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:93-106.
6. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003;107:3059-3065.
7. Iwakura A, Luedemann C, Shastry S, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003;108:3115-3121.
8. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006;113:1605-1614.

9. Hamada H, Kim MK, Iwakura A, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:2261-2270.
10. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005;23:1699-1706.
11. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9:702-712.
12. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 1997;124:2039-2048.
13. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*. 1998;125:1747-1757.
14. Fazel S, Cimini M, Chen L, et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest*. 2006;116:1865-1877.
15. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL. Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:3760-3764.
16. Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109:625-637.
17. Heissig B, Werb Z, Rafii S, Hattori K. Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost*. 2003;90:570-576.

18. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*. 2006;24:928-935.
19. Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments. New-York: John Wiley & Sons; 1986.
20. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4:7-25.
21. Li L, Milner LA, Deng Y, et al. The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity*. 1998;8:43-55.
22. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*. 2000;6:1278-1281.
23. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. 2002;417:954-958.
24. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779.
25. Bautz F, Rafii S, Kanz L, Mohle R. Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol*. 2000;28:700-706.
26. Cazes A, Galaup A, Chomel C, et al. Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ Res*. 2006;99:1207-1215.
27. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118:149-161.
28. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev*. 1993;7:1559-1571.

29. Roussel MF, Theodoras AM, Pagano M, Sherr CJ. Rescue of defective mitogenic signaling by D-type cyclins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6837-6841.
30. Opitz OG, Suliman Y, Hahn WC, Harada H, Blum HE, Rustgi AK. Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest*. 2001;108:725-732.
31. Sasaki Y, Jensen CT, Karlsson S, Jacobsen SE. Enforced expression of cyclin D2 enhances the proliferative potential of myeloid progenitors, accelerates in vivo myeloid reconstitution, and promotes rescue of mice from lethal myeloablation. *Blood*. 2004;104:986-992.
32. Kovacs CJ, Kerr JA, Daly BM, Evans MJ, Johnke RM. Interleukin 1 alpha (IL-1) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) accelerate recovery from multiple drug-induced myelosuppression. *Anticancer Res*. 1998;18:1805-1812.
33. Lebedev VG, Moroz BB, Deshevoi Iu B, Lyrshchikova AV. [Role of hematopoietic microenvironment in the mechanism of radioprotective action of interleukin-1 beta in long-term bone marrow cultures]. *Radiats Biol Radioecol*. 2004;44:170-175.
34. Xiong Y, Donovan KA, Kline MP, et al. Identification of two groups of smoldering multiple myeloma patients who are either high or low producers of interleukin-1. *J Interferon Cytokine Res*. 2006;26:83-95.
35. Miura N, Okada S, Zsebo KM, Miura Y, Suda T. Rat stem cell factor and IL-6 preferentially support the proliferation of c-kit-positive murine hemopoietic cells rather than their differentiation. *Exp Hematol*. 1993;21:143-149.
36. Jenkins BJ, Roberts AW, Najdovska M, Grail D, Ernst M. The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2005;105:3512-3520.
37. Rappold I, Watt SM, Kusadasi N, Rose-John S, Hatzfeld J, Ploemacher RE. Gp130-signaling synergizes with FL and TPO for the long-term expansion of cord blood progenitors. *Leukemia*. 1999;13:2036-2048.

38. Kang YJ, Yang SJ, Park G, et al. A novel function of interleukin-10 promoting self-renewal of hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2007;25:1814-1822.
39. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183:2593-2603.
40. Subramaniam SV, Pearson LL, Adunyah SE. Interleukin-17 induces rapid tyrosine phosphorylation and activation of raf-1 kinase in human monocytic progenitor cell line U937. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259:172-177.
41. Jovicic G, Bugarski D, Petakov M, et al. In vivo effects of interleukin-17 on haematopoietic cells and cytokine release in normal mice. *Cell Prolif*. 2004;37:401-412.
42. Broxmeyer HE, Starnes T, Ramsey H, et al. The IL-17 cytokine family members are inhibitors of human hematopoietic progenitor proliferation. *Blood*. 2006;108:770.
43. Keller JR, Sing GK, Ellingsworth LR, Ruscetti SK, Ruscetti FW. Two forms of transforming growth factor-beta are equally potent selective growth inhibitors of early murine hematopoiesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;593:172-180.
44. Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, et al. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*. 2004;18:2747-2763.
45. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*. 2004;103:1580-1585.
46. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425:836-841.
47. Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol*. 2006;34:967-975.

48. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104:2643-2645.
49. Bhakta S, Hong P, Koc O. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. *Cardiovasc Resusc Med*. 2006;7:19-24.
50. Mohle R, Kanz L. Hematopoietic growth factors for hematopoietic stem cell mobilization and expansion. *Semin Hematol*. 2007;44:193-202.
51. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001;276:43503-43508.
52. Avigdor A, Schwartz S, Goichberg P, et al. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is directly involved in G-CSF induced human hematopoietic stem and progenitor cell mobilization [abstract]. *Blood*. 2004;104.
53. Shirvaikar N, Montano J, Turner A, Ratajczak M, Janowska-Wieczorek A. Upregulation of MT1-MMP expression by hyaluronic acid enhances homing-related responses of hematopoietic CD34(+) cells to an SDF-1 gradient [abstract]. *Blood*. 2004;104.
54. Annabi B, Lee YT, Turcotte S, et al. Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*. 2003;21:337-347.

2.2.9. Tables

2.2.9.1. Table I. Primer pairs designed for Q-PCR

Gene Symbol	Forward Primer	Reverse Primer
Angptl4	5'GACTGCCAGGAACTCTTCCA3'	5'ATCACTGTCCAGCCTCCATC3'
Cryl1	5'GGACCGCATTGTGGATGACC3'	5'TCACTGATGACGGCGTACTG3'
Cxcr4	5'TGGAACCGATCAGTGTGAGT3'	5'ACTTGTCCGTCATGCTCCTT3'
Esr1	5'TCTGACAATCGACGCCAGAA3'	5'TAACACTTGCGCAGCCGACA3'
Gem	5'GACAGCGACTGTGAGGTCTT3'	5'GCTTGCACGGTCTGTGATAG3'
Hspa1a	5'ACATCGACGCCAAGGGCATC3'	5'CTCCACGGCGCTCTTCATGT3'
Il1b	5'TCATTGTGGCTGTGGAGAAG3'	5'TGTTTCATCTCGGAGCCTGTA3'
Il6	5'AAGCCAGAGTCCTTCAGAGA3'	5'TGGTCCTTAGCCACTCCTTC3'
Il12b	5'GAGAACTACAGCACCAGCTT3'	5'TTCCTTGCGCTGGATTTCGAAC3'
Tlr2	5'CGCTGGAGGTGTTGGATGTT3'	5'AGAGCTGGCGTCTCCATACT3'
CypA	5'CCGATGACGAGCCCTTGG3'	5'GCCGCCAGTGCCATTATG3'

2.2.9.2. Table II. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in c-kit⁺ SCs (> 1.5 fold; *P* value < 0.05)

Gene Title	Gene Symbol	Representative Public ID	Variation Ratio	<i>P</i> Value
<i>I) Up-regulated (> 1.5 fold)</i>				
adenosine A2b receptor	Adora2b	BB709140	1.90	0.0140
arginase type II	Arg2	NM_009705	2.01	0.0056
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	Arhgef3	BC012262	1.60	0.0429
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bcl2l11	AF032460	1.56	0.0223
baculoviral IAP repeat-containing 2	Birc2	NM_007464	1.57	0.0185
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Casp4	NM_007609	1.63	0.0258
cyclin D2	Cend2	AV310588	1.57	0.0130
CD69 antigen	Cd69	AK017979	2.25	0.0200
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Cebpb	NM_009883	1.71	0.0434
C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 9	Clecsf9	NM_019948	1.77	0.0256
colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csf2	X03019	1.82	0.0199

chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2	BM251152	1.55	0.0172
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	NM_008176	1.67	0.0205
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	NM_021274	2.95	0.0162
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	D87747	1.50	0.0403
decay accelerating factor 1	Daf1	BE686894	1.81	0.0379
dual specificity phosphatase 4	Dusp4	AK012530	1.70	0.0160
EH-domain containing 1	Ehd1	NM_010119	2.11	0.0118
formyl peptide receptor 1	Fpr1	NM_013521	2.13	0.0093
formyl peptide receptor-like 1	Fprl1	NM_008039	2.11	0.0053
interferon, alpha-inducible protein	Glp2	AK019325	2.12	0.0177
G protein-coupled receptor 18	Gpr18	BG145550	1.79	0.0431
G protein-coupled receptor 85	Gpr85	BC026975	1.96	0.0081
histocompatibility 2, Q region locus 7	H2-Q7	M29881	1.86	0.0356
heat shock protein 1A	Hspa1a	M12573	1.57	0.0033
intercellular adhesion molecule	Icam1	BC008626	1.72	0.0004
interferon activated gene 205	Ifi205	A1481797	1.52	0.0201
interferon beta, fibroblast	Ifnb	NM_010510	1.84	0.0099
interleukin 10	Il10	NM_010548	2.30	0.1246

interleukin 12b	Il12b	AF128214	4.98	0.0088
interleukin 17 receptor	Il17r	AK010040	1.59	0.1181
interleukin 1 alpha	Il1a	BC003727	2.14	0.0375
interleukin 1 beta	Il1b	BC011437	2.21	0.0543
interleukin 23, alpha subunit p19	Il23a	NM_031252	2.11	0.0367
interleukin 6	Il6	NM_031168	6.34	0.0251
integrin alpha 4	Itga4	BB284583	1.50	0.1999
jagged 1	Jag1	AV359819	1.86	0.0023
Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	Klf7	BB524597	1.57	0.0299
leukemia inhibitory factor	Lif	AF065917	1.65	0.0261
ligase III, DNA, ATP-dependent	Lig3	AW123157	1.73	0.0116
Max dimerization protein	Mad	AV228517	1.66	0.0025
Mediterranean fever	Mefv	NM_019453	2.23	0.0113
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	NM_008608	1.64	0.0353
myosin, light polypeptide 9, regulatory	Myl9	AK007972	1.60	0.0383
necdin	Ndn	AW743020	1.52	0.0371
nuclear factor of activated T-cells 5	Nfat5	BB488160	1.54	0.0143
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B- cells inhibitor, epsilon	Nfkbie	AK011965	2.23	0.0268

nuclear protein 1	Nuprl	NM_019738	1.90	0.0118
programmed cell death 1 ligand 1	Pdcd1lg1	NM_021893	1.83	0.0274
phosphodiesterase 4B, cAMP specific	Pde4b	BM246564	1.89	0.0060
proviral integration site 3	Pim3	BB206220	1.76	0.0188
PR domain containing 1, with ZNF domain	Prdm1	NM_007548	1.68	0.0090
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	M94967	2.63	0.0007
RAB20, member RAS oncogene family	Rab20	BG066967	1.82	0.0347
reticuloendotheliosis oncogene	Rel	NM_009044	1.81	0.0208
SKI-like	Skil	U36203	1.55	0.0141
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	Slc11a2	BG065264	1.52	0.0256
solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	Slc13a3	BB497312	2.22	0.0200
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	Slc2a6	BB196807	2.14	0.0008
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	Slc7a11	NM_011990	2.23	0.0116
sorting nexin associated golgi protein 1	Snagl	AV344473	1.55	0.0402
serum-inducible kinase	Snk	BM234765	1.65	0.0440

suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	NM_007707	2.21	0.0051
spermatogenesis associated 13	Spata13	AV271736	1.54	0.0076
transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	BC016492	1.97	0.0237
thrombospondin 1	Thbs1	AI385532	1.69	0.0309
toll-like receptor 2	Tlr2	NM_011905	1.52	0.0197
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2	NM_009396	1.65	0.0300
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	Tnfrsf5	BB220422	2.66	0.0025
Tnf receptor-associated factor 1	Traf1	BG064103	2.22	0.0134
tripartite motif protein 13	Trim13	NM_023233	1.76	0.0125
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	BB250384	1.77	0.1554
vascular endothelial growth factor A	Vegfa	NM_009505	1.75	0.1196

II) Down-regulated (> 1.5 fold)

angiopoietin-like 4	Angptl4	NM_020581	0.65	0.0258
chloride channel 3	Clcn3	BB328803	0.63	0.0033
frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	Frat2	BB353860	0.55	0.0225
high mobility group AT-hook 2	Hmga2	AV377334	0.44	0.0070
phosphatase and tensin homolog	Pten	BB030030	0.67	0.0102
RB-associated KRAB repressor	Rbak	BB446066	0.62	0.0243

S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	Skp2	BC003468	0.51	0.0032
thioredoxin interacting protein	Txnip	AF173681	0.55	0.0322
zinc finger protein 472	Zfp472	BC023090	0.51	0.0212
KRAB-zinc finger protein 62	Zfp62	BM230481	0.66	0.0184

Values are variation ratios, n = 3

2.2.9.3. Table III. Highly represented Gene Ontology biological processes involved in 17 β E action in c-kit⁺ SCs

Category	Genes in Category (%)	Cummulative 17 β E Action (%)
Regulation of transcription, DNA-dependent	7%	7%
Immune response	5%	13%
Regulation of cell cycle	3%	15%
Transport	3%	18%
Inflammatory response	3%	21%
Signal transduction	3%	24%
Proteolysis and peptidolysis	2%	26%
Apoptosis	2%	29%
Intracellular signaling cascade	2%	31%
Cell growth and or maintenance	2%	33%
Defense response	2%	35%
Cell adhesion	2%	36%
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	2%	38%
Cell proliferation	2%	40%
Chemotaxis	2%	42%
Protein amino acid phosphorylation	1%	43%

Protein transport	1%	44%
Cell surface receptor linked signal transduction	1%	45%
Development	1%	46%
Cell differentiation	1%	47%
Nuclear mRNA splicing, via spliceosome	1%	48%
mRNA processing	1%	49%
Protein biosynthesis	1%	50%

2.2.9.4. Table IV. Highly represented Gene Ontology biological processes involved in 17 β E action in CD44+ StroCs

Category	Genes in Category(%)	Cumulative 17βE Action (%)
Regulation of transcription, DNA-dependent	6%	6%
Immune response	4%	10%
Signal transduction	3%	14%
Transport	3%	16%
Intracellular signaling cascade	3%	19%
Development	3%	22%
Regulation of cell cycle	3%	24%
Apoptosis	3%	27%
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	3%	29%
Cell growth and or maintenance	2%	31%
Cell adhesion	2%	34%
Protein amino acid phosphorylation	2%	36%
Inflammatory response	2%	38%
Proteolysis and peptidolysis	2%	40%
Chemotaxis	1%	41%
Cell proliferation	1%	42%

Cell differentiation	1%	44%
Defense response	1%	45%
Protein amino acid dephosphorylation	1%	46%
Cell surface receptor linked signal transduction	1%	47%
Small GTPase mediated signal transduction	1%	48%
Protein transport	1%	49%
Ubiquitin cycle	1%	50%
Intracellular protein transport	1%	50%

2.2.10. Figure legends

2.2.10.1. Figure 1: Percentage of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs in the whole BM culture system under 17 β E treatment.

Percentage (%) of c-kit⁺ SCs (A) and CD44⁺ StroCs (B) was quantified by flow cytometry after a 1 week culture period in incomplete medium alone (INC), in incomplete medium with 17 β E treatment at different concentration (10^{-10} to 10^{-7} M) or in complete medium (COMP). Data are mean \pm SEM, n = 3 experiments, * $P < 0.05$ compared with incomplete medium alone.

2.2.10.2. Figure 2: Expression profiles of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs under 17 β E treatment versus untreated cells.

Gene expression profiles of c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs of untreated or 17 β E treated cells (10^{-9} M; 1 week) were obtained by microarray analysis. Normalized microarray data are represented in (A) for both c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs (n = 3). All the 34,000 gene probes are represented in plots. The green dots represent gene probes which expression has been modulated > 1.5 fold by 17 β E treatment and the central line represents equality in gene expression between 17 β E treated and untreated cells. The comparison of genes modulated by 17 β E treatment in both c-kit⁺ SCs and CD44⁺ StroCs is presented in (B). The number of genes associated to biological processes, according to the Gene Ontology classification, and modulated > 1.5 fold by 17 β E treatment is indicated. The segregation of genes with regards to up-regulation and down-regulation is provided.

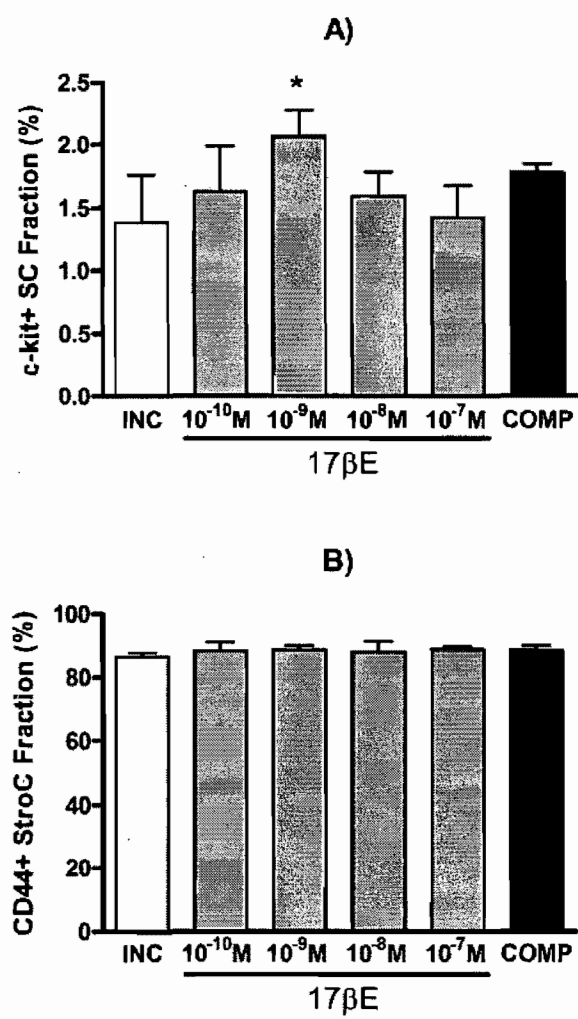
2.2.10.3. Figure 3: Correlation between microarray and Q-PCR variation ratio.

Correlations of microarray variation ratios with ratios obtained by Q-PCR in c-kit⁺ SCs (A) and CD44⁺ StroCs (B) are represented. The intraclass correlation coefficient for each cell type is indicated. A strong positive relationship between microarray and Q-PCR variation ratios was revealed (dashed line). The central line represents equality. Data are mean variation ratios, n =10 genes.

2.2.11. Figures

2.2.11.1. Figure 1

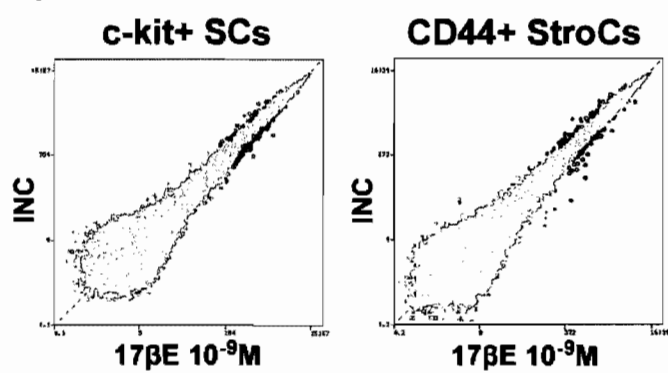
Figure 1



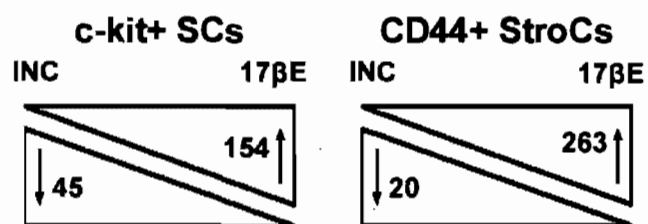
2.2.11.2. Figure 2

Figure 2

A)

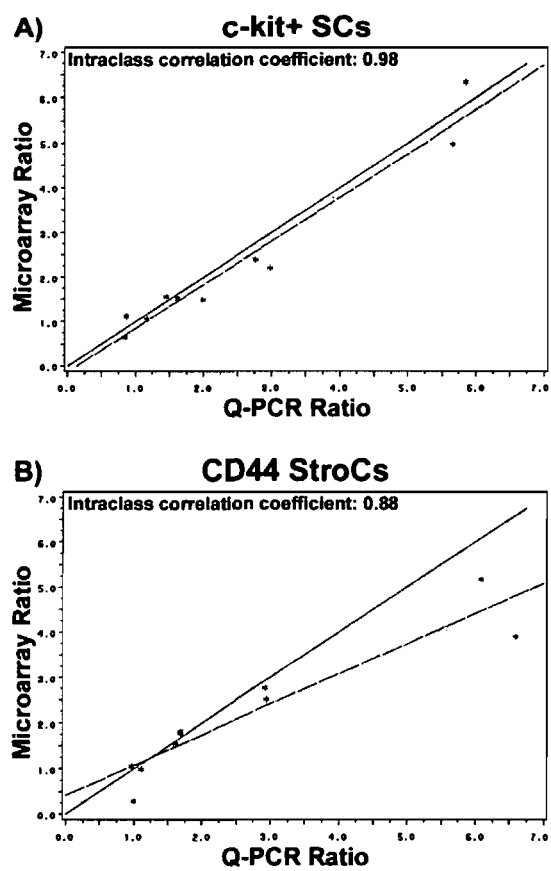


B)



2.2.11.3. Figure 3

Figure 3)



2.2.12. Supplemental data

2.2.12.1. Table SI. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in CD44+ StroCs (> 1.5 fold; *P* value < 0.05)

Gene Title	Gene Symbol	Representative Public ID	Variation Ratio	<i>P</i> Value
<i>I) Up-regulated (> 1.5 fold)</i>				
a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	Adamts4	BB443585	1.71	0.0315
adenosine A2b receptor	Adora2b	BB709140	1.61	0.0094
adaptor protein with pleckstrin homology and src	Aps	NM_018825	1.51	0.0051
arginase type II	Arg2	NM_009705	1.81	0.0358
Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	Arhgef3	BC012262	1.78	0.0409
AXIN1 up-regulated 1	Axud1	BG070296	2.23	0.0433
B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	Bcl2a1a	L16462	1.78	0.0416
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bcl2l11	AF032460	1.75	0.0072
B-cell leukemia/lymphoma 3	Bcl3	NM_033601	1.52	0.0220
bicaudal C homolog 1 (Drosophila)	Bicc1	AV260198	1.96	0.0132

baculoviral IAP repeat-containing 2	Birc2	NM_007464	1.81	0.0050
Braf transforming gene	Braf	BB141769	1.56	0.0430
B-cell stimulating factor 3	Bsf3	BB825816	1.62	0.0455
basic transcription element binding protein 1	Bteb1	AV354744	1.54	0.0419
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	Camk2d	BG074866	1.51	0.0244
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	Casp4	NM_007609	2.00	0.0160
chemokine (C-C motif) ligand 3	Ccl3	NM_011337	1.64	0.0437
chemokine (C-C motif) receptor-like 2	Ccr12	AJ318863	2.09	0.0491
CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	Ccrn4l	AF199491	2.12	0.0491
CD38 antigen	Cd38	BB256012	1.96	0.0295
CD69 antigen	Cd69	AK017979	2.33	0.0219
CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4	Cdc42ep4	NM_020006	1.89	0.0110
cadherin 2	Cdh2	BC022107	1.80	0.0455
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Cebpb	NM_009883	1.67	0.0430
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	BE284491	2.48	0.0163
C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain)	Clecsf9	NM_019948	1.71	0.0067

lectin, superfamily member 9				
carboxypeptidase E	Cpe	BC010197	1.53	0.0193
colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csf2	X03019	1.56	0.0145
colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	Csf3r	NM_007782	1.52	0.0105
chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2	BM251152	1.63	0.0288
cysteine and glycine-rich protein 2	Csrp2	NM_007792	1.71	0.0052
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Cxcl10	NM_021274	2.98	0.0223
chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Cxcr4	D87747	1.54	0.1456
decay accelerating factor 1	Daf1	NM_010016	1.87	0.0130
discoidin domain receptor family, member 1	Ddr1	AI874681	1.99	0.0019
deleted in liver cancer 1	Dlc1	BB768194	1.78	0.0338
dentin matrix protein 1	Dmp1	AV020965	2.17	0.0152
dual specificity phosphatase 4	Dusp4	AK012530	2.25	0.0175
endothelin receptor type B	Ednrb	BB451714	1.67	0.0217
EH-domain containing 1	Ehd1	NM_010119	1.63	0.0059
EH-domain containing 2	Ehd2	AV245241	1.54	0.0036
enabled homolog (Drosophila)	Enah	BQ044016	1.61	0.0175
ErbB2 interacting protein	ErbB2ip	BM240030	1.66	0.0286

E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain	Ets2	BC005486	1.88	0.0224
coagulation factor X	F10	NM_007972	1.87	0.0098
fatty acid binding protein 4, adipocyte	Fabp4	NM_024406	1.67	0.0311
fat tumor suppressor homolog (Drosophila)	Fath	AV088463	1.58	0.0059
forkhead box N2	Foxn2	AV295543	1.59	0.0361
formyl peptide receptor 1	Fpr1	NM_013521	2.20	0.0052
formyl peptide receptor-like 1	Fprl1	NM_008039	2.28	0.0133
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b	AK010420	2.21	0.0160
guanylate nucleotide binding protein 2	Gbp2	NM_010260	1.71	0.0017
GTP cyclohydrolase 1	Gch	NM_008102	1.62	0.0080
growth differentiation factor 15	Gdf15	NM_011819	1.66	0.0426
G protein-coupled receptor 18	Gpr18	BG145550	1.96	0.0283
G protein-coupled receptor 84	Gpr84	NM_030720	1.64	0.0054
G protein-coupled receptor 85	Gpr85	BC026975	2.11	0.0178
histocompatibility 2, complement component factor B	H2-Bf	NM_008198	1.73	0.0423
histocompatibility 2, Q region locus 7	H2-Q7	M29881	2.16	0.0248
intercellular adhesion molecule	Icam1	BC008626	2.06	0.0148

interferon beta, fibroblast	Ifnb	NM_010510	1.63	0.0097
interferon-related developmental regulator 1	Ifrd1	NM_013562	2.01	0.0398
insulin-like growth factor binding protein 7	Igfbp7	AI481026	1.59	0.0194
inhibitor of kappaB kinase epsilon	Ikbke	NM_019777	1.50	0.0252
interleukin 10	Il10	NM_010548	1.87	0.0621
interleukin 12b	Il12b	AF128214	5.17	0.0006
interleukin 17 receptor	Il17r	AK010040	1.93	0.0712
interleukin 1 alpha	Il1a	BC003727	2.04	0.0041
interleukin 1 beta	Il1b	BC011437	2.51	0.0188
interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	M57525	2.11	0.0306
interleukin 4 induced 1	Il4i1	NM_010215	2.07	0.0277
interleukin 6	Il6	NM_031168	3.91	0.0052
jagged 1	Jag1	AA880220	1.74	0.0612
lipocalin 2	Lcn2	X14607	1.58	0.0349
leukemia inhibitory factor	Lif	AF065917	1.80	0.0023
Max dimerization protein	Mad	AV228517	1.73	0.0324
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	Maff	BC022952	2.67	0.0469
mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	Malt1	BM239348	2.80	0.0067

macrophage receptor with collagenous structure	Marco	AI323439	1.59	0.0381
Mediterranean fever	Mefv	NM_019453	2.59	0.0125
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	Mmp14	NM_008608	1.62	0.0233
myeloid differentiation primary response gene 116	Myd116	NM_008654	1.62	0.0355
myosin, light polypeptide kinase	Mylk	BF451748	1.59	0.0055
myosin IB	Myo1b	AA406997	1.56	0.0259
needin	Ndn	NM_010882	1.58	0.0155
nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	NM_010907	1.65	0.0466
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	Nfkbie	AK011965	2.40	0.0160
neuropilin 2	Nrp2	AW743726	2.12	0.0091
nuclear protein 1	Nupr1	NM_019738	1.89	0.0022
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	AB067533	1.63	0.0100
programmed cell death 1 ligand 1	Pdcd1lg1	NM_021893	2.13	0.0025
phosphodiesterase 4B, cAMP specific	Pde4b	BM246564	1.88	0.0029
platelet derived growth factor, B polypeptide	Pdgfb	BC023427	1.57	0.0277
platelet derived growth factor	Pdgfrb	AA499047	1.74	0.0455

receptor, beta polypeptide				
proviral integration site 3	Pim3	BB206220	1.78	0.0113
pleiomorphic adenoma gene-like 2	Plagl2	NM_018807	1.60	0.0310
pleckstrin	Plek	AF181829	1.64	0.0359
procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	Plod2	BC021352	1.82	0.0305
PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	Ppfibp1	AW550306	1.58	0.0035
PR domain containing 1, with ZNF domain	Prdm1	NM_007548	2.29	0.0303
prostaglandin E synthase	Ptges	BB730139	1.58	0.0463
prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	M94967	2.55	0.0115
protein tyrosine phosphatase, receptor type, J	Ptpnj	D83204	1.58	0.0170
ral guanine nucleotide dissociation stimulator	Ralgds	NM_009058	1.79	0.0309
reticuloendotheliosis oncogene	Rel	NM_009044	1.86	0.0137
avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	Relb	NM_009046	1.87	0.0022
receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 2	Ripk2	NM_138952	1.52	0.0004
ring finger protein (C3HC4 type) 19	Rnf19	AF120206	1.69	0.0113
related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	Rras2	NM_025846	1.53	0.0098

serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 2	Serpine2	NM_009255	1.82	0.0345
sialyltransferase 7 ((alpha-N-acetylneuraminy 2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetyl galactosaminde alpha-2,6-sialyltransferase) B	Siat7b	BM502805	1.55	0.0323
SKI-like	Skil	U36203	1.57	0.0082
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	Slc11a2	BF019859	1.53	0.0296
solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	Slc13a3	BB497312	2.10	0.0460
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6	Slc2a6	BB196807	1.84	0.0107
solute carrier family 31, member 2	Slc31a2	NM_025286	1.64	0.0242
solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 11	Slc7a11	NM_011990	1.79	0.0442
stannin	Snn	AK012171	1.52	0.0410
suppressor of cytokine signaling 3	Socs3	NM_007707	1.55	0.0258
superoxide dismutase 2, mitochondrial	Sod2	NM_013671	1.54	0.0161
spermatogenesis associated 13	Spata13	AW546433	1.57	0.0093
Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	Spic	NM_011461	2.30	0.0200

sequestosome 1	Sqstm1	BM232298	1.53	0.0052
syntaxin 11	Stx11	AK017897	1.98	0.0135
synaptopodin	Synpo	BB426294	1.51	0.0155
transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	Tgfb14	AU016382	1.52	0.0080
transforming growth factor, beta 2	Tgfb2	BF144658	1.80	0.0477
transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	BC016492	2.05	0.0250
thrombospondin 1	Thbs1	AI385532	1.81	0.0325
tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	BH11620	1.53	0.0433
toll-like receptor 2	Tlr2	NM_011905	1.78	0.0129
tenascin C	Tnc	NM_011607	1.58	0.0007
tumor necrosis factor	Tnf	NM_013693	1.60	0.0422
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	Tnfaip2	NM_009396	2.10	0.0159
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	Tnfaip3	BM241351	1.62	0.0374
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	Tnfrsf5	BB220422	2.55	0.0075
Tnf receptor-associated factor 1	Trafi1	BG064103	2.21	0.0016
three prime repair exonuclease 1	Trex1	NM_011637	1.56	0.0109
tripartite motif protein 13	Trim13	NM_023233	1.80	0.0358
thioredoxin reductase 1	Txnrd1	AV377065	1.86	0.0043

vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	BB250384	2.18	0.0443
zinc finger protein 263	Zfp263	AI326880	2.17	0.0337
<i>II) Down-regulated (≥ 1.5 fold)</i>				
adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	Ap2a2	AK009735	0.66	0.0288
high mobility group AT-hook 2	Hmga2	AV377334	0.58	0.0094
homeo box A1	Hoxa1	NM_010449	0.53	0.0372
HIV-1 Rev binding protein-like	Hrbl	BC003330	0.56	0.0122
purinergic receptor (family A group 5)	P2y5	AK008952	0.62	0.0379
regulator of G-protein signaling 2	Rgs2	AF215668	0.59	0.0165
regulator of sex-limitation candidate 1	Rslcan1	AW107826	0.53	0.0112
zinc finger protein 472	Zfp472	BC023090	0.49	0.0375
KRAB-zinc finger protein 62	Zfp62	BM230481	0.63	0.0254

Values are variation ratios, n = 3

2.2.12.2. Table SII. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in c-kit⁺ SCs (> 1.5 fold; *P* value > 0.05)

Gene Title	Gene Symbol	Representative Public ID	Variation Ratio	<i>P</i> Value
<i>I) Up-regulated (> 1.5 fold)</i>				
adaptor protein with pleckstrin homology and src	Aps	NM_018825	1.60	0.0615
AXIN1 up-regulated 1	Axud1	BG070296	2.08	0.0622
beta-2 microglobulin	B2m	AA170322	1.55	0.2575
B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	Bcl2a1a	L16462	1.50	0.0875
B-cell leukemia/lymphoma 3	Bcl3	NM_033601	1.60	0.0902
B-cell stimulating factor 3	Bsf3	BB825816	1.56	0.1696
B-cell translocation gene 2, anti- proliferative	Btg2	NM_007570	1.50	0.4444
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	C1qa	NM_007572	1.66	0.4046
complement component 3	C3	K02782	1.55	0.0732
caveolin, caveolae protein	Cav	AB029929	1.76	0.0552
chemokine (C-C motif) ligand 4	Ccl4	AF128218	1.64	0.2321
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	NM_013653	1.77	0.1316
chemokine (C-C motif) receptor- like 2	Ccr12	AJ318863	1.68	0.1543
CCR4 carbon catabolite repression 4-like (<i>S. cerevisiae</i>)	Ccrn4l	AF199491	1.69	0.1163
CD38 antigen	Cd38	BB256012	1.60	0.0913

CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	BE284491	1.53	0.1870
calponin 3, acidic	Cnn3	AV172168	1.52	0.1955
carboxypeptidase A3, mast cell	Cpa3	NM_007753	1.72	0.4635
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	Cxcl9	NM_008599	1.94	0.1187
diaphanous homolog 3 (Drosophila)	Diap3	NM_019670	1.59	0.1332
dual specificity phosphatase 2	Dusp2	L11330	2.15	0.1194
early growth response 1	Egr1	NM_007913	1.55	0.0880
early growth response 2	Egr2	X06746	1.53	0.0795
early growth response 3	Egr3	AV346607	1.63	0.3815
coagulation factor X	F10	NM_007972	1.64	0.1188
fatty acid binding protein 4, adipocyte	Fabp4	NM_024406	1.59	0.0732
FBJ osteosarcoma oncogene B	Fosb	NM_008036	2.30	0.1193
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45a	NM_007836	1.54	0.1449
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b	AK010420	1.97	0.0683
guanylate nucleotide binding protein 2	Gbp2	NM_010260	1.58	0.0852
GTP cyclohydrolase 1	Gch	NM_008102	1.63	0.0556
growth differentiation factor 15	Gdf15	NM_011819	1.63	0.1985
GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	Gem	U10551	2.39	0.1376
G protein-coupled receptor 68	Gpr68	BB538372	1.51	0.0690
G protein-coupled receptor 84	Gpr84	NM_030720	1.65	0.0600

G1 to phase transition 1	Gspt1	BB162021	1.84	0.0632
histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	AV018723	1.51	0.0726
histocompatibility 2, complement component factor B	H2-Bf	NM_008198	1.61	0.0992
inhibitor of DNA binding 3	Idb3	NM_008321	1.55	0.1117
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Ifit1	NM_008331	2.27	0.1818
interferon-related developmental regulator 1	Ifrd1	NM_013562	1.57	0.0929
interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	M57525	1.68	0.0703
insulin induced gene 1	Insigl	BB005488	1.76	0.1275
interferon regulatory factor 7	Irf7	NM_016850	1.81	0.2332
Janus kinase 1	Jak1	BQ032637	1.59	0.6806
Jun-B oncogene	Junb	NM_008416	1.95	0.1565
Jun dimerization protein 2	Jundm2	NM_030887	1.73	0.1446
kappa B and Rss recognition component	Krc	BB164127	1.57	0.0954
lipocalin 2	Lcn2	X14607	1.69	0.1537
lymphocyte antigen 9	Ly9	NM_008534	1.60	0.2319
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	Maff	BC022952	1.85	0.0748
mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1	Malt1	BM239348	2.56	0.0937
macrophage receptor with collagenous structure	Marco	AI323439	2.06	0.2799
myeloid differentiation primary response gene 116	Myd116	NM_008654	2.37	0.0898

non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1	Nck1	BB296097	1.52	0.1213
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	NM_010444	1.87	0.1797
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	Nr4a2	BB703394	1.79	0.2004
neuropilin 2	Nrp2	AW743726	1.69	0.2500
2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	Oasl1	AB067533	1.84	0.0626
oxysterol binding protein-like 3	Osbp13	AI875442	1.54	0.0783
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	Pdgfrb	AA499047	1.69	0.4358
protease, serine, 11 (lgf binding)	Prss11	NM_019564	1.66	0.0687
RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	Rabgef1	BB280137	1.71	0.1952
ral guanine nucleotide dissociation stimulator	Ralgds	NM_009058	1.75	0.1373
avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	Relb	NM_009046	1.64	0.1293
ring finger protein (C3HC4 type) 19	Rnf19	AF120206	1.51	0.2477
serum amyloid A 3	Saa3	NM_011315	1.75	0.1493
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C	Sema4c	BQ032843	1.54	0.3295
sperm associated antigen 9	Spag9	AV279478	1.80	0.2554
Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	Spic	NM_011461	2.07	0.0512
serine protease inhibitor, Kunitz type 2	Spint2	AV058358	1.82	0.0912
sequestosome 1	Sqstm1	AW741388	1.62	0.1217

signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	AW214029	1.53	0.0975
syntaxin 11	Stx11	AK017897	1.65	0.0735
thrombospondin 2	Thbs2	NM_011581	1.67	0.0774
tumor necrosis factor	Tnf	NM_013693	1.55	0.0775
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	Tnfsf9	NM_009404	1.99	0.0634
three prime repair exonuclease 1	Trex1	NM_011637	1.57	0.1198
thioredoxin reductase 1	Txnrd1	AV377065	1.60	0.1113
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor (U2AF) 1	U2af1	NM_024187	1.57	0.1979
<i>II) Down-regulated (> 1.5 fold)</i>				
A kinase (PRKA) anchor protein 10	Akap10	BB314595	0.62	0.0732
ankyrin repeat domain 10	Ankrd10	BM293412	0.65	0.1382
adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	Ap2a2	AK009735	0.66	0.0706
adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	Ap2b1	AV271093	0.44	0.1831
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	Atp5c1	AI644507	0.63	0.0547
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	AI505544	0.57	0.2965
CEA-related cell adhesion molecule 1	Ceacam1	BC016891	0.58	0.0878
chemokine-like factor super family	Cklfsf7	BC026773	0.42	0.2704

7				
cryptochrome 2 (photolyase-like)	Cry2	BF303057	0.66	0.4269
disabled homolog 2 (Drosophila)	Dab2	AK017619	0.57	0.1728
dual specificity phosphatase 6	Dusp6	NM_026268	0.61	0.1283
epidermal growth factor receptor pathway substrate 15	Epsl5	AI649374	0.59	0.1345
FYVE, RhoGEF and PH domain containing 3	Fgd3	AK018025	0.57	0.3531
guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 3	Gdi3	BB364558	0.65	0.1913
germ cell-specific gene 2	Gsg2	BE457839	0.63	0.0854
homeo box A1	Hoxa1	NM_010449	0.61	0.0982
HIV-1 Rev binding protein-like	Hrb1	BC003330	0.61	0.0671
potassium channel tetramerisation domain containing 12b	Kctd12b	BB667457	0.65	0.0622
low density lipoprotein receptor-related protein 1	Lrp1	AV345706	0.45	0.2280
LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	Lsm1	BB372680	0.64	0.0702
meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	Mgea5	NM_023799	0.63	0.1554
POT1-like telomere end-binding protein (S. pombe)	Pot1	AV014607	0.65	0.4234
PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	Prpf4b	U48737	0.62	0.0668

purine rich element binding protein A	Pura	BE864772	0.63	0.4652
ring finger protein 130	Rnf130	BB295604	0.57	0.2608
Sin3-associated polypeptide 18	Sap18	BG073400	0.66	0.1948
Sec61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)	Sec61a2	NM_021305	0.61	0.1328
splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	Sfrs1	X66091	0.61	0.1488
solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 9	Slc12a9	BB668140	0.49	0.2976
striatin, calmodulin binding protein 3	Strn3	BB228907	0.61	0.3239
ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	Ube2v2	AV241588	0.64	0.3403
ubiquitin-like 5	Ubl5	AV210814	0.58	0.2800
Zinc finger protein 118	Zfp118	BB176857	0.66	0.5363
zinc finger protein 54	Zfp54	NM_011760	0.66	0.1100
zinc finger protein 61	Zfp61	NM_009561	0.61	0.1215

Values are variation ratios, n = 3

2.2.12.3. Table SIII. Genes I) up-regulated and II) down-regulated by 17 β E in CD44+ StroCs (> 1.5 fold; *P* value > 0.05)

Gene Title	Gene Symbol	Representative Public ID	Variation Ratio	<i>P</i> Value
<i>I) Up-regulated (> 1.5 fold)</i>				
acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	Acaa1	BB210491	1.55	0.1490
AE binding protein 2	Aebp2	BM242614	1.55	0.1134
1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta)	Agpat4	BE994529	1.66	0.1551
ariadne homolog 2 (Drosophila)	Arih2	BG066446	1.57	0.0634
ADP-ribosylation factor-like 8	Arl8	BB545273	1.84	0.0933
axotrophin	Axot	BB248730	1.52	0.1238
Bcl6 interacting corepressor	Bcor	AV318805	1.61	0.1162
basic helix-loop-helix domain containing, class B2	Bhlhb2	NM_011498	1.62	0.0627
B-cell linker	Blnk	AF068182	1.52	0.3075
complement component 3	C3	K02782	1.64	0.0725
chemokine (C-C motif) ligand 4	Ccl4	AF128218	1.67	0.0733
chemokine (C-C motif) ligand 5	Ccl5	NM_013653	1.82	0.0740
cyclin G2	Ccng2	U95826	1.67	0.1029

C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 10	Clecsf10	AF240358	1.71	0.0980
CDC-like kinase	Clk	U21209	1.85	0.0577
chemokine-like receptor 1	Cmklr1	AW228687	1.68	0.0853
procollagen, type III, alpha 1	Col3a1	AW550625	1.57	0.1364
core promoter element binding protein	Copeb	AF072403	1.59	0.1831
chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Cxcl1	NM_008176	1.84	0.0523
chemokine (C-X-C motif) ligand 5	Cxcl5	NM_009141	2.70	0.0961
cytochrome b-245, beta polypeptide	Cybb	NM_007807	1.58	0.1363
cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	Cyp1b1	BI251808	1.50	0.1503
dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	Dkk3	AK004853	1.57	0.1342
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	Dnaja3	BB530515	1.58	0.0679
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	Dnajb6	C87407	1.58	0.1439
dual specificity phosphatase 16	Dusp16	NM_130447	1.79	0.0684
dual specificity phosphatase 2	Dusp2	L11330	1.96	0.0540
endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	Edg3	AV238324	1.67	0.1264
early growth response 2	Egr2	X06746	1.53	0.0608

enolase 2, gamma neuronal	Eno2	NM_013509	1.59	0.2178
E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	Ets1	BB151715	1.56	0.2457
coagulation factor III	F3	BC024886	2.15	0.0984
FERM, RhoGEF (Arhgef) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	Farp1	BB097480	1.66	0.0968
F-box and leucine-rich repeat protein 3a	Fbxl3a	BF782863	1.56	0.1938
FBJ osteosarcoma oncogene B	Fosb	NM_008036	2.60	0.0586
fos-like antigen 2	Fosl2	BM245170	1.51	0.1377
FYN binding protein	Fyb	BE853428	1.70	0.0801
interferon, alpha-inducible protein	Glp2	AK019325	1.94	0.0536
growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45a	NM_007836	1.97	0.1257
guanylate nucleotide binding protein 3	Gbp3	NM_018734	2.07	0.0819
GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	Gem	U10551	2.76	0.0669
gap junction membrane channel protein alpha 1	Gja1	M63801	1.50	0.0572
guanine nucleotide binding protein, alpha 13	Gna13	BG073165	1.60	0.1483
gephyrin	Gphn	AK017831	1.57	0.1574
G1 to phase transition 1	Gspt1	BB162021	1.51	0.1059

histocompatibility 2, T region locus 24	H2-T24	L22338	1.78	0.1373
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	Hmgcr	BB123978	1.95	0.1802
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	Hmgcs1	BB705380	1.79	0.1901
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Hnrpa1	AK007802	1.59	0.2105
homeo box A9	Hoxa9	AA987181	1.66	0.2026
heat shock protein 1A	Hspa1a	M12573	1.82	0.0695
interferon activated gene 205	Ifi205	A1481797	1.68	0.0790
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	Ifit2	NM_008332	1.50	0.2562
immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	Igh-6	A1326478	1.61	0.2953
immunoglobulin joining chain	Igj	BC006026	1.69	0.4356
immunoglobulin kappa chain variable 8 (V8)	Igk-V8	BC013496	2.58	0.2977
interleukin 25	Il25	NM_080837	1.55	0.2462
insulin induced gene 1	Insig1	BB005488	1.87	0.1571
interleukin-1 receptor-associated kinase 2	Irak2	AV241470	1.63	0.1106
integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)	Itga5	A1481717	1.81	0.0547
kinesin family member 11	Kif11	BB827235	1.52	0.5426

Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	Klf7	BB524597	1.53	0.1628
karyopherin (importin) alpha 3	Kpna3	BM213828	1.54	0.2593
ligase III, DNA, ATP-dependent	Lig3	AW123157	1.88	0.1098
lysyl oxidase	Lox	M65143	1.62	0.0708
mitogen activated protein kinase kinase kinase 8	Map3k8	NM_007746	1.53	0.1227
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	Map4k4	BB113015	1.64	0.0540
myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Marcks	BB454540	1.55	0.1805
myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl1	BC003839	1.55	0.0729
matrix metalloproteinase 13	Mmp13	NM_008607	1.88	0.1169
non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1	Nck1	NM_010878	1.91	0.0532
neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	Nedd4	NM_010890	1.57	0.1469
nuclear, factor, erythroid derived 2, like 2	Nfe2l2	NM_010902	1.61	0.1391
nephroblastoma overexpressed gene	Nov	X96585	1.84	0.3714
nuclear receptor binding factor 1	Nrbf1	BB310008	1.67	0.1280
purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2	P2ry2	NM_008773	1.66	0.0545
p21 (CDKN1A)-activated kinase 3	Pak3	BQ175796	1.66	0.1201

PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	Pdzgef1	AK018008	1.67	0.0845
period homolog 1 (Drosophila)	Perl	AF022992	1.80	0.0991
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	Pfkfb3	NM_133232	1.69	0.2072
proviral integration site 1	Pim1	A1323550	1.55	0.1101
piwi like homolog 2 (Drosophila)	Piwi2	NM_021308	1.64	0.1589
plasminogen activator, tissue	Plat	NM_008872	1.71	0.0574
pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1	Plekhc1	BG070082	1.55	0.0740
phospholipid scramblase 1	Plscl1	BF319989	1.73	0.1572
phosphatidic acid phosphatase 2a	Ppap2a	NM_008903	1.57	0.0930
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	Ppp1r2	BB542221	1.54	0.3553
protein C receptor, endothelial	Procr	NM_011171	1.83	0.0722
protein tyrosine phosphatase 4a1	Ptp4a1	BC003761	1.57	0.1625
protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	Ptpro	AF295638	1.55	0.1182
pentaxin related gene	Ptx3	NM_008987	1.83	0.0906
RAB20, member RAS oncogene family	Rab20	BG066967	2.62	0.0526
RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	Rabgef1	BB280137	1.61	0.0707

Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2	Rassf2	AK018504	1.56	0.3211
RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 2	Rnpc2	C79248	1.53	0.1024
serum amyloid A 3	Saa3	NM_011315	1.58	0.1628
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4C	Sema4c	BQ032843	1.54	0.0707
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1	Serpinh1	BI220012	1.79	0.0517
solute carrier family 15 (H⁺/peptide transporter), member 2	Slc15a2	NM_021301	2.03	0.0959
solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	Slc4a7	BB454531	1.75	0.0882
slit homolog 2 (Drosophila)	Slit2	BG963150	1.58	0.1939
sorting nexin associated golgi protein 1	Snag1	AV344473	1.51	0.0681
serum-inducible kinase	Snk	BM234765	1.73	0.1122
syntrophin, basic 2	Sntb2	BB219478	1.64	0.1440
sorting nexin 7	Snx7	AK011015	1.50	0.1004
sperm associated antigen 9	Spag9	AV279478	1.73	0.1351
spleen tyrosine kinase	Syk	AI451104	1.79	0.1159
transgelin	Tagln	BB114067	1.57	0.0678

transcription factor EC	Tcfec	NM_031198	1.87	0.0621
TG interacting factor	Tgif	NM_009372	1.59	0.1677
thrombospondin 2	Thbs2	NM_011581	1.73	0.0541
TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	Tiparp	BB707122	1.58	0.1868
tight junction protein 1	Tjp1	NM_009386	1.58	0.0995
transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)	Tle3	AW490470	1.59	0.1278
trimethyllysine hydroxylase, epsilon	Tmlhe	AY033513	1.61	0.3574
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	Tnfrsf1b	M60469	1.79	0.1320
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	Tnfsf9	NM_009404	2.22	0.0540
trichorhinophalangeal syndrome I (human)	Trps1	BB136803	1.96	0.0870
unc-5 homolog B (C. elegans)	Unc5b	BG065285	1.52	0.0940
valosin containing protein	Vcp	C76213	1.52	0.1207
zinc finger CCCH type, antiviral 1	Zc3hav1	AK013726	1.55	0.1316
<i>II) Down-regulated (> 1.5 fold)</i>				
crystallin, lamda 1	Cryl1	C85932	0.29	0.2556
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	Ddah1	AW556888	0.66	0.0605
histone 1, H2ae	Hist1h2ae	W91024	0.62	0.3307

hexokinase 1	Hk1	NM_010438	0.62	0.0981
lysosomal-associated protein transmembrane 5	Laptm5	BB216290	0.43	0.1809
major urinary protein 1	Mup1	BF322785	0.62	0.3346
protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	Ptpk	BE957383	0.40	0.2293
sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C	Sema6c	AF363972	0.66	0.2310
thioredoxin interacting protein	Txnip	AF173681	0.62	0.0506
zinc finger protein 162	Zfp162	BB055869	0.45	0.2301
zinc finger protein 39	Zfp39	BB311524	0.57	0.0582

Values are variation ratios, n = 3

2.2.12.4. Table SIV. Validation of microarray variation ratio by quantitative RT-PCR for c-kit+ SCs

Gene Symbol	Microarray Variation Ratio	Q-PCR Variation Ratio
Angptl4	0.65	0.85
Cryl1	1.06	1.16
Cxcr4	1.50	1.99
Esrl	1.12	0.87
Gem	2.39	2.76
Hspa1a	1.57	1.45
Il1b	2.21	2.98
Il6	6.34	5.86
Il12b	4.98	5.65
Tlr2	1.52	1.62

Values are variation ratios, n = 3

2.2.12.5. Table SV. Validation of microarray variation ratio by quantitative RT-PCR for CD44+ StroCs

Gene Symbol	Microarray Variation Ratio	Q-PCR Variation Ratio
Angptl4	1.00	1.11
Cryl1	0.29	1.00
Cxcr4	1.54	1.62
Esrl	1.06	0.97
Gem	2.76	2.92
Hspa1a	1.82	1.69
Il1b	2.51	2.94
Il6	3.91	6.59
Il12b	5.17	6.09
Tlr2	1.78	1.69

Values are variation ratios, n = 3

3. Discussion

Le premier volet de ces travaux de thèse nous a permis de démontrer que le cycle menstruel influence le niveau et la maturité de certaines populations de progéniteurs endothéliaux retrouvés dans la circulation périphérique chez la femme saine non-ménopausée. De façon intéressante, il fut déterminé que la variation du niveau circulant de ces populations se fait en synchronisme avec celle du $17\beta\text{E}$. De même, le processus de maturation de certaines populations de CEP semble être davantage influencé au cours des phases du cycle où le niveau sanguin de $17\beta\text{E}$ est élevé.

Cette étude a également permis d'établir qu'il existe, entre les hommes et les femmes, des différences au niveau de la quantité et de la maturité des différentes populations de progéniteurs endothéliaux retrouvés dans la circulation périphérique en dépit de l'âge, des caractéristiques cliniques et du style de vie comparables des sujets à l'étude. Lorsqu'une différence est constatée, le niveau circulant moyen des progéniteurs est toujours supérieur chez la femme. Il en va de même pour le processus de maturation vers un phénotype endothélial qui semble toujours facilité chez cette dernière. Ces particularités ont permis d'identifier le $17\beta\text{E}$ comme un facteur prédictif de la différence notée entre les genres pour certaines populations de cellules progénitrices et de CEP.

Par la poursuite de nos recherches, nous avons démontré que le $17\beta\text{E}$ fait bel et bien partie des agents actifs capables de moduler l'organisation fonctionnelle de la niche des CS en agissant sur ces principaux constituants cellulaires, les CS et les CStro. Dans notre modèle de culture cellulaire de MO complète, le $17\beta\text{E}$ augmente de façon surprenante la proportion des CS c-kit+ sans influencer la proportion du reste du stroma. Ce phénomène est certainement attribuable à sa capacité d'influencer, et ce à une dose physiologique, le dynamisme de la niche des CS en régulant à la fois, le profil d'expression génique des CS c-kit+ et des CStro CD44+. L'action du $17\beta\text{E}$ est complexe et fait appel à différents processus biologiques dont certains tels la réponse inflammatoire, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la croissance et/ou le maintien cellulaire, l'adhésion cellulaire et la chimiotactie, sont bien connus pour

influencer l'organisation fonctionnelle de la niche des CS. Nous sommes confiant de la pertinence des catégories ciblées dans l'action du 17 β E car la plupart des processus biologiques fortement représentés auprès des gènes influencés par le 17 β E se retrouvent également surreprésentés parmi tous les gènes figurant sur la micropuce (analyse d'enrichissement de termes ontologiques; annexe 1 et 2). Enfin, auprès de ces processus biologiques, nous avons identifié plusieurs facteurs clés impliqués dans l'adhésion, la migration, la protéolyse, et la signalisation par lesquels le 17 β E influence forcément la régulation des fonctions de la niche des CS.

Ici, par souci de synthèse et de rappel, les principaux facteurs clés impliqués dans l'organisation fonctionnelle de la niche des CS et régulés par le 17 β E dans l'étude : *Estrogen-Induced Gene Expression in Bone Marrow c-Kit+ Stem Cells and Stromal Cells: Identification of Specific Biological Processes Involved in the Functional Organization of the Stem Cell Niche*, vous sont présentés sous forme d'un tableau (Tableau 2).

Tableau 2 : Facteurs clés de l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches régulés par le 17 β -estradiol.

Facteurs	Cellules souches c-kit+	Cellules stromales CD44+
<i>Jagged-1</i>	--	↑
<i>VEGF-A</i>	↑	--
<i>GM-CSF</i>	↑	--
<i>ANGPTL4</i>	↓	--
Cycline D2	↑	--
IL1a	↑	↑
IL1b	↑	↑

IL6	↑	↑
IL10	↑	↑
Récepteur de IL17	↑	↑
TGF- β 2	--	↑
Intégrine α 4	↑	--
VCAM-1	↑	↑
N-cadhérine	--	↑
Récepteur CXCR4	↑	↑
Récepteur du G-CSF	--	↑
MT1-MMP	↑	↑

VEGF-A = Vascular endothelial growth factor-A; *GM-CSF* = Granulocyte-macrophage colony stimulating factor; *ANGPTL4* = Angiopoietin like 4; *TGF- β 2* = Transforming growth factor- β 2; *VCAM-1* = Vascular cellular adhesion molecule-1; *G-CSF* = Granulocyte colony stimulating factor; *MT1-MMP* = Membrane type-1 matrix metalloproteinase

3.1. Les cellules de la moelle osseuse : une cible réelle des estrogènes?

Au début de ces travaux de thèse, deux questions principales se posaient à nous : 1) Les CEP dérivées de la MO représentent-elles une réelle cible physiologique des estrogènes? et 2) L'action des estrogènes sur les principaux constituants cellulaires de la niche des CS influence-t-elle l'organisation fonctionnelle de cette dernière? À la lumière des résultats que nous avons obtenus, tout en s'appuyant sur de récentes données provenant de la littérature, nous croyons pouvoir affirmer que les CEP dérivées de la MO, et de façon encore plus globale, que l'organisation fonctionnelle de la niche des CS représentent de réelles cibles d'actions pour les estrogènes.

3.1.1. Les cellules endothéliales progénitrices

Lorsque nous avons entrepris nos projets de recherche, il ne faisait aucun doute que les estrogènes pouvaient, pharmacologiquement, influencer le cycle fonctionnel des CEP^{258,259}. Mais pouvaient-ils le faire physiologiquement chez la femme en âge de reproduction?

Le constat que les CEP représentent une cible physiologique des estrogènes nous est d'abord venu de la découverte de leur modulation périodique au cours du cycle menstruel chez la femme. Bien entendu, la démonstration d'une corrélation entre le niveau circulant des différentes populations de progéniteurs endothéliaux et celui du 17 β E au cours du cycle aurait fermement soutenu notre affirmation. La taille de la population féminine étudiée étant trop petite, nous n'avons pu établir une telle corrélation. En revanche, nous avons constaté que lorsqu'altéré, le niveau circulant des progéniteurs endothéliaux est toujours modulé parallèlement à celui du niveau circulant de 17 β E.

De façon intéressante, il s'avère que plusieurs données recueillies auprès d'études effectuées chez la femme viennent appuyer notre allégation. D'abord, il a été démontré qu'une hyperstimulation ovarienne visant à augmenter les niveaux plasmatiques de $17\beta\text{E}$ chez des femmes en processus de fécondation *in vitro*, est associée à une augmentation du niveau circulant des CEP ²⁵⁸. L'hormonothérapie de remplacement semble aussi moduler à la hausse le niveau circulant des CEP chez la femme ménopausée, en plus d'améliorer le potentiel de prolifération des cellules ²⁶⁵. De plus, tout comme nous, Masuda, H *et coll.* ont récemment constaté une régulation cyclique de la quantité et de la maturité des CEP retrouvées dans la circulation chez des femmes non-ménopausées, un phénomène associé à la variation du $17\beta\text{E}$ circulant ²⁶⁶. Quoique tentant, la conception expérimentale de leur étude et la façon dont ils ont récolté les données ne nous permettent pas de directement comparer les résultats qu'ils ont obtenus auprès des différentes populations de progéniteurs avec les nôtres.

Une revue des recherches effectuées auprès de modèles animaux nous a aussi permis de déceler certains indices pouvant indirectement appuyer notre conclusion. Chez la souris, l'ovariectomie est associée à une diminution du niveau de CEP dans la MO et dans la circulation périphérique ²⁵⁸. À l'inverse, un traitement au $17\beta\text{E}$ augmente de façon significative l'incorporation des CEP au niveau des néovaisseaux de l'endomètre de souris ovariectomisées ²⁶⁶.

L'identification du $17\beta\text{E}$ comme facteur prédictif de certaines des différences notées entre les genres auprès du niveau circulant des progéniteurs endothéliaux, vient renforcer la thèse que les CEP sont de réelles cibles des estrogènes chez la femme. Toutefois, malgré le fait qu'il ait été démontré que les CEP expriment $\text{ER}\alpha$ et $\text{ER}\beta$ à leur surface ^{264,266,267}, nos résultats ne nous permettent pas d'exclure qu'en conditions physiologiques, l'effet des estrogènes sur la mobilisation et le processus de maturation des progéniteurs endothéliaux se fasse indirectement par, ou encore en coopération avec d'autres facteurs tels que les hormones régulatrices du cycle menstruel ou encore certains

agents mobilisateurs (VEGF, facteur stimulant les colonies de granulocytes, hormone parathyroïde) connus pour être modulés lors du cycle menstruel ^{266,268,269}. Alors que les effets direct et/ou indirect des hormones hypophysaires (lutéinisante et folliculostimulante) et de la progestérone sur la matrice osseuse ont déjà fait l'objet de plusieurs recherches (Révisé dans ²⁷⁰), peu d'informations ne nous permettent, à ce jour, d'évaluer si ces hormones exercent un effet quelconque sur la régulation cyclique des CEP chez la femme. En revanche, la modulation de certains agents mobilisateurs des CEP au cours du cycle menstruel suscite davantage d'intérêt en la question. Masuda, H *et coll.* se sont d'ailleurs questionnés sur une coopération possible entre le 17 β E et le VEGF ²⁶⁶. Lors de leur étude, ils ont démontré que le niveau circulant de VEGF varie en synchronisme avec celui du 17 β E au cours du cycle menstruel chez la femme. Cette synchronisation pourrait mener à penser que la mobilisation des CEP par le 17 β E n'est en fait qu'une action indirecte liée à la production de VEGF par l'endomètre. Cette hypothèse fut rapidement rejetée en démontrant que suite à un traitement au 17 β E, la mobilisation des CEP chez des souris mâles est équivalente à celle obtenue auprès de souris femelles ovariectomisées possédant toujours un utérus capable de répondre aux traitements estrogéniques par une production de VEGF ou autres facteurs mobilisants ²⁶⁶. Malgré sa pertinence, ce modèle ne permet pas d'exclure que la coopération entre le 17 β E et le VEGF soit liée à une production locale de ce dernier au niveau de la MO. Ceci réenforce donc l'idée que davantage d'études seront nécessaires afin de bien élucider les phénomènes de coopération possibles dans cette régulation cyclique des CEP chez la femme.

3.1.2. L'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches

Malgré tout l'intérêt que la communauté scientifique a porté à la caractérisation des effets des estrogènes sur le cycle fonctionnel des CEP au cours des dernières années, aucune donnée ne nous permettait d'évaluer si les estrogènes pouvaient agir plus globalement au niveau de la niche des CS de la MO afin de moduler son organisation fonctionnelle.

L'action bien connue des estrogènes sur l'acquisition et la préservation du capital minéral osseux portait déjà à croire que l'organisation fonctionnelle de la niche des CS représentait une cible d'action physiologique de ces derniers. Les estrogènes stimulent les ostéoblastes de la MO à produire différents facteurs de croissance et/ou différentes cytokines afin d'inhiber l'ostéoclastogenèse. À titre d'exemple, les estrogènes augmentent la production du facteur de croissance transformant- β par les ostéoblastes et les cellules du stroma ce qui entraîne une diminution de l'ostéoclastogenèse²⁷¹. Plus récemment, il fut aussi démontré que les estrogènes inhibent la différenciation et l'activité des ostéoclastes en augmentant la production de la protéine ostéoprotégérine par les ostéoblastes²⁷².

Afin de démontrer qu'en agissant sur les principaux constituants cellulaires de la niche des CS les estrogènes régulent son organisation fonctionnelle, nous avons développé un modèle de culture cellulaire de MO complète qui permet la cohabitation des CS c-kit⁺ et des CStro CD44⁺. Ce système nous a permis d'étudier *in vitro*, dans un système isolé, l'action globale du 17 β E. Nos travaux démontrent que le 17 β E, à une dose physiologique, est capable de réguler à la fois le profil génétique des CS c-kit⁺ et des CStro CD44⁺ et différents processus biologiques impliqués dans l'organisation fonctionnel de la niche des CS. Vu l'importance du rôle des gènes modulés, il ne fait aucun doute pour nous que la niche des CS représente une cible d'action des estrogènes.

Bien entendu, nous sommes conscients qu'il ne peut être affirmé que chacune des voies biologiques mises en lumière au cours de nos travaux se traduisent en une réelle action physiologique *in vivo*. En revanche, cette étude nous permet de mieux cibler les mécanismes par lesquels les estrogènes exercent leurs bénéfices sur le système cardiovasculaire et par le fait même, de mieux orienter nos futures recherches.

3.2. Les cellules de la moelle osseuse : une cible réelle des estrogènes dans la protection cardiovasculaire?

Est-ce que les actions exercées par les estrogènes d'abord directement sur le cycle fonctionnel des CEP, et ensuite plus globalement sur l'ensemble de la niche des CS, se traduisent en une meilleure protection cardiovasculaire chez la femme? Répondre à cette question n'est pas simple.

3.2.1. Observations cliniques et épidémiologiques

Compte tenue du rôle des CEP et de la niche des CS dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire, les données épidémiologiques et d'observations cliniques recueillies au cours des dernières années nous porteraient à croire que oui. Premièrement, les maladies coronariennes sont extrêmement rare chez la femme en âge de reproduction ²⁷³. En fait, il semble qu'elle court jusqu'à 4 à 5 fois moins de risques que l'homme de souffrir d'une ischémie avant la ménopause ²⁷⁴. Toutefois, lorsqu'elle en souffre, le groupe de Hamelin, BA *et Coll.* ont suggéré que le bas niveau d'estrogènes normalement retrouvé au début du cycle menstruel soit associé ou encore contribue à ce phénomène ²⁷⁵. Une observation qui, devant les conclusions de ces travaux de thèse, pourrait aussi être reliée au bas niveau circulant de progéniteurs endothéliaux retrouvés en circulation au cours de cette phase du cycle menstruel.

Ensuite, même si les maladies cardiovasculaires représentent une cause de mortalité aussi répandue chez les hommes que chez les femmes, leur apparition est retardée d'au moins 5 ans chez ces dernières ²⁷⁴. En revanche, les femmes ayant subi une ablation des ovaires ou expérimentant une ménopause naturelle en bas âge voient leur probabilité de souffrir d'une maladie cardiovasculaire considérablement augmentée ²⁷⁶. Ceci dit, cette probabilité est grandement atténuée par l'administration d'une hormonothérapie de remplacement ²⁷⁷, ce qui appuie plusieurs études d'observations ayant déjà suggéré qu'une

thérapie hormonale améliore plusieurs marqueurs de risques cardiovasculaires chez la femme ménopausée²⁷⁸.

3.2.2. Propriétés fonctionnelles des différentes populations de progéniteurs endothéliaux

La différence perçue au niveau de la quantité et de la maturité des populations de progéniteurs endothéliaux entre les genres, au cours des travaux ici présentés, pourrait aussi contribuer à expliquer la meilleure protection vasculaire dont bénéficient les femmes avant la ménopause. Tel que mentionné dans l'introduction de cet ouvrage, les CEP représentent un groupe hétérogène de populations cellulaires auquel il est invariablement accordé une action vasculoprotectrice. Mais le potentiel vasculoprotecteur des CEP est-il équivalent entre les différentes populations? Étant donné la diversité des populations présentes en circulation chez l'humain, il est tout à fait possible de croire que non.

Cependant, la rareté des progéniteurs endothéliaux en circulation et le défi technique que représente la séparation des différentes populations, expliquent pourquoi encore aujourd'hui, peu d'informations nous permettent de bien évaluer leur réel potentiel vasculoprotecteur *in vivo*. Par contre *in vitro*, quelques groupes ont débuté des études visant à évaluer ce phénomène entre les CEP dites précoces et tardives ou encore, entre les CEP isolées à partir de différents sites tels que la MO, la circulation périphérique et/ou le cordon ombilical. Collectivement, ces études ont révélé que le potentiel angiogénique, vasculogénique, de réendothélialisation, et/ou de relâche de cytokines sont différents entre les populations de CEP dites précoces ou tardives et qu'ils sont affectés par le site d'origine des cellules^{135,279-282}.

Les travaux de Friedrich, EB *et coll.* illustrent particulièrement bien ce phénomène. Ce groupe a établi que *in vitro*, les CEP CD133+/CD34-/VEGFR2+ possèdent une meilleure capacité d'attachement et de différenciation endothéliale suite à un traitement au

SDF-1 que les CEP CD133+/CD34+/VEGFR2+. Cette capacité étant entre autres, expliquée par une surexpression du récepteur CXCR4. *In vivo*, ils ont aussi fait la démonstration que les CEP CD133+/CD34-/VEGFR2+ humaines, lorsque injectées chez des souris immunodéficientes, semblent être mieux équipées que les CEP CD133+/CD34+/VEGFR2+ pour adhérer et se différencier en CE matures au site de blessure artérielle. Ceci ayant pour effet d'augmenter leur potentiel de réendothélialisation et, du même coup, de contribuer à réduire la taille de la lésion²⁸³.

3.2.3. Cible des estrogènes dans l'organisation fonctionnelle de la niche des cellules souches

Comme la plupart des processus biologiques impliqués dans l'organisation fonctionnelle de la niche des CS sont reproduits au niveau des mécanismes de réparation cardiovasculaire, il pourrait être envisagé que ceux régulés par le 17 β E se traduisent en une meilleure efficacité du maintien de l'homéostasie cardiovasculaire chez la femme.

À titre d'exemple au niveau de la MO, le SDF-1 et son récepteur, le récepteur CXCR4, sont impliqués dans la survie, la prolifération, et la migration de plusieurs types cellulaires tels les CS et/ou leurs progéniteurs et les CStro. Par conséquent, ils occupent une fonction importante dans la régulation de l'organisation fonctionnelle de la niche des CS. En conditions d'homéostasie, le récepteur CXCR4 est à la fois exprimé par les CS et les CStro, ces dernières représentant la principale source de SDF-1 de la MO. La modulation physiologique de l'expression du récepteur CXCR4 et/ou de son ligand au niveau de la MO, influence le processus de mobilisation des CS et autres progéniteurs vers la circulation périphérique (Révisé dans²⁸⁴).

De façon intéressante, il fut récemment démontré que le système SDF-1/CXCR4 occupe aussi un rôle important dans le recrutement des progéniteurs endothéliaux au niveau de la paroi vasculaire. Tel que mentionné précédemment dans l'introduction de cette thèse,

l'adhésion des plaquettes à l'endothélium activé ou encore à l'espace sous endothélial, représente une des premières réponses à la blessure vasculaire visant à maintenir l'homéostasie de l'endothélium^{285,286}. Il fut remarqué, *in vivo* par immunofluorescence en temps réel chez la souris, que suite à leur adhésion, l'activation des plaquettes induit une augmentation de l'expression de surface du SDF-1 et de sa relâche au niveau de la blessure vasculaire²⁸⁷. Son interaction avec le récepteur CXCR4 des progéniteurs dérivés de la MO supporte ainsi leur chimioattraction et leur recrutement primaire à la surface des plaquettes²⁸⁷. Ce contact est rapidement solidifié par l'interaction de la glycoprotéine *PSGL-1* (*PSGL-1* pour *P-selectin glycoprotein ligand-1*) exprimée par les différents progéniteurs et les CEP, et la P-sélectine des plaquettes²⁸⁷⁻²⁸⁹. L'interaction SDF-1/CXCR4 semble même avoir un effet positif sur la maturation endothéliale en favorisant la différenciation des progéniteurs primitifs de la MO en CEP puis en CE matures au niveau de la paroi vasculaire^{288,290,291}.

Nous avons démontré que le 17βE induit une augmentation de l'expression du récepteur CXCR4 chez les CS c-kit+ au niveau de la MO. Par conséquent, il serait donc intéressant de vérifier la pertinence de cette augmentation dans leur recrutement à la paroi vasculaire. Le même parallèle pourrait être fait à propos d'autres facteurs régulés par le 17βE dans les CS c-kit+ de la MO tels le VEGF ou le facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages.

3.2.4. Rôle possible des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse dans la pathogenèse de l'athérosclérose

Malgré tout le potentiel bénéfique des CEP et des constituants cellulaires de la niche des CS sur le système cardiovasculaire, il n'en demeure pas moins que plusieurs suggèrent que certains progéniteurs dérivés de la MO puissent contribuer à la pathogenèse de l'athérosclérose. De bien comprendre les effets néfastes possibles des estrogènes sera donc

essentiel afin de déterminer si leur portée globale sur les cellules de la MO se traduit en une meilleure protection cardiovasculaire chez la femme.

En effet, il fut récemment suggéré que des progéniteurs dérivés de la MO puissent être recrutés au site de lésion vasculaire et se différencier en CML contribuant ainsi au remodelage de l'artère et à la progression des lésions athérosclérotiques. En utilisant un modèle de transplantation de MO provenant de souris transgéniques exprimant la protéine fluorescente verte, Sata, M *et coll.* ont démontré, dans un modèle d'athérosclérose induit par une hyperlipidémie chez des souris ApoE^{-/-}, que près de 50% des cellules positives pour l'actine α du muscle lisse étaient dérivées de la MO. Ces cellules avaient un corps cellulaire élargi et possédaient des organelles synthétiques et sécrétoires associées à une diminution de leur contenu en myofilament ²⁹². Ce phénotype est contraire au CML normalement retrouvées dans la média d'une artère saine. Les auteurs en ont conclu que certains progéniteurs dérivés de la MO avaient la capacité de se différencier en cellules vasculaires capables de participer à la pathogenèse de l'athérosclérose. Cette participation active dans ce processus serait proportionnelle à la sévérité de la blessure vasculaire ²⁹³.

Quoiqu'intéressantes, ces observations sont controversées. Plusieurs se demandent si les progéniteurs impliqués dans la formation de la lésion de ce modèle étaient des progéniteurs à potentiel bénéfique ayant été redirigés vers un phénotype musculaire dû à l'environnement hostile de la lésion. Serait-il possible qu'ils représentent une nouvelle classe de progéniteurs déjà prédestinés à jouer un rôle dans le remodelage vasculaire? De plus, plusieurs se questionnent sur la pertinence d'utiliser un modèle d'athérosclérose accélérée (hyperlipidémie chez des souris ApoE^{-/-}) afin d'étudier un processus de formation de lésion beaucoup plus graduel chez l'humain qui résulte principalement de phénomènes s'échelonnant sur plusieurs années. Malgré le fait qu'à ce jour personne n'ait formellement identifié ce type de progéniteurs, il est possible que la MO contienne des progéniteurs vasculaires ayant des propriétés athérogéniques. De bien comprendre l'action des

estrogènes sur le devenir de ces progéniteurs sera donc un enjeu important afin de bien caractériser leurs actions cardioprotectrices reliées aux cellules de la MO.

Qu'en est-il du phénomène de vascularisation de la lésion athérosclérotique? Par leur potentiel d'action sur la néovascularisation des tissus ischémiques chez l'adulte, plusieurs suggèrent que les CEP puissent aussi contribuer au phénomène de néovascularisation et/ou d'angiogenèse de la lésion athérosclérotique et ainsi faciliter sa déstabilisation. Supportant cette idée, il fut démontré dans un modèle d'allogreffe chez la souris, que les CE des microvaisseaux irriguant l'artère atteinte d'artériosclérose étaient, pour la plupart, dérivées de progéniteurs de la MO de la souris récipiendaire ²⁹⁴. En revanche, une étude conduite chez des souris ApoE^{-/-} a permis de démontrer qu'en absence d'ischémie, l'infusion de cellules mononuclées dérivées de la MO n'a aucun effet proangiogénique ou proathérogénique sur les lésions étudiées. Cependant, en présence d'ischémie, l'infusion de cellules augmente considérablement la taille des lésions sans toutefois en modifier la composition. Ceci suggère un rôle primordial des facteurs sécrétés en conditions ischémiques sur ce phénomène ²⁹⁵. Encore ici, même si plusieurs interrogations demeurent quant aux réelles implications des progéniteurs de la MO dans la vascularisation des lésions athérosclérotiques, il serait intéressant d'étudier l'impact des estrogènes sur ce phénomène afin de bien caractériser leurs actions.

3.3. Les cellules de la moelle osseuse et les estrogènes : outils de prévention et/ou de thérapie

Suite aux travaux de cette thèse et ce malgré toutes les questions qui demeurent en suspend, il est raisonnable de proposer que sous l'effet des estrogènes, les cellules de la MO aient une capacité accrue à répondre aux différents stimuli physiologiques et donc soient mieux disposées à exercer leurs actions cardioprotectrices. Maintenant, est-ce que les effets protecteurs des estrogènes pourraient être utilisés pharmacologiquement pour maintenir la fonctionnalité des CEP chez la femme ménopausée ou encore influencer le succès des thérapies cellulaires cardiovasculaires impliquant les cellules de la MO ou plus spécifiquement les CEP?

3.3.1. Hormonothérapie de remplacement

À première vue, étant donné l'échec des études randomisées à démontrer un bénéfice cardiovasculaire quelconque de l'hormonothérapie de remplacement, il est difficile d'envisager qu'une telle thérapie puisse être bénéfique chez la femme ménopausée et ce, malgré les nouvelles données disponibles concernant les CEP.

L'étude *Heart Estrogen-progestin Replacement Study* (HERS) fut la première étude d'envergure visant à étudier la sécurité et l'efficacité d'une hormonothérapie de remplacement sur les répercussions cliniques des maladies cardiovasculaires chez la femme ménopausée. La population étudiée a regroupée 2763 femmes souffrant de maladies coronariennes. Elles ont toutes été randomisées à un placebo ou une hormonothérapie de remplacement. L'analyse des données recueillies n'a démontré aucune différence statistiquement valable entre le groupe placebo et celui recevant la thérapie pour les critères primaires d'infarctus du myocarde non-fatal et de mort cardiovasculaire ainsi que pour divers critères secondaires de marqueurs de maladies cardiovasculaires pour les 4 premières ou la totalité des 8 années de suivi clinique. En revanche, les investigateurs de l'étude ont

noté une augmentation du risque d'événements thrombotiques veineux chez le groupe de femmes recevant l'hormonothérapie de remplacement ^{296,297}. Les conclusions de l'étude HERS ne supportaient donc pas l'utilisation d'une hormonothérapie de remplacement chez des femmes souffrant de maladies coronariennes dans le but d'y prévenir les conséquences possibles.

De façon similaire, l'étude *Women's Health Initiative* (WHI) n'a pu démontrer un bénéfice cardiovasculaire de l'hormonothérapie de remplacement en prévention primaire chez la femme ménopausée. Le volet de l'étude utilisant la combinaison hormonale estrogènes/progestérone a dû être arrêté au cours de la 5^{ème} année du suivi face au constat d'une augmentation de l'incidence de cancer du sein et d'un manque de bénéfice cardiovasculaire certain. Quant à lui, le volet portant sur l'estrogène comme seule hormone de thérapie fut arrêté à la 7^{ème} année du suivi en absence de bénéfice cardiovasculaire et en présence d'une augmentation du risque de souffrir d'un cancer utérin, d'une augmentation du taux de saignement et de biopsie utérine et du nombre d'hystérectomie ²⁹⁸. Encore ici, les conclusions de l'étude WHI ont forcé les investigateurs à reconnaître que l'hormonothérapie de remplacement n'était donc pas recommandable pour prévenir le développement des maladies cardiovasculaires chez la femme ménopausée.

Même s'il est plausible de croire que les bénéfices cardiovasculaires des estrogènes ont été surestimés dans les différentes études d'observations, plusieurs ont cherché à comprendre les échecs obtenus dans les études randomisées. Il semble de plus en plus évident que le moment où l'hormonothérapie de remplacement est initiée ainsi que le mode de livraison et le type d'hormones utilisées soient d'une importance cruciale.

À titre d'exemple, les résultats de l'étude WHI ont été ré-analysés en tenant compte du nombre d'années s'étant écoulées entre le moment d'entrée en ménopause de la femme recrutée et l'initiation de l'hormonothérapie. Suite à cette analyse, il fut constaté que les risques coronariens avaient tendance à être moins élevés chez les femmes recevant l'hormonothérapie lorsque celle-ci avait débuté au cours des dix premières années de

ménopause. À l'inverse, ce risque tendait à augmenter si l'hormonothérapie était débutée 10 ans ou encore 20 ans suivant la ménopause, un phénomène qui selon les conclusions de l'analyse ne pouvait simplement être lié à l'âge des participantes²⁹⁹. Pour expliquer ce fait, les auteurs se sont appuyés sur la théorie du double effet des estrogènes sur les processus athéroscléreux, retardant la formation des lésions par leurs actions bénéfiques sur la fonction endothéliale et le profil lipidique, mais favorisant les événements aigus en présence de lésions avancées par une action pro-coagulante^{300,301}. Quoi qu'il en soit, cette analyse vient corroborer des données obtenues auprès de recherches effectuées chez les primates où l'efficacité d'une thérapie hormonale sur la progression des lésions athérosclérotiques s'est vue inversement reliée à la durée de la carence en estrogènes suivant une ovariectomie³⁰².

En comparaison à l'administration par voie orale, l'administration d'estrogènes par voie transdermique permet d'éviter l'effet de premier passage ce qui pourrait contribuer à diminuer les effets délétères d'une telle thérapie. L'étude *Estrogen and Thromboembolism Risk* (ESTHER) a permis de démontrer que lorsque pris oralement, les estrogènes augmentent le risque d'événements thrombotiques veineux alors que la prise transdermique n'a que peu ou pas d'effet sur le risque de thrombose³⁰³. Des résultats similaires ont été obtenus auprès de femmes à haut risques de thromboses veineuses et/ou obèses^{304,305}. Des données biologiques recueillies auprès de différentes études permettent en partie d'expliquer cette différence. Collectivement, ces études ont démontré que la prise orale d'estrogènes augmente les niveaux plasmatiques de certains facteurs procoagulants tels le facteur VII, le facteur VIII, le facteur de von Willebrand, le facteur IX et le dimère-D et diminue le niveau de certains facteurs anticoagulants tels l'antithrombine, la protéine C et la protéine S chez la femme. L'administration par voie transdermique quant à elle, n'aurait que peu ou pas d'effet sur les processus de coagulation³⁰⁶⁻³¹⁰. De plus, il semble que contrairement à la prise orale, l'administration transdermique d'estrogènes n'augmente pas les niveaux circulants de la protéine C-réactive pouvant jouer un rôle important dans la progression des processus athéroscléreux^{311,312}.

Le type d'hormones utilisées au cours des différentes études d'observations et randomisées aurait aussi son importance quant à la divergence des résultats obtenus. Encore ici, les données rapportées par l'étude ESTER en sont un bon exemple. Lors de cette étude, il a été rapporté que la prise transdermique d'estrogènes combinée à celle des dérivés du 19-norpregnane était associée à un risque accru d'événements thrombotiques veineux. À l'inverse, lorsque administrés seuls ou en combinaison avec la progestérone ou la pregnane, les estrogènes semblent sécuritaires du point de vue des risques de thrombose ³¹³. Plusieurs combinaisons hormonales sont actuellement disponibles sur le marché et de toute évidence, il sera difficile de tester chacune d'entre elles cliniquement afin de déterminer leur réel potentiel bénéfique sur le système cardiovasculaire.

Ces observations sont tout de même devenues la justification scientifique de l'étude *Kronos Early Estrogen Prevention*. Cette étude randomisée s'échelonnait sur 5 ans et avait pour objectifs de comparer l'efficacité d'une thérapie hormonale de remplacement orale à celle d'une thérapie transdermique afin de prévenir la progression des processus athéroscléreux chez des femmes récemment ménopausées ³¹⁴. Les premiers résultats sont attendus pour 2010.

Les conclusions de ce type d'étude pourraient donc relancer tout le débat entourant l'hormonothérapie de remplacement et la prévention du développement des maladies cardiovasculaires chez la femme. À ce compte, il sera intéressant de vérifier l'effet d'une telle thérapie sur le cycle fonctionnel des CEP et sur l'organisation fonctionnelle de la niche des CS, tout deux capables d'influencer sa réussite. D'ici là, il serait pertinent et même nécessaire de caractériser l'effet de la ménopause sur ces deux paramètres afin d'être en mesure de bien évaluer l'impact qu'aurait sur eux une hormonothérapie de remplacement. La durée de la carence en estrogènes au cours de la ménopause pourrait entre autres influencer l'expression des récepteurs ER α et ER β à la surface des CEP entraînant des conséquences nuisibles. La diminution de l'expression de ER α au niveau de la paroi artérielle s'est déjà vue associée au développement des lésions athérosclérotiques chez la

femme³¹⁵. Cette observation fut supportée par la découverte d'une hyperméthylation du promoteur du gène *ESR1* (et donc d'une diminution de la transcription de ce dernier) dans des échantillons de tissus vasculaires humains portant des lésions athérosclérotiques comparés aux tissus provenant de personnes saines³¹⁶.

3.3.2. Thérapies cellulaires

Des thérapies cellulaires cardiovasculaires impliquant les CEP ou les cellules de la MO sont présentement en développement pour diminuer le processus de resténose suite à l'implantation d'une endoprothèse vasculaire et/ou préserver la fonctionnalité du muscle cardiaque suite à un infarctus. L'utilisation des estrogènes afin d'améliorer le rendement de ces thérapies semble être pour le moment, davantage accessible que ne l'est l'hormonothérapie de remplacement en prévention primaire chez la femme ménopausée.

Premièrement, dans ce contexte, l'utilisation des estrogènes pourrait aussi bien être avantageuse pour l'homme que pour la femme. En effet, plusieurs études ont démontré que les estrogènes exercent des effets cardiovasculaires bénéfiques chez les hommes. La découverte d'une mutation au niveau du gène *ESR1* codant pour ER α d'un jeune homme de 31 ans, illustre bien ce phénomène. Cet homme présentait une substitution cytosine/thymidine au codon 157 de l'exon 2 au niveau de ses deux allèles. Cette transition résultait en un codon d'arrêt prématuré et en un récepteur non fonctionnel. Il fut rapidement constaté qu'il souffrait de maladie coronarienne précoce en plus de présenter un trouble de vasodilatation dépendant de l'endothélium dû à un manque de production de NO^{317,318}. Chez les hommes recrutés dans l'étude *Framingham Heart Study*, il fut également constaté que la présence du polymorphisme *ESR1 PvuII* augmente de l'ordre de 3 fois le risque d'être atteint d'un infarctus du myocarde tout en étant lié à une plus grande variation de la pression artérielle^{319,320}.

Deuxièmement, plusieurs travaux effectués par notre laboratoire démontrent déjà l'immense potentiel de l'utilisation des estrogènes en prévention cardiovasculaire

secondaire. En effet, au cours des dernières années, nous nous sommes grandement intéressés aux bénéfices potentiels d'une livraison locale de $17\beta E$ sur la guérison vasculaire. Nous avons d'abord démontré que, lorsque livré localement au niveau de l'artère, le $17\beta E$ augmente de façon significative la réendothélialisation et la fonction endothéliale suite à une angioplastie coronaire transluminale percutanée chez le porc. Un effet possiblement lié à une augmentation de l'expression de la eNOS au niveau de l'artère ^{321,322}. Nos travaux se sont rapidement vus appuyer par l'étude *Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis* qui a démontré que l'implantation d'une endoprothèse vasculaire à élution de $17\beta E$ est sécuritaire chez l'humain et associée à un faible niveau de resténose ou de revascularisation ³²³. La poursuite de nos recherches a permis de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans ce phénomène. En effet nous avons établi que lorsque livré de façon locale, le $17\beta E$ permet de diminuer l'inflammation et d'inhiber la prolifération des CML tout en augmentant la réendothélialisation vasculaire. Ceci contribuant à réduire le développement de la resténose suite à l'implantation d'une endoprothèse vasculaire chez le porc ³²⁴. Dans un modèle *in vivo* chez le lapin, il fut même suggéré que l'action de l'endoprothèse à élution de $17\beta E$ sur la diminution de la prolifération des CML, soit dépendante d'une inhibition des protéines mitogéniques à activité kinase ³²⁵ ce qui vient appuyer les données *in vitro* rapportées précédemment par notre laboratoire ²⁴¹.

Devant ces observations et surtout face à une compréhension du rôle des estrogènes sur le cycle fonctionnel des CEP et l'organisation fonctionnelle de la niche des CS, il est tout à fait plausible de croire que l'utilisation des estrogènes dans le cadre des thérapies cellulaires cardiovasculaires impliquant les CEP ou les cellules de la MO serait bénéfique.

Jusqu'à présent, les études de thérapies cellulaires visant à améliorer la guérison vasculaire ou myocardique se concentrent sur 4 stratégies principales soit 1) l'augmentation de la mobilisation des CEP ou autres cellules dérivées de la MO par un agent mobilisateur lors de l'intervention, 2) l'augmentation du recrutement des cellules au niveau de la paroi vasculaire à l'aide d'agents recruteurs 3) l'infusion de CEP autologues ou autres cellules

dérivées de la MO au site de blessure vasculaire et 4) l'infusion ou l'injection directe de cellules autologues au niveau de la zone à risque du muscle cardiaque (Révisé dans ³²⁶). Cependant, comme les maladies cardiovasculaires affectent principalement les personnes âgées, il est probable que la fonctionnalité de leur CEP ou des autres cellules de la MO soit affectée par le vieillissement et les diverses pathologies auxquelles il est normalement associé.

Un traitement systémique aux estrogènes pour une courte période précédant une intervention de revascularisation pourrait alors permettre de stimuler la niche des CS afin d'y augmenter la fonctionnalité des CEP et/ou d'augmenter leur niveau circulant. Il est aussi possible que l'augmentation de la réendothélialisation induite par une livraison locale de 17 β E dans notre modèle de blessure vasculaire chez le porc ^{322,324} soit liée à une augmentation du recrutement des CEP et de leur différenciation endothéliale au niveau de la blessure. L'infusion de CEP ou autres cellules de la MO au moment de l'intervention pourrait, quant à elle, certainement bénéficier d'un prétraitement *in vitro* aux estrogènes. Ceci afin de faciliter leur recrutement et leur différenciation endothéliale dans le cas d'une revascularisation ou d'augmenter leur potentiel de vascularisation et/ou angiogénique dans le cas d'une ischémie.

Ce type de stratégie fait déjà l'objet d'investigations auprès d'autres facteurs connus pour moduler la fonctionnalité des CEP tel le SDF-1. Un seul prétraitement des CEP à l'aide de ce facteur a permis d'augmenter leur potentiel angiogénique *in vivo* en améliorant leur adhésion à l'endothélium activé dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez la souris. Cet effet est dépendant de l'augmentation des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 5$ des intégrines et de la sécrétion de la métalloprotéinase-2 ³²⁷.

4. Conclusion

En conclusion, au cours de ces travaux de thèse, nous avons démontré que les CEP représentent une réelle cible d'actions physiologiques pour les estrogènes. Des actions qui, sans aucun doute, sont supportées par une modulation de l'organisation fonctionnelle de la niche des CS par les estrogènes. Nos études replacent donc les estrogènes au premier plan des régulateurs de l'homéostasie du système cardiovasculaire. Nous proposons un rôle actif des ces derniers dans l'association de dépendance mutuelle qui existe entre les CEP, la niche des CS et le maintien de cette homéostasie.

Dans cette lancée, il sera captivant de répondre aux nombreuses questions soulevées par nos travaux. La caractérisation des processus biologiques régulés par les estrogènes au niveau du cycle fonctionnel des CEP et plus globalement, au niveau de la niche des CS, tant en conditions physiologiques qu'en conditions pathologiques, sera certainement le plus grand défi à réaliser. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra de déterminer si cette régulation résulte en une amélioration de la santé cardiovasculaire par les estrogènes. En plus, elle permettra peut-être d'interpréter pourquoi jusqu'à présent, les tentatives d'utiliser la voie de signalisation des estrogènes dans la prévention des maladies cardiovasculaires se sont avérées peu concluantes. La poursuite de cet objectif mènera certainement au développement d'outils pharmacologiques de prévention et de traitement mieux adaptés aux besoins des patients. Un objectif valable compte tenue de l'augmentation de la prévalence de l'athérosclérose et de ses complications auprès de la population mondiale.

5. Bibliographie

1. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86:515-581.
2. Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Jr., Mensah GA, Lenfant C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation.* 2002;106:1602-1605.
3. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med.* 1998;4:1241-1243.
4. Best LC, Martin TJ, Russell RG, Preston FE. Prostacyclin increases cyclic AMP levels and adenylate cyclase activity in platelets. *Nature.* 1977;267:850-852.
5. Leopold J, Loscalzo J. Nitric Oxide and the Cardiovascular System. Vol. 4. Towata,NJ: Humana Press; 2000.
6. Esmon CT, Esmon NL, Harris KW. Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem.* 1982;257:7944-7947.
7. Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem.* 1982;257:859-864.
8. Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Paracrine functions of the coronary vascular endothelium. *Mol Cell Biochem.* 1996;157:137-145.
9. Welch G, Loscalzo J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg.* 1994;9:361-371.
10. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91:3527-3561.
11. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 1995;92:3337-3349.
12. Kifor I, Dzau VJ. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins. *Circ Res.* 1987;60:422-428.

13. Murohara T, Witzenbichler B, Spyridopoulos I, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1156-1161.
14. Gooch KJ, Dangler CA, Frangos JA. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol.* 1997;171:252-258.
15. Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1996;78:225-230.
16. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.
17. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
18. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation.* 2005;111:363-368.
19. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89:2462-2478.
20. Verbeuren TJ, Coene MC, Jordaens FH, Van Hove CE, Zonnekeyn LL, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. II. Influence of treatment with dipyridamole on endothelium-dependent and endothelium-independent responses in isolated aortas of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res.* 1986;59:496-504.
21. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-1374.

22. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131-138.
23. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. 1995;92:1084-1088.
24. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol*. 1989;135:169-175.
25. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.
26. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145:33-43.
27. Arnal JF, Gourdy P, Garmy-Susini B, Delmas E, Bayard F. [Usefulness of experimental models to understand the vascular effects of estrogens]. *Med Sci (Paris)*. 2003;19:1226-1232.
28. Taylor KE, Glagov S, Zarins CK. Preservation and structural adaptation of endothelium over experimental foam cell lesions. Quantitative ultrastructural study. *Arteriosclerosis*. 1989;9:881-894.
29. Dimmeler S, Haendeler J, Zeiher AM. Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:531-536.
30. Shimokawa H, Vanhoutte PM. Endothelium and vascular injury in hypertension and atherosclerosis. New York: Elsevier Science; 1997.
31. Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:451-456.

32. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:842-851.
33. Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:722-726.
34. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14871-14876.
35. Chisolm GM, 3rd, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem.* 1999;274:25959-25962.
36. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002;417:750-754.
37. Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:421-430.
38. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995;270:319-324.
39. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med.* 2001;194:205-218.
40. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756-762.
41. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002;196:887-896.
42. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788-791.
43. Shih PT, Brennan ML, Vora DK, et al. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res.* 1999;84:345-351.

44. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102:145-152.
45. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.
46. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;320:915-924.
47. Navab M, Berliner JA, Watson AD, et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:831-842.
48. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res.* 2004;94:253-261.
49. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest.* 2003;111:333-340.
50. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol.* 1993;143:1551-1559.
51. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
52. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-281.
53. Lutters BC, Leeuwenburgh MA, Appeldoorn CC, Molenaar TJ, Van Berkel TJ, Biessen EA. Blocking endothelial adhesion molecules: a potential therapeutic strategy to combat atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:545-552.
54. Lefer DJ, Jones SP, Girod WG, et al. Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol.* 1999;276:H1943-1950.

55. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*. 1994;89:2176-2182.
56. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res*. 1995;76:980-986.
57. Tomita H, Egashira K, Kubo-Inoue M, et al. Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1456-1464.
58. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990;344:254-257.
59. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8264-8268.
60. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:123-128.
61. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
62. Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:437-445.
63. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*. 2002;105:1158-1161.
64. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med*. 2004;10:416-421.
65. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1876-1890.

66. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:3893-3897.
67. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1547-1559.
68. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-758.
69. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*. 1997;99:2752-2761.
70. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2002;22:661-670.
71. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2003;163:1117-1125.
72. Elhage R, Jawien J, Rudling M, et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2003;59:234-240.
73. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2137-2142.
74. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102:2165-2168.
75. Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002;106:913-919.
76. Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2002;106:1439-1441.

77. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res.* 1999;85:e17-24.
78. Caligiuri G, Rudling M, Ollivier V, et al. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice. *Mol Med.* 2003;9:10-17.
79. Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2003;112:1342-1350.
80. Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med.* 1999;31:217-224.
81. Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2000;275:17527-17535.
82. Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14:137-145.
83. Yudkin JS, Juhan-Vague I, Hawe E, et al. Low-grade inflammation may play a role in the etiology of the metabolic syndrome in patients with coronary heart disease: the HIFMECH study. *Metabolism.* 2004;53:852-857.
84. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54:1615-1625.
85. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA.* 2002;287:2570-2581.
86. Eckel RH, Wassef M, Chait A, et al. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group II: pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Circulation.* 2002;105:e138-143.
87. Demaille D, Guigas B, Chauvin C, et al. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes.* 2005;54:2179-2187.
88. Farhangkhoei H, Khan ZA, Barbin Y, Chakrabarti S. Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia.* 2005;48:1401-1410.

89. Sheu ML, Ho FM, Yang RS, et al. High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:539-545.
90. Varma S, Lal BK, Zheng R, et al. Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1744-1751.
91. Cassidy A, de Pascual Teresa S, Rimbach G. Molecular mechanisms by which dietary isoflavones potentially prevent atherosclerosis. *Expert Rev Mol Med.* 2003;5:1-15.
92. Sirtori CR, Arnoldi A, Johnson SK. Phytoestrogens: end of a tale? *Ann Med.* 2005;37:423-438.
93. Newby AC, George SJ. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol.* 1996;11:574-582.
94. Bjornheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O. Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:870-876.
95. Wilson SH, Herrmann J, Lerman LO, et al. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation.* 2002;105:415-418.
96. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, et al. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest.* 1998;101:1551-1556.
97. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension.* 2002;39:46-50.
98. Heeschen C, Jang JJ, Weis M, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7:833-839.
99. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4736-4741.

100. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349:2316-2325.
101. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002;109:745-753.
102. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:1223-1230.
103. Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med*. 1989;170:1595-1608.
104. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000;247:349-358.
105. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003;59:812-823.
106. Bogaty P, Hackett D, Davies G, Maseri A. Vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*. 1994;90:5-11.
107. Zeiher AM, Goebel H, Schachinger V, Ihling C. Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation*. 1995;91:941-947.
108. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 2001;104:1114-1118.
109. Szczeklik A, Musial J, Undas A, et al. Inhibition of thrombin generation by aspirin is blunted in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:948-954.
110. Bouchie JL, Hansen H, Feener EP. Natriuretic factors and nitric oxide suppress plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP in the regulation of the plasminogen system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1771-1779.

111. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med.* 2002;8:1257-1262.
112. Buchner K, Henn V, Grafe M, de Boer OJ, Becker AE, Kroczeck RA. CD40 ligand is selectively expressed on CD4+ T cells and platelets: implications for CD40-CD40L signalling in atherosclerosis. *J Pathol.* 2003;201:288-295.
113. Weis JR, Pitas RE, Wilson BD, Rodgers GM. Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation. *FASEB J.* 1991;5:2459-2465.
114. Xu Q. The impact of progenitor cells in atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006;3:94-101.
115. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367.
116. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-958.
117. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2002;105:3017-3024.
118. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1567-1572.
119. Cho HJ, Kim HS, Lee MM, et al. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation.* 2003;108:2918-2925.
120. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001;88:167-174.

121. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438.
122. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779.
123. Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005;105:199-206.
124. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109:220-226.
125. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.
126. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-967.
127. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228.
128. Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:141-151.
129. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003;9:702-712.
130. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-353.
131. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002;100:3203-3208.
132. Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8:488-497.

133. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res.* 2003;93:1023-1025.
134. Hur J, Yoon CH, Kim HS, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:288-293.
135. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003;108:2511-2516.
136. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007.
137. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:457-463.
138. Wang X, Hisha H, Taketani S, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells.* 2006;24:482-493.
139. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34:565-571.
140. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood.* 2006;107:1878-1887.
141. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:93-106.
142. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370-1376.
143. Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.* 2004;109:1615-1622.
144. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2001;108:399-405.

145. Fujii H, Li SH, Szmitko PE, Fedak PW, Verma S. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2476-2482.
146. Gennaro G, Menard C, Michaud SE, Rivard A. Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation.* 2003;107:230-233.
147. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest.* 2003;111:187-196.
148. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7.
149. Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:665-670.
150. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond).* 2004;107:273-280.
151. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol.* 2004;27:243-255.
152. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:407-413.
153. Oliveras A, Soler MJ, Martinez-Estrada OM, et al. Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens.* 2007.
154. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* 2005;23:97-104.

155. Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res.* 2001;49:554-560.
156. Abaci A, Oguzhan A, Kahraman S, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation.* 1999;99:2239-2242.
157. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, et al. Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol.* 2004;164:457-466.
158. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2004;53:195-199.
159. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation.* 2002;106:2781-2786.
160. Sorrentino SA, Bahlmann FH, Besler C, et al. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation.* 2007;116:163-173.
161. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, et al. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis.* 2005;183:163-167.
162. Krankel N, Adams V, Linke A, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:698-703.
163. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1442-1447.

164. Laufs U, Wassmann S, Czech T, et al. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:809-814.
165. Sandri M, Adams V, Gielen S, et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation.* 2005;111:3391-3399.
166. Sarto P, Balducci E, Balconi G, et al. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. *J Card Fail.* 2007;13:701-708.
167. Laufs U, Urhausen A, Werner N, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12:407-414.
168. Scheubel RJ, Zorn H, Silber RE, et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2073-2080.
169. Suh W, Kim KL, Choi JH, et al. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321:65-71.
170. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation.* 2004;109:2058-2067.
171. Chen JZ, Zhu JH, Wang XX, et al. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:233-239.
172. Thum T, Tsikas D, Stein S, et al. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1693-1701.

173. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18:3964-3972.
174. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2000;86:1198-1202.
175. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102:1340-1346.
176. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-2890.
177. Ling S, Komesaroff P, Sudhir K. Cellular mechanisms underlying the cardiovascular actions of oestrogens. *Clin Sci (Lond).* 2006;111:107-118.
178. 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;43:218-220.
179. 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;82:4258-4265.
180. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243:122-126.
181. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol.* 1998;54:105-112.
182. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv.* 2003;3:281-292.
183. Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell.* 1988;55:145-156.

184. Tora L, White J, Brou C, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989;59:477-487.
185. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2005;161:307-320.
186. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*. 1999;20:358-417.
187. Fitzpatrick SL, Funkhouser JM, Sindoni DM, et al. Expression of estrogen receptor-beta protein in rodent ovary. *Endocrinology*. 1999;140:2581-2591.
188. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol*. 1993;7:4-11.
189. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem*. 1999;274:33551-33556.
190. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 1997;11:1486-1496.
191. Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995;9:443-456.
192. Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J*. 1996;319 (Pt 3):657-667.
193. Shao D, Lazar MA. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest*. 1999;103:1617-1618.
194. Smith CL, Conneely OM, O'Malley BW. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:6120-6124.

195. Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA. Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol Endocrinol.* 1993;7:992-998.
196. Newton CJ, Buric R, Trapp T, Brockmeier S, Pagotto U, Stalla GK. The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994;48:481-486.
197. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol.* 1999;13:307-319.
198. Tremblay GB, Giguere V. Coregulators of estrogen receptor action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2002;12:1-22.
199. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81:1535-1565.
200. Walker P, Germond JE, Brown-Luedi M, Givel F, Wahli W. Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and apo-VLDLII genes. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:8611-8626.
201. Pike CJ. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1999;72:1552-1563.
202. Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem.* 1998;273:29321-29330.
203. El-Ashry D, Chrysogelos SA, Lippman ME, Kern FG. Estrogen induction of TGF-alpha is mediated by an estrogen response element composed of two imperfect palindromes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996;59:261-269.
204. Nabulsi AA, Folsom AR, White A, et al. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *N Engl J Med.* 1993;328:1069-1075.

205. Ma PT, Yamamoto T, Goldstein JL, Brown MS. Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17 alpha-ethinyl estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:792-796.
206. 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*. 1997;138:863-870.
207. Srivastava RA, Srivastava N, Averna M, et al. Estrogen up-regulates apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor alpha-mediated pathway. *J Biol Chem*. 1997;272:33360-33366.
208. Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, et al. Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278:640-645.
209. Sugioka K, Shimosegawa Y, Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett*. 1987;210:37-39.
210. Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation*. 1997;95:1378-1385.
211. Koivu TA, Dastidar P, Jokela H, et al. The relation of oxidized LDL autoantibodies and long-term hormone replacement therapy to ultrasonographically assessed atherosclerotic plaque quantity and severity in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. 2001;157:471-479.
212. Arnal JF, Clámens S, Pechet C, et al. Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4108-4113.
213. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G. Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo : possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85:377-385.

214. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest.* 1996;98:36-42.
215. Caulin-Glaser T, Farrell WJ, Pfau SE, et al. Modulation of circulating cellular adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:1555-1560.
216. Mukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G, Nathan L. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:4055-4060.
217. Nakai K, Itoh C, Hotta K, Itoh T, Yoshizumi M, Hiramori K. Estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* 1994;54:PL221-227.
218. Simoncini T, De Caterina R, Genazzani AR. Selective estrogen receptor modulators: different actions on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:815-818.
219. 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;87:19-25.
220. Geraldès 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.* 2006;71:566-573.
221. Seli E, Pehlivan T, Selam B, Garcia-Velasco JA, Arici A. Estradiol down-regulates MCP-1 expression in human coronary artery endothelial cells. *Fertil Steril.* 2002;77:542-547.
222. Pendaries C, Darblade B, Rochaix P, et al. The AF-1 activation-function of ERalpha may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:2205-2210.

223. Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 1999;103:401-406.
224. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol.* 2002;16:938-946.
225. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, et al. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000;87:677-682.
226. Zhu Y, Bian Z, Lu P, et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science.* 2002;295:505-508.
227. Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, et al. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett.* 2001;502:103-108.
228. Binko J, Majewski H. 17 beta-Estradiol reduces vasoconstriction in endothelium-denuded rat aortas through inducible NOS. *Am J Physiol.* 1998;274:H853-859.
229. Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J.* 2001;15:2121-2130.
230. Dimitrova KR, DeGroot KW, Pacquing AM, et al. Estradiol prevents homocysteine-induced endothelial injury in male rats. *Cardiovasc Res.* 2002;53:589-596.
231. Sumino H, Ichikawa S, Kanda T, et al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with essential hypertension increases circulating plasma levels of bradykinin. *Am J Hypertens.* 1999;12:1044-1047.
232. Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol.* 1994;9:619-626.
233. Mikkola T, Turunen P, Avela K, Orpana A, Viinikka L, Ylikorkala O. 17 beta-estradiol stimulates prostacyclin, but not endothelin-1, production in human vascular endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:1832-1836.
234. Dubey RK, Gillespie DG, Mi Z, Rosselli M, Keller PJ, Jackson EK. Estradiol inhibits smooth muscle cell growth in part by activating the cAMP-adenosine pathway. *Hypertension.* 2000;35:262-266.

235. Ylikorkala O, Orpana A, Puolakka J, Pyorala T, Viinikka L. Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:3384-3387.
236. Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kurzinger S, Riegger GA. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation.* 1997;95:39-45.
237. Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet.* 1995;346:89-90.
238. 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.* 1995;91:755-763.
239. Piotrowicz RS, Weber LA, Hickey E, Levin EG. Accelerated growth and senescence of arterial endothelial cells expressing the small molecular weight heat-shock protein HSP27. *FASEB J.* 1995;9:1079-1084.
240. Somjen D, Kohen F, Jaffe A, Amir-Zaltsman Y, Knoll E, Stern N. Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. *Hypertension.* 1998;32:39-45.
241. Geraldès P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1585-1590.
242. Geraldès P, Sirois MG, Tanguay JF. Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res.* 2003;93:399-405.
243. Alvarez RJ, Gips SJ, Moldovan N, et al. 17 β -estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237:372-381.
244. Spyridopoulos I, Sullivan AB, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation.* 1997;95:1505-1514.

245. Razandi M, Pedram A, Levin ER. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem*. 2000;275:38540-38546.
246. Fischer-Dzoga K, Wissler RW, Vesselinovitch D. The effect of estradiol on the proliferation of rabbit aortic medial tissue culture cells induced by hyperlipemic serum. *Exp Mol Pathol*. 1983;39:355-363.
247. Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*. 1994;89:1943-1950.
248. Morey AK, Pedram A, Razandi M, et al. Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology*. 1997;138:3330-3339.
249. Ling S, Little PJ, Williams MR, et al. High glucose abolishes the antiproliferative effect of 17beta-estradiol in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282:E746-751.
250. Suzuki A, Mizuno K, Ino Y, et al. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc Res*. 1996;32:516-523.
251. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:964-972.
252. Ling S, Deng G, Ives HE, et al. Estrogen inhibits mechanical strain-induced mitogenesis in human vascular smooth muscle cells via down-regulation of Sp-1. *Cardiovasc Res*. 2001;50:108-114.
253. Chen SJ, Li H, Durand J, Oparil S, Chen YF. Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation*. 1996;93:577-584.
254. Levine RL, Chen SJ, Durand J, Chen YF, Oparil S. Medroxyprogesterone attenuates estrogen-mediated inhibition of neointima formation after balloon injury of the rat carotid artery. *Circulation*. 1996;94:2221-2227.
255. Oparil S, Levine RL, Chen SJ, Durand J, Chen YF. Sexually dimorphic response of the balloon-injured rat carotid artery to hormone treatment. *Circulation*. 1997;95:1301-1307.

256. Iafrafi MD, Karas RH, Aronovitz M, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med*. 1997;3:545-548.
257. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation*. 2001;103:423-428.
258. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003;107:3059-3065.
259. Iwakura A, Luedemann C, Shastri S, et al. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation*. 2003;108:3115-3121.
260. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005;23:1699-1706.
261. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells. *Hypertens Res*. 2005;28:263-271.
262. Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2005;28:763-772.
263. Iwakura A, Shastri S, Luedemann C, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. 2006;113:1605-1614.
264. Hamada H, Kim MK, Iwakura A, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006;114:2261-2270.
265. Bulut D, Albrecht N, Imohl M, et al. Hormonal status modulates circulating endothelial progenitor cells. *Clin Res Cardiol*. 2007;96:258-263.

266. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res.* 2007;101:598-606.
267. Zhao X, Huang L, Yin Y, Fang Y, Zhao J, Chen J. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways. *Microvasc Res.* 2008;75:45-52.
268. Makinoda S, Mikuni M, Sogame M, et al. Erythropoietin, granulocyte-colony stimulating factor, interleukin-1 beta and interleukin-6 during the normal menstrual cycle. *Int J Gynaecol Obstet.* 1996;55:265-271.
269. Zittermann A, Schwarz I, Scheld K, et al. Physiologic fluctuations of serum estradiol levels influence biochemical markers of bone resorption in young women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:95-101.
270. Cromer BA. Menstrual cycle and bone health in adolescents. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1135:196-203.
271. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, et al. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1991;129:3313-3320.
272. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest.* 2003;111:1221-1230.
273. Isles CG, Hole DJ, Hawthorne VM, Lever AF. Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men. *Lancet.* 1992;339:702-706.
274. World Health Annual Statistics 1995. 1996;World Health Organization, Geneva.
275. Hamelin BA, Methot J, Arsenault M, et al. Influence of the menstrual cycle on the timing of acute coronary events in premenopausal women. *Am J Med.* 2003;114:599-602.
276. Senoz S, Direm B, Gulekli B, Gokmen O. Estrogen deprivation, rather than age, is responsible for the poor lipid profile and carbohydrate metabolism in women. *Maturitas.* 1996;25:107-114.

277. Lip GY, Blann AD, Jones AF, Beevers DG. Effects of hormone-replacement therapy on hemostatic factors, lipid factors, and endothelial function in women undergoing surgical menopause: implications for prevention of atherosclerosis. *Am Heart J.* 1997;134:764-771.
278. Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med.* 1991;20:47-63.
279. Yoon CH, Hur J, Park KW, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation.* 2005;112:1618-1627.
280. Awad O, Dedkov EI, Jiao C, Bloomer S, Tomanek RJ, Schattman GC. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:758-764.
281. Mukai N, Akahori T, Komaki M, et al. A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res.* 2008;314:430-440.
282. Au P, Daheron LM, Duda DG, et al. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood.* 2008;111:1302-1305.
283. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res.* 2006;98:e20-25.
284. Dar A, Kollet O, Lapidot T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Exp Hematol.* 2006;34:967-975.
285. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med.* 2003;197:41-49.
286. Chen J, Lopez JA. Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation.* 2005;12:235-246.

287. Massberg S, Konrad I, Schurzinger K, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*. 2006;203:1221-1233.
288. de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, et al. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1653-1659.
289. Lev EI, Estrov Z, Aboufatova K, et al. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*. 2006;96:498-504.
290. Stellos K, Langer H, Daub K, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2008;117:206-215.
291. Daub K, Langer H, Seizer P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J*. 2006;20:2559-2561.
292. Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-409.
293. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:249-253.
294. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:3122-3127.
295. Silvestre JS, Gojova A, Brun V, et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation*. 2003;108:2839-2842.
296. Grady D, Applegate W, Bush T, Furberg C, Riggs B, Hulley SB. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. *Control Clin Trials*. 1998;19:314-335.

297. 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. 1998;280:605-613.
298. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA. 2002;288:321-333.
299. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. JAMA. 2007;297:1465-1477.
300. Prentice RL, Langer RD, Stefanick ML, et al. Combined analysis of Women's Health Initiative observational and clinical trial data on postmenopausal hormone treatment and cardiovascular disease. Am J Epidemiol. 2006;163:589-599.
301. Grodstein F, Clarkson TB, Manson JE. Understanding the divergent data on postmenopausal hormone therapy. N Engl J Med. 2003;348:645-650.
302. Clarkson TB, Appt SE. Controversies about HRT--lessons from monkey models. Maturitas. 2005;51:64-74.
303. Scarabin PY, Oger E, Plu-Bureau G. Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. Lancet. 2003;362:428-432.
304. Straczek C, Oger E, Yon de Jonage-Canonico MB, et al. Prothrombotic mutations, hormone therapy, and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration. Circulation. 2005;112:3495-3500.
305. Canonico M, Oger E, Conard J, et al. Obesity and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women: differential impact of hormone therapy by route of estrogen administration. The ESTHER Study. J Thromb Haemost. 2006;4:1259-1265.
306. Scarabin PY, Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Taisne P, Agher R, Aiach M. Effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on blood coagulation and

- fibrinolysis in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3071-3078.
307. Oger E, Alhenc-Gelas M, Lacut K, et al. Differential effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on sensitivity to activated protein C among postmenopausal women: a randomized trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1671-1676.
308. Post MS, Christella M, Thomassen LG, et al. Effect of oral and transdermal estrogen replacement therapy on hemostatic variables associated with venous thrombosis: a randomized, placebo-controlled study in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1116-1121.
309. Cosman F, Baz-Hecht M, Cushman M, et al. Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. *Thromb Res.* 2005;116:1-13.
310. Dias AR, Jr., Melo RN, Gebara OC, et al. Effects of conjugated equine estrogens or raloxifene on lipid profile, coagulation and fibrinolysis factors in postmenopausal women. *Climacteric.* 2005;8:63-70.
311. Lacut K, Oger E, Le Gal G, et al. Differential effects of oral and transdermal postmenopausal estrogen replacement therapies on C-reactive protein. *Thromb Haemost.* 2003;90:124-131.
312. Yilmazer M, Fenkci V, Fenkci S, et al. Hormone replacement therapy, C-reactive protein, and fibrinogen in healthy postmenopausal women. *Maturitas.* 2003;46:245-253.
313. Canonico M, Oger E, Plu-Bureau G, et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation.* 2007;115:840-845.
314. Manson JE, Bassuk SS, Harman SM, et al. Postmenopausal hormone therapy: new questions and the case for new clinical trials. *Menopause.* 2006;13:139-147.

315. Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM. Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation*. 1994;89:1501-1510.
316. 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*. 1999;43:985-991.
317. Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, et al. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation*. 1997;96:3774-3777.
318. Sudhir K, Chou TM, Messina LM, et al. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet*. 1997;349:1146-1147.
319. Shearman AM, Cupples LA, Demissie S, et al. Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *Jama*. 2003;290:2263-2270.
320. Peter I, Shearman AM, Zucker DR, et al. Variation in estrogen-related genes and cross-sectional and longitudinal blood pressure in the Framingham Heart Study. *J Hypertens*. 2005;23:2193-2200.
321. Chandrasekar B, Tanguay JF. Local delivery of 17-beta-estradiol decreases neointimal hyperplasia after coronary angioplasty in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:1972-1978.
322. Chandrasekar B, Nattel S, Tanguay JF. Coronary artery endothelial protection after local delivery of 17beta-estradiol during balloon angioplasty in a porcine model: a potential new pharmacologic approach to improve endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1570-1576.
323. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, et al. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1118-1121.
324. Chandrasekar B, Sirois MG, Geoffroy P, Lauzier D, Nattel S, Tanguay JF. Local delivery of 17beta-estradiol improves reendothelialization and decreases

inflammation after coronary stenting in a porcine model. *Thromb Haemost.* 2005;94:1042-1047.

325. Han Y, Liang M, Kang J, et al. Estrogen-eluting stent implantation inhibits neointimal formation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007;70:647-653.
326. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005;115:572-583.
327. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, et al. Ex Vivo Priming of Endothelial Progenitor Cells With SDF-1 Before Transplantation Could Increase Their Proangiogenic Potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008.

6. Annexe

**Annexe 1: Processus biologiques de l'Ontologie Génétique
surreprésentés sous l'influence du 17 β E auprès de cellules
souches c-kit+.**

<i>GO ID</i>	<i>Biological Process Category</i>	<i>17βE regulated gene</i>	<i>Total gene on chip</i>	<i>P value</i>
GO:0000723	<i>telomere maintenance</i>	2	15	0,0821
GO:0001562	<i>response to protozoan</i>	2	3	0,00774
GO:0001659	<i>thermoregulation</i>	2	10	0,0578
GO:0001660	<i>fever</i>	2	3	0,00774
GO:0001773	<i>myeloid dendritic cell activation</i>	3	7	0,00273
GO:0001775	<i>cell activation</i>	11	209	0,00307
GO:0001816	<i>cytokine production</i>	10	93	3,99E- 05
GO:0001817	<i>regulation of cytokine production</i>	5	26	0,00107
GO:0001819	<i>positive regulation of cytokine production</i>	4	17	0,00238
GO:0001892	<i>embryonic placenta development</i>	2	11	0,064
GO:0001893	<i>maternal placenta development</i>	1	1	0,0702
GO:0001922	<i>B1-B cell homeostasis</i>	1	1	0,0702
GO:0001923	<i>B1 B cell differentiation</i>	1	1	0,0702
GO:0001935	<i>endothelial cell proliferation</i>	2	8	0,0403
GO:0001936	<i>regulation of endothelial cell proliferation</i>	2	6	0,0255
GO:0002237	<i>response to molecule of bacterial origin</i>	2	14	0,0745
GO:0002250	<i>adaptive immune response</i>	7	79	0,00291

GO:0002252	<i>immune effector process</i>	8	119	0,004
GO:0002253	<i>activation of immune response</i>	6	66	0,00488
GO:0002263	<i>cell activation during immune response</i>	3	9	0,00377
GO:0002274	<i>myeloid leukocyte activation</i>	3	26	0,0412
GO:0002285	<i>lymphocyte activation during immune response</i>	3	8	0,00307
GO:0002286	<i>T cell activation during immune response</i>	3	8	0,00307
GO:0002292	<i>T cell differentiation during immune response</i>	3	8	0,00307
GO:0002293	<i>alpha-beta T cell differentiation during immune response</i>	3	8	0,00307
GO:0002294	<i>CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation during immune response</i>	3	8	0,00307
GO:0002312	<i>B cell activation during immune response</i>	1	1	0,0702
GO:0002313	<i>mature B cell differentiation during immune response</i>	1	1	0,0702
GO:0002315	<i>marginal zone B cell differentiation</i>	1	1	0,0702
GO:0002335	<i>mature B cell differentiation</i>	2	2	0,00377
GO:0002366	<i>leukocyte activation during immune response</i>	3	9	0,00377
GO:0002376	<i>immune system process</i>	33	579	9,98E-17
GO:0002429	<i>immuno response-activating cell surface receptor signaling pathway</i>	3	31	0,0611
GO:0002443	<i>leukocyte mediated immunity</i>	5	88	0,0521

GO:0002449	<i>lymphocyte mediated immunity</i>	5	82	0,0412
GO:0002455	<i>humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin</i>	3	27	0,0443
GO:0002460	<i>adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains</i>	7	79	0,00291
GO:0002520	<i>immune system development</i>	9	236	0,0403
GO:0002521	<i>leukocyte differentiation</i>	8	124	0,00509
GO:0002526	<i>acute inflammatory response</i>	7	67	0,00138
GO:0002541	<i>activation of plasma proteins during acute inflammatory response</i>	3	32	0,064
GO:0002573	<i>myeloid leukocyte differentiation</i>	3	38	0,0742
GO:0002682	<i>regulation of immune system process</i>	7	98	0,00618
GO:0002684	<i>positive regulation of immune system process</i>	6	85	0,0127
GO:0002757	<i>immune response-activating signal transduction</i>	3	34	0,0702
GO:0002764	<i>immune response-regulating signal transduction</i>	4	36	0,0159
GO:0002768	<i>immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway</i>	4	33	0,0123
GO:0006350	<i>transcription</i>	37	1812	0,0635
GO:0006351	<i>transcription, DNA-dependent</i>	34	1704	0,0902
GO:0006417	<i>regulation of translation</i>	7	117	0,0129
GO:0006447	<i>regulation of translational initiation by iron</i>	1	1	0,0702

GO:0006469	<i>negative regulation of protein kinase activity</i>	3	35	0,0702
GO:0006915	<i>apoptosis</i>	20	571	0,00071
GO:0006916	<i>anti-apoptosis</i>	5	74	0,0304
GO:0006935	<i>chemotaxis</i>	6	95	0,0196
GO:0006950	<i>response to stress</i>	35	687	5,53E-15
GO:0006952	<i>defense response</i>	29	352	7,83E-13
GO:0006953	<i>acute-phase response</i>	4	27	0,00709
GO:0006954	<i>inflammatory response</i>	21	188	1,16E-11
GO:0006955	<i>immune response</i>	29	356	8,77E-13
GO:0006956	<i>complement activation</i>	3	32	0,064
GO:0006959	<i>humoral immune response</i>	5	48	0,00709
GO:0007243	<i>protein kinase cascade</i>	7	202	0,0931
GO:0007249	<i>I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade</i>	3	33	0,0677
GO:0008219	<i>cell death</i>	20	600	0,00147
GO:0009605	<i>response to external stimulus</i>	24	398	3,08E-13
GO:0009607	<i>response to biotic stimulus</i>	13	153	1,37E-05
GO:0009611	<i>response to wounding</i>	21	263	6,88E-09
GO:0009615	<i>response to virus</i>	5	39	0,00377
GO:0009617	<i>response to bacterium</i>	6	67	0,00509

GO:0009620	<i>response to fungus</i>	2	12	0,0702
GO:0009889	<i>regulation of biosynthetic process</i>	8	139	0,00839
GO:0009890	<i>negative regulation of biosynthetic process</i>	3	28	0,0482
GO:0009891	<i>positive regulation of biosynthetic process</i>	5	49	0,00755
GO:0009966	<i>regulation of signal transduction</i>	10	313	0,0688
GO:0010468	<i>regulation of gene expression</i>	37	1858	0,0712
GO:0012501	<i>programmed cell death</i>	20	578	0,00088
GO:0016064	<i>immunoglobulin mediated immune response</i>	5	60	0,0151
GO:0016265	<i>death</i>	20	600	0,00147
GO:0019221	<i>cytokine and chemokine mediated signaling pathway</i>	3	43	0,0938
GO:0019222	<i>regulation of metabolic process</i>	41	2012	0,0439
GO:0019541	<i>propionate metabolic process</i>	1	1	0,0702
GO:0019543	<i>propionate catabolic process</i>	1	1	0,0702
GO:0019724	<i>B cell mediated immunity</i>	5	61	0,0159
GO:0030097	<i>hemopoiesis</i>	8	198	0,0439
GO:0030098	<i>lymphocyte differentiation</i>	6	91	0,0164
GO:0030154	<i>cell differentiation</i>	34	1570	0,0382
GO:0030183	<i>B cell differentiation</i>	3	35	0,0702
GO:0030217	<i>T cell differentiation</i>	4	60	0,0635
GO:0030855	<i>epithelial cell differentiation</i>	3	35	0,0702
GO:0030857	<i>negative regulation of epithelial cell differentiation</i>	1	1	0,0702
GO:0030885	<i>regulation of myeloid dendritic cell</i>	1	1	0,0702

	<i>activation</i>			
GO:0030886	<i>negative regulation of myeloid dendritic cell activation</i>	1	1	0,0702
GO:0031323	<i>regulation of cellular metabolic process</i>	39	1939	0,064
GO:0031326	<i>regulation of cellular biosynthetic process</i>	7	124	0,0164
GO:0031328	<i>positive regulation of cellular biosynthetic process</i>	5	40	0,00377
GO:0031649	<i>heat generation</i>	2	6	0,0255
GO:0032200	<i>telomere organization and biogenesis</i>	2	15	0,0821
GO:0032602	<i>chemokine production</i>	2	8	0,0403
GO:0032615	<i>interleukin-12 production</i>	3	11	0,00618
GO:0032635	<i>interleukin-6 production</i>	2	12	0,0702
GO:0032640	<i>tumor necrosis factor production</i>	2	12	0,0702
GO:0032655	<i>regulation of interleukin-12 production</i>	2	2	0,00377
GO:0032695	<i>negative regulation of interleukin-12 production</i>	1	1	0,0702
GO:0032735	<i>positive regulation of interleukin-12 production</i>	1	1	0,0702
GO:0032774	<i>RNA biosynthetic process</i>	34	1708	0,0922
GO:0032943	<i>mononuclear cell proliferation</i>	4	70	0,0745
GO:0033483	<i>gas homeostasis</i>	1	1	0,0702
GO:0033484	<i>nitric oxide homeostasis</i>	1	1	0,0702
GO:0033673	<i>negative regulation of kinase activity</i>	3	35	0,0702
GO:0035148	<i>lumen formation</i>	1	1	0,0702
GO:0042033	<i>chemokine biosynthetic process</i>	2	7	0,0329
GO:0042035	<i>regulation of cytokine biosynthetic</i>	5	48	0,00709

	<i>process</i>			
GO:0042036	<i>negative regulation of cytokine biosynthetic process</i>	2	10	0,0578
GO:0042088	<i>T-helper 1 type immune response</i>	2	8	0,0403
GO:0042089	<i>cytokine biosynthetic process</i>	6	56	0,00302
GO:0042091	<i>interleukin-10 biosynthetic process</i>	1	1	0,0702
GO:0042092	<i>T-helper 2 type immune response</i>	2	6	0,0255
GO:0042093	<i>T-helper cell differentiation</i>	3	8	0,00307
GO:0042107	<i>cytokine metabolic process</i>	6	56	0,00302
GO:0042108	<i>positive regulation of cytokine biosynthetic process</i>	3	31	0,0611
GO:0042110	<i>T cell activation</i>	7	111	0,0101
GO:0042221	<i>response to chemical stimulus</i>	11	295	0,0237
GO:0042226	<i>interleukin-6 biosynthetic process</i>	2	8	0,0403
GO:0042312	<i>regulation of vasodilatation</i>	1	1	0,0702
GO:0042330	<i>taxis</i>	6	95	0,0196
GO:0042536	<i>negative regulation of tumor necrosis factor biosynthetic process</i>	1	1	0,0702
GO:0042632	<i>cholesterol homeostasis</i>	2	15	0,0821
GO:0042742	<i>defense response to bacterium</i>	4	46	0,0314
GO:0042832	<i>defense response to protozoan</i>	2	2	0,00377
GO:0042891	<i>antibiotic transport</i>	1	1	0,0702
GO:0042892	<i>chloramphenicol transport</i>	1	1	0,0702
GO:0042981	<i>regulation of apoptosis</i>	16	351	0,00107
GO:0043011	<i>myeloid dendritic cell differentiation</i>	2	6	0,0255
GO:0043065		6	156	0,0915

GO:0043066	<i>negative regulation of apoptosis</i>	8	142	0,00951
GO:0043067	<i>regulation of programmed cell death</i>	16	354	0,00113
GO:0043068	<i>positive regulation of programmed cell death</i>	6	158	0,0942
GO:0043069	<i>negative regulation of programmed cell death</i>	8	144	0,0101
GO:0043086	<i>negative regulation of catalytic activity</i>	4	45	0,0296
GO:0043122	<i>regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade</i>	2	13	0,0702
GO:0043123	<i>positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade</i>	2	11	0,064
GO:0043154	<i>negative regulation of caspase activity</i>	2	4	0,0129
GO:0043367	<i>CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation</i>	3	11	0,00618
GO:0045064	<i>T-helper 2 cell differentiation</i>	2	4	0,0129
GO:0045073	<i>regulation of chemokine biosynthetic process</i>	2	7	0,0329
GO:0045074	<i>regulation of interleukin-10 biosynthetic process</i>	1	1	0,0702
GO:0045082	<i>positive regulation of interleukin-10 biosynthetic process</i>	1	1	0,0702
GO:0045087	<i>innate immune response</i>	6	81	0,0103
GO:0045321	<i>leukocyte activation</i>	11	195	0,00238
GO:0045408	<i>regulation of interleukin-6 biosynthetic process</i>	2	8	0,0403
GO:0045449	<i>regulation of transcription</i>	35	1751	0,0811
GO:0045630	<i>positive regulation of T-helper 2 cell</i>	1	1	0,0702

	<i>differentiation</i>			
GO:0045727	<i>positive regulation of translation</i>	5	38	0,00345
GO:0045908	<i>negative regulation of vasodilatation</i>	1	1	0,0702
GO:0045994	<i>positive regulation of translational initiation by iron</i>	1	1	0,0702
GO:0046323	<i>glucose import</i>	2	6	0,0255
GO:0046324	<i>regulation of glucose import</i>	2	6	0,0255
GO:0046325	<i>negative regulation of glucose import</i>	2	3	0,00774
GO:0046328	<i>regulation of JNK cascade</i>	2	15	0,0821
GO:0046330	<i>positive regulation of JNK cascade</i>	2	9	0,0482
GO:0046631	<i>alpha-beta T cell activation</i>	3	31	0,0611
GO:0046632	<i>alpha-beta T cell differentiation</i>	3	21	0,0259
GO:0046649	<i>lymphocyte activation</i>	9	179	0,00998
GO:0046651	<i>lymphocyte proliferation</i>	4	70	0,0745
GO:0048305	<i>immunoglobulin secretion</i>	2	11	0,064
GO:0048518	<i>positive regulation of biological process</i>	24	788	0,00165
GO:0048519	<i>negative regulation of biological process</i>	22	832	0,0164
GO:0048523	<i>negative regulation of cellular process</i>	22	774	0,00654
GO:0048534	<i>hemopoietic or lymphoid organ development</i>	8	220	0,0688
GO:0048869	<i>cellular developmental process</i>	34	1570	0,0382
GO:0050708	<i>regulation of protein secretion</i>	2	14	0,0745
GO:0050755	<i>chemokine metabolic process</i>	2	7	0,0329
GO:0050776	<i>regulation of immune response</i>	7	96	0,00561
GO:0050778	<i>positive regulation of immune response</i>	6	83	0,0115
GO:0050789	<i>regulation of biological process</i>	72	3254	0,00014

GO:0050794	<i>regulation of cellular process</i>	66	2930	0,00021
GO:0050896	<i>response to stimulus</i>	54	1446	9,39E-14
GO:0051005	<i>negative regulation of lipoprotein lipase activity</i>	1	1	0,0702
GO:0051023	<i>regulation of immunoglobulin secretion</i>	2	6	0,0255
GO:0051051	<i>negative regulation of transport</i>	2	16	0,0915
GO:0051092	<i>activation of NF-kappaB transcription factor</i>	2	13	0,0702
GO:0051239	<i>regulation of multicellular organismal process</i>	10	252	0,0237
GO:0051240	<i>positive regulation of multicellular organismal process</i>	7	103	0,00745
GO:0051247	<i>positive regulation of protein metabolic process</i>	5	65	0,0196
GO:0051249	<i>regulation of lymphocyte activation</i>	4	78	0,0976
GO:0051336	<i>regulation of hydrolase activity</i>	5	104	0,0702
GO:0051348	<i>negative regulation of transferase activity</i>	3	37	0,0702
GO:0051704	<i>multi-organism process</i>	12	168	0,0002
GO:0051707	<i>response to other organism</i>	12	110	2,89E-06
GO:0051726	<i>regulation of cell cycle</i>	11	332	0,0439
GO:0052547	<i>regulation of peptidase activity</i>	1	1	0,0702
GO:0055088	<i>lipid homeostasis</i>	2	15	0,0821
GO:0055092	<i>sterol homeostasis</i>	2	15	0,0821
GO:0065007	<i>biological regulation</i>	75	3583	0,00071

GO:0065009	regulation of molecular function	9	297	0,0922
------------	----------------------------------	---	-----	--------

L'analyse d'enrichissement fut réalisée à l'aide du logiciel GOstat : (<http://gostat.wehi.edu.au/>) en utilisant tous les gènes figurant sur la micropuce (*Mouse Genome* 430 2.0; Affimetrix) comme référence. Un test de Fisher est utilisé afin de déterminer si les différences observées sont significatives ou non. Suite à une correction de Benjamini pour le taux de fausses découvertes, les catégories dont la valeur de $P < 0,01$ sont retenues. Les résultats sont présentés en ordre croissant suivant la numérotation de l'Ontologie Génétique.

**Annexe 2 : Processus biologiques de l'Ontologie Génétique
surreprésentés sous l'influence du 17 β E auprès de cellules
stromales CD44+.**

<i>GO ID</i>	<i>Biological Process Category</i>	<i>17βE regulated gene</i>	<i>Total gene on chip</i>	<i>P value</i>
GO:0006955	<i>immune response</i>	34	356	2,47E- 23
GO:0002376	<i>immune system process</i>	43	579	2,08E- 20
GO:0006952	<i>defense response</i>	28	352	2,94E- 14
GO:0009605	<i>response to external stimulus</i>	26	398	3,32E- 09
GO:0006954	<i>inflammatory response</i>	20	188	7,24E- 08
GO:0009611	<i>response to wounding</i>	23	263	1,42E- 07
GO:0006950	<i>response to stress</i>	34	687	3,85E- 07
GO:0050789	<i>regulation of biological process</i>	92	3254	0,0009
GO:0065007	<i>biological regulation</i>	99	3583	0,0009
GO:0001816	<i>cytokine production</i>	10	93	0,0009
GO:0008219	<i>cell death</i>	26	600	0,00095
GO:0016265	<i>death</i>	26	600	0,00095
GO:0042981	<i>regulation of apoptosis</i>	18	351	0,00097
GO:0006915	<i>apoptosis</i>	25	571	0,00097

GO:0043067	<i>regulation of programmed cell death</i>	18	354	0,00105
GO:0012501	<i>programmed cell death</i>	25	578	0,00114
GO:0050794	<i>regulation of cellular process</i>	83	2930	0,00148
GO:0009607	<i>response to biotic stimulus</i>	12	153	0,00168
GO:0009891	<i>positive regulation of biosynthetic process</i>	7	49	0,00168
GO:0032615	<i>interleukin-12 production</i>	4	11	0,00174
GO:0051707	<i>response to other organism</i>	10	110	0,00189
GO:0045727	<i>positive regulation of translation</i>	6	38	0,00279
GO:0048518	<i>positive regulation of biological process</i>	30	788	0,00279
GO:0042330	<i>taxis</i>	9	95	0,00279
GO:0006935	<i>chemotaxis</i>	9	95	0,00279
GO:0051092	<i>activation of NF-kappaB transcription factor</i>	4	13	0,00281
GO:0031328	<i>positive regulation of cellular biosynthetic process</i>	6	40	0,0033
GO:0001817	<i>regulation of cytokine production</i>	5	26	0,00367
GO:0048869	<i>cellular developmental process</i>	49	1570	0,00535
GO:0030154	<i>cell differentiation</i>	49	1570	0,00535
GO:0007154	<i>cell communication</i>	68	2387	0,00535
GO:0001773	<i>myeloid dendritic cell activation</i>	3	7	0,00652
GO:0001819	<i>positive regulation of cytokine production</i>	4	17	0,00695
GO:0042035	<i>regulation of cytokine biosynthetic process</i>	6	48	0,0074
GO:0032502	<i>developmental process</i>	71	2558	0,00752

GO:0045321	<i>leukocyte activation</i>	12	195	0,00752
GO:0002286	<i>T cell activation during immune response</i>	3	8	0,00752
GO:0002292	<i>T cell differentiation during immune response</i>	3	8	0,00752
GO:0002293	<i>alpha-beta T cell differentiation during immune response</i>	3	8	0,00752
GO:0002294	<i>CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation during immune response</i>	3	8	0,00752
GO:0042093	<i>T-helper cell differentiation</i>	3	8	0,00752
GO:0002285	<i>lymphocyte activation during immune response</i>	3	8	0,00752
GO:0002335	<i>mature B cell differentiation</i>	2	2	0,00752
GO:0042832	<i>defense response to protozoan</i>	2	2	0,00752
GO:0032655	<i>regulation of interleukin-12 production</i>	2	2	0,00752
GO:0051091	<i>positive regulation of transcription factor activity</i>	4	19	0,00788
GO:0007165	<i>signal transduction</i>	62	2178	0,00813
GO:0016477	<i>cell migration</i>	14	262	0,00879
GO:0002263	<i>cell activation during immune response</i>	3	9	0,00974
GO:0002366	<i>leukocyte activation during immune response</i>	3	9	0,00974
GO:0042221	<i>response to chemical stimulus</i>	14	295	0,0104
GO:0001775	<i>cell activation</i>	12	209	0,0109

GO:0042107	<i>cytokine metabolic process</i>	6	56	0,0109
GO:0042089	<i>cytokine biosynthetic process</i>	6	56	0,0109
GO:0048522	<i>positive regulation of cellular process</i>	25	685	0,0135
GO:0051090	<i>regulation of transcription factor activity</i>	4	23	0,0139
GO:0043367	<i>CD4-positive, alpha beta T cell differentiation</i>	3	11	0,0162
GO:0006928	<i>cell motility</i>	14	307	0,0162
GO:0051674	<i>localization of cell</i>	14	307	0,0162
GO:0046325	<i>negative regulation of glucose import</i>	2	3	0,0162
GO:0001562	<i>response to protozoan</i>	2	3	0,0162
GO:0001660	<i>fever</i>	2	3	0,0162
GO:0009889	<i>regulation of biosynthetic process</i>	9	139	0,0189
GO:0009620	<i>response to fungus</i>	3	12	0,0189
GO:0051704	<i>multi-organism process</i>	10	168	0,0189
GO:0051247	<i>positive regulation of protein metabolic process</i>	6	65	0,0197
GO:0006953	<i>acute-phase response</i>	4	27	0,0218
GO:0002526	<i>acute inflammatory response</i>	6	67	0,0224
GO:0006417	<i>regulation of translation</i>	8	117	0,0226
GO:0006959	<i>humoral immune response</i>	5	48	0,0271
GO:0046649	<i>lymphocyte activation</i>	10	179	0,0271
GO:0043154	<i>negative regulation of caspase activity</i>	2	4	0,0271
GO:0045064	<i>T-helper 2 cell differentiation</i>	2	4	0,0271

GO:0031326	<i>regulation of cellular biosynthetic process</i>	8	124	0,0304
GO:0042108	<i>positive regulation of cytokine biosynthetic process</i>	4	31	0,0329
GO:0048523	<i>negative regulation of cellular process</i>	26	774	0,035
GO:0051726	<i>regulation of cell cycle</i>	14	332	0,0364
GO:0002768	<i>immune response-regulating cell surface receptor signaling pathway</i>	4	33	0,0399
GO:0045084	<i>positive regulation of interleukin-12 biosynthetic process</i>	2	5	0,0413
GO:0006469	<i>negative regulation of protein kinase activity</i>	4	35	0,0478
GO:0033673	<i>negative regulation of kinase activity</i>	4	35	0,0478
GO:0048519	<i>negative regulation of biological process</i>	27	832	0,0483
GO:0030097	<i>hemopoiesis</i>	10	198	0,0491
GO:0048468	<i>cell development</i>	32	1039	0,0496
GO:0002764	<i>immune response-regulating signal transduction</i>	4	36	0,0505
GO:0042110	<i>T cell activation during immune response</i>	7	111	0,0517
GO:0051348	<i>negative regulation of transferase activity</i>	4	37	0,0517
GO:0051023	<i>regulation of immunoglobulin secretion</i>	2	6	0,0517

L

GO:0046324	<i>regulation of glucose import</i>	2	6	0,0517
GO:0043011	<i>myeloid dendritic cell differentiation</i>	2	6	0,0517
GO:0031649	<i>heat generation</i>	2	6	0,0517
GO:0042092	<i>T-helper 2 type immune response</i>	2	6	0,0517
GO:0046323	<i>glucose import</i>	2	6	0,0517
GO:0002520	<i>immune system development</i>	11	236	0,0517
GO:0046632	<i>alpha-beta T cell differentiation</i>	3	21	0,0662
GO:0045075	<i>regulation of interleukin-12 biosynthetic process</i>	2	7	0,0662
GO:0007098	<i>centrosome cycle</i>	2	7	0,0662
GO:0042090	<i>interleukin-12 biosynthetic process</i>	2	7	0,0662
GO:0042033	<i>chemokine biosynthetic process</i>	2	7	0,0662
GO:0045073	<i>regulation of chemokine biosynthetic process</i>	2	7	0,0662
GO:0050755	<i>chemokine metabolic process</i>	2	7	0,0662
GO:0002252	<i>immune effector process</i>	7	119	0,0673
GO:0007626	<i>locomotory behavior</i>	9	181	0,0673
GO:0032501	<i>multicellular organismal process</i>	64	2509	0,0714
GO:0002253	<i>activation of immune response</i>	5	66	0,0724
GO:0009617	<i>response to bacterium</i>	5	67	0,0764
GO:0048534	<i>hemopoietic or lymphoid organ development</i>	10	220	0,0779
GO:0002521	<i>leukocyte differentiation</i>	7	124	0,0779
GO:0045408	<i>regulation of interleukin-6 biosynthetic process</i>	2	8	0,0779
GO:0042226	<i>interleukin-6 biosynthetic process</i>	2	8	0,0779
GO:0032602	<i>chemokine production</i>	2	8	0,0779

GO:0051297	<i>centrosome organization and biogenesis</i>	2	8	0,0779
GO:0042088	<i>T-helper 1 type immune response</i>	2	8	0,0779
GO:0007166	<i>cell surface receptor linked signal transduction</i>	34	1170	0,0785
GO:0050776	<i>regulation of immune response</i>	6	96	0,0785
GO:0043086	<i>negative regulation of catalytic activity</i>	4	45	0,0821
GO:0032943	<i>mononuclear cell proliferation</i>	5	70	0,0822
GO:0046651	<i>lymphocyte proliferation</i>	5	70	0,0822
GO:0002682	<i>regulation of immune system process</i>	6	98	0,0835
GO:0042742	<i>defense response to bacterium</i>	4	46	0,0857
GO:0046330	<i>positive regulation of JNK cascade</i>	2	9	0,0916
GO:0031023	<i>microtubule organizing center organization and biogenesis</i>	2	9	0,0916
GO:0002274	<i>myeloid leukocyte activation</i>	3	26	0,0968

L'analyse d'enrichissement fut réalisée à l'aide du logiciel Gostat : (<http://gostat.wehi.edu.au/>) en utilisant tous les gènes figurant sur la micropuce (*Mouse Genome 430 2.0*; Affimetrix) comme référence. Un test de Fisher est utilisé afin de déterminer si les différences observées sont significatives ou non. Suite à une correction de Benjamini pour le taux de fausses découvertes, les catégories dont la valeur de $P < 0,01$ sont retenues. Les résultats sont présentés en ordre croissant suivant la numérotation de l'Ontologie Génétique.