

Université  
de Toulouse

# THÈSE

**En vue de l'obtention du  
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

Physiologie

---

**Présentée et soutenue par :**

Anne ABOT

**le :** 12 Septembre 2013

**Titre :**

Dissection moléculaire de la fonction activatrice AF-1 du récepteur aux œstrogènes alpha dans la physiopathologie vasculaire et la prolifération utérine

---

**Ecole doctorale :**

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

**Unité de recherche :**

Unité INSERM 1048, I2MC, Equipe 9

**Directeur(s) de Thèse :**

Pr. Jean-François ARNAL et Dr. Coralie FONTAINE

**Rapporteurs :**

Dr. Muriel Le ROMANCER

Dr. Farzad PAKDEL

**Membre(s) du jury :**

Pr. Jean-Michel FOIDART

Dr. Marc POIROT

Dr. Muriel Le ROMANCER

Dr. Farzad PAKDEL

Pr. Jean-François ARNAL

Dr. Coralie FONTAINE

**A Corentin,**

*Ancien collègue et vrai génie de la Science, parti trop tôt, sans t'avoir connu, je ne me serai jamais lancée dans la grande aventure de la thèse...*

**A Charlotte,**

*Ma fille, pour que jamais tu n'oublies que malgré les difficultés, il faut toujours faire ce dont tu as vraiment envie dans la vie, l'important c'est d'y croire !*

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »

François Rabelais, Pantagruel



## **AVANT-PROPOS**

L'histoire commence en 1986, entre la mise en orbite de la station Mir, l'accident de Tchernobyl et le décès de Coluche, deux équipes ont fait une grande découverte, celle du récepteur aux œstrogènes (ER). Une petite protéine capable de grandes choses, qui déchaîne les passions scientifiques. 59468 entrées sur Pubmed à ce jour, qui dit mieux ? Le rôle de ce facteur de transcription est de relayer la signalisation œstrogénique impliquée dans la majorité des processus biologiques. La dérégulation de son expression est liée à un grand nombre de pathologies comme les cancers du sein et de l'endomètre ainsi que les maladies cardiovasculaires. De plus, à la ménopause, les œstrogènes, en association avec un progestatif, sont prescrits pour pallier aux troubles climatériques. La spécificité d'action tissulaire du récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  permet l'utilisation de modulateurs sélectifs de ce récepteur (SERM) dans le traitement de diverses autres pathologies. Le meilleur exemple est le tamoxifène qui module l'effet prolifératif des œstrogènes de manière tissu spécifique : il est utilisé, pour ces propriétés antagonistes dans le traitement du cancer du sein mais il possède des propriétés agonistes sur l'utérus et augmente donc le risque de cancer de l'endomètre. Ainsi ces différents traitements hormonaux restent donc à être améliorés, ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces effets. Le choix de la prescription de ces traitements reste donc à la charge du médecin et de la patiente après évaluation du ratio bénéfices/risques. Ainsi, une meilleure compréhension du mode d'activation du ER $\alpha$  et de sa modulation permettrait d'améliorer ces différents traitements.

Mon équipe a préalablement démontré que l'ER $\alpha$  est nécessaire pour l'action bénéfique du 17 $\beta$ -œstradiol (E2), le principal œstrogène naturel, sur le système cardiovasculaire.

ER $\alpha$  régule la transcription de gènes cibles *via* deux fonctions activatrices (AF) indépendantes ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2. Le but de mon travail de thèse a été de préciser l'implication de ces fonctions activatrices, *in vivo*, dans les effets bénéfiques de l'activation du ER $\alpha$  sur le système cardiovasculaire et les effets de cette activation sur la prolifération utérine.

Dans la première partie d'introduction de ce manuscrit, nous nous livrerons à une étude bibliographique portant sur la structure et les fonctions des récepteurs stéroïdiens et en particulier du ER $\alpha$ . Puis, nous ferons un bilan des effets vasculaires des œstrogènes et du tamoxifène en santé humaine mais également dans les modèles animaux expérimentaux. Nous nous attacherons ensuite à décrire les effets de ces deux molécules dans la prolifération utérine.

La deuxième partie de ce manuscrit consistera en l'exposé de mes travaux expérimentaux démontrant l'implication d'ER $\alpha$ AF-1 en réponse au tamoxifène, agoniste sélectif d'ER $\alpha$ AF-1, connu pour exercer lui aussi un effet vasculoprotecteur. Ensuite, je me suis intéressée au revers de la médaille en étudiant le rôle d'ER $\alpha$ AF-1 dans la prolifération utérine en réponse à l'E2 ou au tamoxifène.

Pour finir, je discuterai de l'ensemble de ces résultats et nous détaillerons les perspectives découlant de ce travail.

## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, **Pr. Foidart**, **Dr. Poirot** et particulièrement mes rapporteurs **Dr. Le Romancer** et **Dr. Pakdel** qui m'ont fait l'honneur de corriger, juger et apporter leur esprit critique à ce travail.*

*J'adresse un grand merci à toutes les personnes qui ont croisé ma route et m'ont supporté durant ces 4 années de dur labeur !*

*Je voudrais tout particulièrement témoigner ici mon entière et sincère reconnaissance à mes deux directeurs de thèse (et oui, moi j'ai eu la chance d'en avoir deux pour moi toute seule !), **Pr. Jean-François Arnal** et **Dr. Coralie Fontaine**. **Jean-François**, merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir encouragé à toujours donner mon maximum, parce qu'au final, ça a payé et grâce à cela, je peux dire aujourd'hui que je suis fière de ma thèse. **Coralie**, tu m'as appris énormément surtout cette dernière année de thèse, tant sur le plan humain que professionnel. J'admire ta capacité à mener à bien tes projets de recherche sans jamais faire ressentir une quelconque supériorité hiérarchique. Tu es un formidable exemple pour moi et j'ai adoré travailler avec toi.*

*Un grand merci à ma « girl's-power-band » : Aurélie, Marine et Mélissa. Les filles, vous avez été d'un soutien sans faille dans les bons et les mauvais moments. Vous savez déjà ce que je pense de vous sur le plan personnel, mais vous m'avez aussi beaucoup apporté sur le plan professionnel (et ça je ne vous l'ai jamais dit !). **Aurélie**, j'adourais discuter manip avec toi. Tu m'as appris que la clarté et la précision des propos sont importantes pour expliquer les résultats et les hypothèses de manière pédagogique pour transmettre au mieux les savoirs. Tu es une formatrice hors pair. **Marine**, cela a été très stimulant de travailler à tes côtés. Je suis sûre d'une chose, la vitesse à laquelle tu percutes les concepts, ta pertinence et ton esprit critique te mèneront loin dans la recherche, **Mélissa**, ma Sophie, je sais que je ne retrouverai jamais un binôme comme toi. Avec toi, les manips étaient un véritable ballet où tout s'accordait parfaitement. Cette pièce ARN, pourtant horrible, exigüe et sans fenêtre, restera pour moi la pièce dans laquelle notre amitié est née. On s'est tout dit dans cette pièce, heureusement que les murs n'ont pas d'oreilles ! J'espère qu'un jour tu te rendras compte que tu vaux de l'or dans un labo : des doigts de fée pour les manips, l'envie de toujours*

*creuser et comprendre ce que tu fais et une conscience professionnelle hors-norme.*

*Merci à Henrik, alias « mon p'tit Glut ». Toi, on pourra dire que tu m'as vraiment supporté ! Je n'ai pas toujours été tendre avec toi mais j'admire ton savoir. Tu es une bible de connaissances et je te remercie de m'avoir fait profiter de cela, surtout pendant la phase de rédaction.*

*Un énorme merci à Hortense pour m'avoir tracté autant pour la manipulation animale. Et oui, après avoir pleuré pendant 2h dans le couloir quand j'ai euthanasié ma première souris, tu as eu du fil à retordre ! Merci à Jiss, d'avoir supporté toutes mes conversations de fille et pour ton efficacité : je tiens à dire ici qu'en 4 an, pas une erreur de screen ! Je vous souhaite plein de bonheur dans vos projets à tous les 2. Merci à Fred pour les entraînements « non-marathoniens ». Merci aussi à Marie-Jo et Guy, on ne s'est pas croisé longtemps mais ça m'a fait plaisir de vous avoir rencontré.*

*Merci à Isabelle, Céline, Fred et tout particulièrement Jean-José pour votre aide afin de mener à bien ce travail. Jean-José, grâce à vous, j'ai appris qu'on pouvait tracer sa route sans cultiver l'élitisme qui me fait horreur et que la mutualisation des personnes et des techniques permettait de faire avancer la recherche, bien plus que de faire ses petites manips en solo sur un coin de paillasse. J'ai découvert chez vous, une très belle philosophie de la vie. Je vous dois beaucoup aujourd'hui.*

*Un grand merci aussi à Elo (R), Sandra, Audrey, Alexia et Elo (C) pour toutes nos discussions scientifiques et papotages « hautement œstrogéniques ».*

*Merci à Pierre et Françoise, vous avez toujours répondu présents quand j'avais besoin de vous.*

*Merci à Eric, Christian, Coco, Stefania de m'avoir beaucoup écouté et conseillé, mais aussi Bernard et Natalia : vos conseils et votre ressenti particulièrement sur cette fin de thèse m'ont permis de vivre les choses un peu plus sereinement.*

*Enfin, un immense merci à mes parents, à Thibault : tu m'a toujours soutenu dans ce projet sans jamais te plaindre de toutes ces longues soirées et ces week-ends passés à travailler pour ma passion, et à Charlotte, ma première et grande passion. Mis à part le fait que grâce à toi, j'ai pu tester les effets d'une imprégnation chronique à l'œstradiol sur mon propre organisme, tu es et tu continueras d'être ma plus belle aventure humaine.*

*Et puis, même si maintenant je suis un peu nostalgique de ne plus baser mes recherches sur la Femme et d'explorer les mécanismes d'action du récepteur aux œstrogènes, je ne me sens pas loin de vous parce que, les œstrogènes, j'ai ça dans le sang !...*

*Grâce à vous tous, ma thèse restera un souvenir formidable, alors du fond du cœur,*

**Merci à tous...**



# **SOMMAIRE**

<b>AVANT-PROPOS.....</b>	3
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	5
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	13
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	15
<b>INTRODUCTION .....</b>	17
1    Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes .....	19
1.1    Une structure commune pour relayer des effets pléiotropiques .....	20
1.1.1    Le domaine N-terminal : plasticité et flexibilité .....	21
1.1.2    Le domaine de liaison à l'ADN : structure conservée.....	24
1.1.3    La région charnière : translocation et trafic cellulaire .....	25
1.1.4    Le domaine C-terminal : une hélice pour tout changer .....	25
1.1.5    Interactions entre les régions N- et C-terminale : importance du synergisme AF-1/AF-2	
28	
1.2    Le récepteur aux œstrogènes (ER) .....	29
1.2.1    Un peu d'histoire... .....	29
1.2.2    Deux types de récepteurs aux œstrogènes : ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	30
1.2.3    L'organisation génique et protéique de ER $\alpha$ .....	30
1.2.3.1    Le gène esr1.....	31
1.2.3.2    Les isoformes protéiques de ER $\alpha$ .....	31
1.3    La transduction du signal œstrogénique .....	33
1.3.1    Activation de la transcription ERE-dépendante ou voie classique .....	35
1.3.2    Activation de la transcription ERE-indépendante ou voie alternative .....	35
1.3.3    Activation ligand-indépendante .....	36
1.3.4    Les effets initiés à la membrane, la signalisation MISS .....	36
1.3.5    ER $\alpha$ AF-1, à la croisée de toutes les signalisations .....	37
1.4    Modulation de l'activité des ER.....	39
1.4.1    La nature du ligand, notion de SERM .....	39
1.4.2    La spécificité cellulaire de la contribution d'ER $\alpha$ AF-1 et d'ER $\alpha$ AF-2 .....	41
1.4.2.1    La spécificité du promoteur.....	42
1.4.2.2    La spécificité des cofacteurs recrutés .....	42
1.4.2.3    Le contexte cellulaire.....	44

1.4.2.4	Modulation par les différents sous types et isoformes d'ER.....	44
1.4.3	Les modifications post-traductionnelles .....	45
1.5	Les modèles murins d'inactivation génique.....	47
1.5.1	Les modèles murins invalidées pour la totalité du récepteur.....	47
1.5.2	Les modèles murines spécifiquement délétées pour les régions activatrices .....	49
2	Dissection de la transmission de la signalisation œstrogénique dans le système cardiovasculaire ..	50
2.1	L'athérosclérose : généralités .....	50
2.1.1	Structure de la paroi artérielle .....	50
2.1.2	La physiopathologie de l'athérosclérose .....	51
2.2	Les œstrogènes, hormones vasculoprotectrices.....	53
2.2.1	Données épidémiologiques et cliniques.....	53
2.2.1.1	Nous les femmes.....	53
2.2.1.2	La ménopause .....	53
2.2.1.3	Traitement hormonal substitutif, problématique clinique .....	53
2.2.2	Données expérimentales.....	54
2.2.2.1	L'athéroprotection .....	54
2.2.2.2	La ré-endothélialisation.....	55
2.2.2.3	La relaxation et la vasodilatation .....	56
2.2.3	L'endothélium, une cible privilégiée de l'E2.....	57
2.2.3.1	L'E2 prévient l'activation endothéliale.....	57
2.2.3.2	L'E2 protège les cellules endothéliales du stress oxydant .....	58
2.2.3.3	L'E2 favorise l'activité vasodilatatrice des cellules endothéliales .....	59
2.2.3.4	L'E2 modifie la balance prolifération/apoptose des cellules endothéliales.....	59
2.3	Le tamoxifène et la vasculo-protection.....	60
2.3.1	Données cliniques.....	60
2.3.2	Données expérimentales.....	61
2.3.2.1	Vasorelaxation.....	61
2.3.2.2	Athéroprotection.....	61
2.4	Implication de ER $\alpha$ dans les effets vasculo-protecteurs .....	61
2.4.1.1	Modèles murins déficients pour la totalité du ER .....	62
2.4.1.2	Modèles murins déficients sélectivement pour les fonctions activatrices .....	62
2.4.1.3	Modèles murins déficients sélectivement pour ER $\alpha$ dans un compartiment cellulaire spécifique .....	63
2.4.2	Signalisation transcriptionnelle relayée par ER $\alpha$ dans le système cardiovasculaire.....	63

2.4.2.1	Effets génomiques.....	63
2.4.2.2	Effets non-génomiques .....	64
3	Dissection de la transmission de la signalisation œstrogénique dans l'utérus.....	65
3.1	La prolifération utérine en réponse à l'E2, de la physiologie à la physiopathologie .....	65
3.1.1	Chez la femme.....	65
3.1.1.1	Cycle menstruel .....	66
3.1.1.1.1	Modifications morphologiques de l'utérus au cours du cycle .....	67
3.1.1.1.2	Régulation hormonale du cycle menstruel .....	67
3.1.1.2	Cancer de l'endomètre hormono-dépendant.....	68
3.1.2	Chez la souris.....	69
3.1.2.1	Anatomie de l'utérus chez la Souris .....	69
3.1.2.2	Le cycle œstral de la souris sous contrôle hormonal .....	71
3.1.2.3	La réponse utérine à l'E2 chez la souris, données expérimentales.....	72
3.1.2.4	Rôle de la progestérone dans la réponse utérine chez la souris.....	73
3.2	Implication du ER $\alpha$ dans l'hypertrophie utérine .....	74
3.2.1	Approche pharmacologique .....	74
3.2.1.1	Les agonistes spécifiques de ER $\alpha$ et ER $\beta$ .....	75
3.2.1.2	Le tamoxifène .....	75
3.2.2	Approche génétique .....	76
3.2.2.1	Modèles murins déficients pour la totalité du ER.....	76
3.2.2.2	Modèles murins déficients sélectivement pour les fonctions activatrices .....	77
3.2.2.3	La réponse utérine à l'E2 nécessite un LBD et un DBD de ER $\alpha$ fonctionnels .....	77
3.2.3	Implication des effets membranaires.....	79
3.2.4	Le dialogue entre le compartiment stromal et épithelial .....	80
3.2.5	Implication des facteurs de croissance .....	82
4	Dissection <i>in vivo</i> des mécanismes moléculaires impliqués dans la transduction du signal œstrogénique, vers un SERM idéal ?.....	85
4.1	Les SERM en clinique.....	85
4.2	Spécificité tissulaire de l'implication d'ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 <i>in vivo</i> .....	86
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX .....</b>		<b>89</b>
<b>Article 1 : Le tamoxifène exerce son effet athéroprotecteur <i>via</i> ER<math>\alpha</math>AF-1 mais n'accélère pas la ré-endothélialisation.....</b>		<b>91</b>
<b>Article 2 : ER<math>\alpha</math>AF-1 est nécessaire et suffisant pour la prolifération épithéliale utérine <i>in vivo</i>. ....</b>		<b>93</b>
.....		95

DISCUSSION.....	97
ANNEXES .....	109
<b>Annexe 1 : ER<math>\alpha</math>AF-2 est nécessaire pour l'effet athéroprotecteur de l'E2 mais pas pour accélérer la ré-endothélialisation.....</b>	109
<b>Annexe 2 : Correction du signal dérivé de l'ADN génomique dans les données de qPCR en temps réel avec ValidPrime. ....</b>	109
<b>Annexe 3 : Leçon sur la dissection des fonctions activatrices ER<math>\alpha</math>AF-1 et ER<math>\alpha</math>AF-2 <i>in vivo</i>......</b>	109
BIBLIOGRAPHIE .....	111

## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**

**Figure 1** : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (**page 18**)

**Figure 2** : Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et des récepteurs nucléaires en général (**page 19**)

**Figure 3** : Représentation schématique de l'organisation structurale du domaine N-terminal et de la fonction activatrice AF-1 des SHR (**page 20**)

**Figure 4** : Alignement de la séquence primaire de la partie N-terminale de ER $\alpha$  chez les Vertébrés (**page 21**)

**Figure 5** : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur aux œstrogènes (**page 22**)

**Figure 6** : Représentation schématique de la conformation du LBD de ER $\alpha$  en présence d'un agoniste (E2) ou d'un agoniste/antagoniste mixte, la raloxifène (RAL) (**page 24**)

**Figure 7** : Alignement de séquence du LBD et de ER $\alpha$ AF-2, région très conservée entre les espèces (**page 25**)

**Figure 8** : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes (**page 27**)

**Figure 9** : Comparaison des régions promotrices du gène *esr1* chez l'Homme, la souris, le rat, le poulet et la truite (**page 29**)

**Figure 10** : Isoformes ER $\alpha$  66 kDa, ER $\alpha$  46 kDa et ER $\alpha$  36 kDa générées par épissage alternatif ou via l'IRES (**page 30**)

**Figure 11** : Mécanismes d'action des ER (**page 32**)

**Figure 12** : Schéma représentatif de l'implication d'ER $\alpha$ AF-1 dans la convergence des voies génomiques (ligand-dépendante et ligand-indépendante) et « non-génomique » (**page 36**)

**Figure 13** : Structure chimique des différents ligands des récepteurs aux œstrogènes discutés dans ce manuscrit (**page 38**)

**Figure 14** : Modélisation des voies d'activation de la transcription via AP-1 dépendantes et indépendantes des fonctions activatrices d'ER $\alpha$  selon la nature du ligand (**page 39**)

**Figure 15** : Modifications post-traductionnelles du ER $\alpha$  (**page 44**)

**Figure 16** : Représentation schématique de la structure génique murine du ER $\alpha$  et les stratégies d'inactivation génique (**page 46**)

**Figure 17** : Représentation schématique de la stratégie d'inactivation génique de l'ER $\alpha$ AF-1 ou l'ER $\alpha$ AF-2 murin (**page 47**)

**Figure 18** : Structure de la paroi artérielle (**page 49**)

**Figure 19** : Initiation, progression et complication de la lésion d'athérome (**page 49**)

**Figure 20** : L'E2 influence les premiers stades de l'athérosclérose (**page 56**)

**Figure 21** : L'E2 possède des propriétés vasodilatatriques (**page 57**)

**Figure 22** : Signalisation membranaire dans les cavéoles des cellules endothéliales (**page 62**)

**Figure 23** : Représentation schématique du cycle menstruel chez la Femme : modifications hormonales et tissulaires associées (**page 64**)

**Figure 24** : Anatomie de l'appareil reproducteur chez la Souris (**page 68**)

**Figure 25** : Coupe transversale d'une corne utérine de souris colorée à l'hémalun-éosine (**page 68**)

**Figure 26** : Schéma représentatif du programme transcriptionnel associé à l'hypertrophie utérine en réponse à l'E2 (**page 71**)

**Figure 27** : Mécanismes d'interaction entre épithélium et stroma pour induire la prolifération épithéliale en réponse à l'E2 (**page 78**)

**Figure 28** : Mécanismes d'interactions fonctionnelles entre ER $\alpha$  et PR dans l'épithélium et le stroma pour induire la prolifération épithéliale en réponse à l'E2 (**page 79**)

**Figure 29** : Mécanismes paracrinés des facteurs de croissance pour induire la prolifération épithéliale utérine (**page 80**)

**Tableau 1** : Principaux récepteurs aux hormones stéroïdiennes (SHR) et pathologies associées (**page 17**)

**Tableau 2** : Liste non exhaustive des cofacteurs intervenant dans la régulation transcriptionnelle par les ER (**page 41**)

**Tableau 3** : Tableau récapitulatif des différents modèles murins invalidés ou mutés sur ER $\alpha$  : caractéristiques phénotypiques utérines et réponse utérine à différents ligands (**page 82**)

**Tableau 4** : Tableau récapitulatif des effets bénéfiques et délétères des principaux SERM en clinique ou en phase de développement (**page 84**)

**Tableau 5 et 5 bis** : Tableau récapitulatif de l'implication *in vivo* des fonctions activatrices ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 concernant les principaux effets bénéfiques et délétères de l'E2 (**page 85 et 97**)

**Tableau 6** : rôle respectif de ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 dans l'athéroprotection et l'accélération de la ré-endothélialisation de l'E2 et du tamoxifène (**page 100**)

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>aa</b> : Acide Aminé	<b>IL-8</b> : Interleukin-8
<b>ADN(c)</b> : Acide Désoxyribo-Nucléique (complémentaire)	<b>Kb</b> : Kilobase
<b>AF</b> : Activation Function	<b>LBD</b> : Ligand Binding Domain
<b>AP-1</b> : Activator Protein 1	<b>LH</b> : Luteinizing Hormone
<b>AR</b> : Androgen receptor	<b>L-NAME</b> : L-NG-Nitroarginine Methyl Ester
<b>ARNm</b> : Acide Ribo-Nucléique messager	<b>MAPK</b> : Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>CEE</b> : Conjugated Equine Estrogen	<b>MCP-1</b> : Monocyte Chemotactic Protein-1
<b>CML</b> : Cellule Musculaire Lisse	<b>MPA</b> : MedroxyProgesterone Acetate
<b>COX2</b> : Cyclooxygenase-2	<b>NCor</b> : Nuclear receptor CoRepressor
<b>DBD</b> : DNA Binding Domain	<b>NLS</b> : Nuclear Localization Signal
<b>DPN</b> : Diarylpropionitrile	<b>NO</b> : Nitric Oxide
<b>E1</b> : œstrone	<b>P4</b> : Progesterone
<b>E2</b> : 17 $\beta$ -œstradiol	<b>PGI2</b> : Prostaglandin I2
<b>E3</b> : œstriol	<b>PI3K</b> : Phospholnositide 3-kinase
<b>E4</b> : estetrol	<b>PPT</b> : 4,4',4''-(propyl-[ (1)H]-pyrazole-1,3,5-triyl) trisphenol
<b>EDC</b> : Estrogen Dendrimer Conjugate	<b>PR</b> : Progesterone Receptor
<b>EGF</b> : Epithelial Growth Factor	<b>RN</b> : Récepteur Nucléaire
<b>EGFR</b> : Epidermal Growth Factor Receptor	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen Species
<b>ERE</b> : Estrogen Responsive Element	<b>SERM</b> : Selective ER Modulator
<b>ER<math>\alpha</math></b> : Estrogen Receptor alpha	<b>SHR</b> : Steroid Hormone Receptor
<b>ER<math>\beta</math></b> : Estrogen Receptor beta	<b>Sp1</b> : Stimulating Protein 1
<b>FSH</b> : Follicule Stimulating Hormone	<b>SRC 1</b> : Steroid Receptor Co-activateur-1
<b>GR</b> : Glucocorticoid Receptor	<b>TGF<math>\beta</math></b> : Transforming Growth Factor beta
<b>ICAM-1</b> : InterCellular Adhesion Molecule 1	<b>THS</b> : Traitement Hormonal Substitutif
<b>ICI 182,780</b> : Flavestrant	<b>TNF<math>\alpha</math></b> : Tumor Necrosis Factor alpha
<b>IGF-1</b> : Insulin-like Growth Factor 1	<b>VCAM-1</b> : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b> : Interleukin-1 beta	<b>VEGF</b> : Vascular Endothelial Growth Factor



# **INTRODUCTION**



## 1 Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes

Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (SHR) appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires (RN). Les principaux SHR sont : le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), le récepteur aux androgènes (AR), le récepteur à la progestérone (PR) et les récepteurs aux œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ). Les SHR sont des régulateurs clés impliqués dans le contrôle d'un grand nombre de processus physiologiques indispensables à la vie tels que la reproduction, le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et l'homéostasie tissulaire ; mais également dans diverses pathologies (listées dans le tableau 1) incluant le cancer, le diabète et l'athérosclérose.

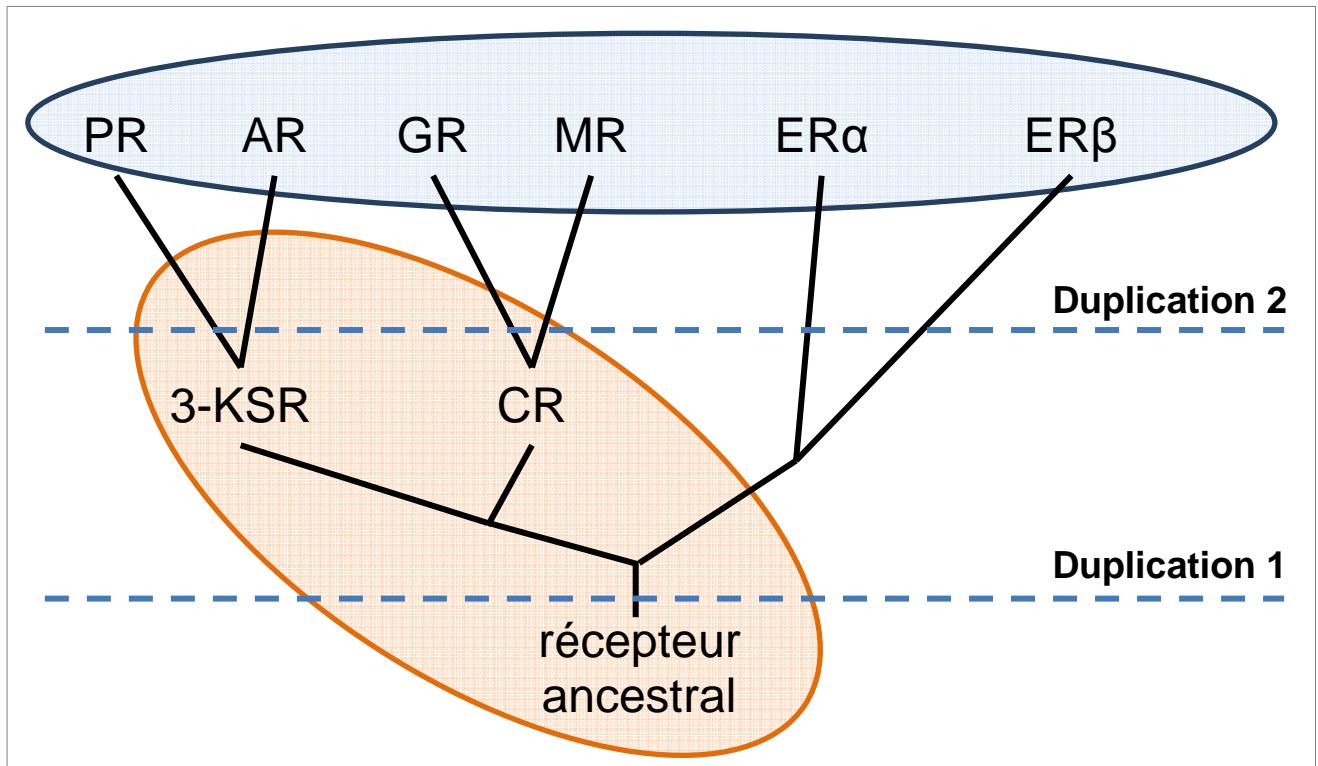
Les SHR sont des facteurs de transcription dont l'activité dépend majoritairement de la fixation de leur ligand respectif : les hormones stéroïdiennes (ou sexuelles), produites par l'organisme à partir du cholestérol. Les SHR régulent finement des programmes d'expression génique en se liant à des éléments de réponse spécifiques localisés sur l'ADN, dans les régions promotrices.

SHR	Ligands naturels	Pathologies associées
MR	aldostérone	cancer du rein, cancer du côlon, hypertension
GR	adrénocorticostéroïdes, cortisol	stress, dépression, leucémie, asthme, diabète
AR	testostérone, dihydrotestostérone	cancer de la prostate, infertilité
PR	progestérone	cancer du sein, cancer de l'endomètre, cancer ovarien, infertilité
ER $\alpha$	œstrogènes	cancer du sein, cancer de l'endomètre, cancer ovarien, infertilité, diabète, maladie d'Alzheimer, lupus, ostéoporose, endométriose, maladies cardiovasculaires
ER $\beta$	œstrogènes	cancer du côlon

**Tableau 1 : Principaux récepteurs aux hormones stéroïdiennes (SHR) et pathologies associées.**

Ces six SHR sont des acteurs clés dans le développement des Vertébrés. Ils dérivent, par duplication, d'un gène commun codant pour un récepteur ancestral présentant une structure proche du ER (Figure 1) (Thornton et al., 2003). Une première duplication génique, chez les

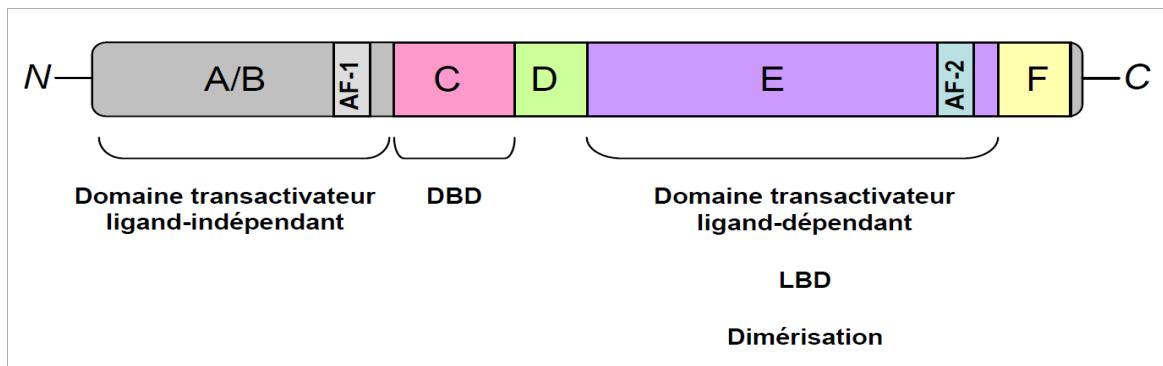
Vertébrés inférieurs, fait apparaître deux autres types de récepteurs stéroïdiens : le récepteur aux corticoïdes (CR) et le récepteur aux stéroïdes 3-ketogonadales (3-KSR). Chez les Vertébrés supérieurs (Gnathostomes), une deuxième duplication génique engendre les ER avec les caractéristiques connues à ce jour, le PR, le AR, le GR et le MR.



**Figure 1 :** Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Adapté de Thornton JW. et al, PNAS 2001).

### 1.1 Une structure commune pour relayer des effets pléiotropiques

Les SHR, comme tous les récepteurs nucléaires (RN), sont des facteurs de transcription présentant une structure fonctionnelle commune composée schématiquement : d'un domaine N-terminal (domaines fonctionnels A et B), un domaine de liaison à l'ADN (DBD, domaine C) lié grâce à une région charnière (domaine D) à un domaine C-terminal (domaines fonctionnels E et F) contenant un domaine de liaison au ligand (LBD) (Figure 2). Ces récepteurs comportent deux fonctions activatrices (AF) situées respectivement dans les domaines N- et C-terminaux.



**Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et des récepteurs nucléaires en général.**

### 1.1.1 Le domaine N-terminal : plasticité et flexibilité

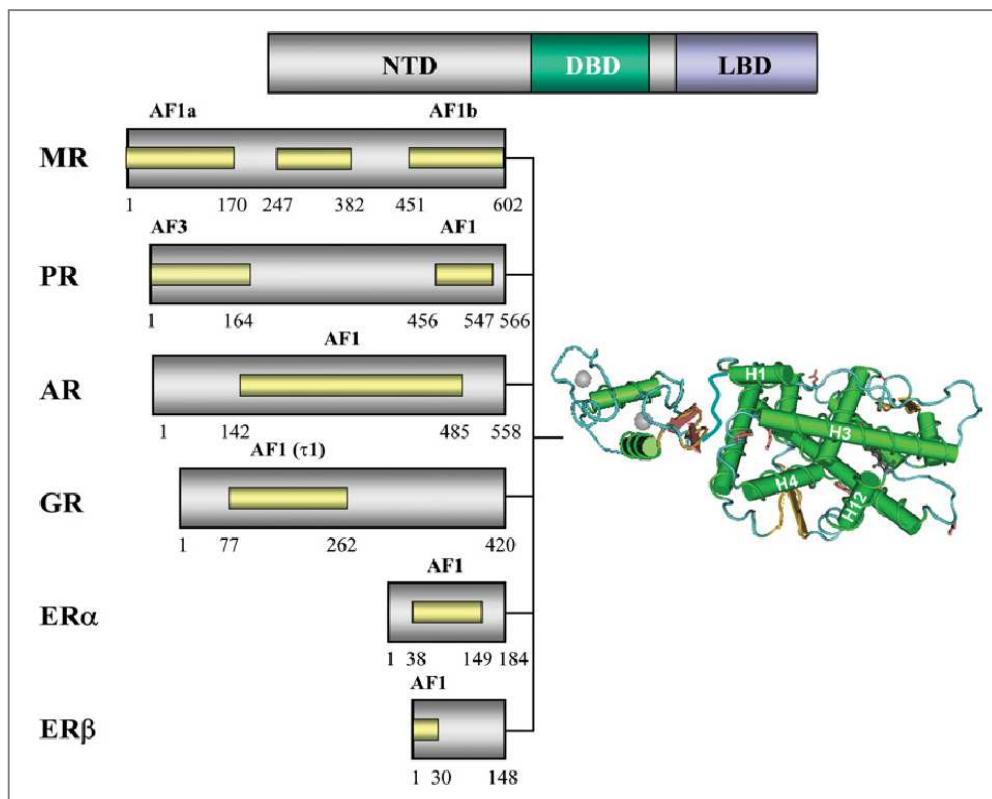
Cette région comprend les domaines A et B non structurés en solution (Warnmark et al., 2001). Le domaine N-terminal est une région dont la structure primaire et la longueur sont **très variables** entre les différents SHR. Ce domaine est particulièrement **non structuré** (présence de nombreuses régions de désordre intrinsèque) en condition aqueuse, ce qui rend son étude cristallographique impossible. Cette absence de conformation stable serait un avantage fonctionnel en permettant la formation rapide de structures selon l'environnement cellulaire : biodisponibilité des cofacteurs, conditions de pH, présence d'osmolytes (Hilser and Thompson, 2011; Kumar and Thompson, 2003; McEwan et al., 2007).

Le domaine N-terminal contient de multiples sites de phosphorylation régulés par des kinases comme les Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pour favoriser l'interaction des SHR avec d'autres cofacteurs afin de réguler l'activité transcriptionnelle en présence ou en absence de ligand. Ces phosphorylations permettent également de réguler l'activité et la **stabilité du récepteur** (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995; Rochette-Egly, 2003; Valley et al., 2005; Weigel, 1996).

La région N-terminale porte la fonction activatrice AF-1 qui peut relayer la **transcription de manière indépendante** de la liaison du ligand. Son activation est donc souvent nécessaire pour une activité transcriptionnelle totale (Bocquel et al., 1989; Kumar et al., 1987; Lees et al., 1989; McKenna and O'Malley, 2002; Metzger et al., 1995a). Le repliement conditionnel de ce domaine d'activation en hélice  $\alpha$ , grâce à ses propriétés hydrophobes, est un prérequis important pour son interaction avec des cofacteurs cibles (co-activateurs ou co-répresseurs) et donc pour la régulation génique (Kato et al., 1995; Kumar and Thompson, 2003).

La cartographie de l'AF-1 de chaque SHR a été réalisée par des approches de mutations ponctuelles ou de délétions ciblées du domaine N-terminal couplées à une protéine de fusion afin d'évaluer l'effet sur la transcription.

La présence d'une région activatrice ligand-indépendante dans le domaine N-terminal fut rapportée pour la première fois dans le GR. Giguere V. et al ont démontré l'importance de la région baptisée Tau1 (entre les acides aminés 77 et 262) dans la régulation de la transcription par le GR. Cette région Tau1, qui contient le domaine AF-1 du GR, assure 80% de l'activité transcriptionnelle relayée par le GR de pleine taille (Giguere et al., 1986; Hollenberg and Evans, 1988).



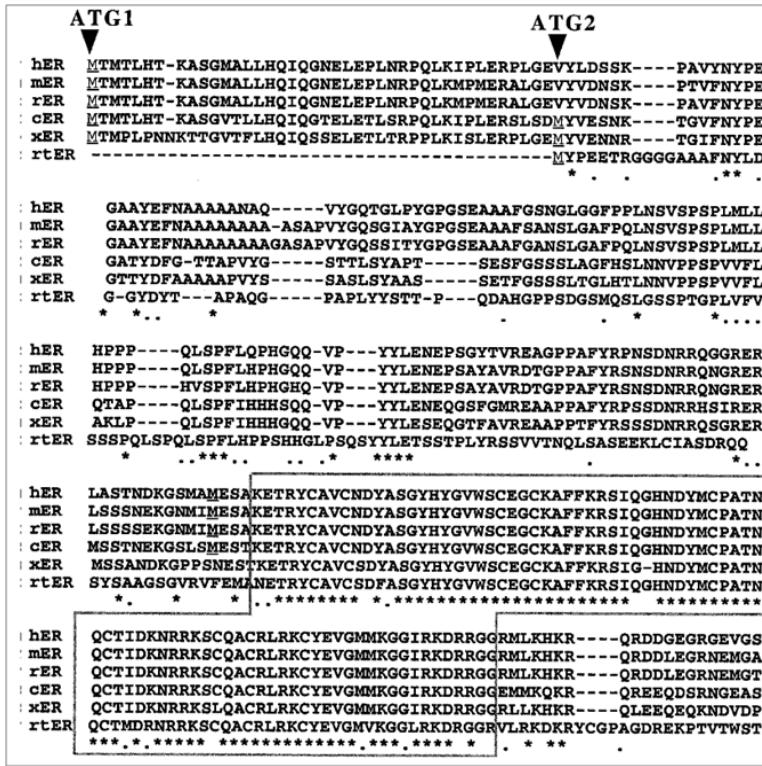
**Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation structurale du domaine N-terminal et de la fonction activatrice AF-1 des SHR (d'après Lavery DN & McEwan IJ, Biochem. J. 2005).**

Les autres SHR présentent une fonction AF-1 plus ou moins découpée le long du domaine N-terminal (Figure 3). Il est intéressant de noter que la région activatrice du domaine N-terminal du PR varie selon les isoformes. En effet, PR-A et PR-B possèdent tous deux l'AF-1 entre les acides aminés 456 et 558 mais PR-B, considéré comme un activateur transcriptionnel plus fort que PR-A, possède un domaine d'activation autonome nommé AF-3 situé entre les acides aminés 1 et 164 (Takimoto et al., 2003; Tung et al., 2001).

Malgré des propriétés structurales communes aux SHR, l'AF-1 présente un pouvoir activateur variable entre les SHR. Ainsi, la délétion ciblée de l'AF-1 du AR (Jenster et al., 1995; Simental et al., 1991) et GR (Hollenberg et al., 1987) réduit très fortement ou abolit l'activité transcriptionnelle relayée par le récepteur.

Concernant les ER, ER $\alpha$ AF-1 est divisé en deux parties distinctes : la « box 1 » ou « AF-1 core », incluant une hélice alpha au début du domaine B, responsable de l'interaction avec les cofacteurs comme SRC1 (Steroid Receptor Co-activateur-1) et la « box 2 », région riche en séries phosphorylables par des kinases (notamment les séries S104, S106 et S118) (McInerney and Katzenellenbogen, 1996; Metivier et al., 2001; Metivier et al., 2000; Metzger et al., 1995a). Il n'existe que 20% d'homologie entre le domaine A/B de l'humain et de la truite arc-en-ciel alors qu'ils possèdent la même activité ce qui témoigne de la conservation de l'activité activatrice ER $\alpha$ AF-1-dépendante au cours de l'évolution (Figure 4) (Metivier et al., 2000). En revanche, l'AF-1 d'ER $\beta$  possède un potentiel activateur faible incapable d'induire une activité transcriptionnelle ligand-indépendante (Delaunay et al., 2000; Kobayashi et al., 2000).

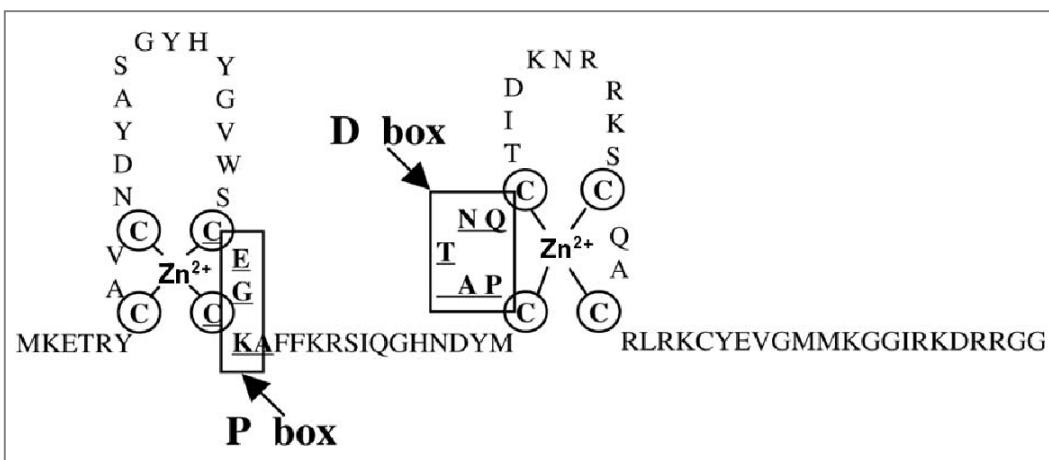
La fonction AF-1 est faiblement conservée entre les deux récepteurs aux œstrogènes avec seulement 18% d'homologie entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Seul un motif de 6 acides aminés de la box 1 d'ER $\alpha$ AF-1 (aa 49 à 54) est conservé dans ER $\beta$ AF-1 chez les Mammifères (Metzger et al., 1995a; White et al., 1987). Contrairement à ER $\alpha$ AF-1, ER $\beta$ AF-1 joue un rôle de répresseur transcriptionnel car sa délétion augmente l'activité transcriptionnelle (Hall and McDonnell, 1999).



**Figure 4 : Alignement de la séquence primaire de la région N-terminale du ER $\alpha$  chez les Vertébrés (humain hER, souris mER, rat rER, poulet cER, xénope xER et truite arc-en-ciel rtER).** Les étoiles indiquent les résidus conservés dans toutes les espèces. Les flèches marquent la position des méthionines initiatrices (ATG1 et ATG2). L'encadré marque le domaine C qui code pour le DBD très conservé. (D'après Griffin C. et al, Molecular Endocrinology 1999).

### 1.1.2 Le domaine de liaison à l'ADN : structure conservée

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) ou domaine C est très conservé selon les espèces. Il a été mis en évidence par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire et cristallographie (Gronemeyer and Moras, 1995). Cette région est caractérisée par une structure globulaire formée par deux hélices  $\alpha$  perpendiculaires, commune à tous les RN ainsi qu'à d'autres facteurs de transcription. Le DBD est divisé en deux sous-domaines invariables de huit cystéines arrangeées en deux groupes de quatre pour former deux doigts de zinc (Green et al., 1988). Celui situé en N-terminal, appelé P-box (proximal) est responsable de l'identification et la fixation initiale du SHR sur des motifs d'ADN spécifiques appelés HRE (Hormone Response Element). Alors que le doigt de zinc situé en C-terminal, appelé D-box (distal), lie l'ADN de manière moins spécifique et est impliqué dans la dimérisation du récepteur (homodimérisation ou hétérodimérisation avec d'autres facteurs de transcription) (Glass, 1994; Mader et al., 1989; Ruff et al., 2000). Le DBD du ER est extrêmement conservé entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  (97% d'homologie) (Figure 5).



**Figure 5 :** Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur aux œstrogènes. (D'après Ruff et al, Breast Cancer Res 2000).

### 1.1.3 La région charnière : translocation et trafic cellulaire

Le rôle de la région charnière (ou domaine D) est d'apporter une flexibilité structurelle permettant la rotation du DBD nécessaire à sa fixation orientée sur l'ADN. C'est une région très peu conservée entre les RN qui présente, toutefois, des caractéristiques communes à tous les SHR : un enrichissement en résidus basiques et une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) permettant la translocation du récepteur dans le noyau (Ylikomi et al., 1992).

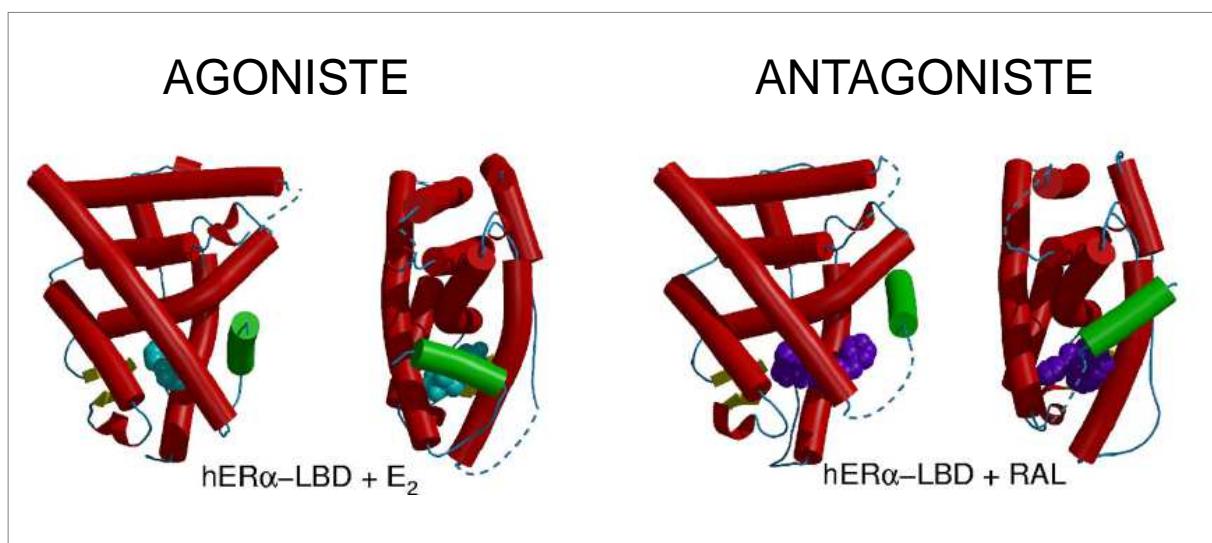
Alors que ER $\alpha$  présente plusieurs NLS, ER $\beta$  n'en possède qu'une seule. Cette séquence NLS permet d'induire la translocation nucléaire du récepteur activé par son ligand, mais régule également la localisation cytoplasmique ou nucléaire du récepteur à l'état basal, selon le type cellulaire (Burns et al., 2011; Metivier et al., 2004; Zhang et al., 2004). La composition et la longueur de cette région charnière affectent les interactions entre AF-1 et AF-2, et donc leur synergisme, et expliquent la différence de capacité d'activation entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Zwart et al., 2010).

### 1.1.4 Le domaine C-terminal : une hélice pour tout changer

Le domaine C-terminal des SHR est composé des domaines fonctionnels E et F.

Le LBD, situé dans le domaine E, est une séquence située en partie C-terminale du récepteur. Il est relativement conservé au sein des SHR. Sa structure a été mise en évidence par diffraction aux rayons X et cristallographie (Figure 6). Il contient l'AF-2 qui reconnaît les motifs LXXLL (L = Leucine et X = acide aminé variable) des cofacteurs transcriptionnels (Feng et al., 1998; Henttu et al., 1997). Ce domaine est structuré en 10 à 13 hélices  $\alpha$  selon les SHR, disposées en trois couches antiparallèles séparées par des feuillets  $\beta$  (Ruff et al., 2000). Les hélices 3, 4, 5 et 12 (contenant l'AF-2) forment une poche hydrophobe pour accueillir le ligand agoniste ou antagoniste.

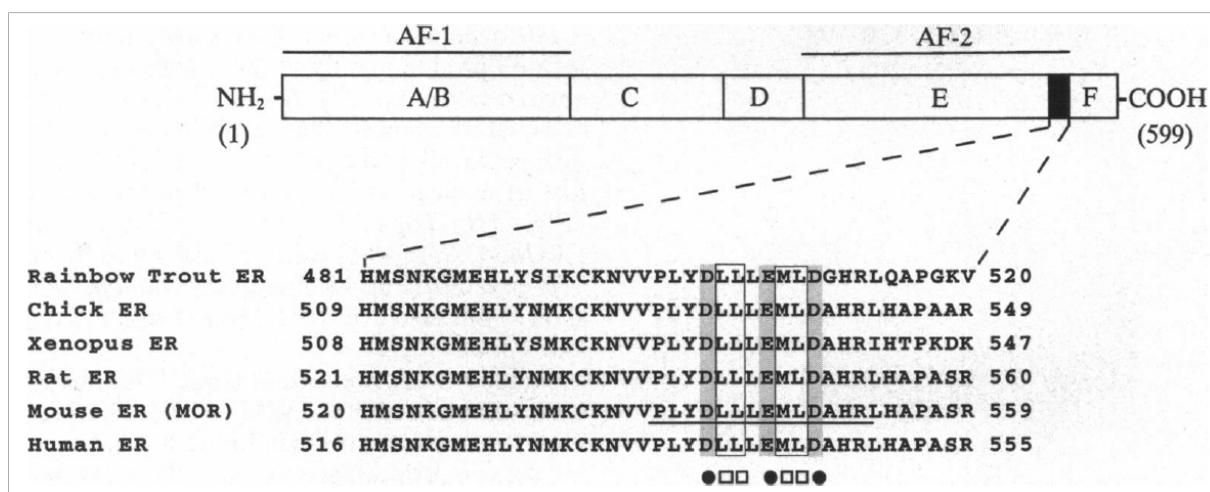
Ainsi, pour les ER, l'activation induite par la fixation de l'E2 se caractérise par un basculement de l'hélice H12 qui porte l'ER $\alpha$ AF-2 (Kumar et al., 1987; Lees et al., 1989; Webster et al., 1988) et qui referme la poche de liaison du ligand formée par les hélices H3, 6, 8, 11 et 12. Ce réarrangement s'accompagne d'une compaction générale du LBD et la création de nouvelles surfaces d'interaction accessibles pour la fixation de co-activateurs au niveau de l'ER $\alpha$ AF-2. En effet, la structure spatiale et l'accessibilité à la poche hydrophobe pour les différents cofacteurs de l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  dépendent de la position de l'hélice H12. Sous l'effet de la liaison de l'E2, par exemple, l'hélice H12 se positionne sur le ligand alors que sous l'action d'un antagoniste, elle ne peut se rabattre totalement (avec le ICI182,780) ou partiellement (avec le raloxifène) ce qui empêche l'exposition de la surface d'interaction avec les co-activateurs (Brzozowski et al., 1997; Nichols et al., 1998) (Figure 6). L'hélice H11 permet le contact pour l'homodimérisation du récepteur. La présence du ER $\alpha$ LBD seul est suffisant pour la dimérisation du récepteur (Peters and Khan, 1999).



**Figure 6 :** Représentation schématique de la conformation du LBD de ER $\alpha$  en présence d'un agoniste (E2) ou d'un agoniste/antagoniste mixte, la raloxifène (RAL).

En présence d'un agoniste, l'hélice H12 de ER $\alpha$  (en vert) est positionnée au-dessus de la cavité hydrophobe qui abrite le ligand. Cette conformation est empêchée par l'encombrement stérique de l'antagoniste. D'après Pike AC. et al, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2000.

Chez l'Homme, l'ER $\alpha$ AF-2 est divisé en deux parties : l' « AF-2 core » sur l'hélice H12 et l'AF-2a situé à l'intersection des domaines D et E (Norris et al., 1997; Tora et al., 1989; Webster et al., 1988). Chez la souris, ER $\alpha$ AF-2 se situe dans le domaine E mais la dissociation en deux parties n'a pas été étudiée (Danielian et al., 1992). Des mutations ponctuelles de ce domaine ont montré que les acides aminés hydrophobes L539 et L540 chez l'humain (correspondant aux acides aminés L543 et L544 chez la souris) sont essentiels à l'activation de la transcription ligand-dépendante sans affecter la fixation du ligand ni l'affinité pour l'ADN (Danielian et al., 1992; Ince et al., 1993). La mutation ponctuelle de ces acides aminés peut modifier les propriétés antagonistes de ligands, comme le tamoxifène et le ICI182,780, qui deviennent alors agonistes (Mahfoudi et al., 1995). De plus, les acides aminés D538, E542 et D445 chez l'humain (correspondant aux acides aminés D542, E546 et D449 chez la souris) sont impliqués dans l'activité ER $\alpha$ AF-2 en absence d'ER $\alpha$ AF-1, démontrant ainsi l'importance du synergisme des fonctions activatrices (Figure 7) (Danielian et al., 1992).



**Figure 7 : Alignement de séquence du LBD et de ER $\alpha$ AF-2, région très conservée entre les espèces.** Les carrés représentent les acides aminés hydrophobes nécessaires à l'activation ligand-dépendante et les ronds représentent les acides aminés chargés négativement impliqués dans l'activité ER $\alpha$ AF-2 en absence d'ER $\alpha$ AF-1. D'après Mahfoudi A. et al, PNAS 1995.

Le domaine F n'est pas clairement caractérisé mais il semblerait impliqué dans la régulation transcriptionnelle en favorisant la liaison avec certains cofacteurs selon la nature agoniste ou antagoniste du ligand (Montano et al., 1995; Nichols et al., 1998; Peters and Khan, 1999).

### 1.1.5 Interactions entre les régions N- et C-terminale : importance du synergisme AF-1/AF-2

Dans la majorité des cas, le plein effet transcriptionnel requiert une coopération entre AF-1 et AF-2. Ce synergisme se traduit soit par une association directe entre les AF, soit par des interactions indirectes impliquant des cofacteurs.

Certaines associations intramoléculaires physiques entre domaine N-terminal et LBD ont été démontrées dans la majorité des SHR afin de contrôler l'activité transcriptionnelle. Ainsi, dans le cas du PR-B (Tetel et al., 1999), du GR (Hittelman et al., 1999) et du AR (Doesburg et al., 1997; Ikonen et al., 1997), la présence d'un ligand agoniste induit une interaction directe entre AF-1 et AF-2 inexiste avec un ligand antagoniste. Dans le cas du AR, en présence de ligand, AF-2 interagit préférentiellement avec le motif FXXLF du domaine N-terminal (hélice  $\alpha$  des 25 premiers acides aminés) plutôt que de recruter d'autres cofacteurs, ce qui permet d'expliquer le faible potentiel activateur d'AF-2 du AR (He et al., 2004; He et al., 2000). Cette interaction FXXLF/AF-2 permet de stabiliser l'hélice H12 afin de ralentir la dissociation du ligand.

Des interactions indirectes entre les deux AF via des cofacteurs ont été rapportées. Par exemple, les co-activateurs de la famille p160 (SRC-1/TIF2) peuvent interagir avec les deux AF pour plusieurs SHR (McKenna et al., 1999; Metivier et al., 2001).

Les interactions directes et indirectes ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, en réponse à la progestérone, le domaine AF-3 du PR-B contenant deux motifs LXXLL, peut interagir soit avec la partie C-terminale du récepteur soit avec le co-activateur GRIP1 (famille p160). Ces deux types d'interactions sur les mêmes motifs d'AF-3 ne sont pas en compétition et sont nécessaires au plein effet transcriptionnel (Dong et al., 2004). D'autres interactions entre le domaine N-terminal et le LBD jouent un rôle fonctionnel dans la régulation transcriptionnelle. Ainsi, un motif polyQ (Q = glutamine) en partie situé dans la région AF-1 du AR réprime l'activité transcriptionnelle relayée par ce récepteur en empêchant l'interaction domaine N-terminal /LBD. Sa délétion totale ou partielle dans certaines pathologies (désordres neurodégénératifs, cancer de la prostate, infertilité) entraîne une augmentation de l'activité du AR en affectant l'association de celui-ci à l'ADN et

en renforçant l'interaction domaine N-terminal /LBD (Chamberlain et al., 1994; Harada et al., 2010; McEwan, 2001). La délétion du LBD (et donc de l'AF-2) engendre une activité transcriptionnelle résiduelle (pour AR) ou un récepteur constitutivement actif (pour GR), ce qui prouve que pour ce dernier, l'AF-2 joue un rôle de répresseur transcriptionnel de l'AF-1.

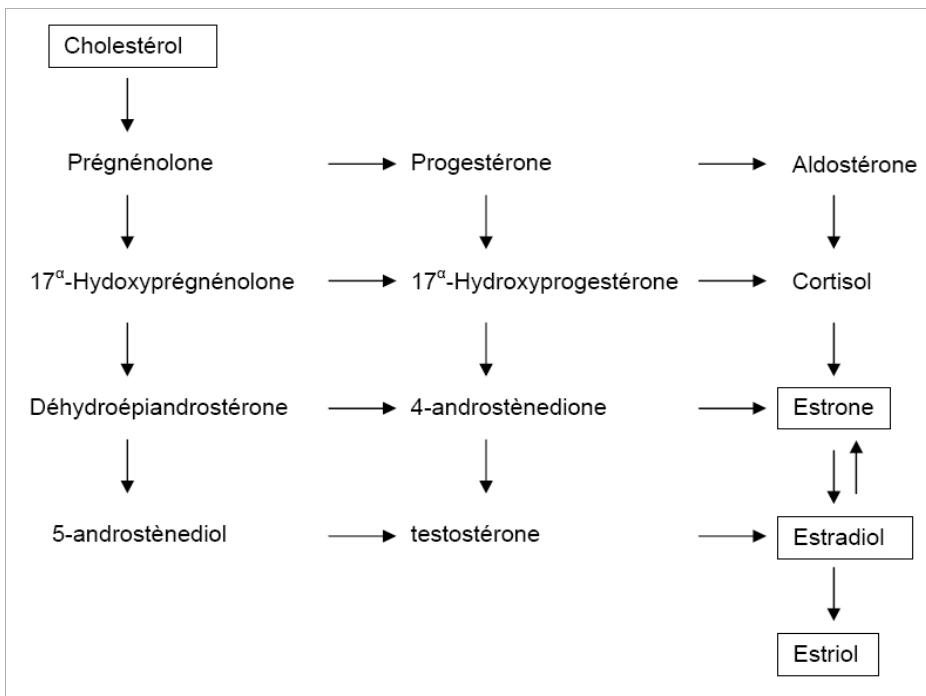
Le synergisme entre AF-1 et AF-2, concernant les ER, sera plus particulièrement décrit dans la partie 1.3.

Les interactions entre AF-1 et AF-2 mettent en évidence l'importance d'AF-1 dans la régulation transcriptionnelle car en plus de sa capacité à induire la transcription de manière ligand-indépendante, cette région contribue de manière significative à l'activation induite par un ligand.

## 1.2 Le récepteur aux œstrogènes (ER)

### 1.2.1 Un peu d'histoire...

Le ER est le plus ancien des SHR (Figure 1) (Thornton et al., 2003). Sa fonction de facteur de transcription induit par un ligand est traditionnellement connue pour être spécifique des Vertébrés. Chez les Vertébrés supérieurs, la signalisation œstrogénique relaie la féminisation alors que la signalisation androgénique régule la maturation reproductive chez le mâle. En revanche, chez les Vertébrés inférieurs (comme la Lamproie), l'AR est inexistant et le ER ancestral est responsable de la différenciation sexuelle et donc de la masculinisation (Thornton, 2001). Chez les Invertébrés (Mollusques et Céphalochordés), des orthologues de ER non-activables par les œstrogènes ont été mis en évidence. Il est intéressant de noter que malgré le caractère ancestral du ER, le  $17\beta$ -œstradiol (E2, principal œstrogène physiologique), ligand naturel de ce récepteur, est le dernier métabolite dans la chaîne de biosynthèse des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol (Figure 8).



**Figure 8 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des hormones stéroïdiennes.**

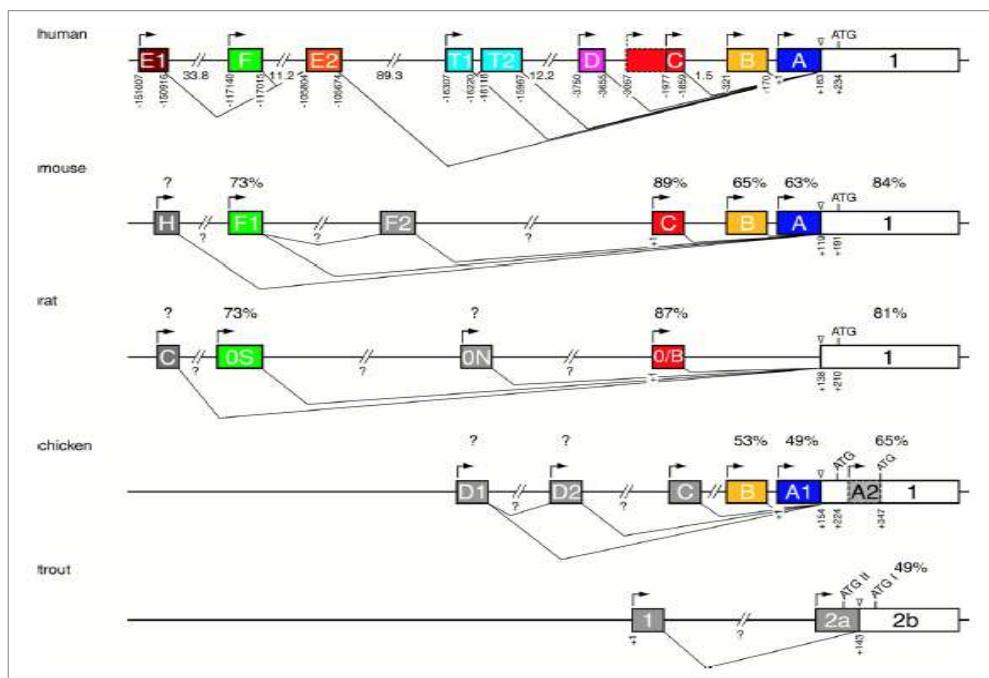
### 1.2.2 Deux types de récepteurs aux œstrogènes : ER $\alpha$ et ER $\beta$

L'existence d'un récepteur relayant les effets biologiques des œstrogènes émerge en 1962 par l'utilisation de  $17\beta$ -œstradiol tritié sur l'utérus de rattenes immatures (Jensen, 1962). En 1968, O'Malley et al démontrent qu'ER $\alpha$  est un facteur de transcription (O'Malley and McGuire, 1968). Cependant, le clonage du ER $\alpha$  n'a été rapporté qu'en 1986 par deux groupes distincts (Green et al., 1986; Greene et al., 1986). En 1996, l'existence d'un récepteur unique a été remise en question à la suite du clonage du ER $\beta$  dans une banque d'ADNc obtenue à partir de prostate de rat (Kuiper et al., 1996) ainsi que dans la rate, le thymus, les ovaires et les testicules humains (Mosselman et al., 1996). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons essentiellement à ER $\alpha$  puisqu'il relaie la majorité des effets des œstrogènes (Arnal et al., 2013).

### 1.2.3 L'organisation génique et protéique de ER $\alpha$

### 1.2.3.1 Le gène *esr1*

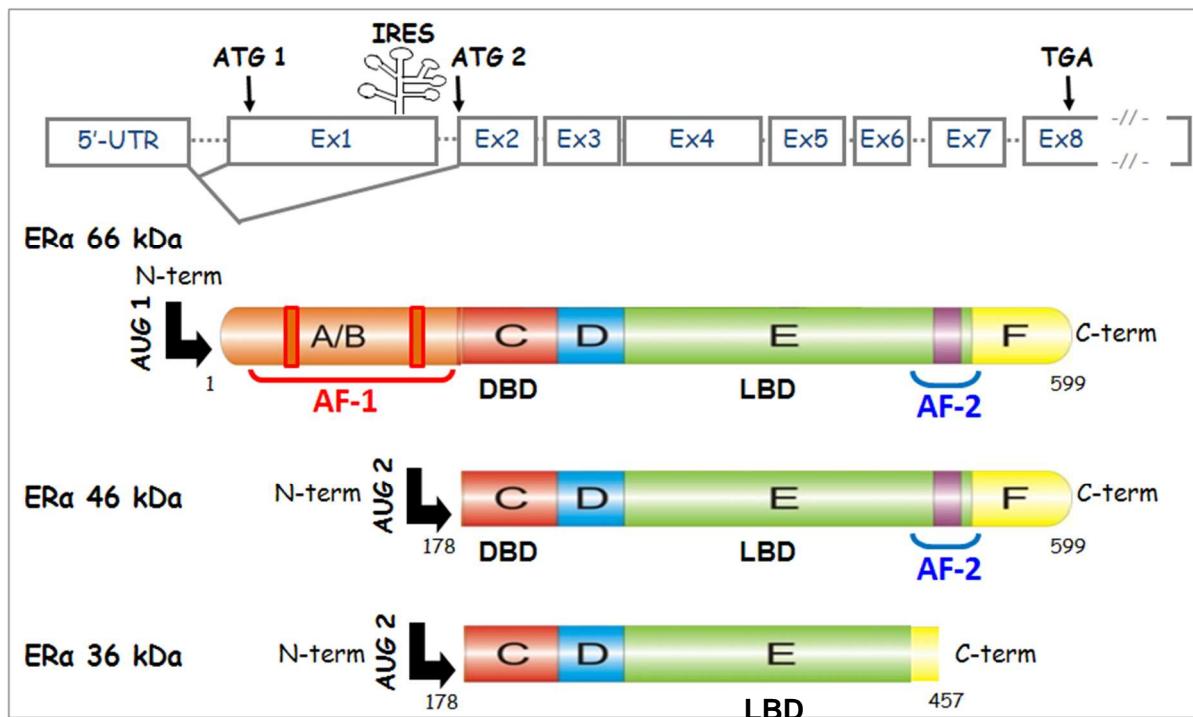
ER $\alpha$  est le produit du gène *Esr1*, localisé au niveau du chromosome 6 chez l'Homme (Gosden et al., 1986; Menasce et al., 1993; Walter et al., 1985). Ce gène s'étend sur plus de 140 kilobases (kb) et comporte 8 exons codants séparés par 7 introns. Il est sous le contrôle d'entre 2 et 7 promoteurs, selon les espèces (Kos et al., 2001). La transcription induite par ces différents promoteurs génère différents variants d'ARNm qui diffèrent de par leur région 5' non traduite. Ceci permet une régulation tissu spécifique de l'expression de variants d'ARNm codant pour ER $\alpha$  (Grandien et al., 1995; Kos et al., 2000). La modification du profil d'expression de certains variants d'épissage des ER diffère selon les espèces et modifie le rôle physiologique ou pathologique de l'E2 (Figure 9) (Taylor et al., 2010).



**Figure 9 : Comparaison des régions promotrices du gène *esr1* chez l'Homme, la souris, le rat, le poulet et la truite.** (D'après Kos M. et al, FEBS Lett 2000).

### 1.2.3.2 Les isoformes protéiques de ER $\alpha$

L'isoforme du ER $\alpha$  majoritairement étudiée est celle de pleine taille de 66 kDa, protéine de 595 acides aminés chez l'humain et de 599 acides aminés chez la souris. Néanmoins, certains tissus ou types cellulaires expriment d'autres isoformes (Figure 10).



**Figure 10 : Isoformes ER $\alpha$  66 kDa, ER $\alpha$  46 kDa et ER $\alpha$  36 kDa générées par épissage alternatif ou via l'IRES.**

Ainsi, une isoforme de ER $\alpha$  de 46kDa, dépourvue de la fonction ER $\alpha$ AF-1, existe naturellement chez plusieurs espèces. Elle est générée par épissage alternatif du premier exon codant ou par un IRES (Internal Ribosome Entry Site), séquence permettant le recrutement direct du ribosome au niveau d'un deuxième codon d'initiation, indépendamment de la présence de la coiffe, en aval du premier codon d'initiation (Baraille et al., 1999; Faye et al., 1986; Flouriot et al., 2000; Pendaries et al., 2002). ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 46 possèdent la même affinité pour l'E2 (Lin et al., 2013).

Le rôle fonctionnel de cette isoforme a pu être mis en évidence dans différents types cellulaires dans des modèles de sur-expression. Ainsi, ER $\alpha$ 46 pourrait agir comme un inhibiteur compétitif de l'isoforme de pleine taille ER $\alpha$ 66 dans une lignée de tumeur mammaire (MCF-7) (Flouriot et al., 2000) et les ostéoblastes (Denger et al., 2001). L'expression de ER $\alpha$ 46 est corrélée à l'état de confluence cellulaire et sa surexpression est capable d'antagoniser la prolifération des MCF-7 induite par l'E2 (Penot et al., 2005). Dans les cellules endothéliales, ER $\alpha$ 46 est capable d'activer la eNOS (NO synthase endothéliale) de manière plus efficace que ER $\alpha$ 66 (Li et al., 2003). Il a été également proposé que cette isoforme joue un rôle dans la différenciation des monocytes en macrophages et est induite par l'E2 (Murphy et al., 2009). Cette isoforme est retrouvée en quantité moins importante dans des biopsies de cancer colorectal comparées à des tissus sains et sa surexpression *in*

*vitro* est également impliquée dans l'inhibition de la croissance et l'apoptose des cellules d'adénocarcinome du côlon (Jiang et al., 2008). Cependant, le rôle physiologique et la régulation de l'expression de cette isoforme sont encore inconnus à ce jour.

Il existe d'autres isoformes de ER $\alpha$ , notamment une plus petite isoforme de 36kDa, générée par épissage alternatif qui ne possède aucune des AF. L'ADNc de cette isoforme a été cloné à partir d'une banque d'ADNc d'utérus humain. Il code pour la séquence des exons 2 à 6 du ER $\alpha$ . En sa partie C-terminale, ER $\alpha$ 36 possède 27 acides aminés qui diffèrent des autres isoformes, ce qui permet de la différencier à l'aide d'un anticorps spécifique (Wang et al., 2005). ER $\alpha$ 36 a été mise en évidence dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires (Wang et al., 2006). Son rôle fonctionnel est peu connu à ce jour, toutefois, il a été rapporté que cette isoforme est impliquée dans la résistance au tamoxifène dans le traitement du cancer du sein (Shi et al., 2009; Zhang et al., 2011).

### 1.3 La transduction du signal œstrogénique

En absence de ligand, ER $\alpha$  se distribue, selon le type cellulaire, entre le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique, sous la forme de monomères associés à des protéines de type HSP (Heat Shock Protein), principalement 70 et 90. Ces protéines chaperonnes maintiennent le récepteur non-liganté à l'état inactif (apo-récepteur). Il s'exerce alors un équilibre dynamique entre les interactions du domaine A avec le domaine E ou des co-répresseurs transcriptionnels tels que le « Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors » (SMRT) ou le « Nuclear receptor CoRepressor-1 » (NCoR) afin de réprimer l'AF-1 core (Metivier et al., 2000; Metivier et al., 2002) ou bien sous la forme de dimères libres dans le noyau. Ces dimères nucléaires aident, *via* ER $\alpha$ AF-1, au remodelage de la chromatine afin de faciliter l'accessibilité de ER $\alpha$  à l'ADN en réponse à un ligand (Carroll et al., 2006; Metivier et al., 2004; Padron et al., 2007).

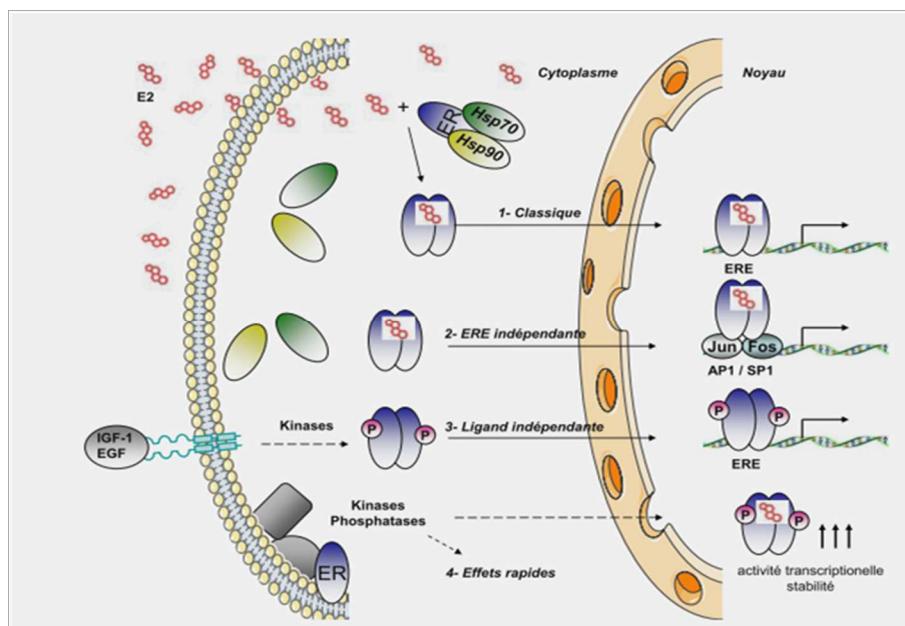
La fixation du ligand induit un repliement du ER $\alpha$  et en particulier de l'hélice H12 du LBD (Shiau et al., 1998). Selon la nature du ligand, les modifications conformationnelles induites par sa fixation peuvent favoriser ou empêcher les interactions entre ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 (Kraus et al., 1995). Ce réarrangement conduit à la dissociation des protéines chaperonnes, à la stabilisation des dimères et à la translocation nucléaire. Une fois fixé sur le promoteur de leurs gènes cibles, ER $\alpha$  activé induit le recrutement de cofacteurs, complexes protéiques enzymatiques capables de remodeler la chromatine pour faciliter l'assemblage du complexe d'initiation de l'ARN polymérase II afin d'initier la transcription.

L'activation de la transcription *via* ER $\alpha$  implique un recrutement orchestré des différents composants de la machinerie transcriptionnelle et des cofacteurs. Ainsi, l'« horloge transcriptionnelle » dicte l'assemblage séquentiel des différents acteurs par un processus cyclique d'environ 20 minutes. Cet enchaînement permet de modifier localement la structure de la chromatine *via* des modifications post-traductionnelles des queues des histones, le remodelage des nucléosomes d'une part, et l'activation ou la répression des gènes cibles d'autres part, comme cela a été démontré, au niveau du promoteur du gène pS2, dans les cellules MCF-7 (Magnani and Lupien, 2013; Metivier et al., 2003).

La régulation transcriptionnelle de gènes cibles spécifiques de ER $\alpha$  est initiée par différents mécanismes reconnus :

- la fixation directe de ER $\alpha$  sur des séquences d'ADN consensus appelées ERE (Estrogen Responsive Element) communément appelée **voie classique ou ligand-dépendante**
- la fixation indirecte de ER $\alpha$  sur des séquences d'ADN Sp1 (Stimulating protein 1) ou AP-1 (Activator Protein 1) *via* l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (**voie alternative**).
- Outre l'activation induite par la fixation du ligand, ER $\alpha$  peut être activé par phosphorylation *via* des kinases activées par des facteurs de croissance (**voie ligand-indépendante**).

Enfin, il existe un autre mode d'activation de ER $\alpha$  non transcriptionnel : la voie membranaire, « **non génomique** » ou MISS (Membrane Initiated Steroid Signal) (Figure 11).



**Figure 11 : Mécanismes d'action des ER.**

### **1.3.1 Activation de la transcription ERE-dépendante ou voie classique**

Le mécanisme classique d'activation des ER est particulièrement bien décrit. Il implique l'interaction du ER avec l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées ERE, situées dans la région promotrice des gènes cibles. Le motif ERE est une séquence consensus palindromique inversée GGTCAnnnTGACC où les n correspondent à des nucléotides spécifiques (Anolik et al., 1993; Mason et al., 2010). Cette séquence a initialement été décrite au niveau de l'extrémité 5' du gène de la Vitellogenine A2 chez le Xénope (Klein-Hitpass et al., 1986). Une fois lié à l'ERE, ER $\alpha$  active la transcription génique *via* ER $\alpha$ AF-1 et/ou ER $\alpha$ AF-2 en recrutant des cofacteurs, communs ou spécifiques à chaque AF, impliqués dans le remodelage local de la chromatine et dans l'activation transcriptionnelle (McKenna and O'Malley, 2002). On évalue la présence de 5000 à 10000 ERE dans le génome humain (Dietz and Carroll, 2008). Cependant, il a été démontré que seulement 2 à 4% des séquences ERE sont retrouvées dans les régions promotrices des gènes cibles de l'E2 dans l'ensemble du génome humain (Carroll et al., 2006; Stender et al., 2010). De plus, une étude a mis en évidence que 660 séquences ERE sont conservées entre humain et souris dans les 15 kb autour des régions promotrices (région proximale) (Bourdeau et al., 2004), mais d'autres études montrent des régions putatives, dans les 150 kb en amont du promoteur (régions distales) (Blackwood and Kadonaga, 1998; Bulger and Groudine, 1999). Ces sites de liaison éloignés du promoteur peuvent se rapprocher grâce à la formation de boucle d'interaction parfois facilitée par le recrutement de cofacteur tel que FOXA1, comme il a été décrit dans les cellules MCF-7 (Carroll et al., 2005; Fullwood et al., 2009). La régulation de gènes cibles par ER $\alpha$  dépend de la structure de leur région promotrice. Par exemple, il existe des séquences ERE spécifiques pour les gènes cibles qui sont plus ou moins dégénérées par rapport à la séquence consensus (Klinge et al., 2004; Wood et al., 2001; Yi et al., 2002).

### **1.3.2 Activation de la transcription ERE-indépendante ou voie alternative**

D'autres mécanismes faisant intervenir une liaison directe à l'ADN, *via* des interactions avec d'autres facteurs de transcription tels que Sp1 ou AP-1 liés sur des séquences d'ADN qui leur sont spécifiques ont été largement décrits (Safe and Kim, 2008).

Les facteurs de transcription de la famille Sp1 se fixent à l'ADN sur des séquences promotrices spécifiques riches en GC. De nombreux gènes régulés par l'E2 présentent, au sein de leur région promotrice, de telles séquences en plus des séquences ERE. Les facteurs de transcription AP-1 sont composés de dimères de proto-oncogènes tels que jun et fos qui se fixent sur les séquences TGA(G/C)TCA. Webb *et al.* ont rapporté pour la première fois la régulation génique ER $\alpha$ /AP-1 (Webb *et al.*, 1995). Contrairement à la signalisation ERE-dépendante, l'interaction entre ER $\alpha$  et AP-1 ne nécessite pas la présence du DBD mais implique le domaine D (Burns *et al.*, 2011; Jakacka *et al.*, 2001). La répression ou l'activation transcriptionnelle induite *via* la voie alternative AP-1 peut être modulée selon la composition du dimère AP-1 fixé à l'ADN (Philips *et al.*, 1998). Il dépend du contexte cellulaire, du sous-type d'ER impliqué et de la structure du ligand (comme nous le verrons dans la partie 1.4). La fixation de l'E2 sur ER $\alpha$  permet son interaction directe avec le complexe AP-1 *via* ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 et module ainsi la transcription de gènes cibles (Teyssier *et al.*, 2001).

### 1.3.3 Activation ligand-indépendante

D'autres voies de signalisation peuvent moduler l'activité du ER $\alpha$  *via* des cascades de phosphorylations relayées par des kinases. Ainsi, certains récepteurs membranaires et facteurs de croissance (comme EGF pour Epithelial Growth Factor, et IGF-1 pour Insulin-like Growth Factor-1) induisent l'activation de kinases intra-cellulaires capables de phosphoryler ER $\alpha$ . Ces modifications post-traductionnelles sont indépendantes de la présence d'E2. La box2 d'ER $\alpha$ AF-1 possède de nombreux sites de phosphorylations qui permettent de moduler les interactions de la fonction ER $\alpha$ AF-1 avec certains cofacteurs transcriptionnels (Lannigan, 2003). Il a notamment été rapporté que, dans les cellules cancéreuses, l'activation du récepteur à l'EGF (EGFR) aboutie, *via* les MAPK p42/p44 à la phosphorylation de la Ser118 localisée au niveau de la fonction ER $\alpha$ AF-1 (Bunone *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1995) augmentant ainsi son activité transcriptionnelle (Endoh *et al.*, 1999) (voir paragraphe 1.4.3).

### 1.3.4 Les effets initiés à la membrane, la signalisation MISS

Les effets rapides des œstrogènes (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes) ont été rapportés pour la première fois en 1977 par Pietras et Szego (Pietras and Szego, 1977). Ils démontrent que l'augmentation de la production d'AMPc et des flux calciques dans

l'endomètre de rattes ovariectomisées s'effectuent *via* des sites potentiels de liaison spécifiques aux œstrogènes localisés à la surface externe de cellules isolées. Ces effets ne sont pas inhibés par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription et de la traduction (Morley et al., 1992). De plus, ils persistent sur des membranes isolées ou cytoplasmes de cellules de cancer du sein anucléées (Welshons et al., 1988).

Au niveau de la membrane plasmique, le ER $\alpha$  peut être localisé dans des régions particulières : les rafts lipidiques (Accconcia et al., 2005; Chambliss and Shaul, 2002; Razandi et al., 2002; Razandi et al., 1999; Razandi et al., 2003), où il est associé à des protéines telles que la cavéoline-1, le « Modulator of non-genomic activity of estrogen receptor » (MNAR) (Cheskis et al., 2008; Wong et al., 2002), Shc (src homology 2 domain-containing transforming protein C1) (Song et al., 2004), ainsi que la striatine (Lu et al., 2004) et des protéines G (Kumar et al., 2007). Cette localisation membranaire et ces interactions protéiques font suite à une série de modifications post-traductionnelles dont la palmitoylation de la Cystéine 447 qui augmente l'hydrophobilité de ER $\alpha$  permettant son ancrage à la membrane plasmique et son interaction avec la cavéoline-1 (Accconcia et al., 2004; Accconcia et al., 2005; Poulard et al., 2012) ainsi que la phosphorylation de la Tyrosine 537 permettant l'interaction ER $\alpha$ /Src (Varricchio et al., 2007).

En s'associant à une véritable plateforme de signalisation, les effets initiés à la membrane par ER $\alpha$  en présence d'E2, incluent la mobilisation de calcium intracellulaire (Improta-Brears et al., 1999), la stimulation de l'activité adénylate cyclase ainsi que la production d'AMPc (Aronica and Katzenellenbogen, 1993; Razandi et al., 1999). De plus, la signalisation MISS de ER $\alpha$  conduit également à l'activation des voies MAPK et phosphoinositol (PI)-3 kinase (Castoria et al., 2001; Migliaccio et al., 1996) ainsi qu'à l'activation non-génomique de la eNOS, notamment dans les cellules endothéliales (Chen et al., 1999; Levin, 2005). Cette signalisation membranaire a été mise en évidence *in vitro* dans de nombreux types cellulaires comme les oocytes, les ostéoblastes, les cellules cancéreuses mammaires, les adipocytes et les cellules endothéliales (Levin, 2011). *In vitro*, de nombreuses études ont montré le rôle majeur de cette signalisation membranaire dans l'effet prolifératif de l'E2 (Marino and Ascenzi, 2008).

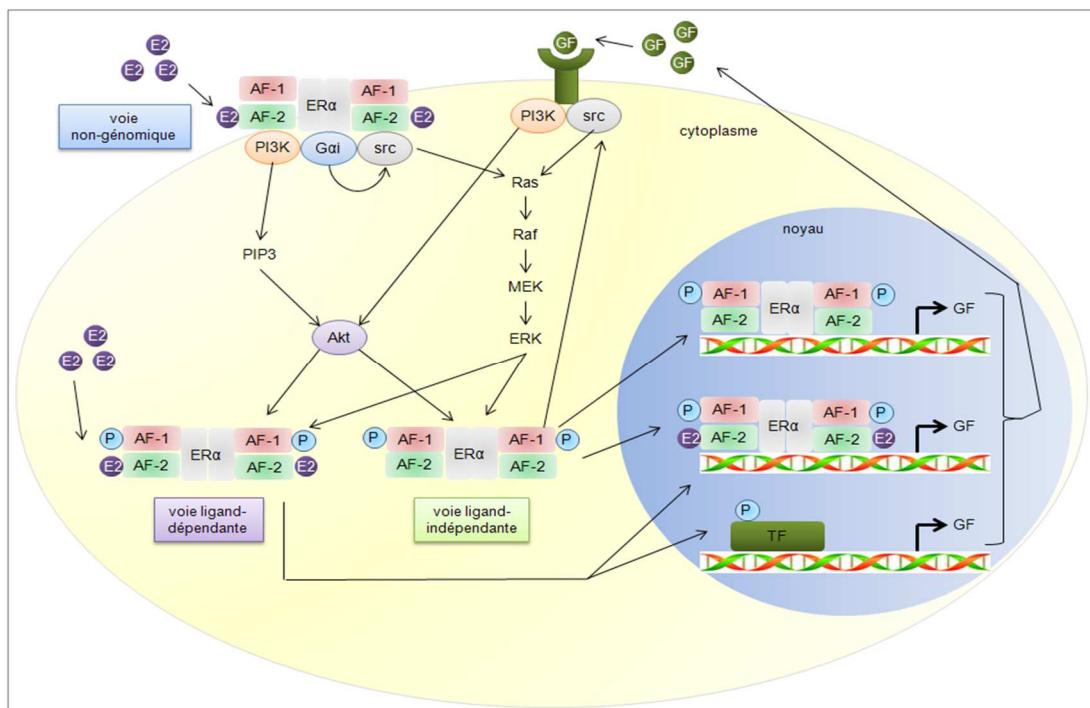
### 1.3.5 ER $\alpha$ AF-1, à la croisée de toutes les signalisations

La voie membranaire (ou « non-génomique ») n'est pas totalement dissociée des voies génomiques de ER $\alpha$ . Le ER $\alpha$  membranaire, en réponse à l'E2, peut s'associer directement

avec la PI3K et/ou src et ainsi activer la voie des MAPK ou de la voie PI3K/Akt. Ces cascades de phosphorylations entraînent rapidement la phosphorylation des serines, au niveau de ER $\alpha$ AF-1 (sérine 118 et 167) de la fraction ER $\alpha$  cytoplasmique, qui sera transloquée alors dans le noyau pour induire la transcription de gènes cibles. Le ER $\alpha$  phosphorylé, liganté ou non, peut également recruter d'autres cofacteurs (Figure 12) (Bjornstrom and Sjoberg, 2002; Lannigan, 2003; Levin, 2005). Ainsi, la mutation du site de palmitoylation dans des cellules MCF-7 et Hela diminue de 50 à 70% l'activité promotrice ERE-dépendante (La Rosa et al., 2012).

Les facteurs de croissance sont également des acteurs clés de l'interaction entre les effets transcriptionnels et les effets initiés à la membrane. En effet, l'activation du ER $\alpha$  membranaire par l'E2 conduit à la stimulation des récepteurs aux facteurs de croissance, localisés à proximité, qui activent également les cascades de phosphorylation des MAPK et PI3K (Razandi et al., 2003) (Figure 12) (Campbell et al., 2001; Edwards, 2005; Levin, 2003; Martin et al., 2000; Simoncini et al., 2000).

Ainsi, ER $\alpha$ AF-1 joue un rôle clé dans la convergence des effets génomiques et non-génomique.

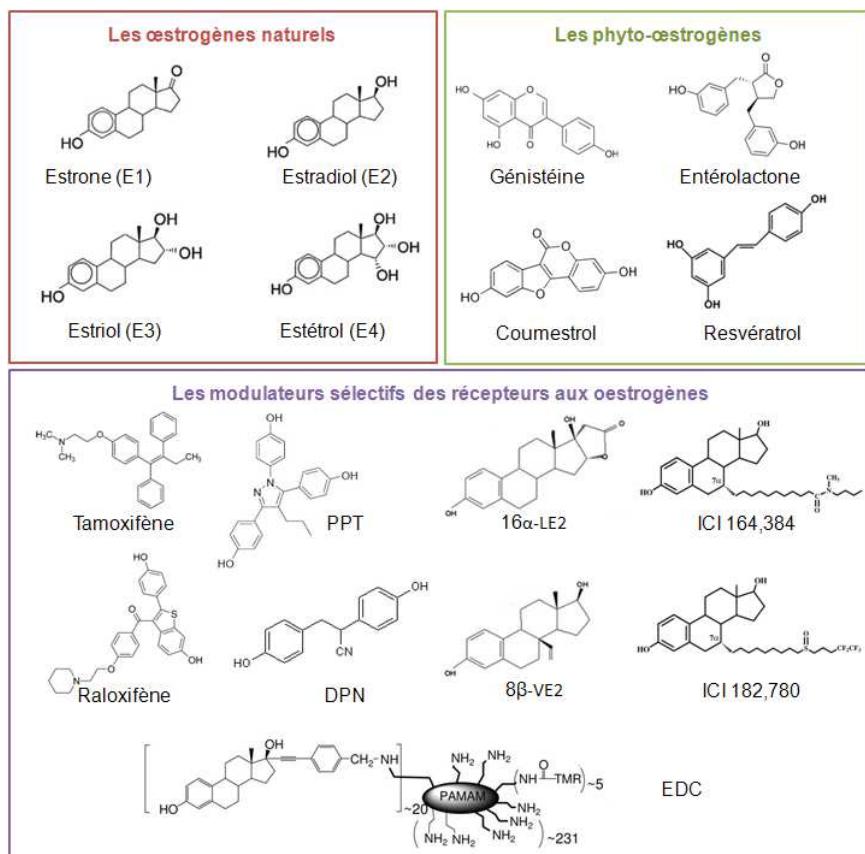


**Figure 12 :** Schéma représentatif de l'implication d'ER $\alpha$ AF-1 dans la convergence des voies génomiques (ligand-dépendante et ligand-indépendante) et « non-génomique ». GF = facteurs de croissance, TF = facteurs de transcription.

## 1.4 Modulation de l'activité des ER

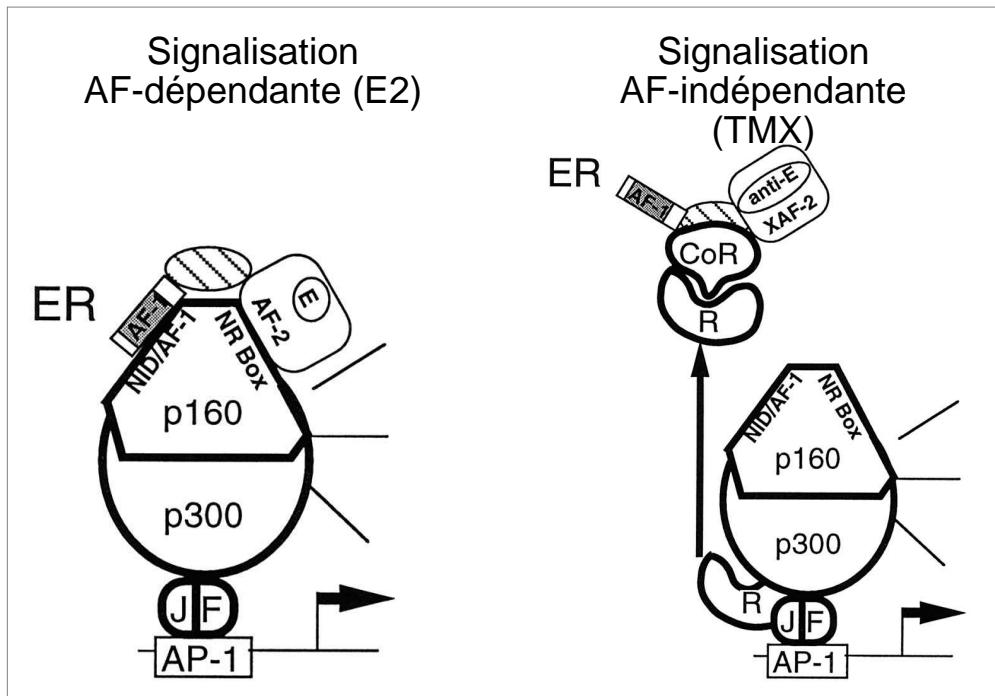
### 1.4.1 La nature du ligand, notion de SERM

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes dérivées en C18 du cholestérol. Le  $17\beta$ -estradiol (**E2**), synthétisé au niveau des ovaires dès la puberté, est le ligand endogène majoritaire des ER et la forme d'œstrogène prédominante chez les femmes pré-ménopausées. D'autres œstrogènes, agonistes faibles, sont rencontrés fréquemment : l'estrone (**E1**) produit chez les femmes post-ménopausées, l'estriol (**E3**) et l'estétrol (**E4**) qui sont retrouvés en période de gestation. Il existe également des molécules végétales, qui possèdent des propriétés œstrogéniques : les phyto-œstrogènes. Les plus connues sont la **génistéïne**, l'**entérolactone**, le **coumestrol** et le **resvératrol**. Outre les œstrogènes naturels, il existe d'autres composés synthétiques qui miment une partie des effets des œstrogènes et permettent ainsi de moduler sélectivement l'activité transcriptionnelle relayée par les ER, d'où leur dénomination de SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator). Des molécules de synthèse telles que le **tamoxifène**, le **raloxifène**, le **PPT** (4,4',4''-(propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl) trisphenol) et le **16 $\alpha$ -LE2** sont connues pour avoir une affinité selective pour ER $\alpha$  alors que le **DPN** (Diarylpropionitrile) ou encore le **8 $\beta$ -VE2** activent préférentiellement ER $\beta$ . Le recrutement spécifique d'un sous-type du récepteur peut également varier selon la biodisponibilité du ligand : la génistéïne est connue pour être un agoniste partiel d'ER $\beta$  à faible dose et d'ER $\alpha$  à forte dose (Barkhem et al., 1998; Paige et al., 1999; Van Den Bemd et al., 1999). Certains ligands ont été développés dans le but d'activer une voie de transduction du signal œstrogénique spécifique. Ainsi, l'E2 a été couplé à un dendrimère de poly(amido)amine, composé appelé l'**EDC** (Estrogen Dendrimer Conjugate) incapable d'être transloqué dans le noyau et activant donc de manière spécifique les ER membranaires (Figure 13) (Harrington et al., 2006).



**Figure 13 : Structure chimique des différents ligands des récepteurs aux œstrogènes discutés dans ce manuscrit. PAMAM = dendrimère poly(amido)amine**

Le **tamoxifène** est un agoniste partiel de ER $\alpha$ . Il favorise, comme l'E2, l'activation transcriptionnelle *via* la fonction ER $\alpha$ AF-1 en recrutant des co-activateurs (comme p160 et p300) (Berry et al., 1990) mais au niveau de sites d'interaction différents de l'E2 sur l'ER $\alpha$ AF-1 (McInerney and Katzenellenbogen, 1996; Metzger et al., 1995a). De plus, le tamoxifène antagonise ER $\alpha$ AF-2 en recrutant des co-répresseurs (Berry et al., 1990; Katzenellenbogen et al., 2001) et en inhibant le recrutement de co-activateurs au niveau de cette AF (Shiau et al., 1998). Ceci permet d'expliquer une activation transcriptionnelle moindre *via* ER $\alpha$  au niveau de la signalisation ERE ou AP-1 et Sp1 en réponse au tamoxifène (McInerney et al., 1996; Paech et al., 1997; Webb et al., 1995). La fixation du tamoxifène régule positivement l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1 mais par un mécanisme différent de celui de l'E2. En effet, il a été proposé que ER $\alpha$  lié au tamoxifène n'interagit pas directement avec le complexe AP-1, comme pour l'E2, mais qu'il titrerait les co-répresseurs tels que NCor ou les HDAC (histone désacétylase), inhibant ainsi leur interaction avec le complexe AP-1 (activation transcriptionnelle AF-indépendante) (Figure 14) (Webb et al., 1999).



**Figure 14 : Modélisation des voies d'activation de la transcription via AP-1 dépendantes et indépendantes des fonctions activatrices d'ER $\alpha$  selon la nature du ligand.** (D'après Webb P. et al, Molecular Endocrinology 1999).

Le ICI182,780 exerce une activité antagoniste totale sur l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  en se fixant au sein du LBD entraînant ainsi, de par son encombrement stérique, un mauvais repliement de l'hélice 12 qui inhibe toute activité du récepteur aussi bien au niveau d'ER $\alpha$ AF-1 que d'ER $\alpha$ AF-2 (Wakeling et al., 1991). Cette conformation entraîne le recrutement de co-répresseurs d'une part, mais aussi une augmentation de la dégradation du récepteur par le protéasome (Lupien et al., 2007; Nawaz et al., 1999; Webb et al., 2003; Wijayaratne and McDonnell, 2001).

Ces différents ligands, de par leurs propriétés structurelles et chimiques, reflètent les possibilités de combinaisons multiples pour réguler l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ . Ces molécules représentent également une palette d'outils pharmacologiques efficace pour disséquer les mécanismes d'action des ER dans la régulation de la transcription.

#### 1.4.2 La spécificité cellulaire de la contribution d'ER $\alpha$ AF-1 et d'ER $\alpha$ AF-2

Les activités respectives d'ER $\alpha$ AF-1 et d'ER $\alpha$ AF-2 sont modulées de façon spécifique en fonction du type des promoteurs des gènes cibles de ER $\alpha$ , de la disponibilité des corégulateurs, du type cellulaire et des isoformes de ER $\alpha$  exprimées.

#### **1.4.2.1 La spécificité du promoteur**

Les activités respectives d'ER $\alpha$ AF-1 et d'ER $\alpha$ AF-2 sont modulées de façon spécifique en fonction des promoteurs mis en jeu. Les deux AF ont des activités transcriptionnelles propres, néanmoins, comme pour les autres SHR, il existe de nombreuses preuves de l'existence d'un synergisme entre ER $\alpha$ AF-1/ER $\alpha$ AF-2 sur certains promoteurs (Tora et al., 1989). Au niveau structurel, il a été démontré que les acides aminés 51 à 93 et 102 à 149 de ER $\alpha$ AF-1, chez l'humain (correspondant aux acides aminés 91 à 121 chez la souris), interagissent, de manière directe ou indirecte, avec ER $\alpha$ AF-2 (Danielian et al., 1992; Metzger et al., 1995a). Ce synergisme entre les deux AFs est nécessaire à la modulation de l'activité transcriptionnelle.

#### **1.4.2.2 La spécificité des cofacteurs recrutés**

Il existe six classes de co-activateurs recrutés de manière séquentielle ou combinatoire :

- la famille p160 : SRC-1 (steroid receptor coactivator protein 1), TIF2 (transcriptional intermediary factor 2) et SRC-3 (steroid receptor coactivator protein 3) qui promeut le remodelage nucléosomal nécessaire à l'activation transcriptionnelle via son interaction avec ER $\alpha$  grâce à un motif LXXLL présent sur tous les RN (Heery et al., 1997)
- les histones acétyl transférases (HAT)
- les histones arginine methyl transférases (HMT)
- le complexe de remodelage SWI/SNF
- le complexe SMCC/TRAP/DRIP/ARC permettant de former un pont direct avec la machinerie transcriptionnelle, facilitant ainsi l'activation de l'ARN polymérase II
- les RNA hélicases (Glass and Rosenfeld, 2000; Lemon and Freedman, 1999).

L'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  peut être initiée via une coopération fonctionnelle entre ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 ou via chaque AF de façon indépendante (Kobayashi et al., 2000; Metivier et al., 2001). Ceci peut expliquer la permissivité préférentielle des cellules et des promoteurs, résultante de la biodisponibilité variable de ces cofacteurs (Tableau 2) (Hall and McDonnell, 2005; McDonnell and Norris, 2002; McKenna et al., 1999; McKenna and O'Malley, 2002; Metivier et al., 2003; Smith and O'Malley, 2004).

	Interaction avec ER	Cofacteur	Nom complet	Fonction/activité
Co-activateurs	Interaction avec AF-2 via motif LXXLL	SRC3 (p160)	Steroid Receptor Coactivator 3	HAT
		ASC1	Activating Signal Cointegrator 1	favorisent recrutement des HATs et autres NR
		ASC2	Activating Signal Cointegrator 2	
		TRAP220/ DRIP205	Thyroid hormone receptor activating protein of 220 kDa	
	Interaction avec AF-2 via motif LXXLL + synergisme avec AF-1core	SRC1 (p160) / TIF2	Steroid Receptor Coactivator 1	HAT
		CBP/p300	CREB-binding protein	HAT
		SRC2 (p160) / GRIP1	Steroid Receptor Coactivator 2	HAT
	Interaction avec AF-1	SRA	Steroid Receptor Activator	Epissage
		TBP	TATA box binding protein	Enhancer ER $\alpha$ spécifique
		p72	p72 RNA hélicase	RNA hélicase
Co-répresseurs	Interaction avec AF-1 (mais pas AF-1core) en réponse à l'E2 mais pas TMX	p68	p68 RNA hélicase	RNA hélicase
	Interaction indirecte avec AF-2 via association avec les p160	CARM1	Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1	Arginine histone methyl transferase
		PRMT1	Protein methyltransferase 1	Arginine histone methyl transferase
	Interaction avec AF-2 via motif LXXLL	NCOR	Nuclear receptor corepressor	HDAC
		SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroïd receptors	HDAC
		RIP140 (NRIP)	Receptor interacting protein of 140 kDa	compétition avec les co-activateurs et association avec les HDAC
	liaison indirecte	REA	Repressor of estrogen receptor activity	inhibe interaction avec SRC1
	Interaction avec AF-1	RTA	Repressor of tamoxifen transcriptional activity	

**Tableau 2 : Liste non exhaustive des cofacteurs intervenant dans la régulation transcriptionnelle par les ER.** D'après Hall J. et al, Molecular Intervention 2005, McInerney EM. et al, PNAS 1996, Kobayashi et al, J Biol Chem 2000, Métivier R. et al, Molecular Endocrinology 2001, Endoh H. et al, Mol Cell Biol 1999, Watanabe M. et al, EMBO J 2001, Wärnmark A. et al JBC 2001, Webb P. et al, Molecular Endocrinology 1998, Onate SA. et al, JBC 1998, Tremblay A. et al, Mol Cell 1999, Norris LD. et al, JBC 1998, McInerney et al, PNAS 1996, Métivier R. et al, Cell 2003.

Des études *in vitro* montrent que la modification de l'expression de cofacteurs au sein de la cellule est suffisante pour modifier la réponse à un ligand indépendamment du contexte cellulaire (Romano et al., 2010).

Ce réseau complexe entre les co-activateurs et les co-répresseurs permet de réguler l'activité transcriptionnelle des ER au sein des différents types cellulaires ainsi que la balance entre activité agoniste et antagoniste des SERM selon les tissus, bien que, *in vivo*, l'expression des cofacteurs soit relativement ubiquitaire et constante.

#### **1.4.2.3 Le contexte cellulaire**

Selon le type cellulaire, il a été démontré que ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 agissent de manière indépendante ou en synergie pour réguler l'expression de gènes cibles. Ainsi, les cellules HepG2 sont plus permissives à la fonction ER $\alpha$ AF-1, les cellules HeLa régulent la transcription de manière exclusivement ER $\alpha$ AF-2-dépendante alors que les fibroblastes embryonnaires de poulet font intervenir les 2 AFs (Berry et al., 1990; Tora et al., 1989; Tzukerman et al., 1994). Dans un contexte cellulaire ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 dépendant, l'ER $\alpha$ AF-1core est nécessaire pour le synergisme entre les 2 AFs afin de recruter des cofacteurs de manière coopérative en réponse à l'E2 ou au tamoxifène (Metivier et al., 2001). Ce phénomène est dépendant de l'état de différenciation de la cellule. En effet, Mérot et al ont démontré que plus la cellule est différenciée plus elle relaie la signalisation via ER $\alpha$ AF-1 alors que ER $\alpha$ AF-2 est suffisante pour réguler la transcription au niveau de cellules indifférenciées ou dédifférenciées (Huet et al., 2008; Merot et al., 2004).

Ce recrutement préférentiel d'ER $\alpha$ AF-1 et/ou d'ER $\alpha$ AF-2 selon le contexte et la différenciation cellulaires est essentiellement basé sur des travaux *in vitro* dans des modèles de sur-expression du récepteur.

#### **1.4.2.4 Modulation par les différents sous types et isoformes d'ER**

ER $\alpha$  et ER $\beta$  relaient des profils d'expression génique distincts (Chang et al., 2008; Williams et al., 2008). Ceci est entre autre dû à une expression différentielle de ces 2 ER dans les types cellulaires. Il est admis que ER $\alpha$  est un activateur transcriptionnel plus efficace que ER $\beta$  notamment en recrutant des panels différents de co-activateurs et de co-répresseurs (Cowley et al., 1997; Delaunay et al., 2000 ; Kraichely et al., 2000). Ainsi, le recrutement différentiel de co-répresseurs, dans les cellules HeLa, suite à la délétion de la partie N-terminale des ER, entraîne des effets différents sur la transcription ERE-dépendante relayée par ER $\alpha$  (perte d'activité) et ER $\beta$  (augmentation d'activité). La co-expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  au sein d'une même cellule peut engendrer des effets compétitifs pour la fixation du ligand et de l'ADN (Charn et al., 2010). Néanmoins, ER $\beta$  a été rapporté comme jouant un rôle de dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle classique relayée par ER $\alpha$  (Cowley et al., 1997; Hall and McDonnell, 1999), mais également sur l'activation ERE-indépendante (Li et al., 2004). Ainsi, ER $\alpha$  et ER $\beta$  diffèrent dans leur signalisation classique et non classique (Paech et al., 1997; Weatherman and Scanlan, 2001). Mais ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont aussi capables de s'hétérodimériser *in vitro* et *in situ* lorsqu'ils sont co-exprimés (Cowley et al., 1997; Ogawa et al., 1998; Pace et al., 1997; Tremblay et al., 1999). Cependant, le rôle de ces hétérodimères reste peu connu.

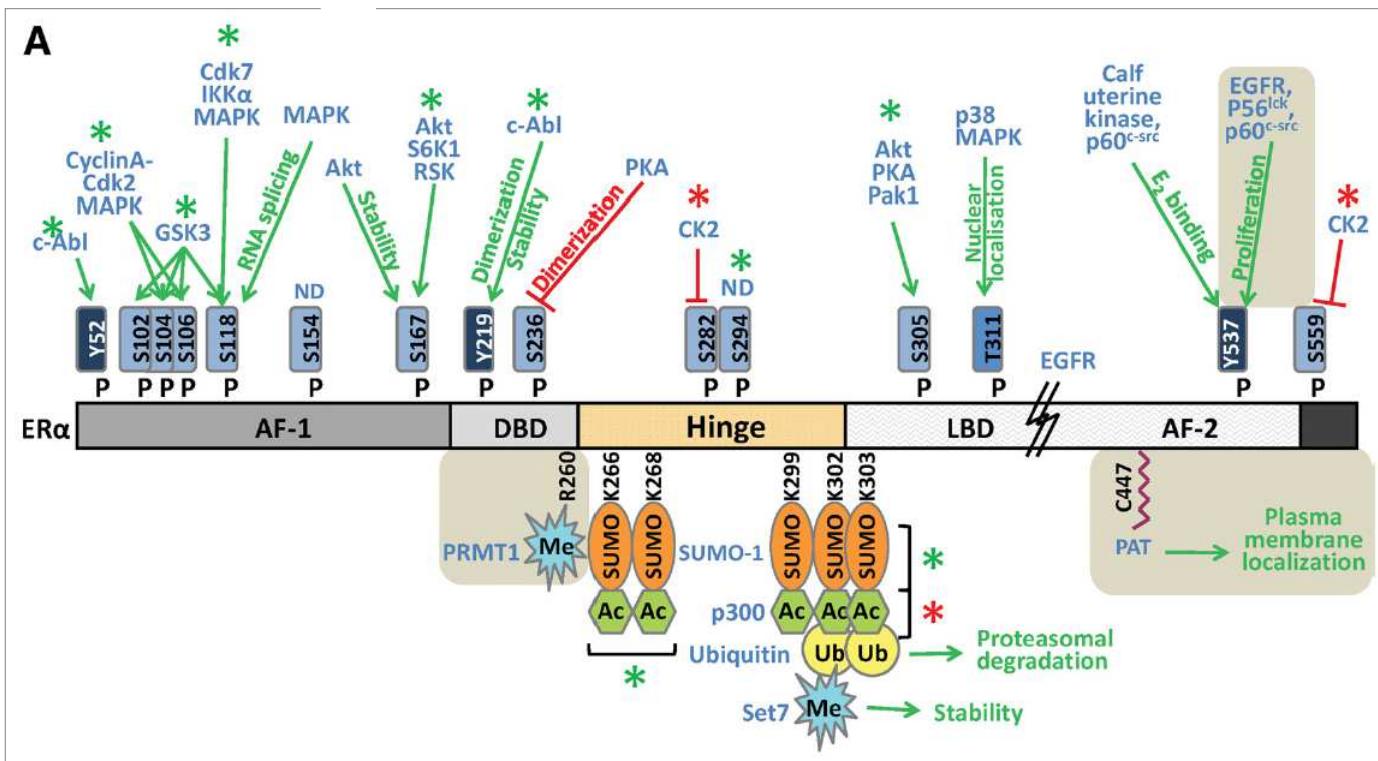
De même, les différentes isoformes de ER $\alpha$  sont capables de moduler l'activité transcriptionnelle lorsque ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 46 sont exprimées au sein d'un même type cellulaire. La surexpression de ER $\alpha$ 46 favorise la formation de l'homodimère 46/46 qui possède une affinité plus grande pour les séquences ERE par rapport à l'homodimère 66/66. De plus, ER $\alpha$ 46 est capable d'activer la transcription *in vitro* dans un contexte ER $\alpha$ AF-2 dominant mais n'est plus capable d'induire la transcription de manière ligand-indépendante dans un contexte ER $\alpha$ AF-1 préférentiel. L'hétéro-dimère 66/46, quant à lui, ne semble pas être présent de manière endogène (Penot et al., 2005).

Par ailleurs, ER $\alpha$ 66 et ER $\alpha$ 46 présente une affinité différente pour certains SERM. En effet, le raloxifène, le tamoxifène et le ICI182,780 sont plus affins pour ER $\alpha$ 66 que ER $\alpha$ 46 (Lin et al., 2013).

#### 1.4.3 Les modifications post-traductionnelles

Il existe de très nombreuses modifications post-traductionnelles impliquées dans la régulation du ER $\alpha$  (Figure 15).

Dans la majeure partie des cas, la phosphorylation a un effet positif sur l'activité transcriptionnelle (Lannigan, 2003). Les phosphorylations ayant lieu au niveau du domaine portant la fonction ER $\alpha$ AF-1 influencent le recrutement des co-activateurs et participent à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur. En particulier, la phosphorylation des résidus du domaine A/B (Ser104, Ser106, Ser118, Ser167) par des kinases comme Akt, les MAPK ou cdk7 (cyclin dépendant kinase 7) facilite le recrutement de co-activateurs. De manière intéressante, la phosphorylation de la Ser236, située dans la région C, du récepteur non-liganté, par la Protéine Kinase A empêche la dimérisation et la liaison à l'ADN (Le Romancer et al., 2011).



**Figure 15 : Modifications post-traductionnelles du ER $\alpha$ .** Me = méthylation, P = phosphorylation, Ac = acétylation, Ub = ubiquitination, Sumo = sumoylation. Les actions présentées en vert sont activatrices et celles présentées en rouge sont inhibitrices. (D'après Le Romancer M. et al, Endocrine Reviews 2011).

La palmitoylation consiste en l'ajout d'acides gras à longues chaînes sur des résidus cystéine. Elle a été mise en évidence au niveau de la Cys447 du ER $\alpha$  (Acconia et al., 2004). Cette modification est indispensable à la localisation membranaire du ER $\alpha$ , à son interaction avec la cavéoline-1 ainsi qu'à l'induction des effets non-génomiques des œstrogènes (Marino et al., 2006; Pietras et al., 2005). En présence d'E2, ER $\alpha$  est dépalmitoylé mais favorise l'interaction entre l'E2 le récepteur (Acconia et al., 2005; Lin et al., 2013).

Le récepteur se trouve également être la cible d'acétylations par la « cAMP responsive element binding protein (CREB)/p300 ». L'acétylation des résidus Lys266 et Lys268 du domaine C induit une augmentation de sa capacité de fixation à l'ADN. Au contraire, l'acétylation des Lys302 et Lys 303 du domaine D empêche la dimérisation du récepteur (Kim et al., 2006; Wang et al., 2001).

Un mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur par le monoxyde d'azote (NO) a été mis en évidence. Il s'agit de la nitrosylation des résidus cystéine formant

les motifs en doigt de zinc du DBD. Elle induit une dissociation de l'atome de zinc et conduit à une perte des capacités de fixation du récepteur à l'ADN dans les cellules HeLa et MCF-7 (Garban et al., 2005; Marino et al., 2001).

Le ER $\alpha$  fait également l'objet d'une méthylation par l'arginine méthyltransferase PRMT1 au niveau de l'Arg260 localisée dans le domaine de liaison à l'ADN. Le ER $\alpha$  se trouve alors uniquement localisé dans le cytoplasme où sous l'action de l'E2, il forme un complexe avec Src, PI3K et FAK (Focal Adhesion Kinase) à l'origine d'une réponse non génomique (Le Romancer et al., 2008).

Par ailleurs, le ER $\alpha$  peut être sumoylé, de manière ligand-dépendante, par SUMO-1, au niveau de la région charnière. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de gènes spécifiques (Sentis et al., 2005).

Pour finir, l'ubiquitination, consistant en la liaison de peptides d'ubiquitine, joue un rôle clé dans la régulation de la dégradation du récepteur par le protéasome. Il a été mis en évidence que des résidus lysine situés dans le LBD, sont des sites d'ubiquitination en absence de ligand (Nawaz et al., 1999; Reid et al., 2002; Reid et al., 2003; Tateishi et al., 2004).

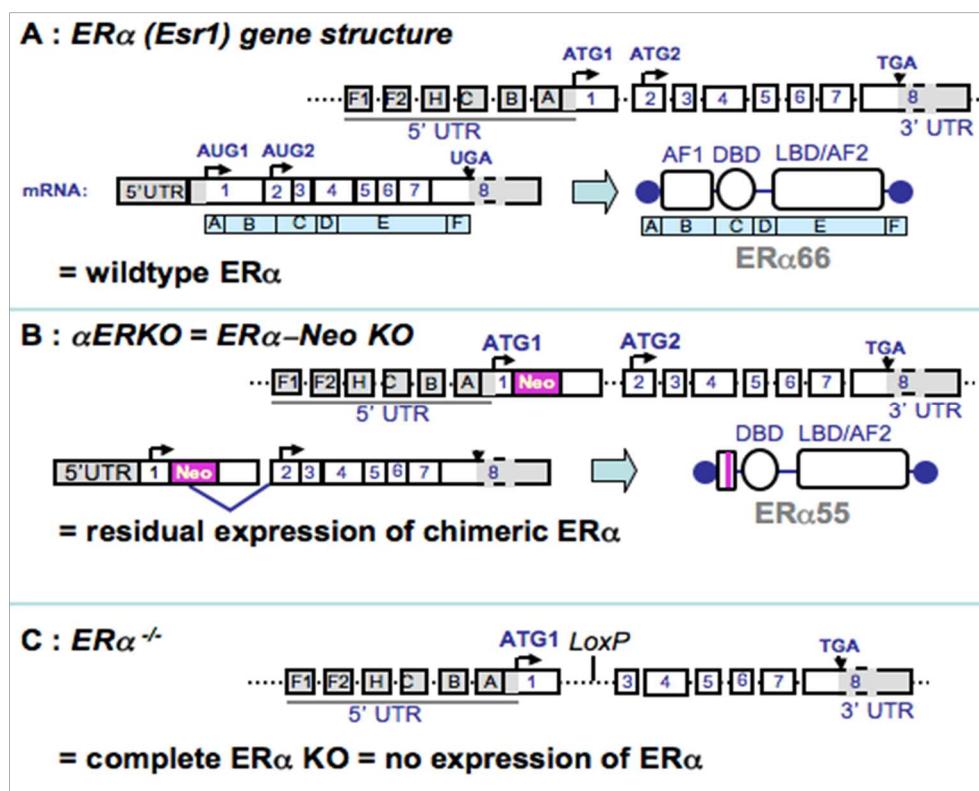
## 1.5 Les modèles murins d'inactivation génique

Les progrès de l'inactivation génique par recombinaison homologue ont permis de développer des modèles murins totalement dépourvues du gène d'intérêt ou sélectivement dans un compartiment cellulaire. La clinique de la Souris (IGBMC, Strasbourg) a généré un modèle murin dont le gène *Esr1* a été flanqué de part et d'autre de l'exon 2 de sites loxP, permettant le recrutement et l'excision-recombinaison par la cre-recombinase (souris ER $\alpha$ <sup>fl/fl</sup>). En croisant ce mutant avec une souris exprimant la cre-recombinase sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, ou sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique, on obtient respectivement, des souris totalement déficientes pour ER $\alpha$  ou dont la déficience est spécifique d'un type cellulaire.

### 1.5.1 Les modèles murins invalidées pour la totalité du récepteur

Le premier modèle de souris invalidées pour ER $\alpha$  (appelées ER $\alpha$ -Neo KO) a été générée en 1993 par l'insertion d'une cassette de résistance à la néomycine dans le premier exon

codant du gène ER $\alpha$  (Lubahn et al., 1993). Cependant, les travaux de notre équipe ont révélé la production de deux formes tronquées du récepteur chez ces souris : une isoforme de 55 kDa (protéine chimérique déletée pour 64 acides aminés dans le domaine B remplacées par 7 acides aminés codées par la cassette néomycine) détectée dans l'utérus et l'aorte et l'isoforme physiologique de 46 kDa (déletée pour le domaine A/B mais possédant le DBD et le LBD) dans l'utérus uniquement. Ces deux isoformes sont dépourvus de la fonction activatrice AF-1 (Figure 16) (Pendaries et al., 2002). Pour nos études, nous avons utilisé un deuxième modèle (appelée ER $\alpha^{-/-}$ ) dont l'inactivation a été obtenue par excision de l'exon 2. Aucune protéine ER $\alpha$  n'est exprimée chez ces souris (Figure 16) (Dupont et al., 2000).



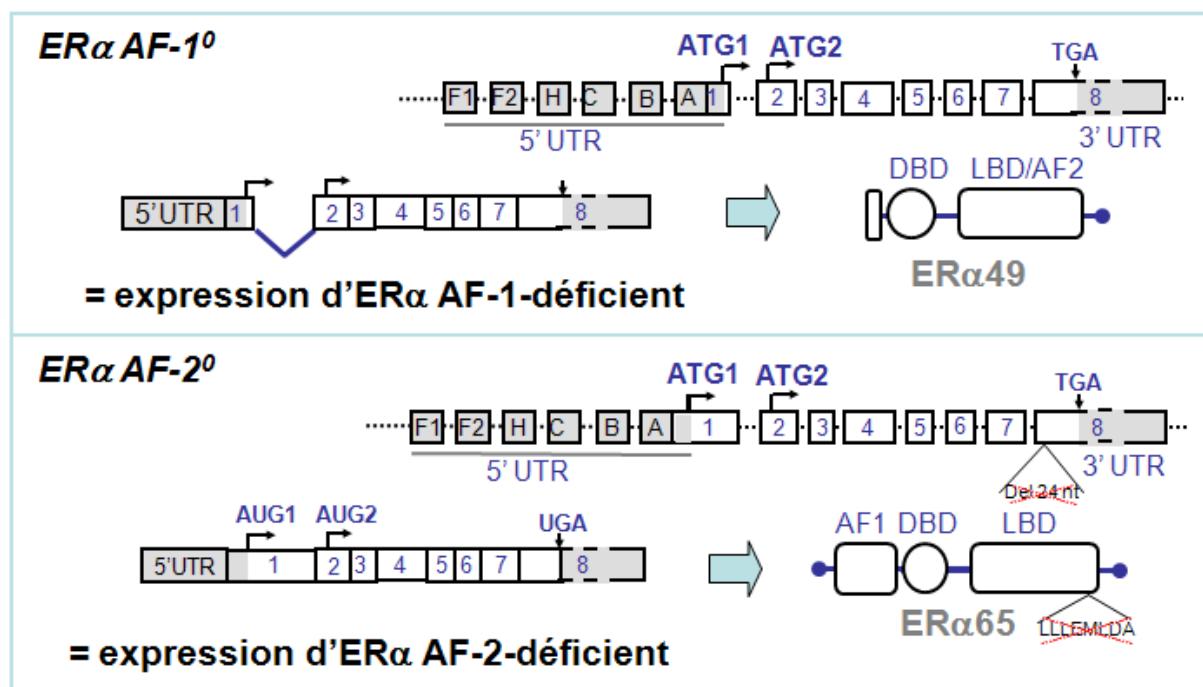
**Figure 16 : Représentation schématique de la structure génique murine du ER $\alpha$  et les stratégies d'inactivation génique.** (A) Structure génique et protéique du ER $\alpha$  sauvage de pleine taille. (B) La première stratégie de ciblage du gène *Esr1* consiste à insérer une cassette néomycine dans le premier exon du gène (dénommé  $\alpha$ ER-NeoKO). Son épissage génère une isoforme chimère de 55 kDa dont l'expression est très variable. (C) La seconde approche d'inactivation de *esr1* (dénommé ER $\alpha^{-/-}$ ) consiste à introduire des sites LoxP de part et d'autre de l'exon 2 permettant son excision. Il en résulte une abolition complète de l'expression protéique du ER $\alpha$ .

Plusieurs mutants déficients pour le gène d'ER $\beta$  ont également été générés, par délétion de l'exon 3 codant pour une partie du DBD (ER $\beta$ KO<sub>CH</sub>, ER $\beta$ KO<sub>KI</sub>, ER $\beta$ KO<sub>ST</sub>) ou par insertion de codons stop et troncation des exons 1 et 2 codant pour le domaine A/B et une partie du DBD (ER $\beta$ KO<sub>WY</sub>). Cependant plusieurs transcrits ont pu être détectés dans ces différents mutants (Antal et al., 2008).

### 1.5.2 Les modèles murines spécifiquement délétées pour les régions activatrices

Afin d'étudier le rôle de ER $\alpha$ AF-1, une souris (ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>) exprimant une protéine ER $\alpha$  tronquée a été générée par recombinaison homologue (délétion de 441 nucléotides appartenant à l'exon 1) (Figure 17). L'isoforme de 49 kDa ainsi générée est proche de l'isoforme de 46 kDa exprimée de manière physiologique. Comme pour l'isoforme naturelle de pleine taille ER $\alpha$ 66, l'expression de l'isoforme ER $\alpha$ 49 est initiée à partir du premier codon ATG, générant une protéine dont le niveau d'expression est comparable à celle de l'isoforme de 66 kDa chez les animaux sauvages (Billon-Gales et al., 2009b).

Les souris ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> ont également été obtenues par recombinaison homologue avec une construction présentant une délétion des acides aminés 543 à 549, essentiels pour l'activité transcriptionnelle induite par l'E2 (Danielian et al., 1992) (Figure 17).



**Figure 17 :** Représentation schématique de la stratégie d'inactivation génique de l'ER $\alpha$ AF-1 ou l'ER $\alpha$ AF-2 murin.

Parallèlement, une équipe américaine a développé un deuxième mutant murin permettant d'étudier ER $\alpha$ AF-2. Les souris AF2ERKI présentent deux mutations ponctuelles (L543A et L544A), au niveau de l'hélice H12, qui empêchent le recrutement de cofacteurs par ER $\alpha$ AF-2 sans modifier l'affinité du récepteur pour le ligand et pour l'ADN (Arao et al., 2011).

## 2 Dissection de la transmission de la signalisation œstrogénique dans le système cardiovasculaire

### 2.1 L'athérosclérose : généralités

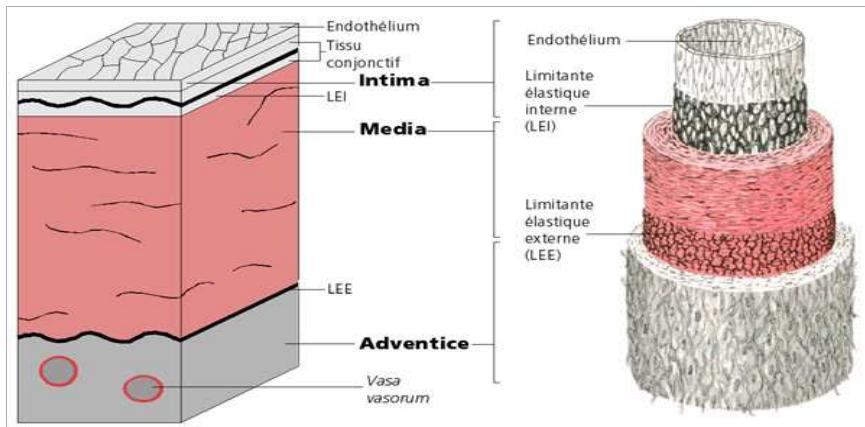
#### 2.1.1 Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle comprend trois tuniques concentriques : l'intima, composée de l'endothélium et de la lame basale, la média et l'avventice.

L'endothélium est composé d'une monocouche de cellules orientées dans le sens du flux sanguin. Il constitue le revêtement interne des vaisseaux, à l'interface entre la lumière et la paroi vasculaire. Ainsi, il permet les échanges entre le sang et la média sous-jacente, ce qui lui confère un rôle clé dans la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire.

La média est composée principalement d'élastine et de cellules musculaires lisses qui sécrètent les éléments de la matrice extracellulaire comme le collagène. Cette structure confère des propriétés élastiques intrinsèques à cette tunique intermédiaire et permet d'assurer la compliance artérielle et le tonus vasculaire.

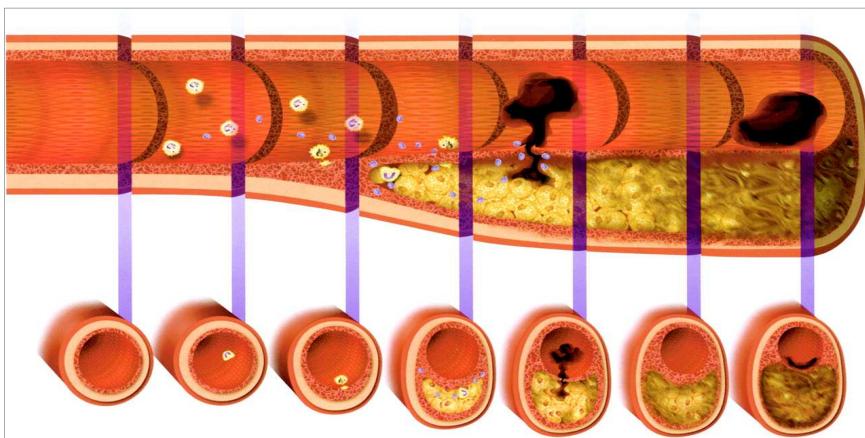
L'avventice, la couche la plus externe, est en contact direct avec les tissus environnants. Elle est formée d'un tissu conjonctif lâche composé de fibres de collagène, de fibres élastiques et de fibroblastes. Les *vasa vasorum*, petits vaisseaux qui traversent ce tissu conjonctif, assurent la nutrition des couches les plus externes de la paroi (Figure 18).



**Figure 18 : Structure de la paroi artérielle.** (D'après Kahle W, Anatomie, Flammarion Médecine-Sciences 1990).

### 2.1.2 La physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose a été définie, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, comme étant : "une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media" (OMS, 1954). Ces dépôts constituent alors l'athérome, qui se présente, dans un premier temps, par une plaque lipidique rétrécissant progressivement la lumière artérielle (sténose) et qui à terme peut conduire à l'oblitération du vaisseau (thrombose). Toutes les artères du corps peuvent être atteintes par l'athérome : l'aorte et les artères des membres, les carotides, les artères rénales, les artères coronaires, les artères digestives.



**Figure 19 : Initiation, progression et complication de la lésion d'athérome.** (D'après Libby P. et al, Circulation 2001).

L'endothélium joue un rôle crucial dans le développement du processus d'athérosclérose (Figure 19). En effet, les cellules endothéliales sont soumises, par le flux sanguin, à des forces de cisaillement. Ces forces se trouvent être modifiées lorsque le flux sanguin est perturbé (« shear stress ») au niveau des embranchements artériels et des courbures. C'est au niveau de ces sites que la dysfonction endothéliale apparaît (Cunningham and Gotlieb, 2005). L'initiation de la lésion athéromateuse débute suite à l'agression par des molécules comme les LDL (Low Density Lipoprotein) ainsi qu'une action de cytokines pro-inflammatoires et de l'Angiotensine 2 au niveau de l'endothélium (Brasier et al., 2002). La modification des propriétés des cellules endothéliales permet l'infiltration des LDL et leur accumulation dans l'espace sous-endothélial où ils sont oxydés (Steinberg, 1997).

Les cellules endothéliales sécrètent alors des molécules d'adhésion de la famille des sélectines (Pet E-sélectine) et des intégrines (ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1 et VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1) ainsi que des molécules chimioattractrices comme MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) (Gosling et al., 1999) permettant le recrutement des cellules du système immuno-inflammatoire tels que les monocytes et les lymphocytes T. Les monocytes recrutés dans l'intima se différencient en macrophages qui expriment des récepteurs « scavengers » permettant la capture des LDL oxydés. Les macrophages gorgés de lipides évoluent en cellules spumeuses ou « foam cells ». Ce processus aboutit à la formation des lésions athéromateuses précoces ou stries lipidiques.

Au cours du temps, ces lésions peuvent évoluer vers un phénotype plus complexe. Sous l'effet de la réaction immuno-inflammatoire, les cellules musculaires lisses migrent et prolifèrent afin d'encapsuler le centre nécrotique de la plaque athéromateuse, composé de lipides (Ross, 1999). Ce processus par épaissement et envahissement de la lumière artérielle (sténose) est susceptible d'entraîner une oblitération progressive de l'artère avec pour conséquence la privation de sang oxygéné pour l'organe irrigué (ischémie). La privation circulatoire engendrée peut être responsable de complications aigues : accidents vasculaires cérébraux ou infarctus du myocarde. Néanmoins, le développement de cette chape fibreuse stabilise la plaque d'athérome. A un stade plus avancé, les médiateurs de l'inflammation peuvent recruter des protéases qui fragilisent la chape fibreuse. La rupture de certaines plaques aura pour conséquence la formation d'un thrombus.

L'athérosclérose est la première cause de mortalité au niveau mondial, et à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Elle ne se manifeste qu'au bout de plusieurs années et son diagnostic est souvent trop tardif. Sa prévention et son traitement restent donc capitales.

## 2.2 Les œstrogènes, hormones vasculoprotectrices

### 2.2.1 Données épidémiologiques et cliniques

#### 2.2.1.1 *Nous les femmes...*

Des études épidémiologiques, comme l'étude de Framingham, ont montré que les femmes, en période d'activité génitale, présentent deux à quatre fois moins d'accidents cardiovasculaires que les hommes (Lerner and Kannel, 1986). Les femmes sont donc protégées des maladies cardiovasculaires, par leur statut hormonal, et ce, jusqu'à la ménopause (Kalin and Zumoff, 1990). Par ailleurs, dans la Nurses' Health Study, il a été démontré que chez les femmes ayant subies une hystérectomie, on observe une augmentation du risque de coronaropathie (Colditz et al., 1987). Ceci suggère fortement que les œstrogènes endogènes exercent un rôle protecteur vis-à-vis du risque cardiovasculaire (Arnal et al., 2007; Barrett-Connor and Stuenkel, 1999; Grodstein et al., 1996).

#### 2.2.1.2 *La ménopause*

La ménopause se traduit par l'arrêt progressif du cycle menstruel dû à une insuffisance folliculaire. Ceci s'accompagne d'une modification du statut hormonal. On observe notamment une insuffisance en œstrogènes qui conduit à l'apparition de nombreux symptômes réunis sous le terme de climatère : aménorrhée définitive, bouffées de chaleur, sécheresse vaginale et cutanée, diminution de la densité osseuse, prise de poids ainsi qu'une augmentation de l'incidence de maladies cardiovasculaires qui rejoint celle des hommes (Lerner and Kannel, 1986). Afin de limiter ces symptômes, les femmes peuvent avoir recours à un traitement hormonal substitutif (THS).

L'évolution démographique fait que les problèmes de santé liés au vieillissement deviennent de plus en plus importants dans les pays industrialisés. La prise en charge médicale de la ménopause représente un enjeu de santé publique.

#### 2.2.1.3 *Traitements hormonaux substitutifs, problématique clinique*

Bien que le THS soit le traitement le plus efficace pour palier à ces troubles climatériques, les bénéfices globaux liés à sa prescription ont été remis en question par la parution les études HERS (Heart and Estrogen/progestin Replacement Study) en 1998 et WHI (Women's

Health Initiative) en 2002 (Hulley et al., 1998; Rossouw et al., 2002; Rossouw et al., 2007). Ces études rapportent une augmentation de l'incidence des pathologies cardiovasculaires chez les femmes post-ménopausées qui ont reçu du CEE (Conjugated Equine Estrogen) combiné à l'acétate de medroxyprogesterone (MPA) par rapport à des femmes ayant reçu un placebo. Ce risque cardiovasculaire n'est pas augmenté chez des femmes post-ménopausées hysterectomisées ayant reçu le CEE seul (Anderson et al., 2004), mettant en évidence le rôle délétère du progestatif associé dans ce traitement. Ceci a été démontré antérieurement et expérimentalement par Miyagawa et al, chez des primates femelles ovariectomisées, la prévention par l'E2 de la dysfonction endothéliale coronarienne et donc du spasme coronaire étant abolie si l'E2 est associé à la MPA (Miyagawa et al., 1997).

De plus, il est important de souligner que les femmes incluses dans l'étude WHI avaient reçu le THS après 11 ans de ménopause, en moyenne. Or, le bras de cette étude incluant les femmes ayant débuté le traitement au début à la ménopause montre une forte tendance à la diminution du risque cardiovasculaire comparé aux femmes traitées longtemps après les premiers symptômes de la ménopause (Stevenson et al., 2009). Ainsi, la durée de privation œstrogénique est un facteur clé pour les effets vasculaires de l'E2 et pour le ratio bénéfices/risques du THS (Barrett-Connor, 2007; Clarkson and Appt, 2005; Lenfant et al., 2011).

Selon le principe de précaution, l'Afssaps recommandait en 2008 que : « le THS reste indiqué chez la femme ménopausée présentant des troubles fonctionnels liés à la ménopause. Il doit être prescrit à la dose minimale efficace, pour la durée la plus courte possible, dans le respect des précautions d'emploi et des contre-indications ». Ainsi, une meilleure compréhension de la balance entre les effets bénéfiques et délétères des œstrogènes est indispensable pour améliorer les traitements hormonaux et optimiser la prévention des maladies cardiovasculaires après la ménopause. Cependant, notre équipe ne partage pas cette position aussi restrictive car il existe de nombreuses preuves cliniques et expérimentales témoignant du rôle bénéfiques des œstrogènes au niveau cardiovasculaire (Arnal et al., 2012).

## 2.2.2 Données expérimentales

### 2.2.2.1 L'athéroprotection

Le potentiel athéroprotecteur de l'E2 a été mis en évidence dans plusieurs modèles expérimentaux de la souris au singe (Hodgin and Maeda, 2002). Tous ces travaux

concordent pour démontrer que les œstrogènes endogènes et exogènes exercent un effet protecteur significatif, caractérisé par une réduction de la constitution des lésions athéromateuses chez des femelles ovariectomisées en réponse à l'E2. En fonction des sites vasculaires étudiés (aorte ou coronaires) et du type de traitement administré (formulation orale ou parentérale des œstrogènes), cet effet protecteur varie de 35 % à 80 % comparé à un traitement placebo (Hodgin and Maeda, 2002). De plus, en fonction des études, l'effet protecteur des œstrogènes est soit non modifié, soit atténué par l'association d'un progestatif. Cet effet athéroprotecteur de l'E2 est notamment retrouvé chez les femelles ovariectomisées déficientes pour l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) (Bourassa et al., 1996) ou pour le récepteur aux LDL (LDLr<sup>-/-</sup>) (Elhage et al., 1997a), deux modèles murins d'étude de l'athérosclérose. Néanmoins, contrairement à l'humain et aux primates où le taux plasmatique de LDL-cholestérol et le taux de HDL-cholestérol varient en réponse à un traitement œstrogénique, chez la souris, l'E2 induit une diminution simultanée de ces deux taux de lipoprotéines plasmatiques. Il est intéressant de souligner que l'effet protecteur des œstrogènes observé dans les modèles murins d'athérosclérose est indépendant de l'évolution des paramètres lipidiques. En effet, des travaux antérieurs de mon équipe montrent, chez la souris, qu'en absence d'expression de ER $\alpha$  au niveau médullaire, l'E2 exerce un effet athéroprotecteur sans impact sur la cholestérolémie (Billon-Gales et al., 2009a). De plus, il a été démontré chez la souris que l'effet athéroprotecteur de l'E2 est indépendant du taux de cholestérol plasmatique (Marsh et al., 1999). L'effet athéroprotecteur de l'E2 est aboli ou devient même délétère chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> ovariectomisées et traitées à l'E2 après une longue période de privation œstrogénique ; notamment en altérant l'environnement immunologique des lésions athéromateuses et la progression des plaques (Cann et al., 2008; Miller et al., 2007). Ces résultats expérimentaux confirment les données cliniques démontrant l'influence de la durée de la privation œstrogénique sur la réponse bénéfique vasculaire de l'E2.

#### 2.2.2.2 La ré-endothélialisation

Il a été montré que l'E2 favorise le processus de cicatrisation endothéliale après agression vasculaire. Il existe deux modèles expérimentaux pour étudier ce phénomène : le modèle de traumatisme endovasculaire permettant de dénuder la totalité de l'endothélium (Sullivan et al., 1995) et le modèle péri-vasculaire, dans lequel l'ensemble des cellules de la paroi artérielle sont lésées par un courant électrique (Carmeliet et al., 1997). Les œstrogènes sont capables d'accélérer la vitesse de régénération de l'endothélium dans ces modèles expérimentaux d'agression vasculaire réalisé chez le rat et la souris (Bouchet et al., 2001; Krasinski et al., 1997). Cet effet est dépendant de la présence de la eNOS qui jouerait un

rôle dans l'association du récepteur au complexe de signalisation membranaire et non de son activité, ainsi que du fibroblast growth factor 2 (FGF2) médullaire (Billon et al., 2008; Fontaine et al., 2006; Iwakura et al., 2003).

### 2.2.2.3 La relaxation et la vasodilatation

Les propriétés vasodilatatrices de l'E2 ont été démontrées *in vivo* chez des animaux ovariectomisés (Chambliss and Shaul, 2002; Rubanyi et al., 2002) ainsi que chez des femmes ménopausées sous THS (Sader and Celermajer, 2002). L'E2 potentialise la voie du NO (monoxyde d'azote) en augmentant l'expression et/ou l'activité, en aigu (en quelques minutes) de la eNOS (NO synthase des cellules endothéliales ou NOS3) (Binko et al., 1998; Hayashi et al., 1992) et en augmentant la biodisponibilité du NO, à plus long terme (en quelques heures) (Arnal et al., 1996).

Le NO est produit par la eNOS qui catalyse l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline (Pollock et al., 1991; Pollock et al., 1993). Ce messager radicalaire joue un rôle important dans la vasculoprotection par ses propriétés vasodilatatrices et anti-agrégantes (Gisclard et al., 1988). Dans les vaisseaux sanguins sains, l'endothélium produit du NO en réponse à divers stimuli tels que l'acétylcholine, et surtout en réponse au shear stress. La production de NO induit une vasodilatation par relaxation des cellules musculaires lisses et une inhibition de l'activation plaquettaire. Ces deux actions conduisent à un effet vasoprotecteur (Moncada and Higgs, 1993).

Cependant, l'inhibition pharmacologique de la production de NO par le L-NAME (L-NG-Nitroarginine Methyl Ester), à la différence de ce qui avait été observé chez le lapin (Holm et al., 1997), n'influence pas le développement de la strie lipidique chez la souris déficiente pour l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) (Elhage et al., 1997b) et n'altère pas l'effet athéroprotecteur de l'E2. De façon concordante, la surface des lésions reste réduite de 75% par l'administration d'E2 chez des souris ApoE<sup>-/-</sup>eNOS<sup>-/-</sup> (Hodgin et al., 2002). Il semblerait donc que la potentialisation de la production de NO par l'E2 n'est pas impliquée dans l'athéroprotection à un stade précoce (Elhage et al., 1997b). Cependant, à un stade plus avancé de la pathologie, le NO prévient des spasmes coronaires chez le primate et la femme (Collins et al., 1995; Miyagawa et al., 1997).

## 2.2.3 L'endothélium, une cible privilégiée de l'E2

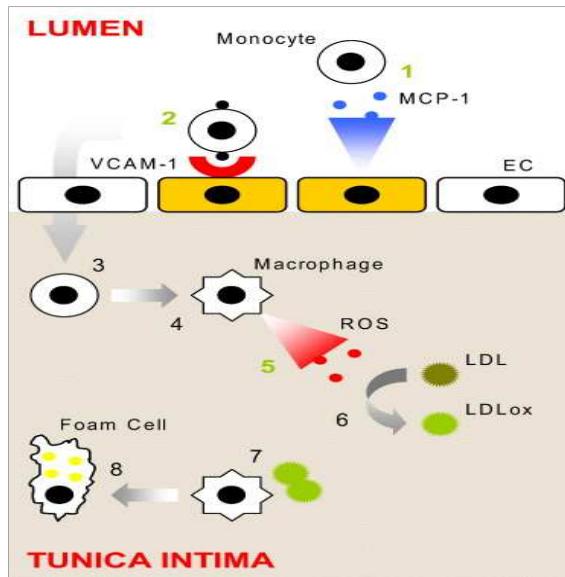
L'E2 exerce son pouvoir athéroprotecteur en ciblant l'endothélium, qui est le garant de l'intégrité artérielle. Des études chez le lapin et la souris hypercholestérolémiques montrent que les effets bénéfiques de l'E2 sont plutôt dus à son action directe sur la paroi artérielle et non à une modification du profil lipidique. Holm *et al.* ont observé une perte de l'effet athéroprotecteur de l'E2 chez le lapin hypercholestérolémique ayant subi une agression endothéliale par ballonnisation (Holm *et al.*, 1999). De plus, mon équipe a également démontré l'absence d'effet athéroprotecteur de l'E2 chez la souris, dans un modèle d'inactivation sélective du ER $\alpha$  endothérial (*Tie2-Cre*<sup>+</sup>ER $\alpha$ <sup>flox/flox</sup>LDLr<sup>-/-</sup>) (Billon-Gales *et al.*, 2009a).

Ainsi, l'effet protecteur de l'E2 à un stade précoce du processus athéromateux s'explique par un effet prédominant sur la cible endothéliale. En revanche, l'effet pro-inflammatoire de l'E2 pourrait se manifester à un stade avancé de la pathologie, alors que les plaques d'athérome sont déjà formées. L'hypothèse actuelle est que ceci pourrait contribuer au surcroit de risque cardiovasculaire observé dans les études cliniques en favorisant les phénomènes de rupture de plaque (Calippe *et al.*, 2008; Gourdy *et al.*, 2005; Maret *et al.*, 2003).

Il a été montré, *in vitro* et *in vivo*, que l'E2 agit également au niveau des cellules musculaires lisses (CML) en inhibant leur prolifération et leur migration *via* la signalisation des MAPK. Ce processus prolifératif et de migration des CML contribue, d'une part à la formation pathologique de sténose artérielle, mais également à la stabilisation des plaques d'athérome déjà formées (Cathapermal *et al.*, 1998; Geraldes *et al.*, 2002; Kolodgie *et al.*, 1996; Pare *et al.*, 2002).

### 2.2.3.1 L'E2 prévient l'activation endothéliale

L'E2 prévient l'activation endothéliale notamment en inhibant l'induction de VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), d'ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1), de E-selectine, d'IL-8 et MCP-1 dans des cellules endothéliales activées par l'IL-1 $\beta$  ou par le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) (Caulin-Glaser *et al.*, 1996; Nakai *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 2002). Ces cytokines permettent de diminuer l'adhésion et l'infiltration monocytaire dans l'endothelium chez les lapins hypercholestérolémiques (Figure 20) (Nathan *et al.*, 1999).



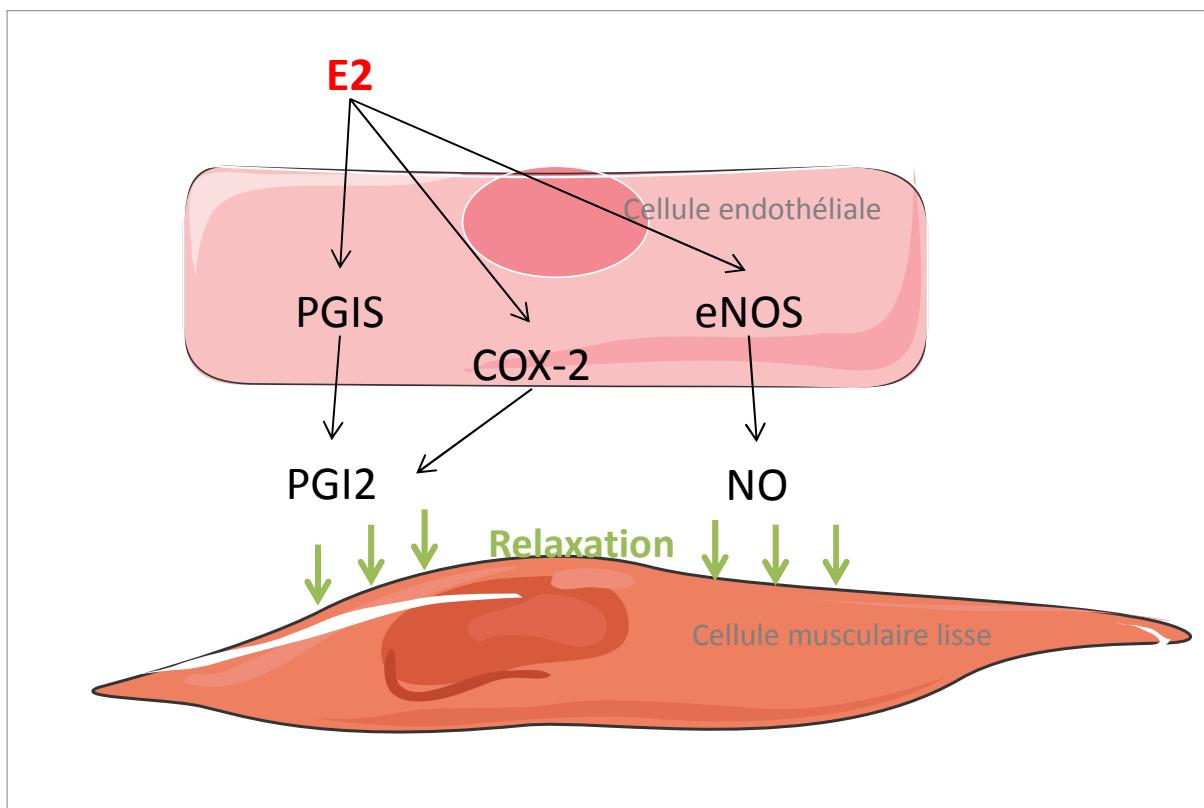
**Figure 20 : L'E2 influence les premiers stades de l'athérosclérose.** Les cellules endothéliales (CE) recrutent les monocytes par la sécrétion de MCP-1 (composé chimioattractant (1) et les lymphocytes par la sur-expression, à leur surface, de molécules d'adhésion pour les leucocytes comme VCAM-1 (2). Les monocytes adhérents migrent dans l'espace sous-endothélial (3) et se différencient en macrophages. Les macrophages entretiennent la réaction immuno-inflammatoire, notamment en sécrétant des espèces réactives à l'oxygène (ROS), qui stimulent l'oxydation des LDL. Les macrophages phagocytent les LDL oxydées (LDLox) et se différencient en cellules spumeuses. Les étapes surlignées en vert (1, 2 et 5) sont soumises à une inhibition œstrogénique. (D'après Gilliver SC. et al, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2010).

### 2.2.3.2 L'E2 protège les cellules endothéliales du stress oxydant

Le stress oxydant, dû à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les mitochondries, est crucial dans la pathogenèse de l'athérosclérose. En condition physiologique, il existe un équilibre entre la chaîne de transport des électrons, la xanthine oxidase et les NAD(P)H oxidases qui génèrent des ROS et les superoxyde dismutases (SOD), les catalases et les glutathion peroxidases chargées de leur élimination. Il a été démontré, *in vivo*, chez le lapin ainsi que chez l'humain que l'expression de la NAD(P)H oxidase est augmentée au niveau des lésions d'athérome (Sorescu and Griendling, 2002; Warnholtz et al., 1999). Il a été observé, chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>, que l'E2 diminue l'expression de la NAD(P)H oxidase et induit, l'expression de Cu/ZnSOD et MnSOD, responsables de la capture des ROS, conférant ainsi à l'E2 des propriétés anti-oxydantes (Figure 20) (Wing et al., 2009).

### 2.2.3.3 L'E2 favorise l'activité vasodilatatrice des cellules endothéliales

L'endothélium est une cible importante de l'E2 en potentialisant l'activité de la eNOS (cf. relaxation et vasodilatation décrit dans la partie 2.2.2.3) mais également la production de prostacycline (PGI2). Cette molécule, produite par COX-2 (cytochrome c oxidase subunit 2) et la prostacycline synthase, possède des propriétés vasodilatatrices et antiagrégantes et confère ainsi une protection vasculaire. Ceci a été confirmé par la perte de l'effet athéroprotecteur de l'E2 dans un mutant murin invalidé pour le récepteur à la prostacycline (Egan et al., 2004). Ainsi, l'E2 induit l'expression de médiateurs de la vasodilatation et permet le dialogue entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Figure 21).



**Figure 21 : L'E2 possède des propriétés vasodilatatrices.** (PGIS = prostacycline synthase, COX-2 = cyclooxygenase 2, eNOS = NO synthase endothéliale, PGI2 = prostacycline, NO = monoxyde d'azote)

### 2.2.3.4 L'E2 modifie la balance prolifération/apoptose des cellules endothéliales

L'E2 favorise l'expression endothéliale de la molécule pro-apoptotique FasL qui pourrait ainsi limiter le trafic trans-endothelial des leucocytes, en favorisant en particulier l'apoptose des lymphocytes activés (Amant et al., 2001; Liou et al., 2010). Il est admis que le turn-over des cellules endothéliales est faible, expliqué par une résistance de ces cellules à l'apoptose

(Kockx and Knaapen, 2000). Néanmoins, il a été démontré *in vitro* que l'E2 prévient des phénomènes apoptotiques induits par divers stimuli tels que le TNF $\alpha$  (Spyridopoulos et al., 1997) ou l'hypoxie (Razandi et al., 2000).

De plus, l'E2 augmente la prolifération et la migration des cellules endothéliales en activant, *in vitro*, la signalisation des MAPK qui induit *in fine*, l'expression de la cycline D1 et inhibe l'expression de la thrombospondine 1 (TSP-1) (Fu et al., 2007; Geraldès et al., 2002). Ceci a été démontré *in vivo* après une agression de la carotide concomitante à un traitement à l'E2 (Filipe et al., 2008), comme précédemment expliqué (dans la partie 2.2.2.2).

## 2.3 Le tamoxifène et la vasculo-protection

Le tamoxifène est un modulateur sélectif des ER. Il est utilisé pour traiter ou prévenir la récidive du cancer du sein hormono-dépendant (tumeurs ER $\alpha$  positives). En effet, le tamoxifène diminue le taux de mortalité et le taux de récidive du cancer du sein chez les femmes, indépendamment de leur âge et de leur statut hormonal, dès un an de traitement. Ces taux diminuent de manière proportionnelle à la durée de prise du traitement (1998; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, 2005). De plus, la prise prolongée de tamoxifène exerce un effet vasculoprotecteur en prévenant le développement de l'athérosclérose.

### 2.3.1 Données cliniques

Il a été démontré, chez les femmes ménopausées (moyenne d'âge 55 ans), qu'un traitement par tamoxifène (20 mg/jour) pour le cancer du sein pendant environ 4 ans, diminue le risque d'infarctus du myocarde (Braithwaite et al., 2003). Ce risque est diminué proportionnellement à la durée du traitement (2 ans *versus* 5 ans) (Hackshaw et al., 2011). Ceci peut être corrélé à d'autres études épidémiologiques qui prouvent que l'administration de 20 mg/jour de tamoxifène diminue l'épaisseur intima-média chez les femmes ménopausées, indépendamment de l'âge et de la durée de ménopause avant le traitement en comparaison avec des femmes ménopausées traitées pour un autre type de cancer sans prise d'hormono-thérapie (Simon et al., 2002; Stamatelopoulos et al., 2004).

## 2.3.2 Données expérimentales

### 2.3.2.1 Vasorelaxation

L'étude de la relaxation artérielle chez le lapin (mâles ou femelles non gestantes) montre que le tamoxifène possède des propriétés vasodilatatrices par un mécanisme dépendant du NO (effet inhibé par le L-NAME) et dépendant de ER $\alpha$  (effet inhibé par le ICI182,780). La vasorelaxation observée en réponse au tamoxifène est en partie dépendante de l'intégrité de l'endothélium, mais néanmoins toujours effective sur un segment aortique dénué d'endothélium, ce qui suggère que le tamoxifène peut exercer son potentiel relaxant directement *via* les cellules musculaires lisses (Figtree et al., 2000).

### 2.3.2.2 Athéroprotection

L'effet athéroprotecteur du tamoxifène a été démontré dans plusieurs modèles expérimentaux tels que le singe, le lapin, le rat et la souris soumis à un régime hypercholestérolémique (Grainger et al., 1995; Kallas Hueb et al., 2005; Lawn et al., 1996; Reckless et al., 1997; Williams et al., 1997). Le tamoxifène, comme l'E2, modifie le profil lipidique dans les différents modèles expérimentaux. Néanmoins, l'implication de ces variations du profil lipidique sur l'effet athéroprotecteur reste contreversé car variable selon les études (Kallas Hueb et al., 2005; Reckless et al., 1997). Chez les femmes, ménopausées ou non, le tamoxifène induit une modification bénéfique du profil lipidique, à savoir : une diminution du cholestérol total et du LDL-cholestérol plasmatiques (Love et al., 1994; Rossner and Wallgren, 1984; Stevenson et al., 1994). Par ailleurs, même si différents processus ont été proposés tels que la diminution de la formation de cellules spumeuses et l'augmentation de TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) par les cellules musculaires lisses (de Medina et al., 2004; Grainger et al., 1993; Grainger et al., 1995), les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet athéroprotecteur du tamoxifène restent à définir. De plus, aucune donnée bibliographique n'a démontré l'implication du ER $\alpha$  dans ce mécanisme. Or, le tamoxifène présente une forte affinité pour des sites de fixation différents des ER appelés Anti-Estrogen Binding Site (AEBS). Il s'agit de complexes composés de 3 $\beta$ -hydroxysterol-D8-D7-isomérase et de 3 $\beta$ -hydroxysterol-D7-reductase qui ne présentent aucune affinité pour l'E2 (Kedjouar et al., 2004).

## 2.4 Implication de ER $\alpha$ dans les effets vasculo-protecteurs

ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont exprimés dans la plupart des acteurs cellulaires de l'athérosclérose, à savoir : les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les monocytes-macrophages, aussi bien chez les hommes que chez les femmes. La déprivation oestrogénique ainsi que l'administration retardée d'E2 altère l'expression du ER $\alpha$  dans les cellules de la paroi vasculaire : *in vitro* sur des cellules endothéliales en culture (Ihionkhan et al., 2002) et *in vivo* chez la ratte ovariectomisée (Pinna et al., 2008). De plus, il a été rapporté une corrélation inverse entre le taux d'expression de ER $\alpha$  et la quantité de lésions athéromateuses chez la femme préménopausée (Haas et al., 2007; Losordo et al., 1994; Nakamura et al., 2004). L'unique homme possédant une mutation inactivatrice du ER $\alpha$  présente des lésions athérosclérotiques précoces et une dysfonction endothéliale (Sudhir et al., 1997).

#### **2.4.1.1 Modèles murins déficients pour la totalité du ER**

Nous avons démontré expérimentalement le rôle crucial de ER $\alpha$  dans la ré-endothélialisation (Bouchet et al., 2001), la prévention de l'hyperplasie de la média (Pare et al., 2002), la production de NO (Darblade et al., 2002) et l'atheroprotection (Billon-Gales et al., 2009b) puisque ces effets vasculo-protecteurs sont abolis chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ .

En revanche, chez les souris déficientes pour ER $\beta$  (ER $\beta^{-/-}$ ) ovariectomisées, l'E2 n'influence pas la cicatrisation endothéliale ni la prolifération des cellules musculaires lisses après agression vasculaire (Bouchet et al., 2001; Karas et al., 1999). De plus, dans ce modèle murin, l'E2 n'induit pas d'augmentation de la production de NO (Pendaries et al., 2002) ni d'athéroprotection (Hodgin and Maeda, 2002). Le récepteur ER $\beta$  ne semble donc pas jouer un rôle primordial dans les effets vasculo-protecteurs de l'E2. Par contre, il a été démontré que ER $\beta$  serait impliqué dans la prévention de la fibrose cardiaque (Pedram et al., 2010) ainsi que dans la régulation de la pression artérielle (Zhu et al., 2002).

#### **2.4.1.2 Modèles murins déficients sélectivement pour les fonctions activatrices**

Les travaux récents au sein de notre équipe ont démontré, en utilisant les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>, que cette fonction activatrice n'est pas impliquée dans la majorité des effets vasculo-protecteurs de l'E2, tels que : la production de NO, le processus de ré-endothélialisation ainsi que l'effet atheroprotecteur (Billon-Galès et al, PNAS 2009). Quant à ER $\alpha$ AF-2, elle est nécessaire à l'effet athéroprotecteur de l'E2 mais pas à l'effet accélérateur de la ré-endothélialisation (Billon-Gales et al., 2011).

#### **2.4.1.3 Modèles murins déficients sélectivement pour ER $\alpha$ dans un compartiment cellulaire spécifique**

La diminution des lésions athéromateuses en réponse à l'E2 persiste chez des souris LDLr $^{-/-}$ , irradiées létalement et reconstituées avec de la moelle osseuse de souris ER $\alpha$  $^{-/-}$ , excluant un rôle du ER $\alpha$  hématopoïétique dans l'athéroprotection en réponse à l'E2 (Billon-Gales et al., 2009a). Par contre, la perte de l'effet athéroprotecteur de l'E2 chez les souris déficiente pour le ER $\alpha$  endothérial (Tie2-Cre $^{+}$ ER $\alpha$  $^{\text{flox/flox}}$ /LDLr $^{-/-}$ ) démontre le rôle crucial du ER $\alpha$  dans ce compartiment cellulaire (Billon-Gales et al., 2009a).

### **2.4.2 Signalisation transcriptionnelle relayée par ER $\alpha$ dans le système cardiovasculaire**

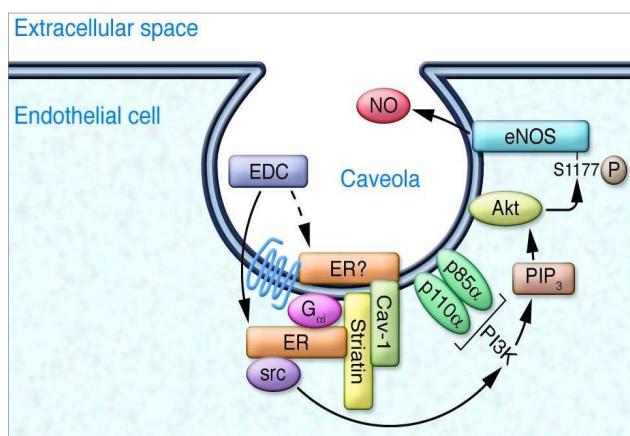
#### **2.4.2.1 Effets génomiques**

L'analyse du profil d'expression génique *in vitro*, dans des cultures primaires de cellules endothéliales, montre que l'E2 régule précocément (en 24h) des gènes impliqués dans la modification du cytosquelette, le métabolisme cellulaire, le métabolisme du cholestérol, la signalisation du vegf (vascular endothelial growth factor) ainsi que dans le métabolisme de l'inositol phosphate de manière ER-dépendante. Néanmoins, l'amplitude de régulation de ces gènes reste faible (seulement une vingtaine de gènes sont régulés plus de 2,5 fois en comparaison avec le contrôle) (Sobrino et al., 2009).

Deux études ont montré, par une approche de puce à ADN sur aorte entière, la modification du profil transcriptionnel induit par l'E2 chez la souris ovariectomisée. La première réalisée *ex vivo* afin de s'affranchir des régulations géniques dues à l'environnement (modification du profil lipidique, stress oxydant...) montre qu'à des temps de traitement très courts (entre 2 et 8h), l'E2 régule l'expression de gènes impliqués dans la physiologie à long terme et la physiopathologie vasculaire (métabolisme lipidique, croissance, prolifération cellulaire et facteurs de transcription). La réponse transcriptionnelle présente une hiérarchie temporelle : à 2h, on observe majoritairement une répression de l'expression des gènes régulés par l'E2, alors qu'après 8h de traitement, la majorité des gènes régulés sont induits et présentent des séquences ERE dans leur région promotrice (Schnoes et al., 2008). En revanche, l'analyse du transcriptome en réponse à un traitement chronique d'E2 (1 semaine), *in vivo*, démontre que la proportion de gènes induits est deux fois plus importante que la proportion de gènes réprimés chez les souris sauvages. La majorité des gènes cibles sont impliqués dans la synthèse de matrice extracellulaire, l'inhibition du stress oxydant, la régulation de la chaîne

respiratoire mitochondriale ainsi que des facteurs de transcription. Cette réponse transcriptionnelle est abolie chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ . Il est intéressant de noter que la délétion d'ER $\alpha$  augmente le nombre de gènes réprimés comparé aux souris sauvages (O'Lone et al., 2007). Très peu de données bibliographiques sont disponibles sur les régulations géniques induites par le tamoxifène au niveau du système cardiovasculaire, à l'exception d'une étude démontrant, par une approche de puce à ADN sur l'artère mésentérique, qu'après trois jours de traitement par voie orale, l'éthinylestradiol (EE) et le tamoxifène régulent différemment l'activité transcriptionnelle (Mark-Kappeler et al., 2011).

#### 2.4.2.2 Effets non-génomiques



**Figure 22 : Signalisation membranaire dans les cavéoles des cellules endothéliales.**  
(D'après Mendelsohn ME. et al, JCI 2010)

Les œstrogènes induisent une vasodilatation rapide (entre 5 et 20 minutes) via les effets non-génomiques sans que cela ne soit accompagné de modifications de l'expression génique (Caulin-Glaser et al., 1997; Lantin-Hermoso et al., 1997). Ces effets rapides de l'E2 sont relayés par ER $\alpha$  au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales (Chen et al., 1999; Pappas et al., 1995), notamment via l'isoforme ER $\alpha$  46 kDa, dépourvue de la fonction ER $\alpha$ AF-1 (Li et al., 2003). L'E2 active la eNOS via l'activation de la protéine G $\alpha$ i, la tyrosine kinase src ainsi que la voie PI3K/Akt qui conduisent à la phosphorylation de la eNOS sur la serine 1177, favorisant ainsi la production de NO (Chambliss and Shaul, 2002; Li et al., 2007; Stirone et al., 2005). Cette transduction du signal œstrogénique du ER $\alpha$  est localisée au niveau des cavéoles. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique qui constituent de véritables plateformes de signalisation par le regroupement des acteurs impliqués. L'adressage et le maintien à la membrane du ER $\alpha$  est assuré par sa

palmitoylation sur la Cystéine 447 ainsi que par des interactions protéiques avec la striatine, Src et la cavéoline-1 (Figure 22) (Mendelsohn and Karas, 2010). Les effets relayés par le ER $\alpha$  membranaire ont pu être mis en évidence par l'utilisation d'un œstrogène couplé à des oligodendrimères (EDC pour estrogen-dendrimer conjugate), *In vitro*, l'EDC induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales de manière similaire à l'E2. Ce qui lui confère, *in vivo*, les mêmes propriétés que l'E2 concernant la ré-endothélialisation après lésion carotidienne (Chambliss et al., 2010).

La régulation transcriptionnelle précoce par l'E2 peut être la résultante de la convergence entre les effets génomiques et les effets relayés à la membrane (ou non-génomiques). Ainsi, les effets initiés à la membrane peuvent potentialiser les effets génomiques *via* les cascades d'activation des kinases et les canaux calciques, impliquant des interactions protéine-protéine, la translocation protéique et la phosphorylation (Bjornstrom and Sjoberg, 2005; Vasudevan and Pfaff, 2007). Aucune donnée bibliographique ne démontre d'effets relayés à la membrane en réponse au tamoxifène.

### 3 Dissection de la transmission de la signalisation œstrogénique dans l'utérus

#### 3.1 La prolifération utérine en réponse à l'E2, de la physiologie à la physiopathologie

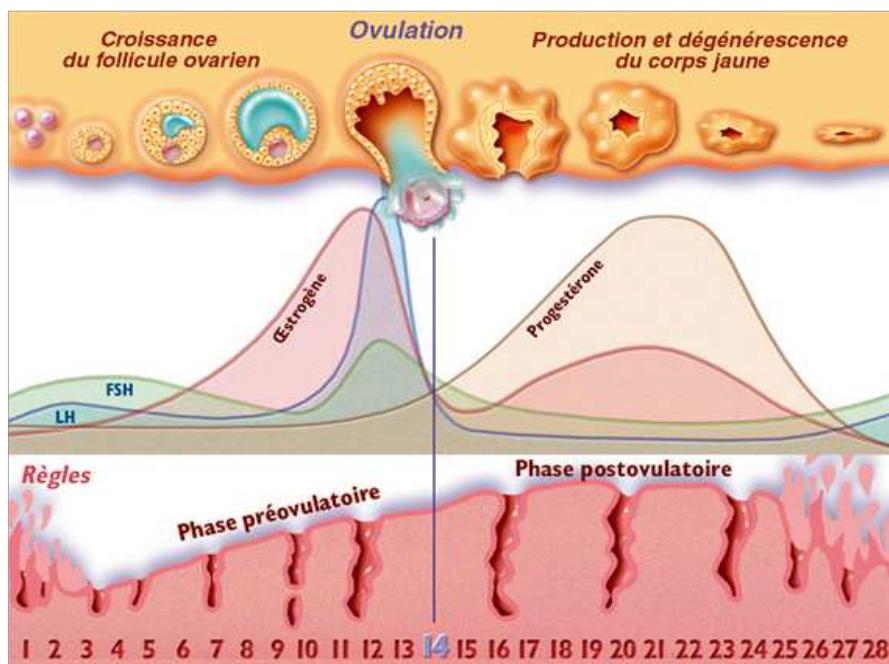
Chez les Mammifères, la morphologie utérine peut varier selon les espèces. Ses parois musculaires épaisses et extensibles lui permettent d'héberger le(s) fœtus pendant son développement et de l'(les) expulser lors de l'accouchement. Sa plasticité lui permet de s'adapter à plusieurs processus physiologiques tels que la menstruation chez les primates, l'implantation et la nidation de l'ovule fécondé.

##### 3.1.1 Chez la femme

Chez la femme, l'utérus est un organe en forme de poire renversée. Il se situe dans la cavité abdominale, entre le rectum et la vessie. Il comprend le corps qui constitue sa portion centrale et un col dans sa partie inférieure étroite qui s'ouvre dans le vagin. La paroi utérine est constituée de la muqueuse utérine ou endomètre, du myomètre richement vascularisé et de la séreuse formée de tissu conjonctif et du péritoine. De part et d'autre de l'utérus, dans les plis des ligaments larges, on trouve les trompes de Fallope qui transportent les ovocytes secondaires et les ovules fécondés des ovaires jusqu'à l'utérus (Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques, Lean K et Dalley AF. Editions De Boeck 1999).

### 3.1.1.1 Cycle menstruel

De la puberté et ce jusqu'à la ménopause, l'utérus subit des modifications morphologiques cycliques corrélées aux variations de la production des hormones sexuelles, répétées à intervalles périodiques, selon un rythme bien défini par l'axe hypothalamo-hypophysaire, celui du cycle menstruel. Le but de ces changements morphologiques est de préparer l'utérus à l'implantation embryonnaire et à la nidation. Le cycle s'étend sur environ 28 jours chez la Femme (Figure 23).



**Figure 23 : Représentation schématique du cycle menstruel chez la Femme : modifications hormonales et tissulaires associées.** (D'après Maïeutia, encyclopédie libre).

### 3.1.1.1.1 Modifications morphologiques de l'utérus au cours du cycle

Dans les premiers jours du cycle (J1 à J4), l'endomètre subit une phase de desquamation caractérisée par l'élimination de la zone fonctionnelle de celui-ci. Entre J5 et J8, l'endomètre commence à se régénérer : l'épithélium de surface se reconstitue et l'endomètre se vascularise à nouveau, les glandes, responsables de l'activité sécrétoire, commencent à se prolonger. La phase de prolifération endométriale, à proprement parler se situe entre J9 et J14, les glandes deviennent sinuées et les artéries spirales. La hauteur épithéliale est augmentée. Après l'ovulation, les glandes deviennent très contournées, ramifiées et sécrètent du glycogène. Les artéries atteignent leur développement maximal (de J15 à J25). L'endomètre est alors physiologiquement préparé à l'implantation embryonnaire, c'est la déciduaïsation. En l'absence de fécondation, il s'en suit alors un nouveau cycle de dégénérescence de l'endomètre. Ces modifications de l'utérus lors de la période génitale ne sont interrompues que par la gestation. À la ménopause, le corps et le col de l'utérus vont progressivement s'atrophier.

### 3.1.1.1.2 Régulation hormonale du cycle menstruel

L'hormone GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), synthétisée par l'hypothalamus de manière pulsatile, déclenche la sécrétion hypophysaire des hormones gonadotropes : la FSH (Follicle Stimulating Hormone), permettant le développement et la maturation d'un follicule de De Graaf par cycle et la LH (Luteinizing Hormone), responsable de l'évolution du follicule en corps jaune, transformant ainsi les cellules folliculaires de la granulosa en cellules lutéales (lutéinisation). Les hormones gonadotropes contrôlent également l'activité hormonale ovarienne, à savoir : la sécrétion d'E2 par les ovaires et de progestérone par les cellules lutéales du corps jaune. Les ovaires exercent, en retour, un rétrocontrôle hormonal sur le système hypothalamo-hypophysaire en inhibant la production de LH et FSH. La diminution de la production d'E2 et de progestérone en fin de cycle lève ce rétro-contrôle (Figure 23).

L'E2 joue un rôle clé dans le fonctionnement cyclique de l'appareil génital des mammifères. Au niveau de l'endomètre, l'E2, sécrété essentiellement par les ovaires, et en moindre quantité, par une conversion périphérique dans le tissu adipeux, stimule la prolifération cellulaire lors de la phase proliférative du début du cycle jusqu'à l'ovulation (de jour 1 à jour 14) avec un pic de production 24h avant l'ovulation. L'E2 favorise également l'angiogenèse ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins afin de faciliter l'apport d'oxygène, de nutriments et de facteurs de croissance, qui permettent la croissance et la prolifération des cellules endométriales (Lecce et al., 2001). Lors de la phase sécrétoire, (après ovulation), le

taux d'E2 est augmenté mais de manière moins importante et plus constante comparée à la phase proliférative. En absence de fécondation, le taux d'E2 diminue brutalement environ 48h avant les menstruations (Figure 23).

La progestérone est l'hormone stéroïdienne directement responsable de la nidation de l'ovule fécondé et le maintien de la gestation, en induisant des modifications histologiques de l'endomètre, c'est la décidualisation. L'augmentation de sa synthèse, caractéristique de la phase sécrétoire, permet de réduire la perméabilité vasculaire, de modifier la composition de la glaire cervicale (afin d'empêcher l'entrée des spermatozoïdes), et de limiter la croissance cellulaire œstrogéno-dépendante de l'endomètre (Gershenson et al., 1977). Comme pour l'E2, l'absence de fécondation induit une diminution forte de la synthèse de progestérone 48h avant le début des menstruations.

A la ménopause, l'épuisement des follicules ovariens et leur résistance à l'action des hormones gonadotropes conduisent à la diminution progressive de la synthèse d'E2 et de progestérone, induisant ainsi l'atrophie utérine. L'endomètre entre alors en quiescence : l'épithélium perd sa fonctionnalité, les glandes deviennent simples et tubulaires et perdent leur activité sécrétoire et le stroma devient fibreux (Di Cristofano and Ellenson, 2007).

### **3.1.1.2 *Cancer de l'endomètre hormono-dépendant***

L'incidence du cancer de l'endomètre hormono-dépendant (type I) est augmentée après la ménopause. Ce type de cancer est lié à une hyper-œstrogénie d'origine endogène (le taux d'E2 synthétisé reste élevé mais n'est plus contre-balancé par la progestérone ce qui conduit à une hyperplasie endométriale) ou d'origine exogène. C'est particulièrement le cas chez les femmes ménopausées des pays industrialisés, ayant reçu un traitement œstrogénique seul (non associé à un progestatif), avant 1975. En effet, dans ce cas, la survenue de cancer de l'endomètre est augmentée de manière proportionnelle à la durée de traitement (risque augmenté d'un facteur 10 après 10 ans de traitement) et dépendante du composé œstrogénique utilisé (risque augmenté avec les CEE, issus de jumants gravides par rapport à l'utilisation d'un œstrogène synthétique) (Anderson et al., 2003; Grady et al., 1995).

Ainsi, l'E2 peut être impliqué dans le développement de pathologies utérines. Pourtant, en dépit du rôle essentiel que tient l'utérus dans le domaine de la fertilité et de la santé des femmes, les mécanismes hormonaux, cellulaires, et moléculaires qui contrôlent le fonctionnement de l'utérus, ne sont pas entièrement définis. La compréhension des mécanismes à l'origine de certaines pathologies gynécologiques ainsi que leur traitement, sont compliqués par la difficulté à trouver des modèles expérimentaux adéquats. En effet, le

cancer de l'endomètre, retrouvé généralement chez l'humain, ne se développe pas spontanément chez la souris. Chez la souris, l'E2 a un effet cancérigène sur l'utérus, uniquement s'il est administré en chronique à des femelles de 20 mois ou plus (Anisimov et al., 2005). Cependant, l'étude de la prolifération épithéliale chez la souris reste un excellent modèle d'étude des réponses hormonales de l'endomètre souvent après ovariectomie bilatérale.

Dans l'endomètre, l'effet du tamoxifène varie selon la concentration d'E2. En effet, chez les femmes en période d'activité génitale (avec un taux plasmatique d'E2 élevé), il joue le rôle d'antagoniste de l'E2 sans induire un épaississement de l'endomètre alors que chez les femmes ménopausées (faible taux d'E2 endogène), il est plutôt agoniste en augmentant l'épaisseur de l'endomètre (Chang et al., 1998; Kedar et al., 1994).

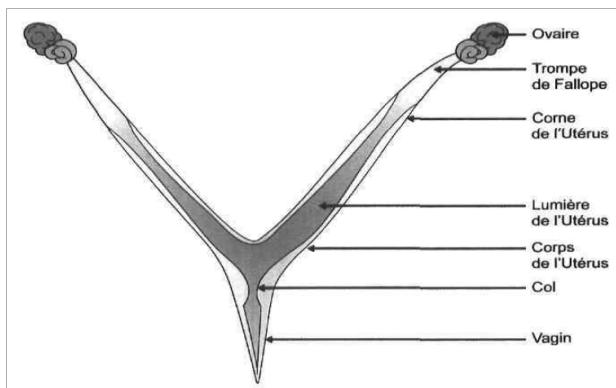
Bien que le bénéfice du tamoxifène sur la survie au cancer du sein est plus important que sur l'augmentation de la mortalité par cancer de l'endomètre, des études épidémiologiques montrent que le risque de développer un cancer de l'endomètre est 2 fois plus important après 2 ans de traitement par le tamoxifène et 7 fois plus important après 5 ans de traitement, quelque soit la dose utilisée chez les femmes ménopausées ou péri-ménopausées. Ce sur-risque n'est pas diminué après l'arrêt du traitement (Bergman et al., 2000). Mourits MJ et al ont démontré que le tamoxifène augmente l'expression protéique de ER $\alpha$  dans l'endomètre et modifie la balance prolifération/apoptose chez les femmes ménopausées traitées pour un cancer du sein par le tamoxifène sans lésions endométriales diagnostiquées par rapport à des femmes traitées pour le cancer du sein par une autre molécule (Mourits et al., 2002).

### 3.1.2 Chez la souris

#### 3.1.2.1 Anatomie de l'utérus chez la Souris

Sur le plan anatomique, l'utérus de la souris est bifide. Il est formé de deux cornes utérines dans lesquelles débouchent les oviductes, d'une cavité utérine et d'un col qui constitue une séparation entre les cavités utérine et vaginale.

La structure de la paroi utérine comporte différents compartiments tissulaires ou tuniques ainsi disposées de la lumière vers la périphérie : une muqueuse ou endomètre (composé de l'épithélium et du stroma), une musculeuse ou myomètre, et une séreuse.

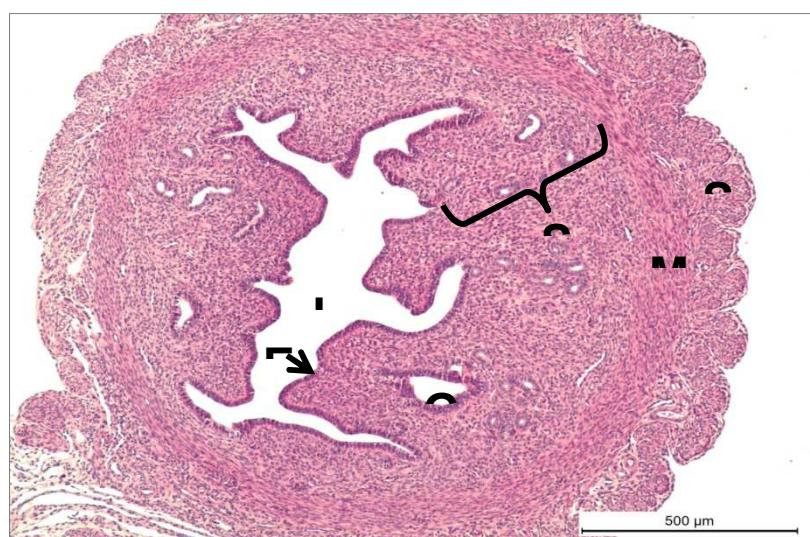


**Figure 24 : Anatomie de l'appareil reproducteur chez la Souris.** (D'après Foster HL. et al, The mouse in biomedical research. Normative Biology, Immunology, and Husbandry. Volume 3, 1991).

L'épithélium, au contact direct de la lumière utérine, est cylindrique et composé d'une couche de cellules épithéliales qui sécrètent du mucus. La hauteur et la structure des cellules épithéliales varient selon la sécrétion des hormones ovariennes au cours du cycle.

Sous l'épithélium, le stroma, dans lequel s'invaginent les glandes utérines, est très vascularisé. Il contient de nombreux fibroblastes ainsi que des cellules du système immuno-inflammatoire.

Le myomètre, tunique intermédiaire, est composé de deux couches concentriques de cellules musculaires lisses entourées par la séreuse (Figure 25).



**Figure 25 : Coupe transversale d'une corne utérine de souris colorée à l'hémalun-eosine.** L = lumière utérine, E = épithélium, St = stroma, Gl = glandes, My = myomètre, Se = séreuse

### **3.1.2.2 Le cycle œstral de la souris sous contrôle hormonal**

Chez la souris, le cycle œstral s'étend sur environ quatre à six jours (avec des variations inter-individuelles, génétiques et environnementales) et, contrairement au cycle œstral chez la femme, il n'est pas achevé par des menstruations. Le cycle œstral de la souris comprend quatre phases : pro-œstrus, œstrus, métœstrus et diœstrus, qui sont sous le contrôle des hormones gonadotropes et sexuelles, comme chez la femme. Ces différentes phases du cycle sont facilement détectables par un frottis vaginal.

La phase de **pro-œstrus** correspond à la phase proliférative chez la femme. Cette phase débute suite à la régression du corps jaune du cycle précédent, entraînant alors une chute de la synthèse de progestérone et une augmentation du taux de FSH. Cette première phase du cycle est caractérisée par une maturation des follicules ainsi qu'une prolifération endométriale. La maturation folliculaire favorise la sécrétion des œstrogènes qui induit le passage en œstrus. Sous l'influence des œstrogènes, l'endomètre se régénère, le stroma et le myomètre s'hypertrophient et l'épithélium devient pseudo-stratifié avec envahissement de quelques polynucléaires neutrophiles. L'activité glandulaire s'intensifie (Wood et al., 2007).

L'**œstrus** est caractérisé par la réceptivité sexuelle et l'acceptation du mâle par la femelle. Cette phase est marquée par l'influence des œstrogènes. C'est la phase d'ovulation qui se produit suite à un pic de LH. A la fin de l'œstrus, le taux d'œstrogènes diminue. Cette phase est caractérisée par une augmentation de la prolifération épithéliale lumineuse et glandulaire (Wood et al., 2007).

Le **métœstrus** est une phase de transition où le taux d'œstrogènes diminue et est contrecarré par la sécrétion de progestérone suite au développement du corps jaune. Les glandes deviennent contournées et ramifiées. L'œdème stromal commence à régresser. La dégénérescence de l'endomètre, observée au cours de cette phase, s'explique notamment par de nombreux événements apoptotiques des cellules stromales sous l'influence de la progestérone, et des cellules épithéliales luminales et glandulaires sous l'influence de la diminution d'E2 (Dharma et al., 2001; Wood et al., 2007).

La phase de **diœstrus**, quant à elle est sous la seule influence du corps jaune et de la progestérone. On observe alors une augmentation de l'activité glandulaire dans le stroma afin d'augmenter les sécrétions et ainsi favoriser l'implantation embryonnaire. En l'absence de fécondation, le corps lutéal régresse et l'endomètre subit une involution avec une régression glandulaire, une forte infiltration lymphocytaire, ainsi qu'une diminution de la vascularisation (Walmer et al., 1992; Wood et al., 2007).

La présence et la variation de l'expression des SHR dans les cellules utérines (en l'occurrence ER et PR) déterminent la sensibilité aux hormones stéroïdiennes au cours du cycle oestral en induisant la régulation transcriptionnelle spécifique de gènes cibles. Ceux-ci sont principalement impliqués dans le métabolisme, la division ou la différenciation cellulaire.

Il existe des différences majeures entre l'action de l'E2 chez la femme et chez la souris, notamment au niveau de l'implantation utérine qui est œstrogéno-dépendante chez la souris mais pas chez la femme (Curtis Hewitt et al., 2002). L'E2 stimule la prolifération cellulaire dans l'endomètre, caractérisée par une intense activité mitotique et la croissance des glandes utérines chez la Femme et chez la souris. Néanmoins, des différences de réactivité sont observées : il faut environ cinq jours d'exposition à l'E2 pour observer une activité mitotique de l'endomètre chez la femme alors que seulement 18 à 24h d'exposition sont suffisantes chez la souris (Groothuis et al., 2007).

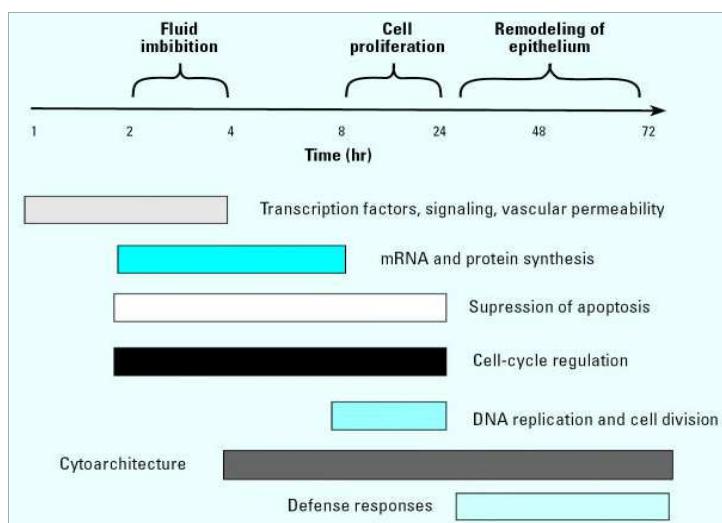
### ***3.1.2.3 La réponse utérine à l'E2 chez la souris, données expérimentales***

L'injection d'une dose unique d'E2 à des femelles rongeurs ovariectomisées induit une réponse proliférative endométriale en deux phases (Barton et al., 1998; Couse and Korach, 1999) :

- La phase précoce, qui survient dans les 6 premières heures après l'administration de l'E2, est caractérisée par une augmentation importante de la synthèse d'ARNm, de protéines et de lipides. Les mécanismes d'hyperémie et de perméabilité vasculaire se mettent en place. La sécrétion de prostaglandines ainsi que le métabolisme cellulaire (du glucose notamment) sont favorisés. L'activité de l'ARN polymérase et de la chromatine s'intensifient.
- La phase tardive (entre 6h et 24h) montre une augmentation de la synthèse d'ADN ainsi qu'une entrée en mitose synchronisée des cellules épithéliales chez les souris matures, ovariectomisées, et dans les compartiments épithelial et stromal chez les souris femelles immatures (avant la puberté, avant 4 semaines) (Quarmby and Korach, 1984). On distingue généralement deux vagues d'activité mitotique après environ 16 et 24h de traitement. Les processus mis en place lors de la phase précoce continuent leur progression (synthèse d'ADN et d'ARN). L'hyperplasie cellulaire et l'hypertrophie utérine deviennent alors observables.

L'intensité de la stimulation de la croissance utérine dépend de la dose d'E2 administrée, de sa biodisponibilité dans l'organisme et de son interaction avec les ER (Agarwal et al., 1982).

L'analyse globale du profil d'expression génique dans l'utérus en réponse à l'E2, par puce à ADN, est influencée par la méthode expérimentale : souris immatures ou ovariectomisées, le fond génétique, le mode d'administration et la dose d'E2 utilisée ainsi que le temps de traitement. Ainsi, les études du transcriptome montrent beaucoup de différences au niveau des cibles géniques régulées. Néanmoins, il existe une hiérarchie temporelle dans la régulation de l'expression génique en réponse à l'E2 corrélée aux modifications histologiques sur l'utérus (Figure 26) (Hewitt et al., 2003; Ivanga et al., 2007; Moggs et al., 2004; Suzuki et al., 2007; Wall et al., 2013; Watanabe et al., 2003).



**Figure 26 : Schéma représentatif du programme transcriptionnel associé à l'hypertrophie utérine en réponse à l'E2.** (D'après Moggs JG. Et al, Toxicogenomics 2004).

Une approche de microdissection par capture laser a également permis de mettre en évidence qu'il existe toutefois une différence dans la régulation de l'expression des gènes cibles de l'E2 entre le stroma et l'épithélium luminal (Hong et al., 2004).

### 3.1.2.4 Rôle de la progestérone dans la réponse utérine chez la souris

La réponse physiologique utérine est la conséquence de l'action combinée de l'E2 et de la progestérone, qui agissent comme de véritables chefs d'orchestre de la régulation transcriptionnelle au sein des différents compartiments utérins.

La progestérone joue un rôle important dans la physiologie utérine, en particulier sur le contrôle de la prolifération cellulaire induite par l'E2 et le remodelage de l'utérus nécessaire à

l'implantation embryonnaire (décidualisation). Ainsi, l'altération de sa signalisation est impliquée dans diverses pathologies comme l'endométriose et l'hyperplasie endométrial. Les souris femelles invalidées pour le PR ( $PR^{-/-}$ ) sont stériles (absence d'ovulation) et présentent une réponse utérine altérée au traitement simultané à l'E2 et la progestérone (P4) (Lydon et al., 1995). Les souris spécifiquement invalidées pour l'isoforme PR-A ( $PR-A^{-/-}$ ), présentent le même phénotype, démontrant que cette isoforme, à l'inverse de PR-B, joue un rôle prédominant dans l'utérus (Mulac-Jericevic et al., 2000). PR est exprimé dans tous les compartiments utérins mais son expression varie au cours du cycle oestral (Graham and Clarke, 1997).

La progestérone inhibe la prolifération épithéliale induite par l'E2 et induit la prolifération au niveau du compartiment stromal. Après un traitement chronique à l'E2 (4 jours), PR est fortement induit dans le stroma et réprimé dans l'épithélium (Tibbetts et al., 1998). Cette redistribution de la localisation de PR dans les compartiments épithelial et stromal est dépendante du ER $\alpha$ . En effet, les femelles ER $\alpha^{-/-}$  ovariectomisées présentent une forte expression de PR au niveau de l'épithélium, de manière identique au souris sauvages mais n'est pas réprimée en réponse à l'E2 (Kurita et al., 2000b). De plus, la progestérone exerce un rétro-contrôle négatif en inhibant l'expression de PR (Martin et al., 1973; Tibbetts et al., 1998). Le rôle fonctionnel de PR dans chaque compartiment utérin sera détaillé dans la partie 3.2.4.

## 3.2 Implication du ER $\alpha$ dans l'hypertrophie utérine

ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont tous deux exprimés dans les différents compartiments cellulaires de l'utérus (épithélium, stroma, myomètre) ; néanmoins, la quantité de ER $\alpha$  est plus importante. Son expression est augmentée (ARNm et protéine) en phase de pro-oestrus chez les souris intactes matures et en réponse à un traitement chronique à l'E2 chez les souris matures ovariectomisées. De plus, la localisation nucléaire du ER $\alpha$  est favorisée (Bergman et al., 1992).

### 3.2.1 Approche pharmacologique

### **3.2.1.1 Les agonistes spécifiques de ER $\alpha$ et ER $\beta$**

L'utilisation d'agonistes spécifiques de chaque type de ER, administrés à des souris femelles immatures, montre que le PPT (agoniste spécifique de ER $\alpha$ ) induit une augmentation du poids utérin de manière dose-dépendante au même titre que l'E2. Ceci est corrélé à une réponse transcriptionnelle précoce et une induction de la prolifération modérée, comparable à l'E2. A l'inverse, le DPN (agoniste spécifique de ER $\beta$ ) n'induit aucune activité uterotrophique et les souris traitées présente un profil transcriptionnel identique aux souris contrôles (sauf pour la répression de PR et AR). Ces résultats démontrent donc que l'activation d'ER $\alpha$ , à l'inverse d'ER $\beta$ , est suffisante pour relayer la réponse utérine à l'E2. De manière intéressante, lorsque ces composés sont administrés de manière concomitante, l'hypertrophie utérine induite est modérée par rapport à celle induite par le PPT seul. Ainsi, ER $\beta$  semble jouer un rôle de répresseur dans la réponse utérine relayée par ER $\alpha$  (Frasor et al., 2003).

### **3.2.1.2 Le tamoxifène**

Dans l'utérus, le tamoxifène exerce une action uterotrophique, malgré son potentiel œstrogénique plus faible que l'E2. Cette molécule induit une réponse transcriptionnelle comparable à celle induite par l'E2 (en particulier en stimulant la signalisation IGF-1) (Klotz et al., 2000). L'analyse comparative, à large échelle par puce à ADN, de la réponse transcriptionnelle utérine montrent qu'environ 65% des gènes régulés par les œstrogènes le sont également par le tamoxifène malgré une réponse retardée avec cette molécule. Cette même étude révèle que la proportion de gènes spécifiquement régulés par l'une ou l'autre des molécules reste marginale (Fong et al., 2007). Après 18h de traitement, le tamoxifène induit une prolifération épithéliale chez des souris matures ovariectomisées de manière identique à l'E2 (Zhang et al., 2005).

De manière similaire à l'E2, lors de l'hypertrophie utérine en réponse au tamoxifène, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'accumulation de liquide interstitiel contribuent à la formation de l'œdème stromal dû, notamment, à l'induction de l'expression du VEGF (Hyder et al., 1996).

Il est intéressant de noter que le tamoxifène exerce son pouvoir antagoniste sur l'utérus, particulièrement sur l'œdème stromal seulement en présence d'E2. Ainsi, un traitement chronique au tamoxifène (28 jours) entraîne uniquement une diminution du poids utérin chez des souris intactes en période d'activité génitale ainsi que chez des souris matures ovariectomisées et traitées à l'E2 (Sourla et al., 1997). Le tamoxifène réprime également l'induction de PR induite par l'E2 mais n'a pas d'influence sur l'augmentation de la synthèse

d'ADN en réponse à l'E2 (Castellano-Diaz et al., 1989). Pourtant, l'analyse transcriptionnelle globale démontre que seulement 10% des gènes cibles des œstrogènes présentent une régulation altérée en réponse au co-traitement avec le tamoxifène. Toutefois, aucunes données fonctionnelles concernant la prolifération épithéliale ne sont rapportées dans cette étude (Fong et al., 2010).

### 3.2.2 Approche génétique

#### 3.2.2.1 Modèles murins déficients pour la totalité du ER

Il existe plusieurs modèles murins déficients pour ER $\alpha$ , ER $\beta$  ou les deux ER. De manière générale, les souris matures ER $\alpha^{-/-}$  et ER $\alpha\beta^{-/-}$  sont infertiles et présentent un utérus atrophique avec peu de glandes au repos et des cellules épithéliales cuboïdales. Cependant, certaines souris ER $\beta^{-/-}$  présentent une fertilité identique aux souris sauvages ou seulement une fertilité altérée (Dupont et al., 2000; Krege et al., 1998; Lubahn et al., 1993).

Les souris doublement invalidées pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  (ER $\alpha\beta^{-/-}$ ), comme les souris ER $\alpha^{-/-}$ , et à la différence des souris ER $\beta^{-/-}$ , présentent une hyper-œstrogénie et une absence de cycle œstral et ne répondent pas à l'E2 en terme de régulation transcriptionnelle et de prolifération épithéliale (Couse et al., 1995; Dupont et al., 2000; Hewitt et al., 2003; Hewitt et al., 2010a; Lubahn et al., 1993; Watanabe et al., 2003). En revanche, les souris ER $\beta^{-/-}$  ovariectomisées présentent une hyperprolifération épithéliale et une perte de la différenciation cellulaire (diminution de l'expression de la E-cadhéchine épithéliale) en réponse à l'E2 (Wada-Hiraike et al., 2006). Les souris ER $\beta^{-/-}$  immatures ne présentent pas d'augmentation de la prolifération stromale et épithéliale en réponse à l'E2 mais une activité prolifératrice importante à l'état basal (Weihua et al., 2000). L'ensemble de ces études permet de conclure qu'ER $\alpha$  est crucial dans la réponse utérine à l'E2, alors qu'ER $\beta$  exerce plutôt un rôle de frein dans la prolifération utérine.

La réponse utérine au tamoxifène est abolie chez les souris ER $\alpha$ NeoKO, ce qui démontre un rôle crucial de ER $\alpha$  dans ces mécanismes (Das et al., 1997; Klotz et al., 2000).

Malgré des taux de progestérone identique chez les souris mutées pour les ER, la redistribution de PR, dans l'utérus, en réponse à l'E2 nécessite la présence de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . En réponse à l'E2, l'induction de l'expression de PR dans le stroma est ER $\alpha$ -dépendante (Winuthayanon et al., 2010) alors que la répression de l'expression de PR dans l'épithélium est ER $\beta$ -dépendante (Weihua et al., 2000).

### **3.2.2.2 Modèles murins déficients sélectivement pour les fonctions activatrices**

Les souris ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> présentent une stérilité et une atrophie utérine en période d'activité génitale. Elles sont insensibles à un traitement chronique d'E2 en terme d'induction du poids utérin (Billon-Gales et al., 2011b). De plus, les souris AF2ERKI sont infertiles à l'état homozygote et présentent une hyper-œstrogénie. L'utérus de ces souris est atrophique, présente peu de glandes et est insensible à l'E2 concernant la réponse transcriptionnelle et la prolifération épithéliale. Le tamoxifène, connu pour antagoniser la fonction activatrice ER $\alpha$ AF-2, induit une prolifération épithéliale et une réponse transcriptionnelle, bien qu'elle soit atténuée par rapport à celle de l'E2, chez les souris AF2ERKI ovariectomisées. Ainsi, ER $\alpha$ AF-2 n'est pas nécessaire pour induire une activité uterotrophique en réponse au tamoxifène (Tableau 3) (Arao et al., 2011). Les souris AF2ERKI ne présentent pas de prolifération utérine en réponse aux facteurs de croissance. Cette étude suggère que l'hélice H12 joue un rôle important dans cette signalisation (Arao et al., 2011). Ainsi, ER $\alpha$ AF-2 est crucial pour relayer la réponse utérine à l'E2 (Tableau 3).

La mise en évidence d'une fuite transcriptionnelle dans la première génération de souris ER $\alpha$ NeoKO, générée en 1993, a été rapportée en 2002. La protéine chimérique de 55 kDa résultante de cette fuite est exprimée de manière très hétérogène dans les différents tissus mais est présente dans l'utérus (Kos et al., 2002; Pendaries et al., 2002). Cette protéine chimérique est dépourvue de ER $\alpha$ AF-1. Il est alors nécessaire de réinterpréter les données bibliographiques utilisant ce mutant (ER $\alpha$ NeoKO) (Arnal et al., 2012). L'absence de prolifération épithéliale en réponse à l'E2 et aux facteurs de croissance et la persistance de la réponse utérine à la progestérone chez les souris femelles ovariectomisées ER $\alpha$ NeoKO sont des preuves indirectes de l'implication de ER $\alpha$ AF-1 dans ces mécanismes (Curtis et al., 1999; Curtis et al., 1996; Klotz et al., 2002; Lubahn et al., 1993). De plus, le modèle KIKO, présentant un allèle muté sur le DBD et un allèle ER $\alpha$ NeoKO dépourvu de ER $\alpha$ AF-1, sont insensibles à l'E2 en terme d'induction du poids utérin et d'hyperémie (Tableau 3) (O'Brien et al., 2006). Ainsi, une diminution de l'expression de ER $\alpha$ AF-1 pourrait influencer l'œdème stromal induit par l'E2. Néanmoins, aucune preuve directe et fonctionnelle de l'implication *in vivo* de ER $\alpha$ AF-1 dans les mécanismes de l'hypertrophie utérine n'a été démontrée à ce jour.

### **3.2.2.3 La réponse utérine à l'E2 nécessite un LBD et un DBD de ER $\alpha$ fonctionnels**

L'étude du mutant ENERKI (Nonclassical ER $\alpha$  knock-in), présentant une mutation au niveau du LBD (G525L) qui empêche l'interaction de l'E2 avec le récepteur, témoigne de l'importance de l'activation ligand-dépendante du ER $\alpha$  dans la prolifération utérine et la fertilité. En effet, ces souris sont stériles à l'état homozygote. Les femelles ENERKI

ovariectomisées présentent une absence de prolifération épithéliale en réponse à l'E2, qui reste effective en réponse à l'IGF-1. Ceci démontre donc que la réponse utérine à l'E2 nécessite un LBD fonctionnel et que la présence seule du DBD et de l'ER $\alpha$ AF-1 n'est pas suffisante (Tableau 3) (Sinkevicius et al., 2008).

Le mutant murin NERKI à l'état hétérozygote (car les souris sont stériles à l'état homozygote), présente un allèle de *esr1* avec deux mutations ponctuelles d'acides aminés situés dans le premier doigt de zinc du DBD (E207A, G208A) et un allèle sauvage. Ce modèle permet d'étudier la réponse utérine lorsque la balance entre signalisation classique (*via* les ERE) et non-classique (*via* les interactions protéines-protéines sur les éléments AP-1 et Sp1) est altérée (Jakacka et al., 2002). Le mutant KIKO hémizygote (qui présente un allèle déficient pour ER $\alpha$  et un allèle NERKI) permet d'étudier les effets exclusivement dus à la signalisation oestrogénique ERE-indépendante (O'Brien et al., 2006). L'analyse comparative du phénotype utérin de ces deux mutants démontre que 65% des gènes cible de l'E2 sont régulés *via* la signalisation classique contre 35% de gènes régulés *via* la signalisation non-classique et qu'il existe une hiérarchie temporelle dans la réponse transcriptionnelle puisque ces derniers semblent régulés plus précocement (Hewitt et al., 2009). De plus, l'altération des régulations transcriptionnelles, en réponse à l'E2 à court terme (dans les 6 premières heures de traitement, en phase précoce), *via* les séquences ERE n'influence pas l'induction de l'hypertrophie utérine ainsi que la prolifération épithéliale à 24h. En revanche, l'abolition de cette voie de signalisation bloque l'hyperémie et la formation de l'œdème stromal (corrélé ou non à la prolifération épithéliale car les résultats sont controversés sur ce point (Tableau 3) (Hewitt et al., 2009; O'Brien et al., 2006).

Ces résultats sont toutefois à nuancer au vue de la caractérisation du mutant EAAE (mutations dans le DBD Y201E, K210A, K214A, R215E) présentant une incapacité du récepteur à se fixer sur l'ADN. Ces souris sont stériles à l'état homozygote. Les souris mutantes EAAE ovariectomisées et traitées par gavage à l'EE présentent une abolition de la réponse transcriptionnelle (induction et répression) en phase précoce et tardive corrélée à une absence d'augmentation du poids utérin. Aucunes données sur la prolifération utérine ne sont abordées dans cette étude (Tableau 3) (Ahlborg-Dieker et al., 2009). Le mode d'activation du ER $\alpha$  *via* les séquences ERE est donc nécessaire pour relayer la réponse utérine de l'E2, et en particulier la formation de l'œdème stromal. De plus, la réponse utérine à l'E2 nécessite un DBD fonctionnel et la présence seule du LBD et de l'ER $\alpha$ AF-1 n'est pas suffisante pour relayer cette réponse.

La prolifération épithéliale en réponse au tamoxifène est préservée chez les souris ovariectomisées hétérozygotes NERKI et hémizygotes KIKO, ce qui suggère que ce

mécanisme est plutôt relayé par la signalisation non-classique. A l'inverse, l'instauration de l'œdème stromal n'est pas relayé par la signalisation non-classique car aucune augmentation du poids de l'utérus en réponse à un traitement chronique au tamoxifène (72h) n'est observée chez les souris KIKO (Jakacka et al., 2002; O'Brien et al., 2006).

Au niveau moléculaire, l'analyse par ChIP-Seq d'*uteri* de souris ovariectomisées et traitées pendant une heure à l'E2, en co-précipitant ER $\alpha$  et l'ARN polymérase II montre que ER $\alpha$  se fixe sur de nombreux sites ERE de manière proximale ou distale du promoteur des gènes cibles (environ 10000 sites ERE). De plus, il est intéressant de noter qu'ER $\alpha$  interagit avec les séquences ERE à l'état basal chez les souris ovariectomisées et non traitées (signalisation indépendante du ligand) (Hewitt et al., 2012).

### 3.2.3 Implication des effets membranaires

Dans les cellules Ishikawa (lignée de carcinome endométrial humaine), la croissance cellulaire n'est pas induite par l'EDC. De plus, *in vivo*, l'EDC ne montre aucune activité uterotrophique quelque soit la durée de traitement et la dose utilisée (Chambliss et al., 2010). Les souris MOER (exprimant seulement un domaine E fonctionnel à la membrane) présente un utérus atrophique même après un traitement chronique à l'E2 pendant 3 jours (Pedram et al., 2009).

Ainsi, il semblerait que les approches pharmacologiques et génétiques convergent pour suggérer que l'hypertrophie utérine en réponse à l'E2 ne peut être relayée par des effets membranaires seuls. La fraction nucléaire d'ER $\alpha$  est donc cruciale et ne peut être compensée par le ER $\alpha$  membranaire. Toutefois ces résultats n'excluent pas un rôle du ER $\alpha$  membranaire dans la réponse utérine à l'E2.

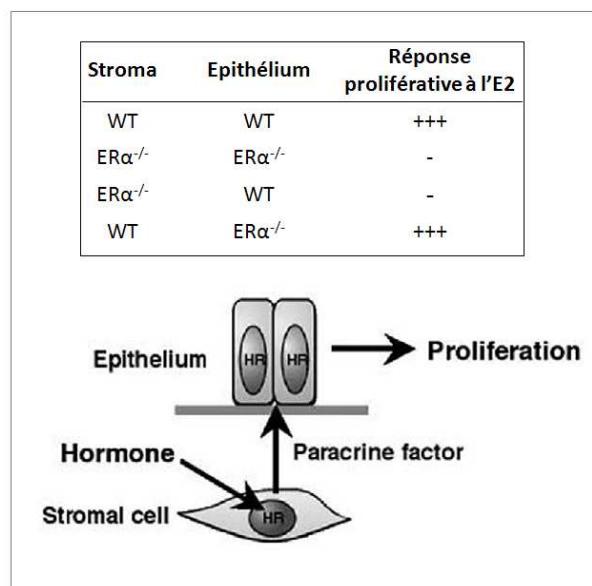
Le ER $\alpha$  membranaire est impliqué dans la régulation du cycle oestral et la reproduction chez la souris mature intacte. En effet, comme démontré à l'aide d'E2 couplé à l'albumine sérique bovine, ce qui le rend imperméable à la membrane et lui permet donc d'activer seulement les effets membranaires, le ER $\alpha$  membranaire inhibe la production de LH au niveau central, en régulant les flux calciques dans les astrocytes. De plus, l'ER $\alpha$  membranaire joue également un rôle dans la réceptivité sexuelle en favorisant la lordose (cambrure de la femelle pour l'acceptation du mâle) (Micevych et al., 2009).

### 3.2.4 Le dialogue entre le compartiment stromal et épithéial

La prolifération épithéliale en réponse à l'E2 est dépendante du ER $\alpha$  stromal qui exerce sa fonction par un mécanisme paracrine sur les cellules épithéliales.

*In vitro*, la mise en co-culture de cellules utérines stromales et épithéliales primaires entraîne une prolifération cellulaire épithéliale en réponse à l'E2 sans le contact physique entre ces deux populations cellulaires. Cette absence de contact préserve également l'inhibition de la prolifération cellulaire en réponse à un co-traitement d'E2 et P4 (Chung and Das, 2011). Les interactions paracrines épithélium-stroma ont également été mises en évidence *in vivo* par différentes approches.

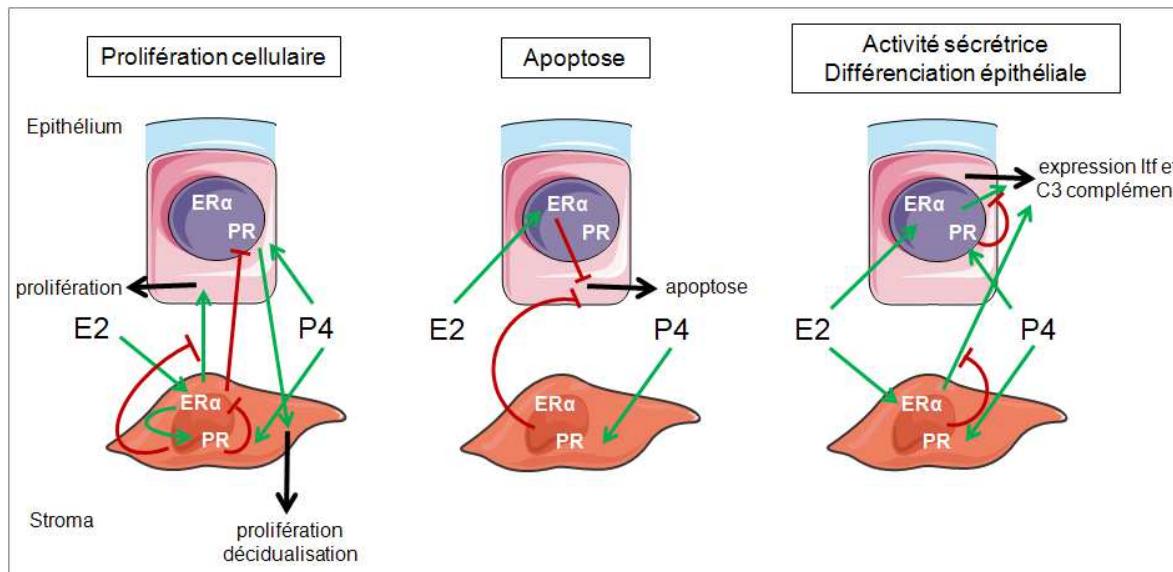
La technique de recombinaison tissulaire a permis de mettre en évidence l'implication de ER $\alpha$  spécifiquement dans le compartiment stromal et épithelial. Cette technique consiste à dissocier l'épithélium et le stroma par digestion enzymatique et à recombiner ces tissus provenant d'un autre animal génétiquement modifié afin de régénérer une unité stromale/épithéliale chimérique qui est ré-implantée sous la capsule rénale d'une souris Nude ovariectomisée et traitée ou non par l'E2. La greffe recombinatoire entre souris sauvage et ER $\alpha^{-/-}$  montre que l'ER $\alpha$  stromal est indispensable pour relayer la prolifération épithéliale totale par un mécanisme paracrine, en réponse à l'E2, tandis que ER $\alpha$  épithelial ne l'est pas (Figure 27) (Cooke et al., 1997).



**Figure 27 : Mécanismes d'interaction entre épithélium et stroma pour induire la prolifération épithéliale en réponse à l'E2.** WT = souris sauvage (D'après Cunha GR. et al, Arch Histol Cytol 2004).

Cette technique a permis de mettre en évidence certains effets nécessitant la présence du ER $\alpha$  à la fois dans le stroma et dans l'épithélium comme l'activité sécrétrice des cellules épithéliales (régulation de la lactotranferine et du C3 complément) (Figure 28) (Buchanan et al., 1999).

Enfin, l'absence d'implication du ER $\alpha$  épithéial dans la prolifération utérine en réponse à l'E2 a été confirmée grâce à un modèle murin issu du croisement entre des souris ER $\alpha^{flox/flox}$  avec des souris exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur spécifiquement épithéial Wnt7a. Ces femelles déficientes spécifiquement pour ER $\alpha$  épithéial sont infertiles malgré un cycle oestral régulier et un développement folliculaire normal. Les femelles mutantes matures ovariectomisées ne présentent pas d'augmentation du poids utérin après 24h de traitement à l'E2 et légère augmentation du poids utérin est observable après 3 jours de traitement. Cependant, l'épithélium de ces souris prolifère en réponse à l'E2 et à l'IGF-1. Comme précédemment démontré avec la technique de recombinaison tissulaire, ER $\alpha$  épithéial est par contre indispensable (en synergie avec ER $\alpha$  stromal) pour l'induction de la lactotransférine et joue un rôle crucial dans la prévention de l'apoptose et l'implantation embryonnaire (Figure 28) (Winuthayanon et al., 2010).



**Figure 28 :** Mécanismes d'interactions fonctionnelles entre ER $\alpha$  et PR dans l'épithélium et le stroma pour induire la prolifération épithéliale en réponse à l'E2. (Adapté de Cunha GR. Et al, Arch Histol Cytol 2004).

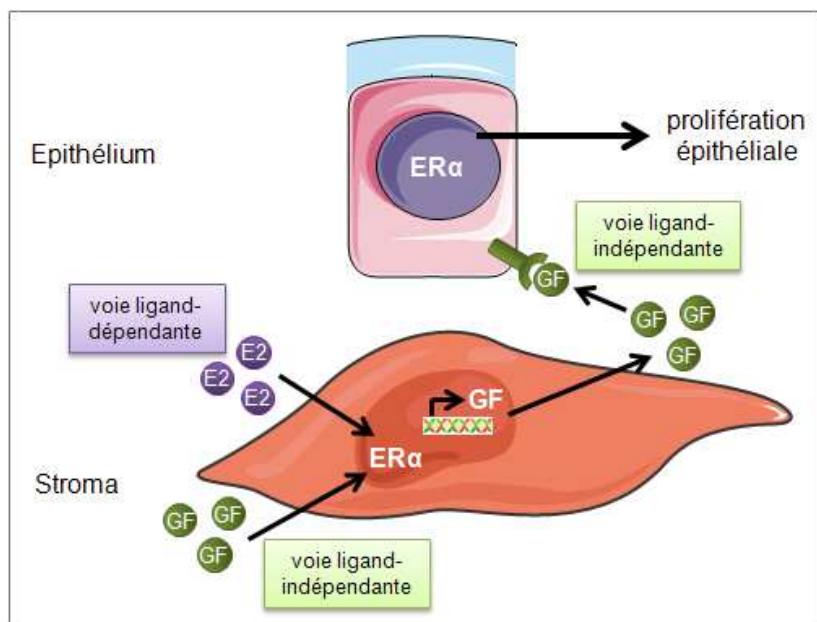
Le ER $\alpha$  stromal est responsable de la répression de l'expression de PR dans l'épithélium et de l'induction de son expression dans le stroma (Kurita 2000). La technique de

recombinaison tissulaire en utilisant des souris PR<sup>-/-</sup> a permis de mettre en évidence une différence fonctionnelle entre le PR épithéial et stromal. Le PR stromal permet de relayer l'effet inhibiteur de P4 sur la prolifération épithéliale induite par l'E2 en inhibant l'activité paracrine du ERα stromal et en synthétisant ses propres messagers paracrines impliqués dans l'effet anti-prolifératif dans les cellules épithéliales. Il permet également de lever l'inhibition de l'expression de PR épithéial par l'E2 en réponse à P4 (Figure 28) (Kurita et al., 2000b). Le PR stromal est également impliqué dans la prévention de l'apoptose dans les cellules épithéliales en réponse à P4 (Kurita et al., 2001). Le PR épithéial est impliqué dans l'inhibition des mécanismes de sécrétion des cellules épithéliales en réprimant l'expression de la lactotransférine et du C3 complément (Figure 28) (Kurita et al., 2000a).

Les échanges entre l'épithélium et le stroma, indispensables pour relayer et contrôler la réponse physiologique utérine à l'E2, impliquent des médiateurs paracrines dont les facteurs de croissance.

### 3.2.5 Implication des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des acteurs clés dans la stimulation œstrogénique ainsi que dans la prolifération épithéliale induite par des mécanismes paracrines (Figure 29).



**Figure 29 : Mécanismes paracrines des facteurs de croissance pour induire la prolifération épithéliale utérine.** GF = facteurs de croissance

La famille des EGF (epidermal growth factor), incluant notamment l'EGF, l'amphiréguline, l'hb-EGF (héparine binding EGF), mais également l'IGF-1 sont synthétisés principalement par les cellules stromales. Ces facteurs de croissances, se liant à leurs récepteurs (EGFR, ERBB1 à 4) à la surface des cellules épithéliales, activent la prolifération cellulaire et la croissance *via* les voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/Akt. *In vivo*, l'administration d'EGF ou d'IGF-1 à des souris matures ovariectomisées se substitue totalement à l'E2 pour induire la prolifération épithéliale et l'expression des gènes cibles. De plus, après altération de cette voie de signalisation par l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'EGF ou l'IGF-1, ainsi que chez les souris EGFR<sup>-/-</sup> et IGF-1<sup>-/-</sup>, on observe une abolition de la réponse utérine induite par l'E2 (utérus hypoplasique) (Adesanya et al., 1999; Curtis et al., 1996; Hom et al., 1998; Ignar-Trowbridge et al., 1992; Nelson et al., 1991).

L'E2 induit l'expression des différents facteurs de croissance dans l'utérus tels que EGF et IGF-1 (DiAugustine et al., 1988; Huet-Hudson et al., 1990; Murphy and Ghahary, 1990). De plus, la prolifération cellulaire induite par l'EGF ou l'IGF-1 est abolie par l'administration d'un antagoniste du ER $\alpha$  (ICI164,384) à des souris sauvages, ainsi que chez les souris totalement déficientes pour ER $\alpha$  (ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>) mais pas chez les souris spécifiquement déficientes pour ER $\alpha$  dans le compartiment épithéial (UtEpiER $\alpha$ <sup>-/-</sup>) (Curtis et al., 1996; Hewitt et al., 2010a; Ignar-Trowbridge et al., 1992; Klotz et al., 2002; Winuthayanon et al., 2010). A contrario, la réponse proliférative aux facteurs de croissance est toujours effective chez les souris ovariectomisées ENERKI (mutées pour le LBD de ER $\alpha$ ) (Sinkevicius et al., 2008). Ceci met en évidence l'importance de la synergie existante entre les facteurs de croissance et le mode d'activation du ER $\alpha$  indépendante du ligand au niveau du stroma. L'absence de prolifération en réponse à l'IGF-1, chez les souris KIKO (mutation du DBD de ER $\alpha$ ), montre que le mode d'activation du ER $\alpha$  *via* les séquences ERE est indispensable pour relayer la transduction du signal des facteurs de croissance (Hewitt et al., 2010b). Toutes ces caractéristiques sont résumées dans un tableau récapitulatif (Tableau 3) à la fin de ce chapitre. Il est intéressant de noter que la délétion du ER $\alpha$  hépatique induisant une diminution de la production et du taux circulant d'IGF-1 conduit à une altération du cycle oestral perturbant la prolifération utérine de souris matures, en condition de restriction calorique (Della Torre et al., 2011).

Néanmoins, l'étude de la réponse transcriptionnelle globale, par une approche de puces à ADN, chez des souris ovariectomisées sauvages ou ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> montre que peu de gènes (dont ceux impliqués dans les voies MAPK et PI3K) sont régulés communément par l'E2, EGF et IGF-1 après 2h ou 24h de traitement et qu'il existe une part importante de cibles régulées par les facteurs de croissance de manière ER $\alpha$  indépendante (Hewitt et al., 2005). Ainsi, il a été proposé que les facteurs de croissance sont capables d'induire une réponse utérine en

mimant les effets de l'E2 mais également de potentialiser cette réponse par des mécanismes différents.

Mutant	Délétion	Construction	Phénotype utérin souris matures intactes	Phénotype utérin souris matures ovariectomisées traitées			Références	
				Ligand	Réponse transcriptionnelle	Prolifération épithéliale après 24h de traitement		
<b>ERαKO ch (1ère génération)</b>	ERα total (avec fuite)	insertion cassette néo dans l'exon 1	stérilité, hyper-oestraadiolémie, utérus atrophique, glandes peu développées, cellules épithéliales cuboidales, absence de cycle oestral	E2		non après 3 jours de traitement	Lubahn DB. Et al, PNAS 1993, Couse JF. Et al, Mol Endoc 1995	
				TMX	non	non	Das SK. Et al, PNAS 1997, Klotz DM. Et al, Endocrinology 2000	
				EGF	non sauf c-fos	non	Curtis SW. Et al, PNAS 1996	
				IGF-1	ND	non	Klotz DM. Et al, JBC 2001	
<b>ERαKO ch (2ème génération)</b>	ERα total	Cre lox dans l'exon 2		E2	non	non	Hewitt SC. Et al, FASEB 2010	
<b>ERαKO st</b>	ERα total	Cre lox dans l'exon 2		ND	ND	ND	Dupont S. et al, Development 2000	
<b>ENERKI</b>	ERαLBD	G525L	stérilité, hyper-oestraadiolémie, surexpression ERβ (x14/WT)	E2	ND	non	Sinkevicius KW. Et al, Endocrinology 2008	
				IGF-1	ND	oui		
<b>EAAE</b>	ERαDBD	Y201E, K210A, K214A, R215E	idem ERαKO	EE	non	ND	Ahlbory-Dieker DL. Et al, Molecular Endocrinology 2009	
<b>NERKI hétérozygotes AA/+</b>	ERαDBD	un allèle E207A, G208A / un allèle WT	stérilité, oestradiolémie normale, bloquées en diestrus, hyperplasie utérine due à une augmentation de la formation de glandes, une forte activité sécrétatoire et une altération de la signalisation de la progestérone	E2	oui pour gènes régulés via AP-1 (lgf-1) et moindre pour gènes régulés via ERE (Prl)	oui	Jakacka M. et al, Mol Endocrinol 2002	
				TMX	ND	oui		
<b>KIKO (hémizygotes NERKI AA-)</b>	ERαDBD	un allèle NERKI / un allèle ERαKO	stérilité, oestradiolémie et progéstérénémie normales, bloquées en diestrus, utérus hypoplásique (phénotype intermédiaire entre WT et ERαKO), une altération de la signalisation de la progestérone	E2	oui pour gènes régulés via Sp-1 (p21) et non pour gènes régulés via ERE (Aqp5)	controversé	O'Brien JE. Et al, JBC 2006, Hewitt SC. Et al, Molecular Endocrinology 2009, Hewitt SC. Et al, JBC 2010	
				TMX	ND	oui		
				IGF-1	ND	non		
<b>AF2ERKI</b>	ERαAF-2	L543A et L544A	idem ERαKO	E2	non	non	Arao Y. et al, PNAS 2011	
<b>MOER</b>		expression domaine E de ERα seul		TMX	oui	oui		
				IGF-1		non		
<b>UtEpiaERKO</b>	ERα épithéial	Wnt7a-Cre X ERα floxé	stérilité, cycle oestral régulier, développement folliculaire normal	E2	oui	oui après 24 et 72h	Winuthayanon W. et al, PNAS 2010	
				IGF-1	ND	oui		

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des différents modèles murins invalidés ou mutés sur ERα : caractéristiques phénotypiques utérines et réponse utérine à différents ligands.**

## **4 Dissection *in vivo* des mécanismes moléculaires impliqués dans la transduction du signal œstrogénique, vers un SERM idéal ?**

### **4.1 Les SERM en clinique**

Les SERM sont des molécules chimiques qui modulent l'action des œstrogènes par leur fixation aux ER. Dans certains cas, les SERM antagonisent les effets des œstrogènes par compétition pour la fixation sur le LBD, alors que dans d'autres cas, ils présentent une activité agoniste en mimant l'action des œstrogènes. La réponse pharmacodynamique des SERM est déterminée par la position du ligand au sein du LBD et les sous-types et isoformes de ER fixés. (Nilsson et al., 2011; Howellet al., 2004).

Actuellement, en clinique, les SERM sont utilisés dans le traitement et la prévention du cancer du sein et de l'ostéoporose. La majorité des SERM diminuent le risque de cancer du sein mais présentent également des effets néfastes en particulier sur l'utérus en augmentant le risque de cancer de l'endomètre. La balance bénéfices/risques associée à un SERM particulier doit être évaluée pour chaque patiente, au cas par cas.

Ainsi, l'administration de tamoxifène, pour le traitement et la prévention de la récidive du cancer du sein, augmente le risque de cancer de l'endomètre et d'endométriose (Jordan, 2004). Le raloxifène, initialement utilisé pour le traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées, s'avère aussi efficace que le tamoxifène dans la prévention du cancer du sein sans avoir d'incidence sur le développement du cancer de l'endomètre (étude STAR Trial). Cependant, le raloxifène augmente le risque thrombotique et d'accident vasculaire cérébral chez les femmes ménopausées (Jordan, 2004; Mosca et al., 2009). Des études menées sur le bazedoxifène montrent que ce composé possède les mêmes propriétés bénéfiques (sur le sein, l'utérus et l'os) et délétères (risque de thrombose) que le raloxifène mais qu'il n'a aucune influence sur les bouffées de chaleur. Quant au lasofoxifène, prescrit contre l'ostéoporose, il exerce un effet protecteur sur le système cardiovasculaire, n'augmente pas la survenue de cancer de l'endomètre après 5 ans de traitement, toutefois, il augmente l'épaisseur endométriale et l'apparition de polypes, d'après l'étude PEARL Trial. A ce jour, aucune étude clinique n'a évalué l'effet des SERM sur la prévention du diabète de type II.

L'enjeu capital est donc de développer un « SERM idéal » capable de mimer les effets bénéfiques des œstrogènes en inhibant les effets délétères (Tableau 4). De nombreuses équipes de recherche et de laboratoires pharmaceutiques tentent de « designer »,

synthétiser ou screener à large échelle des banques de molécules capables d'être utilisées comme candidats potentiels. Le « design » de ces molécules est principalement basé sur la structure de l'E2 et du raloxifène avec un ou plusieurs groupements phénoliques et des groupements hydroxy-alcooliques (Therrien et al., 2012). La génération des ces molécules nécessite, en aval, de nombreux tests pharmacologiques et biologiques concernant la biodisponibilité, le temps de demi-vie, les effets potentiels des métabolites issus de la dégradation du composé dans l'organisme, l'étude de la dynamique transcriptionnelle du ER induite au niveau de tous les tissus, notamment grâce au modèle murin ERE-luc permettant de mesurer l'activité transcriptionnelle sur animaux vivants par analyse de la bioluminescence (Rando et al., 2010).

SERM	Climatère	Sein	Utérus	Métabolisme	OS	Système cardiovasculaire
SERM idéal	+	-	-	+	+	+
E2	+	+	+	+	+	+
CEE + MPA	+	+(progestatif)	-	+	+	controversé
Tamoxifène	-	-	+	?	neutre	+
Raloxifène	-	-	-	?	+	-
Bazedoxifène	neutre	-	-	?	+	-
Lasofoxifène	?	-	+	?	+	+

**Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets bénéfiques et délétères des principaux SERM en clinique ou en phase de développement.** (D'après Katzenellenbogen BS. et al, Science 2002, Jordan VC. et al, Cancer Cell 2004, Shang Y. et al, Nature 2006, Jordan VC. et al, Clin Cancer Res 2006, De Villiers TJ. et al, Climateric 2009, Pinkerton JV. et al, Menopause 2010, Nilsson S. et al, Clinical Pharmacology & Therapeutics 2011, Maximov PY. Et al, Current Clinical Pharmacology 2013).

## 4.2 Spécificité tissulaire de l'implication d'ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 *in vivo*

Les œstrogènes ont des effets pléiotropes sur de nombreux tissus, outre ceux précédemment décrits au niveau du système cardiovasculaire et de l'utérus. Le déficit œstrogénique observé à la ménopause peut conduire au développement de diverses pathologies. Grâce aux souris délétées spécifiquement pour ER $\alpha$ AF-1 ou ER $\alpha$ AF-2, il est possible, *in vivo*, de discriminer l'implication de ces deux fonctions activatrices dans différents modèles physiopathologiques.

Les œstrogènes jouent un rôle critique dans la maturation et la maintenance de l'os. La déficience œstrogénique chez les femmes ménopausées conduit à l'ostéoporose due à une augmentation de la résorption osseuse par les ostéoclastes qui n'est pas compensée par la régénération ostéoblastique. Börjesson *et al.* ont démontré qu'ER $\alpha$ AF-2, contrairement à ER $\alpha$ AF-1, joue un rôle crucial dans le maintien de la densité minérale de l'os cortical en réponse à l'E2 (tableau 5) (Borjesson *et al.*, 2011).

Le déclin de la production d'œstrogènes endogènes, cause naturelle du vieillissement, entraîne également une dérégulation de la balance énergétique et de l'homéostasie du glucose. La transition pré- et postménopause est associée à de nombreux changements métaboliques, notamment, une redistribution de la masse graisseuse corporelle qui s'accumule essentiellement au niveau abdominal et une insulino-résistance conduisant à une augmentation du risque de développement d'un diabète de type II (Carr, 2003). Ces symptômes, induits par une ovariectomie bilatérale dans les modèles murins expérimentaux soumis à un régime riche en graisses, sont inversés par l'administration d'E2 *via* un mécanisme ER $\alpha$ -dépendant faisant intervenir ER $\alpha$ AF-2 et non ER $\alpha$ AF-1 (tableau 5) (Riant *et al.*, 2009) (Handgraaf S *et al.*, en révision 2013).

		Effets ER $\alpha$ AF-1 Dépendants	Effets ER $\alpha$ AF-2 Dépendants	Références
Effets bénéfiques	Prévention de l'athérome	NON	OUI	Billon A. <i>et al.</i> PNAS 2009 et 2011
	Prévention de l'insulino- résistance et de l'obésité	NON	OUI	Handgraaf S. <i>et al.</i> Revised in Diabetes
	Ostéoporose	NON	OUI	Borjesson AE. <i>et al.</i> PNAS 2011
Effets délétères	Prolifération endométriale	?	?	

**Tableau 5 : Tableau récapitulatif de l'implication *in vivo* des fonctions activatrices ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 concernant les principaux effets bénéfiques et délétères de l'E2.**

La discordance entre les observations épidémiologiques et les résultats des études cliniques d'intervention est à l'origine du climat d'incertitude actuel quant aux effets vasculaires des œstrogènes. Il n'existe pas d'études prospectives évaluant l'impact sur la morbidité cardio-vasculaire de THS administrés plus précocement à la ménopause et en utilisant d'autres

modes d'administration que la voie orale, avec l'obligation d'associer à ce traitement un progestatif afin de protéger des lésions hyperplasiques endométriales mais exerçant lui-même des effets délétères sur le sein. La seule façon de progresser dans les années à venir repose sur une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets vasculaires et utérorotropiques des œstrogènes.

Ainsi, en croisant les approches pharmacologiques et génétiques (grâce à l'utilisation de souris invalidées pour ER $\alpha$  ou sélectivement pour le domaine A/B et donc ER $\alpha$ AF-1), mes travaux de thèse contribuent à approfondir la dissection moléculaire de l'action du ER $\alpha$  *in vivo* qui pourrait contribuer à proposer une nouvelle modulation du ER $\alpha$ . En effet, l'activation sélective du ER $\alpha$  induisant la plupart des effets bénéfiques de l'E2 (sur l'os, le système cardiovasculaire et le métabolisme) sans induire ses effets délétères (prolifération dans l'utérus et la glande mammaire) représenterait un intérêt thérapeutique majeur (Arnal et al., 2013; Arnal et al., 2012).

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## **Article 1 : Le tamoxifène exerce son effet athéroprotecteur via ER $\alpha$ AF-1 mais n'accélère pas la ré-endothélialisation.**

Lorsque j'ai débuté ce travail de thèse, mon équipe d'accueil, en collaboration avec le Dr A. Krust et le Pr P. Chambon (IGBMC, Strasbourg), avait clairement établi que les actions bénéfiques de l'E2 sur le système cardiovasculaire telles que la production basale de NO, la ré-endothélialisation et l'athéroprotection étaient entièrement dépendantes de ER $\alpha$  grâce à l'utilisation d'un modèle murin totalement déficient pour ce récepteur (Billon-Gales et al., 2009a; Billon-Gales et al., 2009b; Bouchet et al., 2001; Darblade et al., 2002). L'étude de ces différents effets vasculaires chez des souris sélectivement déficientes pour ER $\alpha$ AF-1 (ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>) a permis de mettre en évidence que ER $\alpha$ AF-1 n'est pas nécessaire pour relayer l'action bénéfique de l'E2. En effet, comme chez les souris sauvages (ER $\alpha$ AF-1<sup>+/+</sup>), l'E2 induit une augmentation de la production basale de NO, une accélération de la ré-endothélialisation et un effet athéroprotecteur au niveau du sinus aortique chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>. ER $\alpha$ AF-1 n'est donc pas nécessaire pour induire ces trois effets vasculoprotecteurs de l'E2 (Billon-Gales et al., 2009b).

Le tamoxifène est un SERM exerce une activité agoniste sur l'os et l'utérus notamment, alors qu'il se comporte comme un antagoniste sur le sein. Des études épidémiologiques ont démontré que le tamoxifène, utilisé depuis de nombreuses années en hormonothérapie sur les tumeurs du sein ER $\alpha$ -positives, exerce, comme l'E2, un effet bénéfique sur le système cardiovasculaire. L'effet athéroprotecteur du tamoxifène a également été démontré expérimentalement chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> (Grainger et al., 1995; Lawn et al., 1996; Reckless et al., 1997). Au niveau moléculaire, le tamoxifène est connu pour activer l'expression de gènes cibles via ER $\alpha$ AF-1 mais, contrairement à l'E2, il est incapable d'induire la transcription via ER $\alpha$ AF-2. Ainsi, il est donc surprenant que l'E2 et le tamoxifène exercent tous deux un effet athéroprotecteur alors que le tamoxifène active sélectivement ER $\alpha$ AF-1, fonction activatrice dispensable pour relayer les effets vasculoprotecteurs de l'E2. De plus, le tamoxifène peut également exercer son action de manière indépendante du ER $\alpha$ , via des sites AEBS (Anti-Estrogen Binding Sites) (Kedjouar et al., 2004).

Il nous a donc paru intéressant de disséquer les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les effets bénéfiques du tamoxifène sur le système cardiovasculaire. Le but de ce travail est donc de déterminer *in vivo* l'implication du ER $\alpha$  et de ER $\alpha$ AF-1 dans les effets vasculoprotecteurs du tamoxifène.

Dans un premier temps, nous avons confirmé, chez les souris LDLr<sup>-/-</sup> soumises à un régime hypercholestérolémique, que le tamoxifène exerce un effet athéroprotecteur. Cependant, il



## VASCULAR BIOLOGY, ATHEROSCLEROSIS, AND ENDOTHELIUM BIOLOGY

# Tamoxifen Elicits Atheroprotection through Estrogen Receptor $\alpha$ AF-1 But Does Not Accelerate Reendothelialization

Coralie Fontaine,\* Anne Abot,\* Audrey Billon-Galés,\* Gilles Flouriot,<sup>†</sup> Hortense Bergès,\* Etienne Grunenwald,\* Alexia Vinel,\* Marie-Cécile Valera,\* Pierre Gourdy,\* and Jean-François Arnal\*

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1048,\* Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, University of Toulouse 3, Toulouse; and INSERM U1085,<sup>†</sup> Institute of Health Research and Work Environment, University of Rennes 1, Rennes, France

Accepted for publication  
March 7, 2013.

Address correspondence to  
Jean-François Arnal, M.D.,  
Ph.D., Université de Toulouse  
3, Institut National de la Santé  
et de la Recherche Médicale  
(INSERM) U1048, Team 9, BP  
84225, 31432 Toulouse Cedex  
4, France. E-mail: [jean-francois.arnal@inserm.fr](mailto:jean-francois.arnal@inserm.fr).

Based on both experimental and clinical data, tamoxifen has been proposed to have cardiovascular benefits, although the mechanism(s) contributing to that protective effect are still poorly understood. *In vitro* experiments demonstrated that tamoxifen elicits its transcriptional effect through estrogen receptor ( $ER\alpha$ ), but other targets can participate in its actions. However, although tamoxifen selectively activates the activating function (AF)-1 of  $ER\alpha$ , we recently showed that this  $ER\alpha$  subfunction is dispensable for the atheroprotective action of  $17\beta$ -estradiol (E2), the main ligand of ERs. The goal of the present work is to determine to which extent  $ER\alpha$  and its AF-1 mediate the vasculoprotective action of tamoxifen. Our data confirm that tamoxifen exerts an atheroprotective action on low density lipoprotein receptor ( $LDL-r^{-/-}$ ) female mice, but, in contrast to E2, it fails to accelerate reendothelialization after carotid electric injury. Tamoxifen and E2 elicit differences in gene expression profiles in the mouse aorta. Finally, the atheroprotective action of tamoxifen is abrogated in  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  mice and in  $LDL-r^{-/-}$  mice selectively deficient in  $ER\alpha$ AF-1 ( $ER\alpha$ AF-1<sup>0/0</sup>  $LDL-r^{-/-}$ ). Our results demonstrate, for the first time to our knowledge, that tamoxifen mediates its actions *in vivo* through the selective activation of  $ER\alpha$ AF-1, which is sufficient to prevent atherosclerosis, but not to accelerate endothelial healing. (Am J Pathol 2013; 183: 304–312; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.010>)

Tamoxifen is one of the major drugs used for hormonotherapy of estrogen receptor (ER)—positive breast cancers.<sup>1,2</sup> In addition to the clear reduction in the risk of recurrence and of developing new breast cancer, tamoxifen has been proposed to exert cardiovascular beneficial effects for several years.<sup>3</sup> Indeed, epidemiological studies<sup>4,5</sup> suggest and experimental results clearly demonstrate a major atheroprotective action of tamoxifen. This drug strongly reduces the progression of atherosclerosis in monkey,<sup>6</sup> rabbit,<sup>7</sup> and mouse,<sup>8–10</sup> at variance with the other selective estrogen receptor modulator, raloxifene.<sup>3,11,12</sup> Consistent with these preclinical studies, numerous clinical trials report that tamoxifen significantly decreases myocardial infarction incidence and fatal outcome.<sup>3,13,14</sup>

Tamoxifen is a ligand for estrogen receptors (ERs  $\alpha$  and  $\beta$ ) and exerts estrogen agonist actions on some targets, such as uterus and bone, while acting as an estrogen antagonist

on breast. ERs belong to the nuclear receptor subfamily whose members, based on structural and functional similarities, can be subdivided into six distinct regions, termed A to F. The two activation functions (AF-1 and AF-2), involved in the transcriptional activity of ERs, are located within regions B and E, respectively.<sup>15,16</sup> ERs activate gene expression by two major ways. In the best understood mode of action, the so-called classic pathway, ERs bind to specific estrogen response elements (EREs), within or near promoters of target genes, and recruit co-activator complex,

Supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Toulouse 3, and Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil, the Agence Nationale de la Recherche, the Fondation de France, the Conseil Régional Midi-Pyrénées, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Fondation Coeur et Artère, and Groupe de Réflexion sur le Recherche Cardiovasculaire grant (A.A.).

C.F. and A.A. contributed equally to this work.

leading to gene expression by remodeling chromatin and by contacting the basal transcription machinery.<sup>17</sup> In a second mode of action, ERs use unspecified protein-protein interactions that enhance the activity of heterologous transcription factors. For example, both ERs enhance the transcription of genes that contain activator protein 1 (AP1) sites, the cognate binding site for the Jun/Fos complex.<sup>17</sup> Through its active metabolite, 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), tamoxifen regulates ER $\alpha$ -mediated gene transcription in a cell-specific manner,<sup>18,19</sup> depending, at least in part, on the relative roles of ER $\alpha$ AF-1 and ER $\alpha$ AF-2. Indeed, *in vitro* experiments demonstrate that tamoxifen activates ER $\alpha$ AF-1-dependent gene expression, but fails to induce co-activator binding in ER $\alpha$ AF-2-mediated transcription.<sup>20,21</sup> Tamoxifen also binds to a high-affinity binding site different from ERs. This binding site, named microsomal anti-estrogen binding site,<sup>22</sup> is a hetero-oligomeric complex composed of 3 $\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 8- $\Delta$ 7-isomerase and 3 $\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 7-reductase<sup>23</sup> and has no affinity for estrogens. In addition, tamoxifen exerts ER-independent effects through its actions on estrogen-related receptors<sup>24,25</sup> and G-protein-coupled estrogen receptor (also called GPR30).<sup>26,27</sup> We have recently shown that ER $\alpha$ AF-1 is dispensable for the atheroprotective action of 17 $\beta$ -estradiol (E2), the major endogenous ligand of ER $\alpha$ .<sup>28</sup> The goal of the present work was to determine to which extent ER $\alpha$  and its AF-1 mediate the vasculoprotective action of tamoxifen using a mouse model deficient for ER $\alpha$  ( $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$ ) or selectively deficient for its AF-1 ( $ER\alpha$ AF-1 $^{0/0} LDL-r^{-/-}$ ).

## Materials and Methods

### Mice

All procedures involving experimental animals were performed in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and were approved by the local Animal Care and Use Committee. The investigation conforms with the directive 2010/63/EU of the European parliament.  $ER\alpha^{-/-}$  and  $ER\alpha$ AF-1 $^{0/0}$  mice were generated as previously described<sup>28</sup> on a C57Bl/6J genetic background. Briefly,  $ER\alpha$ AF-1 $^{0/0}$  was generated through a targeted deletion using a knock-in strategy, through which 441 nucleotides of exon 1 were deleted. The truncated protein lacks the A domain, and all three motifs constituting ER $\alpha$ AF-1 (AF-1 boxes 1 to 3) in the B domain, thus yielding a 451-amino acid long 49-kDa protein. To generate the double-deficient mice,  $LDL-r^{-/-}$  female mice, purchased from Charles River (L'Arbresle, France), were crossed with  $ER\alpha^{+/-}$  or  $ER\alpha$ AF-1 $^{+/-}$  mice. Heterozygous  $ER\alpha^{+/-} LDL-r^{-/-}$  and  $ER\alpha$ AF-1 $^{+/-} LDL-r^{-/-}$  mice were generated and used as the parental genotypes. Before surgical and euthanasia procedures, mice were anesthetized with a combination of 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Panpharma, Fougères, France) and 5 mg/kg xylazine (Sigma-Aldrich, Isle d'Abeau Chesnes, France) via i.p. injection.

## Mouse Carotid Injury and Quantification of Reendothelialization

The carotid electric injury was performed as previously described.<sup>29</sup> Bilateral ovariectomy was performed at 4 weeks of age, and mice concomitantly received s.c. pellets releasing placebo, E2 [17 $\beta$ -estradiol, 0.1 mg, 60-day release (ie, 80  $\mu$ g/kg per day); Innovative Research of America, Sarasota, FL], or tamoxifen [5 mg, 60-day release (ie, 4 mg/kg per day); Innovative Research of America]. Two weeks later, carotid injury was performed and reendothelialization was evaluated after 3 days. Briefly, surgery was performed with a stereomicroscope (SMZ800; Nikon, Champigny Sur Marne, France), and the left common carotid artery was exposed via an anterior incision in the neck. The electric injury was applied to the distal part (4 mm precisely) of the common carotid artery with a bipolar microregulator. En face confocal microscopy was used to visualize the endothelial monolayer and to determine the reendothelialization area, as previously described.<sup>30</sup>

## Analyses of Atherosclerosis Lesions

Bilateral ovariectomy was performed at 4 weeks of age, and mice received pellets of E2 or tamoxifen (similar doses as previously described), both at weeks 6 and 14. At 6 weeks of age, mice were switched to a hypercholesterolemic atherogenic diet (1.25% cholesterol, 6% fat, and no cholate; TD96335; Harlan Teklad, Madison, WI). At 18 weeks, mice that fasted overnight were anesthetized and blood was collected from the retro-orbital venous plexus. Total and high-density lipoprotein (HDL) plasma cholesterol concentrations were determined, as described later. Lipid deposition size was estimated at the aortic sinus, as previously described.<sup>28,31,32</sup> Each heart was frozen on a cryostat mount with optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Torrance, CA). One hundred sections (10  $\mu$ m thick) were prepared from the top of the left ventricle, where the aortic valves were first visible, up to a position in the aorta where the valve cusps were just disappearing from the field. After drying for 2 hours, the sections were stained with oil red O and counterstained with Mayer's hematoxylin. Of the 100 sections, each separated by 90  $\mu$ m, 10 were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions using a computerized Biocom (Köln, Germany) morphometry system. The first and most proximal section to the heart was taken 90  $\mu$ m distal to the point where the aorta first becomes rounded. The mean lesion size (expressed in  $\mu$ m<sup>2</sup>) in these 10 sections was used to evaluate the lesion size of each animal. Other sections were dedicated to lesion composition analysis, including collagen detection and immunohistochemical (IHC) staining. Collagen fibers were stained with Sirius red. For IHC staining of macrophages, a rat monoclonal anti-CD68 antibody (clone FA-11; AbCys, Paris, France) was used. At least four sections per animal were analyzed for each immunostaining.

## Determination of Plasma Lipids

Total cholesterol was assayed using the CHOD-PAD kit (Horiba ABX, Montpellier, France). The HDL fraction was isolated from 10 µL of serum and assayed using the C-HDL + Third generation kit (Roche, Lyon, France).

## Analysis of mRNA Levels by qPCR

Bilateral ovariectomy was performed at 4 weeks of age. Two weeks after surgery, mice were chronically treated and sacrificed, as previously indicated, or mice were injected with a single dose of placebo, 8 µg/kg E2, or 4 mg/kg tamoxifen and were euthanized 6 hours later. Dissected thoracic aortas were homogenized using a Precellys tissue homogenizer (Bertin Technology, Cedex, France), and total RNA from tissues was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). A total of 1 µg was reverse transcribed for 10 minutes at 25°C and for 2 hours at 37°C in a 20-µL final volume using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Quantitative real-time PCRs (qPCRs) were performed on the StepOne instrument (Applied Biosystems). Primers were validated by testing PCR efficiency using standard curves (95% ≤ efficiency ≤ 105%). Gene expression was quantified using the comparative  $C_T$  method; hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT) was used as a reference.

## Transfection Assays

HepG2 and HeLa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuillé, France) and antibiotics (Sigma-Aldrich) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Transfections were performed using jetPEI reagent, according to the manufacturer's instructions (Polyplus; Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). One day before transfection, cells were plated in 24-well plates at 50% confluence. One hour before transfection, the medium was replaced with phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich) containing 2.5% charcoal-stripped fetal calf serum (Biowest). Transfection was performed with 100 ng of complement (C3) containing (ERE) promoter or AP1 site cloned upstream of the thymidine kinase promoter-driven renilla luciferase (luc) reporter, 100 ng of cytomegalovirus (CMV)-β-galactosidase internal control, and 50 ng of pSG5, pSG5-ERα, or pSG5-ERαAF-1<sup>0</sup> expression vectors. After an overnight incubation, cells were treated for 24 hours with 10 nmol/L E2, 2 µmol/L 4-hydroxytamoxifen, or ethanol (vehicle control). Cells were then harvested, and luc and β-galactosidase assays were performed as previously described.<sup>33</sup>

## Statistical Analysis

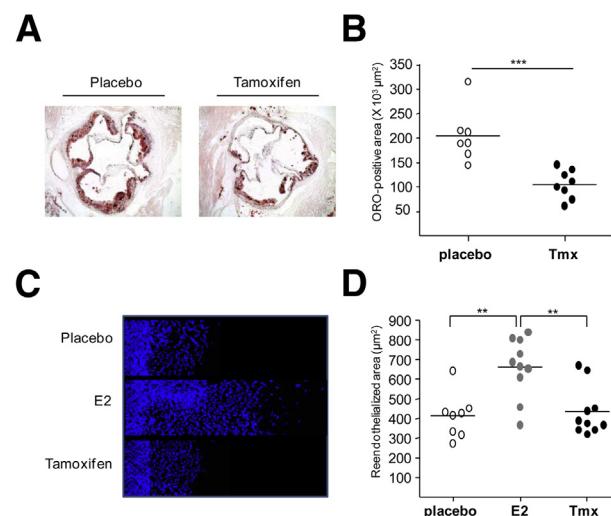
To test the significance of different treatments, a one-way analysis of variance, followed by a Bonferroni post test, was

performed. To test the respective roles of tamoxifen treatment and genotype (ERα or ERαAF-1 deficiency), a two-way analysis of variance was realized. When an interaction was observed between the two factors, the effect of tamoxifen treatment was studied in each genotype using a Bonferroni post test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

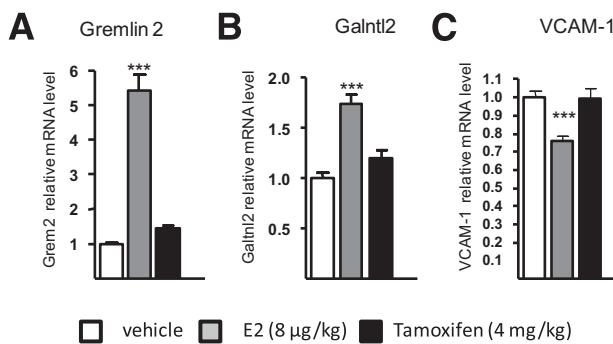
## Results

### Tamoxifen Prevents Atheroma But Fails to Accelerate Endothelial Healing

Previous studies have reported that tamoxifen prevents lesion formation in different mouse models when their diet was supplemented with tamoxifen.<sup>8–10</sup> We confirmed these results using the well-known model of atherosclerosis, the low density lipoprotein receptor ( $LDL-r^{-/-}$ ) mouse under a high-cholesterol diet. As expected, s.c. tamoxifen treatment (4 mg/kg per day) for 12 weeks protected ovariectomized  $LDL-r^{-/-}$  in terms of lipid deposition at the aortic sinus compared with placebo-treated mice (Figure 1, A and B, and Supplemental Table S1). Tamoxifen also decreased total and HDL plasma cholesterol, but no trend toward a change was observed on total cholesterol/HDL cholesterol ratio (Supplemental Table S1). We and others reported that E2 down-regulates vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, a key molecular actor of monocyte recruitment in atherosclerosis.<sup>34,35</sup>



**Figure 1** Tamoxifen has an atheroprotective effect but fails to accelerate reendothelialization after carotid electric injury. **A** and **B:** Four-week-old ovariectomized  $LDL-r^{-/-}$  mice were given either placebo or 4 mg/kg per day tamoxifen (Tmx) and switched to an atherogenic diet from the age of 6 to 18 weeks. **A:** Representative micrographs of oil red O (ORO) lipid-stained cryosections of the aortic sinus. **B:** Quantification of lipid deposition. **C** and **D:** Four-week-old ovariectomized mice were given placebo, 80 µg/kg per day estradiol (E2), or 4 mg/kg per day Tmx for 2 weeks. Electric injury was applied to the distal part (4 mm precisely) of the common carotid artery, and the endothelial regeneration process was evaluated 3 days after injury. **C:** Representative *en face* confocal IHC analysis of the intima tunica of the carotid artery. Nuclei, stained with propidium iodide, appear in dark blue. **D:** Quantification of the reendothelialized area. The effect of tamoxifen treatment was studied using a one-way ANOVA and Bonferroni's post test. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 2** Estradiol and tamoxifen treatments cause differential gene expression in the aorta. Four-week-old ovariectomized  $LDL-r^{-/-}$  mice received a single s.c. injection with placebo, 8 µg/kg E2, or 4 mg/kg tamoxifen (Tmx) and were euthanized 6 hours later. Gremlin 2 (A), UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase like 2 (Galntl2; B), and VCAM-1 (C) mRNA levels from aortas were quantified by qPCR and normalized to HPRT mRNA levels. Results are expressed according to the level in aortas from placebo, set as 1. The significance of the observed effects was evaluated using one-way analysis of variance, followed by Bonferroni's post hoc test. \*\*\* $P < 0.001$ .

We show that this down-regulation of VCAM-1 is also observed in tamoxifen-treated  $LDL-r^{-/-}$  mice (Supplemental Figure S1A). In addition, expression of the inflammatory mediators of atherosclerosis (monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage migration inhibitory factor) (Supplemental Figure 1, B and C) and expression of the macrophage marker genes (*F4/80* and *CD68*) (Supplemental Figure 1, D and E) on whole aorta were similarly decreased by E2 or tamoxifen compared with placebo-treated mice. Taken together, these results show that E2 and tamoxifen s.c. treatments both confer mice atheroprotection.

In addition to its atheroprotective effect, we and others previously demonstrated that E2 also favors another major vasculoprotective action (namely, the acceleration of endothelial healing).<sup>28,29,36</sup> To ascertain if tamoxifen was able to elicit this beneficial action, we studied reendothelialization after electric carotid injury in placebo-, E2-, and tamoxifen-treated mice. At day 3 after injury, E2 induced a significant enlargement of the reendothelialized area compared with placebo-treated mice, whereas tamoxifen had no accelerative effect on endothelial healing (Figure 1, C and D).

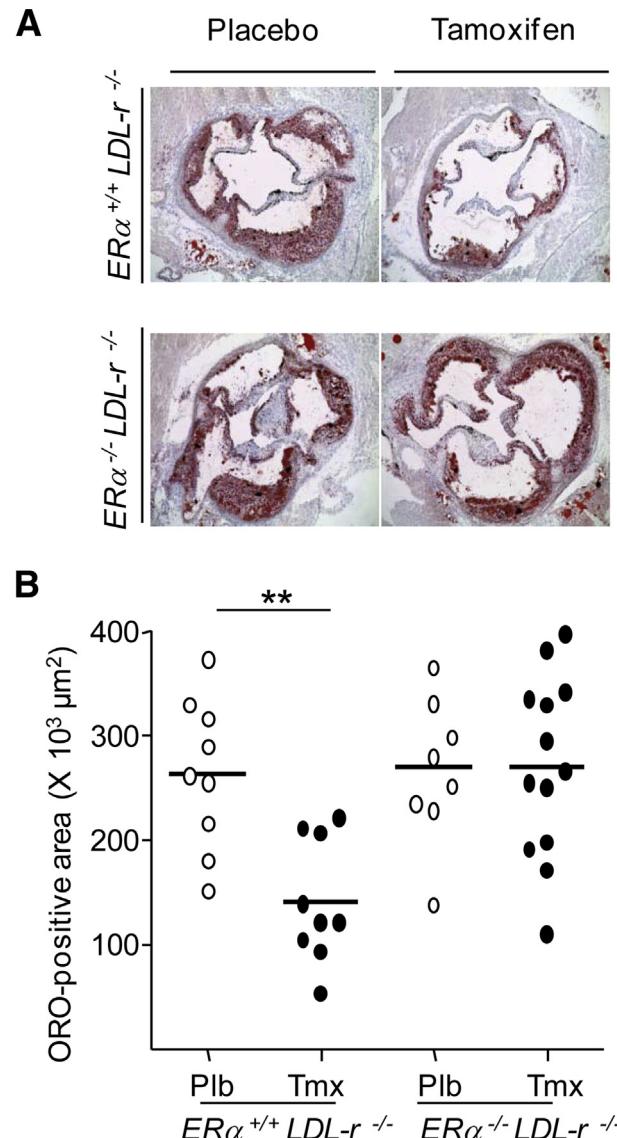
#### Acute E2 and Tamoxifen Treatments Elicit Different Gene Expression Changes in the Aorta

Then, to evaluate transcriptional change in response to E2 and tamoxifen in the vessel, we assessed the expression of several key genes in the aorta from mice exposed to acute E2 or tamoxifen treatment. Mendelsohn and colleagues<sup>37</sup> reported and we<sup>32</sup> recently confirmed that Gremlin 2 and Uridine-diphospho-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase like 2 expression levels are strongly induced by E2 in the aorta. By contrast, tamoxifen treatment did not regulate expression of these genes (Figure 2, A and B). In addition, VCAM-1 expression, which plays a major role in atherogenesis,<sup>34,35</sup> was repressed by E2, but

not by tamoxifen, after short-term treatment (Figure 2C). These data underline that E2 and tamoxifen elicit different gene expression changes in the mouse aorta.

#### ER $\alpha$ Is Necessary for the Atheroprotective Action of Tamoxifen

Because ER $\alpha$  was shown to be necessary for the E2-mediated vasculoprotection,<sup>31</sup> we then explored the involvement of this receptor in the atheroprotective effect of tamoxifen using  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  mice. Lesion sizes at the aortic sinus were



**Figure 3** ER $\alpha$  is necessary to atheroprotective action of tamoxifen in  $LDL-r$ -deficient mice. Four-week-old ovariectomized  $ER\alpha^{+/+} LDL-r^{-/-}$  and  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  female mice received s.c. either a placebo or tamoxifen (Tmx; 4 mg/kg per day) pellet and were switched to a hypercholesterolemic diet from the age of 6 to 18 weeks. A: Representative micrographs of oil red O (ORO) lipid-stained cryosections of the aortic sinus. B: Quantification of lipid deposition at the aortic sinus. A two-way analysis of variance indicated an interaction between tamoxifen treatment and ER $\alpha$  genotype.  $P = 0.01$ . The effect of tamoxifen treatment was studied in each genotype using Bonferroni's post test. \*\* $P < 0.01$ .

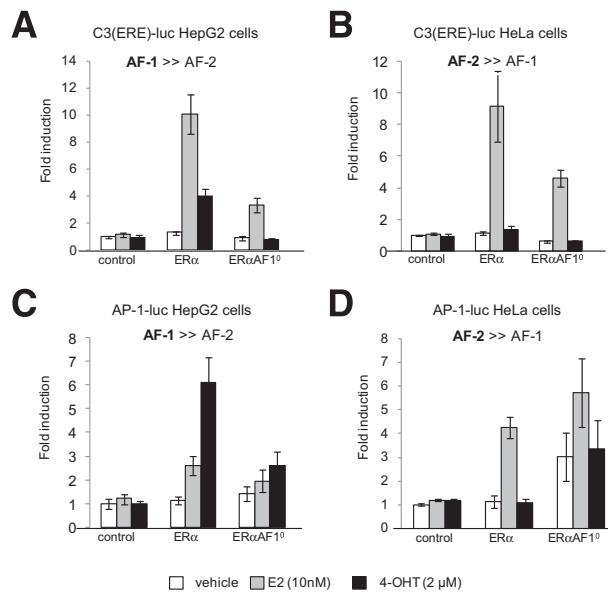
similar in both placebo-treated  $ER\alpha^{+/+} LDL-r^{-/-}$  and  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  mice (Figure 3, A and B), as previously reported.<sup>31</sup> As expected, tamoxifen prevented lipid deposition in ovariectomized control  $ER\alpha^{+/+} LDL-r^{-/-}$  mice exposed to a high-cholesterol diet, whereas this effect was completely abolished in  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  mice. This result clearly demonstrates that the atheroprotective effect of tamoxifen is entirely  $ER\alpha$  dependent. In addition,  $ER\alpha$  was also found to be necessary for the tamoxifen effects on body weight and uterine hypertrophy (Supplemental Table S2). Conversely, a significant decrease in total and HDL plasma cholesterol was still observed in  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  tamoxifen-treated mice compared with control, suggesting an  $ER\alpha$ -independent effect.

### $ER\alpha$ AF-1 Is Necessary to the Atheroprotective Action of Tamoxifen

Both tamoxifen (Figure 3) and E2<sup>28</sup> induced atherosprotection in an  $ER\alpha$ -dependent manner. We recently established that the  $ER\alpha$ AF-1 is dispensable for the E2 vasculoprotective effects.<sup>28</sup> However, previous *in vitro* experiments demonstrated that tamoxifen exerts  $ER\alpha$ AF-1 agonist and  $ER\alpha$ AF-2 antagonist actions.<sup>38,39</sup> To further delineate the role of  $ER\alpha$ AF-1 in tamoxifen atherosprotective actions, we did the following.

We reconsidered the role of  $ER\alpha$ AF-1 on classic and AP-1-mediated transcriptional response to tamoxifen using transfection assays, using the small  $ER\alpha$  isoform lacking the N-terminal portion (domains A/B) and thereby AF-1 ( $ER\alpha$ AF-1<sup>0</sup>). Both  $ER\alpha$  AF-1 and AF-2 have been shown to exert their transcriptional activity in a cell-specific manner. Accordingly, cell contexts can be defined as AF-1 or AF-2 permissive, depending on which AF is principally involved in  $ER\alpha$  activity.<sup>40</sup> We examined the effect of 4-OHT on its ability to stimulate complement C3 containing ERE (Figure 4, A and B) and AP1 (Figure 4, C and D) promoters in transient transfection assays in two cell lines, HepG2 (AF-1 permissive) and HeLa (AF-2 permissive), previously characterized as devoid of endogenous ERs.<sup>40</sup> In the AF-1-permissive HepG2 cells,<sup>40</sup> although 4-OHT induced C3 (ERE) and AP1-mediated transcriptional activity using a wild-type  $ER\alpha$  construct, this action was entirely (Figure 4A) or dramatically (Figure 4C) reduced using the  $ER\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mutant. In addition, by using HeLa cells that are mainly  $ER\alpha$ AF-2 permissive,<sup>40</sup> 4-OHT was unable to induce gene transcription, through either ERE or AP-1 pathways, at variance with E2. Altogether, these results clearly confirm that  $ER\alpha$ AF-1 is crucial to induce gene expression changes in response to tamoxifen, but not to E2, and that response to tamoxifen is dependent on the cellular context.

We tested the involvement of  $ER\alpha$ AF-1 in the atherosprotective effect of tamoxifen *in vivo*. To this end, we used mice deleted for the A/B region of  $ER\alpha$  and, thereby, deficient in AF-1,<sup>28,38</sup> bred with  $LDL-r^{-/-}$  mice ( $ER\alpha$ AF-1<sup>0/0</sup>  $LDL-r^{-/-}$ ).

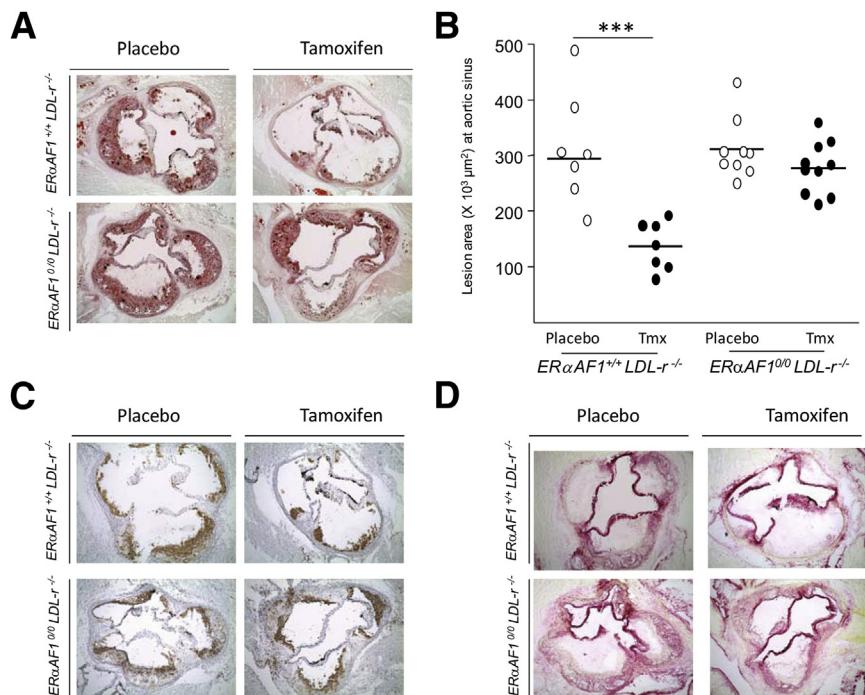


**Figure 4**  $ER\alpha$ AF-1 is necessary for transcriptional activation of tamoxifen on classic and AP-1 pathways. HepG2 (A and C) and HeLa (B and D) cells were transiently transfected with the C3(ERE) luc (A and B) or AP1-thymidine kinase (tk) luc (C and D) reporter constructs in the presence of pSG5- $ER\alpha$ , pSG5- $ER\alpha$ AF-1<sup>0</sup>, or empty pSG5 vectors. Cells were treated with 10 nmol/L E2, 2  $\mu$ M 4-OHT, or vehicle for 24 hours. Normalized luc activities were expressed as fold increase higher than values measured with empty pSG5 (control) and vehicle. Data correspond to the means  $\pm$  SEM of at least three separate transfection experiments.

As expected, analysis of the lesion size (Figure 5, A and B) as well as macrophage (CD68-positive cell) (Figure 5C) and collagen (Figure 5D) contents indicated that tamoxifen prevents fatty streak deposits at the aortic sinus from ovariectomized  $ER\alpha$ AF-1<sup>+/+</sup>  $LDL-r^{-/-}$  mice. The atherosprotective effect of tamoxifen was totally abolished in  $ER\alpha$ AF-1<sup>0/0</sup>  $LDL-r^{-/-}$  (Figure 5), demonstrating that  $ER\alpha$ AF-1 is absolutely required for the atherosprotective effect of tamoxifen.  $ER\alpha$ AF-1 was also found to be required for tamoxifen effect on body weight and uterine hypertrophy (Supplemental Table S3). Furthermore, as described using  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  mice (Supplemental Table S2), tamoxifen's effect on HDL and total cholesterol still remained efficient in  $ER\alpha$ AF-1<sup>0/0</sup>  $LDL-r^{-/-}$  mice (Supplemental Table S3).

### Discussion

In agreement with previous studies in monkey,<sup>6</sup> rabbit,<sup>7</sup> and mice,<sup>8–10</sup> the atherosprotective effect of tamoxifen was extended to another major model of atherosomatous mice (ie,  $LDL-r^{-/-}$  mice). However, at variance with E2,<sup>29</sup> tamoxifen was not able to accelerate reendothelialization in an electric model of carotid injury (Figure 1). Along with these different actions on vascular pathophysiological models, E2 and tamoxifen elicited striking differences in gene expression levels in the aorta (Figure 2). Different effects of E2 and tamoxifen were also found in terms of weight gain under a high-cholesterol diet. Indeed, consistent with previous

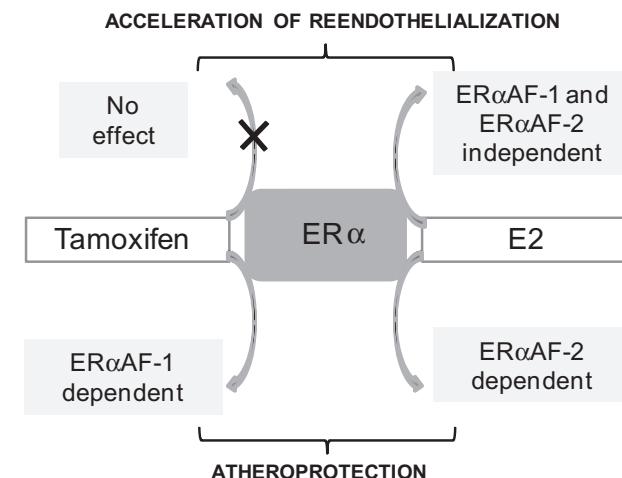


**Figure 5** ER $\alpha$ AF-1 is necessary to the atheroprotective action of tamoxifen on LDL-r-deficient mice. Four-week-old ovariectomized  $ER\alpha AF1^{+/+} LDL-r^{-/-}$  and  $ER\alpha AF1^{0/0} LDL-r^{-/-}$  female mice received s.c. either a placebo or tamoxifen (Tmx; 4 mg/kg per day) pellet and were switched to a hypercholesterolemic diet from the age of 6 to 18 weeks. **A:** Representative micrographs of oil red O lipid-stained cryosections of the aortic sinus. **B:** Quantification of lipid deposition at the aortic sinus. A two-way analysis of variance indicated an interaction between tamoxifen treatment and  $ER\alpha$ AF-1 genotype.  $P = 0.01$ . The effect of tamoxifen treatment was studied in each genotype using Bonferroni's post test. \*\*\* $P < 0.001$ . Representative micrographs of CD68 (**C**) and Sirius red (**D**) staining of the aortic sinus.

studies,<sup>8–10</sup> tamoxifen significantly and importantly reduced body weight gain (Supplemental Tables S1–S3), contrary to E2.<sup>28,31,32</sup>

By using an  $apoE^{-/-}$  mouse model, the sevenfold decrease in plasma cholesterol in response to tamoxifen was sufficient to explain the decrease of lesion development.<sup>10</sup> Induction of LDL-r expression and activity by tamoxifen have been proposed to contribute to its hypolipidemic effect.<sup>41</sup> Because the hypocholesterolemic effect of tamoxifen was lower in  $LDL-r^{-/-}$  mice (less than twofold) (Supplemental Tables S1–S3), our results also suggest a role for LDL-r in its action on lipid metabolism. The effect of tamoxifen on cholesterol metabolism was shown to involve the binding to anti-estrogen binding site, leading to inhibition of 3 $\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 8- $\Delta$ 7-isomerase, 3 $\beta$ -hydroxysterol- $\Delta$ 7-reductase,<sup>23</sup> and to perform the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase activity.<sup>42</sup> The persistence of the hypocholesterolemic effect of tamoxifen in  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  mice, observed herein, supports the idea of an ER $\alpha$ -independent mechanism. Previous studies performed in cholesterol-fed ovariectomized rabbit, treated or untreated with tamoxifen, did not reveal any correlation between the circulating cholesterol and aortic atherosclerosis lesions.<sup>7</sup> Several lines of evidence from the present work support the notion that the influence of tamoxifen on the cholesterol profile does not significantly contribute to its atheroprotective effect in mice. The tamoxifen-induced changes in total cholesterol concentrations were similar in  $ER\alpha^{+/+} LDL-r^{-/-}$  and in  $ER\alpha AF-1^{+/+} LDL-r^{-/-}$  compared with  $ER\alpha^{-/-} LDL-r^{-/-}$  and  $ER\alpha AF-1^{0/0} LDL-r^{-/-}$  mice, respectively, despite an atheroprotective effect in the former group (wild-type ER $\alpha$ ), but not in the latter group (targeted ER $\alpha$ ). However, because this effect still occurs in the presence of

a decrease in circulating total cholesterol, we could not exclude that tamoxifen could have been pro-atherogenic if the cholesterol levels would have remained unchanged. If we account for HDL cholesterol, although in one of the three sets of experiments (Supplemental Table S2), tamoxifen tended to decrease the total cholesterol/HDL cholesterol ratio, which could have contributed to atheroprotection; this was not the case in the two other sets of experiments (Supplemental Tables S1 and S3). Furthermore, although the atheroprotective effect of tamoxifen was strongly influenced by the genotype ( $ER\alpha^{-/-}$  or  $ER\alpha AF-1^{0/0}$ ,  $P^{\text{Interaction}} < 0.01$ ), the effect of tamoxifen treatment on total cholesterol/HDL cholesterol ratio was independent of the genotype (no significant interaction) (Supplemental Tables S2 and S3). Thus, as previously described for E2,<sup>31</sup> it can be concluded



**Figure 6** Respective role of ER $\alpha$  AF-1 and AF-2 in the vascular actions of E2 and tamoxifen.

that the atheroprotective effect of tamoxifen appears to be essentially mediated through a direct action on the arterial wall through an ER $\alpha$  and, more specifically, an ER $\alpha$ AF-1-dependent mechanism.

*In vitro* experiments have demonstrated a key role of ER $\alpha$ AF-1 in the transcriptional activity of tamoxifen<sup>38,39</sup> (Figure 4). Different association of co-activator proteins with AF-1 versus AF-2 could determine the affinity of tamoxifen- and estrogen-ligated ERs for different gene promoters<sup>20,21</sup> and could explain the major differences in the regulation of aortic gene expression (Figure 2). To determine the role of ER $\alpha$ AF-1 in tamoxifen actions *in vivo*, and more particularly in the atheroprotective one, we used ER $\alpha$ AF-1<sup>0/0</sup> mice in which the sequence coding for the main part of the A/B region, including AF-1, is deleted.<sup>28</sup> We previously showed that ER $\alpha$ AF-1 is dispensable for the E2 atheroprotective action and demonstrate the requirement of this ER $\alpha$  function to mediate this beneficial effect in response to tamoxifen (Figure 5). We also show herein that tamoxifen actions on body weight and uterine hypertrophy entirely rely on ER $\alpha$ AF-1. These results highlight, for the first time, to our knowledge, *in vivo*, the crucial role of ER $\alpha$ AF-1 for several effects of tamoxifen. In addition, in contrast to the dispensable role of AF-1, ER $\alpha$ AF-2 is absolutely required to induce atheroprotection in response to E2.<sup>32</sup> Thus, ER $\alpha$  mediates both tamoxifen and E2 atheroprotective effects, but the subfunctions of ER $\alpha$  involved in this action are different (Figure 6).

Finally, another major difference between E2 and tamoxifen is related to their action on endothelial healing after carotid electric injury, because tamoxifen fails to accelerate reendothelialization *in vivo* (Figure 1). This is consistent with *in vitro* studies that reported that E2, but not 4-OHT, stimulates endothelial cell migration and proliferation.<sup>43</sup> Tamoxifen is known to induce transforming growth factor- $\beta$  activity,<sup>8–10</sup> which inhibits both endothelial proliferation and migration.<sup>44–47</sup> Such a mechanism could contribute to the lack of accelerative effect in response to tamoxifen. These differences between E2 and tamoxifen actions could also be because of nongenomic ER $\alpha$ -mediated actions. Indeed, in addition to the classic transcriptional actions mediated through ER $\alpha$ AF1 and/or AF2, E2 induces rapid nongenomic actions involving a pool of ERs localized at the plasma membrane.<sup>48–51</sup> In particular, E2, but not 4-OHT, rapidly activates ERs, resulting in mitogen-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase activation in cultured endothelial cells.<sup>52</sup> We previously reported that ER $\alpha$ , but neither AF1<sup>28</sup> nor AF-2,<sup>32</sup> is necessary to induce the accelerative effect of E2 *in vivo*. Chambliss et al<sup>53</sup> recently provided evidence supporting the physiological relevance of the membrane initiated steroid signaling pathway in vascular pathophysiological features using an estrogen-dendrimer conjugate, a compound that selectively activates nonnuclear ERs *in vivo*; this conjugate is able to accelerate reendothelialization in the same model of carotid electric injury used in the present study. Altogether, these

data suggest that tamoxifen does not elicit the non-genomic action required to accelerate reendothelialization.

To conclude, the present study demonstrates that, although tamoxifen and E2 exert a similar atheroprotective action through an ER $\alpha$ -dependent mechanism, molecular targets accounting for this beneficial action appear to be different. Indeed, although ER $\alpha$ AF-1 is dispensable for E2-mediated protective effects on arteries,<sup>28</sup> tamoxifen action entirely relies on ER $\alpha$ AF-1. Furthermore, tamoxifen elicits only partial vasculoprotection compared with E2, because the selective activation of ER $\alpha$ AF-1 is sufficient to prevent atheroma, but not to accelerate endothelial healing.

## Acknowledgements

We thank the staff of the animal facilities and of the Plateforme d'Experimentation Fonctionnelle (Aurore Desquesnes) for skillful technical assistance, Marie-Josée Fouque and Jean-Christophe Albouys for technical support, Prof. Pierre Chambon and Dr. Andrée Krust for kindly providing ER $\alpha$ <sup>+/−</sup> and AF-1<sup>+/0</sup> mice, and Jean-José Maoret and Frédéric Martins for their excellent technical assistance and contribution to RT-qPCR experiments performed at the GeT-TQ Genopole Toulouse Facility.

## Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.010>.

## References

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Lancet 1998, 351:1451–1467
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet 2005, 365:1687–1717
3. Grainger DJ, Schofield PM: Tamoxifen for the prevention of myocardial infarction in humans: preclinical and early clinical evidence. Circulation 2005, 112:3018–3024
4. Simon T, Boutouyrie P, Simon JM, Laloux B, Tournigand C, Tropeano AI, Laurent S, Jaillon P: Influence of tamoxifen on carotid intima-media thickness in postmenopausal women. Circulation 2002, 106:2925–2929
5. Stamatelopoulos KS, Lekakis JP, Poulakaki NA, Papamichael CM, Venetsanou K, Aznaouridis K, Protopgerou AD, Papaioannou TG, Kumar S, Stamatelopoulos SF: Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. Am Heart J 2004, 147:1093–1099
6. Williams JK, Wagner JD, Li Z, Golden DL, Adams MR: Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997, 17:403–408
7. Kallas Hueb C, Aldrich JM, Kallas E, Franchini Ramires JA: Repercussions of raloxifene, tamoxifen and estrogen on aortic atherosclerotic lesions of female rabbits submitted to ovariectomy and hypercholesterolemia diet. Maturitas 2005, 50:30–38

8. Grainger DJ, Witchell CM, Metcalfe JC: Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med* 1995, 1:1067–1073
9. Lawn RM, Pearle AD, Kunz LL, Rubin EM, Reckless J, Metcalfe JC, Grainger DJ: Feedback mechanism of focal vascular lesion formation in transgenic apolipoprotein(a) mice. *J Biol Chem* 1996, 271: 31367–31371
10. Reckless J, Metcalfe JC, Grainger DJ: Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 1997, 95:1542–1548
11. Clarkson TB, Anthony MS, Jerome CP: Lack of effect of raloxifene on coronary artery atherosclerosis of postmenopausal monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:721–726
12. Castelo-Branco C, Sanjuán A, Casals E, Ascaso C, Colodrón M, Vicente JJ, Mercader I, Escaramis G, Blumel JE, Ordi J, Vanrell JA: Raloxifene inhibits cholesterol aortic content but not atherosclerotic plaque size in oophorectomised cholesterol-fed rabbits. *J Obstet Gynaecol* 2004, 24:47–51
13. Braithwaite RS, Chlebowski RT, Lau J, George S, Hess R, Col NF: Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen. *J Gen Intern Med* 2003, 18:937–947
14. Clarke SC, Schofield PM, Grace AA, Metcalfe JC, Kirschenlohr HL: Tamoxifen effects on endothelial function and cardiovascular risk factors in men with advanced atherosclerosis. *Circulation* 2001, 103: 1497–1502
15. Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P: The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 1986, 5:891–897
16. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P: The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 1989, 59:477–487
17. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P: Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 2006, 7:497–508
18. Nilsson S, Koehler KF: Oestrogen receptors and selective oestrogen receptor modulators: molecular and cellular pharmacology. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005, 96:15–25
19. Arnal JF, Lenfant F, Flouriot G, Tremolieres F, Laurell H, Fontaine C, Krust A, Chambon P, Gourdy P: From in vivo gene targeting of estrogen receptors to optimisation of their modulation in menopause. *Br J Pharmacol* 2012, 165:57–66
20. Smith CL, O'Malley BW: Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004, 25:45–71
21. Shiu AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998, 95:927–937
22. Sutherland RL, Murphy LC, San Foo M, Green MD, Whybourne AM, Krozowski ZS: High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature* 1980, 288:273–275
23. Kedjourou B, de Medina P, Oulad-Abdelghani M, Payre B, Silvente-Poirot S, Favre G, Faye JC, Poirot M: Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 2004, 279: 34048–34061
24. Tremblay GB, Bergeron D, Giguere V: 4-Hydroxytamoxifen is an isoform-specific inhibitor of orphan estrogen-receptor-related (ERR) nuclear receptors beta and gamma. *Endocrinology* 2001, 142: 4572–4575
25. Coward P, Lee D, Hull MV, Lehmann JM: 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:8880–8884
26. Vivacqua A, Bonfiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M: 17 $\beta$ -Estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 2006, 70:1414–1423
27. Vivacqua A, Bonfiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M: The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 $\beta$ -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006, 20:631–646
28. Billon-Gales A, Fontaine C, Filipe C, Douin-Echinard V, Fouque MJ, Flouriot G, Gourdy P, Lenfant F, Laurell H, Krust A, Chambon P, Arnal JF: The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:2053–2058
29. 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
30. Filipe C, Lam Shang Leen L, Brouchet L, Billon A, Benouaich V, Fontaine V, Gourdy P, Lenfant F, Arnal JF, Gadeau AP, Laurell H: Estradiol accelerates endothelial healing through the retrograde commitment of uninjured endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008, 294:H2822–H2830
31. Billon-Gales A, Fontaine C, Douin-Echinard V, Delpy L, Berges H, Calippe B, Lenfant F, Laurell H, Guery JC, Gourdy P, Arnal JF: Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17 $\beta$ -estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2009, 120:2567–2576
32. Billon-Gales A, Krust A, Fontaine C, Abot A, Flouriot G, Toutain C, Berges H, Gadeau AP, Lenfant F, Gourdy P, Chambon P, Arnal JF: Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor-alpha is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108:13311–13316
33. Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Metivier R, Flouriot G: The human estrogen receptor-alpha isoform hERAlpha46 antagonizes the proliferative influence of hERAlpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2005, 146:5474–5484
34. Gourdy P, Mallat Z, Castano C, Garmy-Susini B, Mac Gregor JL, Tedgui A, Arnal JF, Bayard F: The atheroprotective effect of 17 $\beta$ -estradiol is not altered in P-selectin- or ICAM-1-deficient hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis* 2003, 166:41–48
35. 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
36. Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW: Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 1997, 95:1768–1772
37. O'Lone R, Knorr K, Jaffe IZ, Schaffer ME, Martini PG, Karas RH, Bienkowski J, Mendelsohn ME, Hansen U: Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* 2007, 21:1281–1296
38. Metzger D, Losson R, Bornert JM, Lemoine Y, Chambon P: Promoter specificity of the two transcriptional activation functions of the human oestrogen receptor in yeast. *Nucleic Acids Res* 1992, 20: 2813–2817
39. Berry M, Metzger D, Chambon P: Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 1990, 9:2811–2818
40. Merot Y, Metivier R, Penot G, Manu D, Saligaut C, Gannon F, Pakdel F, Kah O, Flouriot G: The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem* 2004, 279:26184–26191
41. Suarez Y, Fernandez C, Gomez-Coronado D, Ferruelo AJ, Davalos A, Martinez-Botas J, Lasuncion MA: Synergistic upregulation of low-density lipoprotein receptor activity by tamoxifen and lovastatin. *Cardiovasc Res* 2004, 64:346–355

42. de Medina P, Paillasse MR, Segala G, Poirot M, Silvente-Poirot S: Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107:13520–13525
43. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF: Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002, 22:1585–1590
44. Metcalfe JC, Grainger DJ: TGF-beta: implications for human vascular disease. *J Hum Hypertens* 1995, 9:679
45. Merwin JR, Newman W, Beall LD, Tucker A, Madri J: Vascular cells respond differentially to transforming growth factors beta 1 and beta 2 in vitro. *Am J Pathol* 1991, 138:37–51
46. Merwin JR, Roberts A, Kondaiah P, Tucker A, Madri J: Vascular cell responses to TGF-beta 3 mimic those of TGF-beta 1 in vitro. *Growth Factors* 1991, 5:149–158
47. Merwin JR, Tucker A, Madisen L, Purchio A, Madri J: Vascular cell responses to a hybrid transforming growth factor-beta molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 175:589–595
48. Kim KH, Bender JR: Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 308:3–8
49. Levin ER: Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005, 19:1951–1959
50. Fu XD, Simoncini T: Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life* 2008, 60:502–510
51. Mendelsohn ME, Karas RH: Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling. *J Clin Invest* 2010, 120:2277–2279
52. Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, Bhatnagar S, Noisin EL, Sumanasekera WK, Zhao L, Brey M, Keynton RS: Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells. *J Biol Chem* 2005, 280:7460–7468
53. Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, Konaniah ES, Umetani M, Korach KS, Thomas GD, Mineo C, Yuhanna IS, Kim SH, Madak-Erdogan Z, Maggi A, Dineen SP, Roland CL, Hui DY, Brekken RA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shaul PW: Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest* 2010, 120:2319–2330

n'accélère pas capable d'induire une accélération de la ré-endothélialisation après agression électrique péri-vasculaire au niveau de la carotide. Un traitement aigu d'E2 ou de tamoxifène montre une divergence dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles aortiques. Malgré cela, nous avons mis en évidence que le pouvoir athéroprotecteur du tamoxifène, comme l'E2, est dépendant de ER $\alpha$ . Cependant, les mécanismes athéroprotecteurs mis en jeu semblent diverger entre l'E2 et la tamoxifène. En effet, le rôle d'ER $\alpha$ AF-1 est crucial pour le tamoxifène car l'effet athéroprotecteur est perdu chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>LDLr<sup>-/-</sup>.

Bien que le tamoxifène et l'E2 exercent une action athéroprotectrice similaire via ER $\alpha$ , les mécanismes moléculaires impliqués dans cette action bénéfique sont différents. En effet, alors que ER $\alpha$ AF-1 n'est pas nécessaire pour relayer l'effet athéroprotecteur de l'E2, l'action du tamoxifène repose entièrement sur cette fonction activatrice. De plus, le tamoxifène exerce un effet vasculoprotecteur partiel car il n'est pas capable d'accélérer la cicatrisation endothéliale après une agression électrique de la carotide, contrairement à l'E2.

## **Article 2 : ER $\alpha$ AF-1 est nécessaire et suffisant pour la prolifération épithéliale utérine *in vivo*.**

La réponse utérine à l'E2 est très largement étudiée dans la littérature scientifique en termes de régulation transcriptionnelle, prolifération cellulaire et modifications histologiques. L'ensemble des modifications cellulaires et moléculaires dans l'utérus, en réponse à l'E2, est dépendante de ER $\alpha$ . Pendant ma thèse, l'équipe de Korach K. a montré, grâce à l'utilisation d'une souris mutée sur ER $\alpha$ AF-2, que cette fonction activatrice est cruciale pour la régulation de gènes cibles et la prolifération épithéliale en réponse à l'E2 (Arao et al., 2011). Néanmoins, l'implication de ER $\alpha$ AF-1 n'a jamais été démontré directement *in vivo*.

L'objectif de ce travail est d'explorer le rôle de ER $\alpha$ AF-1 dans la réponse utérine en combinant une approche pharmacologique (E2, activant ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 versus tamoxifène, activant ER $\alpha$ AF-1 mais pas ER $\alpha$ AF-2) et une approche génétique (par l'utilisation de souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>).

Nous avons démontré que ER $\alpha$ AF-1 est suffisant pour relayer la réponse utérine à court terme. En effet, l'analyse transcriptionnelle à large échelle montre que le set de gènes utérins étudié entre 2h et 24h est régulé de manière commune par l'E2 et le tamoxifène malgré une réponse transcriptionnelle retardée au tamoxifène, expliquée par son pouvoir agoniste plus faible. De plus, la prolifération épithéliale utérine, dépendante de ER $\alpha$ , est observée en réponse à l'E2 comme au tamoxifène. Les régulations transcriptionnelles et la prolifération cellulaire, au niveau de l'épithélium utérin, sont abolies chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> en réponse à un traitement aigu ou chronique d'E2, démontrant ainsi le rôle crucial de ER $\alpha$ AF-1 dans ces mécanismes. Néanmoins, après 4 semaines d'imprégnation œstrogénique, on observe un œdème stromal résiduel chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>, notamment dû à la persistance de l'expression de vegf-a, facteur impliqué dans la perméabilité vasculaire. La balance prolifération/apoptose ainsi que la réponse à la progestérone sont altérées chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>.

Ainsi, nous avons mis en évidence que ER $\alpha$ AF-1 joue un rôle crucial dans les effets prolifératifs de l'E2 au niveau de l'utérus.

Ces résultats, publiés dans Endocrinology, ont été réalisé en utilisant une dose d'E2 physiologique (8 µg/kg) correspondant au taux retrouvé chez une souris en période d'activité génitale. Nous avons poursuivi cette étude en utilisant une dose d'E2 correspondante à celle de la gestation (80 µg/kg). Après six semaines de traitement, l'hypertrophie résiduelle est retrouvée chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> ovariectomisées en réponse à cette dose plus forte d'E2. L'analyse des paramètres morphologiques de l'endomètre comme l'épaisseur de

l'épithélium, du stroma ainsi que la densité cellulaire stromale montre, comme précédemment, un effet intermédiaire chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> comparées aux souris sauvages et ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Alors qu'un traitement E2 à 8 µg/kg pendant 4 semaines n'induit pas de prolifération épithéliale, l'administration d'E2 à 80 µg/kg pendant 6 semaines induit un effet prolifératif utérin, chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>, qui présentent 13% de cellules épithéliales marquées positivement au Ki67.

Il semblerait donc que ER $\alpha$ AF-1 joue un rôle crucial dans la prolifération épithéliale mais qu'un traitement plus long en utilisant une dose plus importante d'E2 permet l'implication d'autres mécanismes *via* ER $\alpha$ AF-2 et/ou les effets initiés à la membrane, indépendants d'ER $\alpha$ AF-1 pour relayer la prolifération cellulaire épithéliale au niveau de l'utérus.

## The AF-1 Activation Function of Estrogen Receptor $\alpha$ Is Necessary and Sufficient for Uterine Epithelial Cell Proliferation In Vivo

Anne Abot, Coralie Fontaine, Isabelle Raymond-Letron, Gilles Flouriot, Marine Adlanmerini, Melissa Buscato, Christiane Otto, Hortense Bergès, Henrik Laurell, Pierre Gourdy, Françoise Lenfant, and Jean-François Arnal

Institut National Scientifique de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048 (A.A., C.F., M.A., M.B., H.B., H.L., P.G., F.L., J.-F.A.), Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Université Paul Sabatier, BP 84225, 31 432 Toulouse cedex 04, France; Université de Toulouse (I.R.-L.) , Institut National Polytechnique, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, F-31076 Toulouse, France; Université de Rennes I (G.F.), Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6026 Équipe "Récepteur des oestrogènes et destinée cellulaire", Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France; and Therapeutic Research Group Oncology & Gynecological Therapy (C.O.), Bayer Pharma AG, 13342 Berlin, Germany

Estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) regulates gene transcription through the 2 activation functions (AFs) AF-1 and AF-2. The crucial role of ER $\alpha$ AF-2 was previously demonstrated for endometrial proliferative action of 17 $\beta$ -estradiol (E2). Here, we investigated the role of ER $\alpha$ AF-1 in the regulation of gene transcription and cell proliferation in the uterus. We show that acute treatment with E2 or tamoxifen, which selectively activates ER $\alpha$ AF-1, similarly regulate the expression of a uterine set of estrogen-dependent genes as well as epithelial cell proliferation in the uterus of wild-type mice. These effects were abrogated in mice lacking ER $\alpha$ AF-1 ( $ER\alpha$ AF-1 $^0$ ). Four weeks of E2 treatment led to uterine hypertrophy and sustained luminal epithelial and stromal cell proliferation in wild-type mice, but not in  $ER\alpha$ AF-1 $^0$  mice. However,  $ER\alpha$ AF-1 $^0$  mice still presented a moderate uterine hypertrophy essentially due to a stromal edema, potentially due to the persistence of Vegf-a induction. Epithelial apoptosis is largely decreased in these  $ER\alpha$ AF-1 $^0$  uteri, and response to progesterone is also altered. Finally, E2-induced proliferation of an ER $\alpha$ -positive epithelial cancer cell line was also inhibited by overexpression of an inducible ER $\alpha$  isoform lacking AF-1. Altogether, these data highlight the crucial role of ER $\alpha$ AF-1 in the E2-induced proliferative response in vitro and in vivo. Because ER $\alpha$ AF-1 was previously reported to be dispensable for several E2 extrareproductive protective effects, an optimal ER $\alpha$  modulation could be obtained using molecules activating ER $\alpha$  with a minimal ER $\alpha$ AF-1 action. (*Endocrinology* 154: 2222–2233, 2013)

Estrogens, particularly 17 $\beta$ -estradiol (E2), play a pivotal role in sexual development and reproduction but are also implicated in other physiologic processes in mammals. The uterus is a major estrogen target, and waves of steroid hormone-induced cell proliferation and differentiation dictate the cyclical changes that occur in the uterine epithelium during the reproductive cycle (1). In addition, estrogens induce a rapid increase in endometrial micro-

vascular permeability, leading to stromal edema and marked uterine weight increase. Stromal edema is believed to create an optimal environment for the growth and remodeling of the endometrium in preparation for embryo implantation and pregnancy (2). Estrogens and progesterone (P4) actions, mediated by their respective receptors, cause molecular and cellular events during uterine receptivity, and the balance between them is important for the

endometrium functions (3). At menopause, after cessation of ovarian function, estrogen replacement is used to relieve climacteric symptoms, in order to prevent osteoporosis but also coronary disease when given early after menopause (4, 5). To minimize the proliferative effects of estrogens on the uterus and reduce the risk of endometrial cancer, progestins are routinely administered together with estrogens in hormone replacement therapy. However, the Women's Health Initiative trial highlighted that the estrogen-medroxyprogesterone acetate association might increase the risk of breast cancer and cardiovascular diseases, whereas administration of estrogens alone in hysterectomized women have protective (breast cancer) and neutral (coronary heart disease) effects (6, 7).

The different physiologic responses to estrogens are initiated by their binding to the estrogen receptors (ERs) ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which belong to the nuclear receptor superfamily and are structurally organized into 6 functional domains (A to F). The E domain allows hormone binding, an event that induces specific conformational changes that are required for ER transcriptional activity through the modulation of 2 activation functions (AFs), AF-1 and AF-2, located in the A/B and E domains, respectively (8). ER-mediated transcriptional regulation involves either direct interaction of ER with specific estrogen-responsive elements (EREs) in or near the promoter region of target genes, or an indirect mechanism via protein/protein interactions with other transcriptional factors (9). ER-mediated transactivation is then achieved via an ordered sequence of interactions between the AFs and various coactivators, such as members of the p160 subfamily or the cAMP response element binding protein/p300 (10–12).

In the rodent uterus, E2 generates a robust and rapid transcriptional response with a biphasic temporal effect. Early response includes RNA transcription, hyperemia, and water imbibition, whereas later responses comprise cycles of DNA synthesis and mitosis in epithelial cells (13–15). The strong expression of ER $\alpha$  in the uterus is powerful evidence for its importance in the response to E2. In fact, ER $\alpha$  ligand-induced signaling is critical for the normal development of uterine tissue (13, 16, 17). Recently, an ER $\alpha$ AF-2 mutant mouse line allowed us to show that this AF-2 is required for regulating some uterine gene expression and epithelial cell proliferation in response to E2 (18). Although weak E2 action on uterine weight in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice has been previously reported (19), the precise role of ER $\alpha$ AF-1 in uterine function has not been precisely studied. Therefore, to explore the role of AF-1 in the molecular mechanisms of uterine growth, we used a combination of pharmacologic and genetic approaches to compare the effects of acute and chronic administration of E2 on uterine gene expression and epithelial cell proliferation in

wild-type mice and in mice lacking ER $\alpha$ AF-1 (ER $\alpha$ AF-1 $^0$ ) (19). We proved that ER $\alpha$ AF-1 is required for E2-induced uterine epithelial cell proliferation, whereas it is partially dispensable for the induction of edema after chronic E2 stimulation.

## Materials and Methods

### Mice

All procedures involving experimental animals were performed in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and were approved by the local Animal Care and Use Committee. ER $\alpha^{+/+}$  and ER $\alpha$ AF-1 $^{+/0}$  mice were generated as previously described (19, 20). C57Bl/6J as well as ER $\alpha^{-/-}$ , ER $\alpha$ AF-1 $^0$ , and their corresponding wild-type littermates (all backcrossed at least 10 times on a C57Bl/6J genetic background) were ovariectomized at 4 weeks of age, and 3 weeks after were sc injected with vehicle (castor oil), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg), the ER $\alpha$  agonist 16 $\alpha$ -LE2 (also termed cpd1471) (28.8  $\mu$ g/kg), tamoxifen (4 mg/kg) or P4 (1 mg). Mice were humanely destroyed 2, 6, 12, and 24 hours after unique or daily repeated treatment (during 3 d). For chronic E2 treatment, ovariectomized mice were implanted with sc pellets that release either placebo or E2 (0.01 mg 17 $\beta$ -estradiol, 60-d release, ie, 8  $\mu$ g/kg/d; Innovative Research of America, Sarasota, Florida). Because no significant statistical difference was observed in the parameters of ER $\alpha^{+/+}$  and ER $\alpha$ AF-1 $^{+/+}$  mice, these two control groups were pooled and indicated as WT in Figures 4 and 6 and Supplemental Figure 10.

### Analysis of mRNA levels by quantitative RT-PCR

Dissected uteri were homogenized using a Precellys tissue homogenizer (Bertin Technology, Cedex, France) and total RNA from tissues was prepared using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California). One microgram of RNA was reverse transcribed at 25°C for 10 minutes and then at 37°C for 2 h in 20  $\mu$ L final volume using the High Capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, California). The 96.96 Dynamic Arrays for the microfluidic BioMark system (Fluidigm Corp., South San Francisco, California) were used to study by high throughput quantitative PCR the gene expression profile in 6.5 ng cDNA from each mouse uterus, as described previously (21, 22). Primers (Supplemental Figure 1 published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>) were validated by testing the PCR efficiency using standard curves (95%  $\leq$  efficiency  $\leq$  105%). Gene expression was quantified using the comparative C<sub>t</sub> (threshold cycle) method, and HPRT1 expression is used as reference. Each probe was indeed normalized to each respective genotype placebo in order to better visualize the impact of E2 or tamoxifen on gene expression changes because no significant difference was detected between wild-type and ER $\alpha$ AF-1 $^0$  untreated ovariectomized mice.

### Immunohistochemistry

Paraffin-embedded transverse sections (4- $\mu$ m) from formalin-fixed uterine specimens were dewaxed in toluene and rehydrated through acetone bath to deionized water. Antigen re-

trieval was performed in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 30 minutes in a water bath at 95°C. Cooled sections were then incubated in peroxidase blocking solution (DAKO Corp., Carpinteria, California) to quench endogenous peroxidase activity. To block nonspecific binding, sections were incubated in normal goat serum (DAKO) for 20 minutes at room temperature. Primary antibodies were all rabbit polyclonal antibodies: anti-Ki-67 antigen (Monosan; Sanbio B.V., Uden, The Netherlands), anti-ER $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), anti-progesterone receptor (PR) (DAKO) and antiactive caspase-3 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Sections were incubated 50 minutes at room temperature with primary antibodies. The secondary antibody, biotinylated goat antirabbit IgGs (Thermo-Scientific, Rockford, Illinois), was applied for 25 minutes at room temperature followed by an horseradish peroxidase-streptavidin solution (DAKO) for 25 minutes. Peroxidase activity was revealed by 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate (DAKO). Finally, sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated, and coverslipped. The luminal epithelial height was measured from the basal membrane to the apical surface. The values are the mean of 10 measurements in each transverse uterus section.

### Determination of apoptotic index

The number of apoptotic cells present in a section is expressed as a fraction of the total number of epithelial cells, so called activated caspase-3 labeling apoptotic index.

### Statistical analyses

Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM. To test the effect of treatments, 1-way ANOVA was performed. To test the interaction between treatments and genotypes a 2-way ANOVA was carried out. When an interaction was observed between two variables, the effect of treatment was studied in each genotype using the Bonferroni post hoc test. A value of  $P < .05$  was considered as statistically significant.

## Results

### ER $\alpha$ AF-1 is sufficient to mediate ER $\alpha$ -dependent uterine response to estrogens in vivo

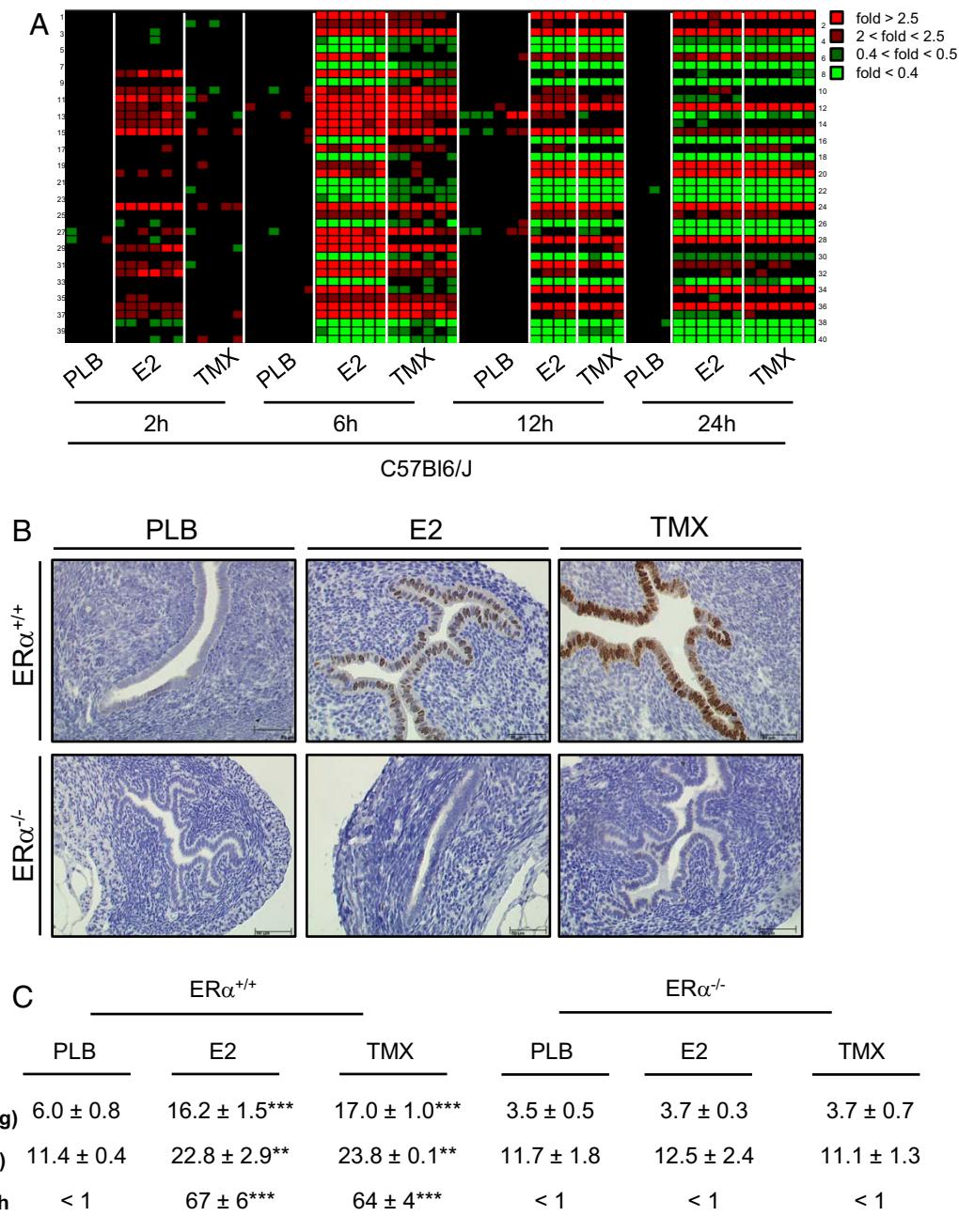
We first confirmed the crucial role of ER $\alpha$  in the uterine response to E2 (ie, gene transcription and cell proliferation). To this aim, we selected a set of genes known to be regulated by E2 in the uterus (23–27) (Supplemental Figure 1) and evaluated their expression profile in ovariectomized C57Bl/6J mice after a unique acute administration of 8  $\mu$ g/kg E2 or placebo. We first observed a similar transcriptional regulation of this set of genes upon acute administration of E2 or using the selective ER $\alpha$  agonist 16 $\alpha$ -LE2 (Supplemental Figures 2A and 3). Conversely, acute administration of E2 in ovariectomized ER $\alpha^{-/-}$  mice did not have any effect on the expression of these genes. In addition, 24 hours after E2 or 16 $\alpha$ -LE2 treatment, both luminal epithelial height (LEH) and uterine weight were significantly increased in ovariectomized

C57Bl/6J mice (Supplemental Figure 2, B and C). Nuclear expression of Ki-67 (a proliferation marker) was observed in 87% (E2) and 93% (16 $\alpha$ -LE2) of uterine luminal epithelial cells, whereas no Ki-67-positive cells were detected in placebo-treated animals and ER $\alpha^{-/-}$  mice (Supplemental Figure 2, B and C).

Then, to determine the role of ER $\alpha$ AF-1 in the uterine response to E2, we compared uterine gene transcription and cell proliferation in ovariectomized wild-type mice given either 8  $\mu$ g/kg E2 or 4 mg/kg tamoxifen, a selective ER $\alpha$ AF-1 agonist and ER $\alpha$ AF-2 antagonist (28–30) (Figure 1 and Supplemental Figure 4). The set of genes regulated by E2 was very similarly regulated by tamoxifen after 12 or 24 hours, although the earlier response (at 2 and 6 h) to tamoxifen was somewhat delayed compared with E2 (Figure 1A and Supplemental Figure 4), in agreement with a previous report (31). The effects of E2 and tamoxifen on uterine weight, LEH, and Ki-67 expression were also quite similar in wild-type mice, and abrogated in ER $\alpha^{-/-}$  mice (Figure 1, B and C). These findings suggest that ER $\alpha$ AF-1 activation is sufficient to mediate the ER $\alpha$ -dependent uterine response.

### Uterine gene expression in response to acute E2 or tamoxifen administration requires ER $\alpha$ AF-1

To further evaluate the role of ER $\alpha$ AF-1 in the E2 or tamoxifen-induced uterine transcriptional response in vivo, we used transgenic mice, in which the sequence coding for the main part of the A/B domain of ER $\alpha$  including AF-1 was deleted (ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice) (19). Regulation of most of the genes regulated by acute E2 treatment in ER $\alpha$ AF-1<sup>+/+</sup> mice was lost in ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice (Figure 2A and Supplemental Figure 5). Only 2 genes, encoding the family with sequence similarity 65 member B (*Fam65b*) and the progesterone receptor (*Pr*) were still significantly up-regulated by E2, although in a lesser extent than in wild-type mice (Figure 2B and Supplemental Figure 5). The transcriptional regulation of the classical ERE-responsive genes by E2, such as insulin-like growth factor (*Igf1*) and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*P21*), was strictly ER $\alpha$ AF-1 dependent. Interestingly, *Vegf-a*, which is implicated in vascular permeability and water imbibition (32), was up-regulated in response to an acute treatment with E2 in wild-type but not in ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice (Figure 2B). In the same way, E2 strongly induced the activity of the C3 (ERE) promoter and of the AP-1 site in human endometrial adenocarcinoma Ishikawa cells transfected with the wild-type ER $\alpha$ , but not with the ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> in luciferase reporter assays (Supplemental Figure 6). The transcriptional effect of tamoxifen was totally abrogated using the ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice (Figure 2 and Supplemental Figure 5).

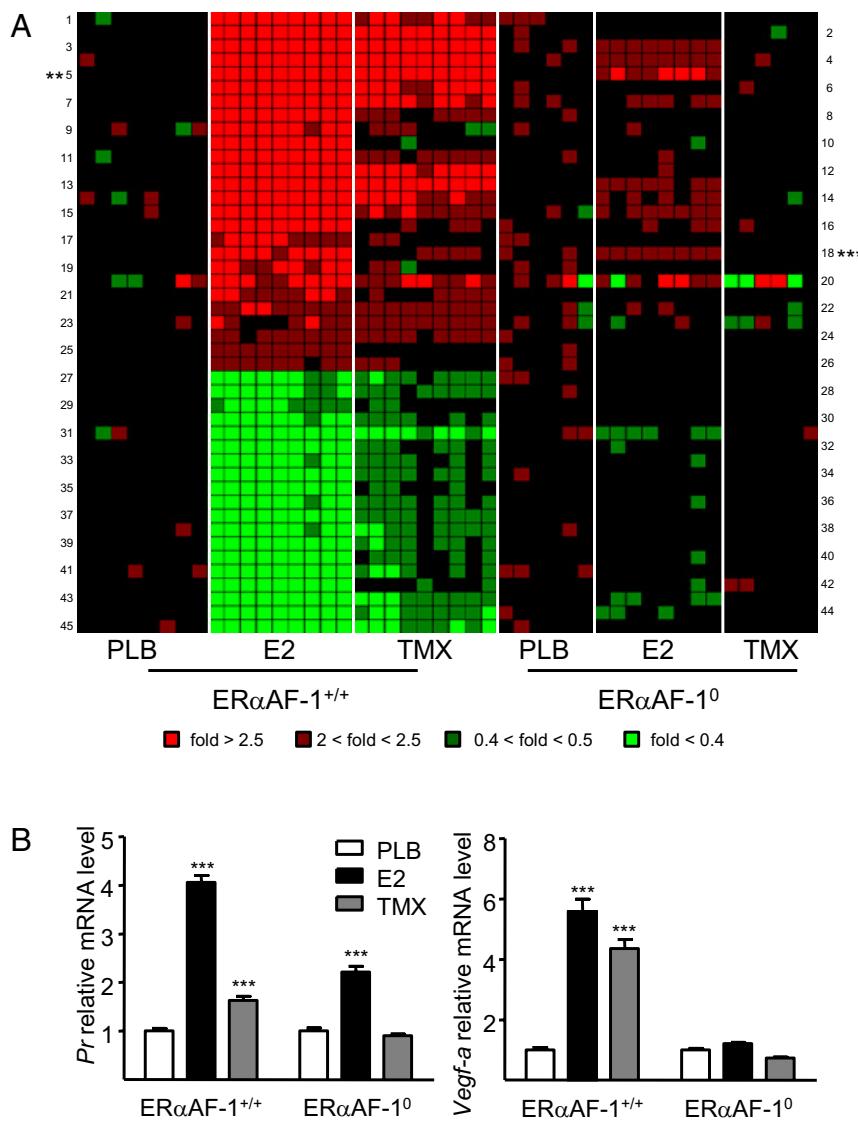


**Figure 1.** ER $\alpha$ AF-1 Is Sufficient to Induce Uterine Epithelial Proliferation in Response to Acute E2 or Tamoxifen Treatment in Vivo. Ovariectomized C57BL/6J, ER $\alpha^{+/+}$  and ER $\alpha^{-/-}$  mice (7 wk of age) were injected sc with placebo (PLB, castor oil), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg), or tamoxifen (TMX, 4 mg/kg), and were euthanized at different time points (A) or 24 hours after treatment (B and C). A, Data obtained from 96.96 Dynamic Arrays were used to generate a cluster diagram describing the significant changes in the expression of 40 E2-regulated genes labeled 1–40. Each horizontal line represents a single gene, and each vertical line represents an individual sample. Genes that were up-regulated at least 2-fold after E2 administration relative to placebo are in red, whereas down-regulated genes are in green. The color intensity indicates the degree of variation in expression. B, Ki-67 detection in transverse uterus sections (scale bar, 50  $\mu$ m). C, Uterine weight, LEH, and percentage of Ki-67-positive epithelial cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the 2 factors, effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*\*,  $P < .01$ ; and \*\*\*,  $P < .001$ ;  $n = 4$  to 6 mice per group).

### ER $\alpha$ AF-1 is required for cell proliferation in response to acute E2 or tamoxifen treatment

Next we investigated the role of ER $\alpha$ AF-1 in the induction of uterine epithelial cell proliferation after acute administration of E2 or tamoxifen. First, we verified that

ER $\alpha$  was similarly expressed in the epithelium and in the stroma of both wild-type and ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice using immunohistochemistry (Figure 3A). Uterine weight, LEH, and stromal height were significantly increased in wild-type mice, but not in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice 24 hours after acute ad-



**Figure 2.** ER $\alpha$ AF-1 Is Necessary for the Uterine Transcriptional Response to E2 or Tamoxifen (TMX) Acute Exposure in Vivo. Ovariectomized ER $\alpha$ AF-1<sup>+/+</sup> and ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice (7 wk of age) were injected sc with placebo (PLB, castor oil), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg), or TMX (4 mg/kg) and euthanized 6 hours later. A and B, Data obtained from 96.96 Dynamic Arrays were used to generate a cluster diagram of the significant changes in the expression of the E2-regulated genes. Each horizontal line represents a single gene, and each vertical line an individual sample. Genes that were up-regulated at least 2-fold after E2 administration relative to placebo are in red, whereas down-regulated genes are in green. The color intensity indicates the degree of variation in expression. C, Quantification of the relative mRNA level of PR and Vegf-a by quantitative PCR. Data were normalized to HPRT1 expression. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*\*\*,  $P$  < .001;  $n$  = 6 to 9 mice per group).

ministration of E2 (8  $\mu$ g/kg) or tamoxifen (4 mg/kg) (Figure 3B). A strong induction of epithelial proliferation, as indicated by Ki-67 nuclear expression, was observed in wild-type, but not in ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice after E2 or tamoxifen exposure (Figure 3, C and D). The absence of uterine hypertrophy after E2 or tamoxifen treatment in ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice was associated with the absence of regulation at 24 hours of most of the studied genes (Supplemental Figure 7).

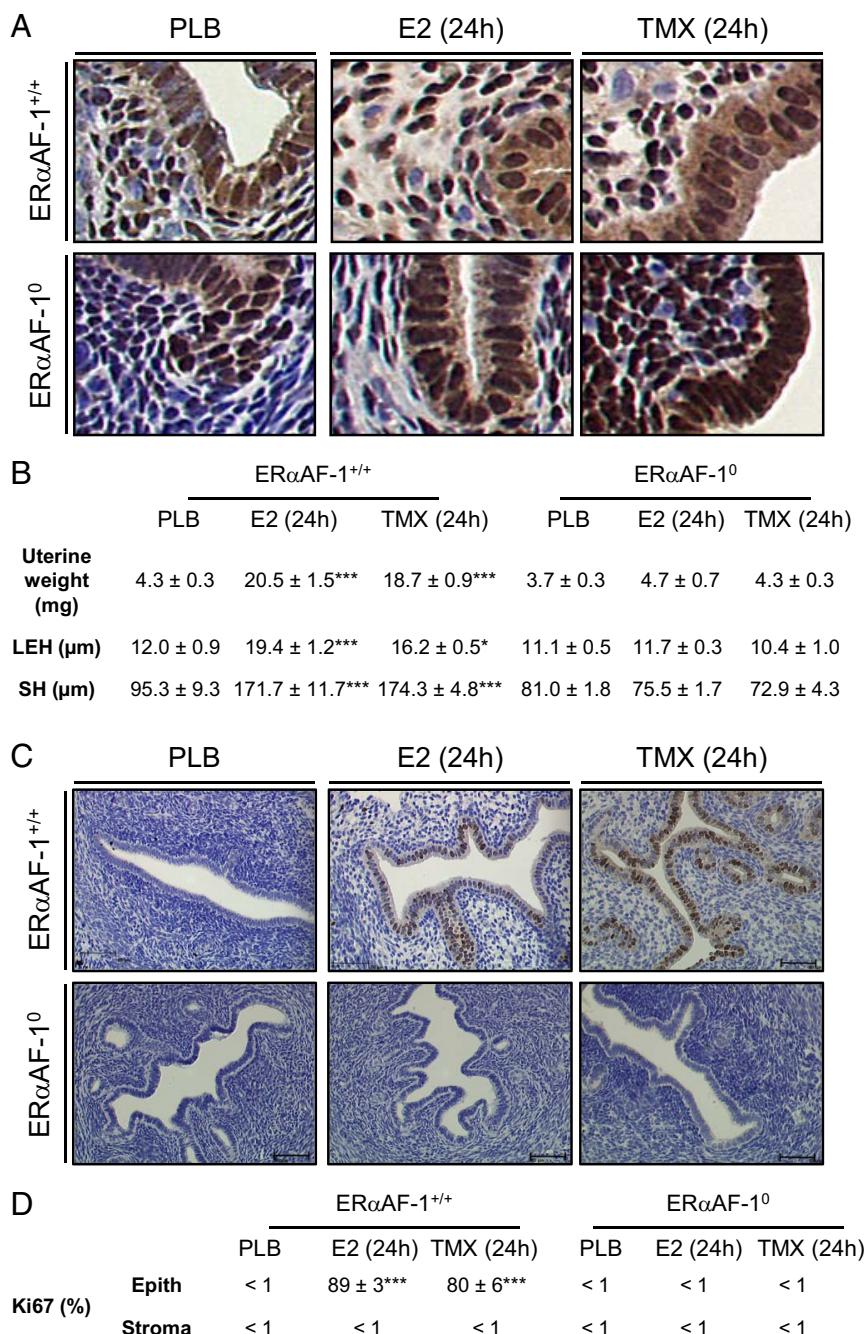
To assess the role of the other AF of ER $\alpha$ , ie, AF-2, we used ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> mice in which the sequence encoding 7 amino acids in helix 12 that are crucial for AF-2 activity has been deleted (33). No increase in uterine weight, LEH, and epithelial proliferation were observed in these ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> mice after acute E2 or tamoxifen (Supplemental Figure 8). Thus, we confirmed the crucial role of ER $\alpha$ AF-2 for uterine response to E2 previously demonstrated with another mouse model of invalidation of this AF (18).

Interestingly, overexpression of an AF-1-deficient ER $\alpha$  isoform inhibited the cell proliferation in response to E2 of the MCF7 ER $\alpha$ -positive breast cancer cell line (Supplemental Figure 9). Altogether, these results show the crucial role of ER $\alpha$ AF-1 in the proliferative response to acute E2 treatment both in vitro and in vivo.

#### Luminal epithelial cell proliferation is inhibited in ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice after chronic exposure to E2

We then evaluated the role of ER $\alpha$ AF-1 in uterus-mediated E2 signaling after chronic exposure to E2 (8  $\mu$ g/kg/d for 4 wk) (Figure 4). In wild-type animals, chronic E2 treatment strongly increased uterine weight in comparison to placebo (Figure 4A). The luminal epithelium from wild-type E2-treated mice was characterized by the presence of large columnar cells with eosinophilic cytoplasm, apoptotic bodies, and neutrophilic infiltration; 19% of luminal epithelial cells were Ki-67 positive (Figure 4B). The uterine stroma presented significant de-

crease of cell density and presented loosely arranged oval fibroblasts, glands with cystic dilatation and neutrophilic infiltration. In parallel, stromal cell proliferation was increased by E2 in comparison with placebo-treated controls (Figure 4B). Conversely, chronic E2 treatment did not have any effect in ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> animals. Indeed, in these mice, uterine stroma was compact and dense without mitotic activity, and the luminal epithelium was composed of

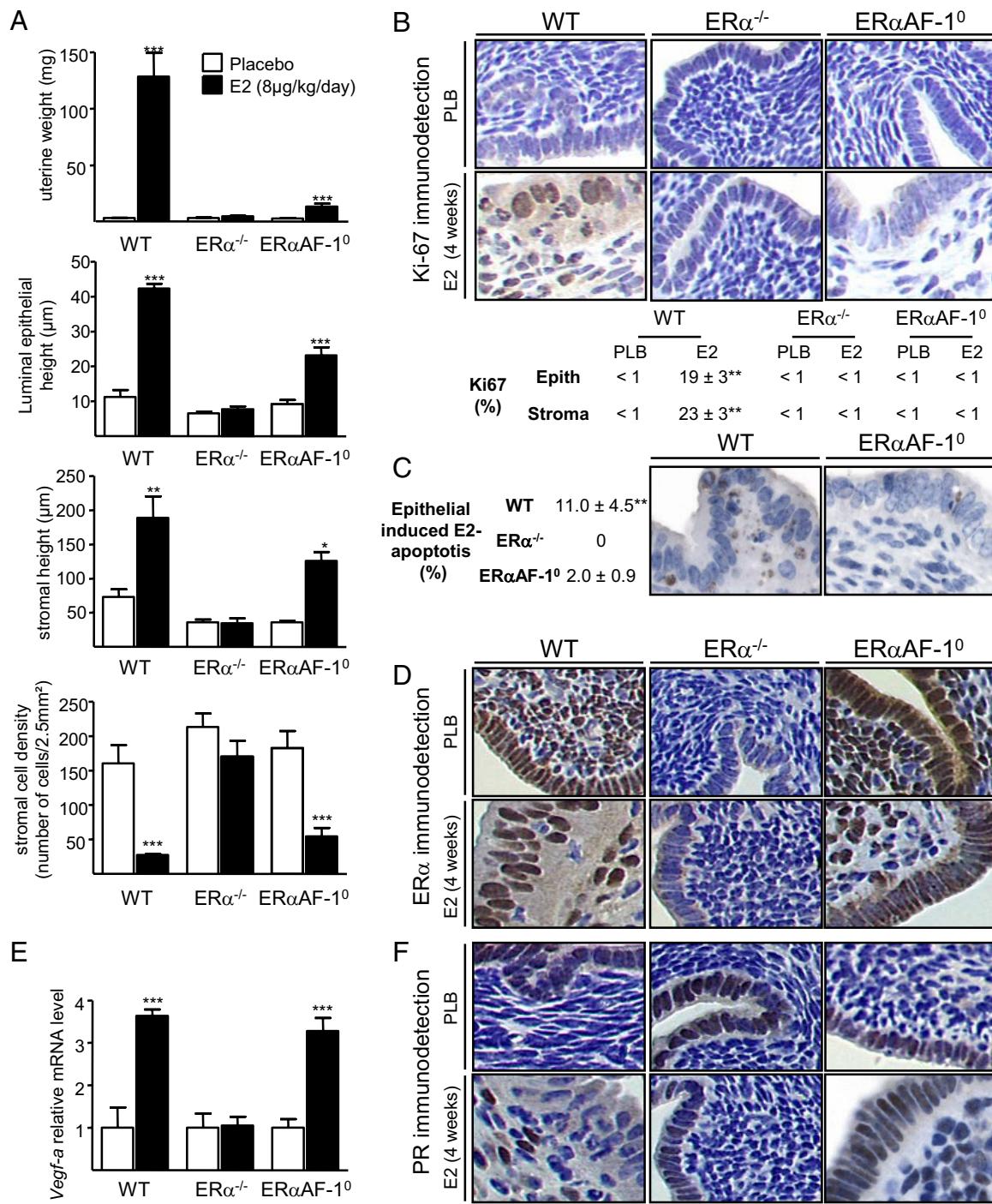


**Figure 3.** ER $\alpha$ AF-1 Is Required to Induce Uterine Epithelial Proliferation in Response to Acute E2 or Tamoxifen (TMX) Treatment in Vivo. Ovariectomized ER $\alpha$ AF-1 $^{+/+}$  and ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (7 wk of age) were injected sc with placebo (PLB, castor oil), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg), or TMX (4 mg/kg) and euthanized 24 hours later. A, ER $\alpha$  immunodetection in stromal and epithelial compartments from transverse uterus sections. B, Uterine weight, LEH, and stromal height (SH) were calculated. C, Ki-67 immunodetection in transverse uterus sections (scale bar, 50  $\mu$ m). D, Percentage of Ki-67-positive cells in luminal epithelial (Epith) and stroma were calculated. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*,  $P < .05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; n = 4 to 5 mice per group).

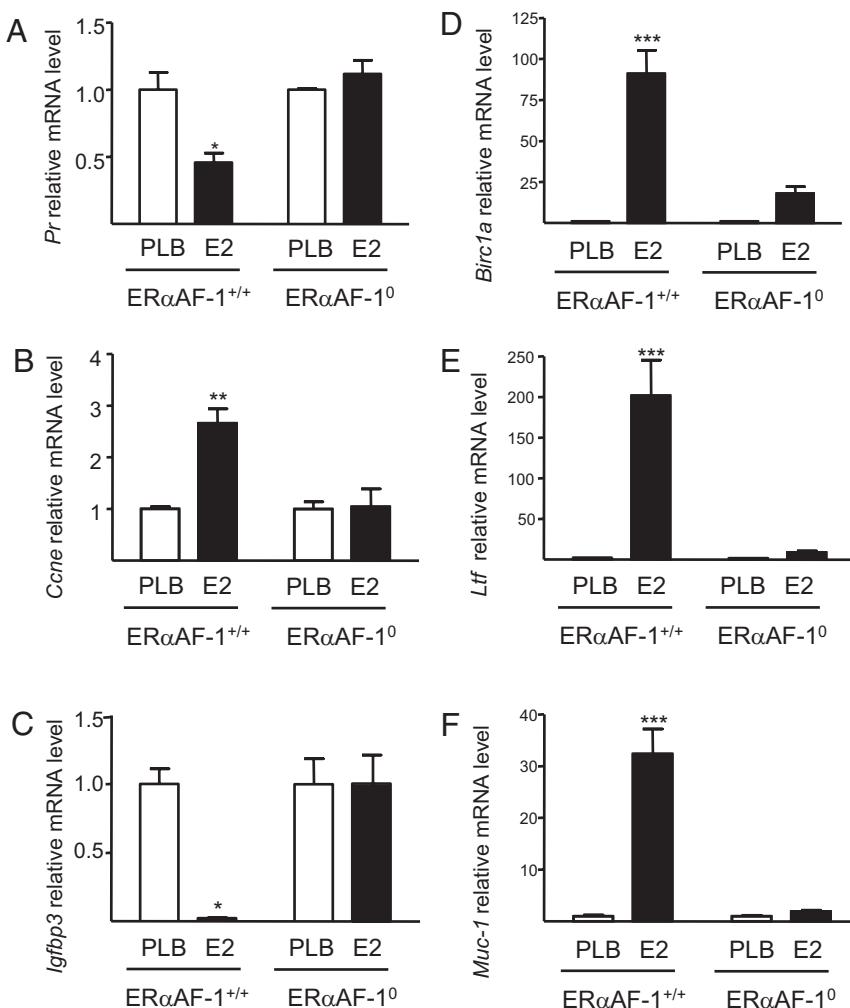
cuboidal, nonproliferating cells with a high nuclear-cytoplasmic ratio (Figure 4B). On the other hand, in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice, chronic E2 administration had a moderated, but

significant, effect on uterine weight, luminal epithelial height (LEH), stromal height, and stromal cell density (Figure 4A). The uterine stroma cell density of ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice was modest, but significantly reduced in response to chronic E2 treatment in comparison with wild-type mice, highlighting the persistent induction of stromal edema. Moreover, in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice, glandular epithelial cells showed mitotic activity, whereas no proliferation was observed in the luminal epithelium and in the stromal compartment. No apoptotic events were observed in the epithelium from all 3 genotypes in ovariectomized untreated mice. The increase in active caspase-3 in wild-type mice (~11%), which indicates a normal regulation between growth and apoptosis after E2-induced epithelial proliferation, was abrogated in ER $\alpha$  $^{-/-}$  mice and largely attenuated in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (~2%) (Figure 4C). Detection of ER $\alpha$  by immunohistochemistry showed same protein expression levels in epithelium and stroma of wild-type and mutant mice (Figure 4D). Whereas acute E2 treatment did not up-regulate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) A (*Vegf-a*) in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (Figure 2B), this gene became quite similarly regulated after chronic E2 treatment in wild-type and ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (Figure 4E), probably explaining the delayed decrease in uterine stroma cell density and revealing another impact on edema.

PR protein is expressed exclusively in the epithelium from ovariectomized untreated mice independent of the genotype, including ER $\alpha$  $^{-/-}$  mice (Figure 4F). In wild-type mice, E2 caused a redistribution in which the expression of epithelial PR was repressed whereas its expression in the stromal compartment was induced (34–36) (Figure 4F). In ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice, the PR labeling was still observed on the epithelium whereas a significant labeling



**Figure 4.** ER $\alpha$ AF-1 Is Necessary to Induce Uterine Endometrial Proliferation in Response to Chronic and Physiologic E2 treatment but Is Partially Dispensable for Water Imbibition. Ovariectomized wild-type (WT), ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice (7 wk of age) were given placebo (PLB) or 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg/d) for 4 weeks. A, Uterine weight, LEH, stromal height (SH), and stromal cell density (number of cells/2.5 mm $^2$ ) were calculated. B, Ki-67 immunodetection in transverse uterus sections. Percentage of Ki-67-positive cells in uterine stroma (stroma) and epithelium (epith). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*,  $P < .05$ ; \*\*,  $P < .01$ ; \*\*\*,  $P < .001$ ; n = 4 to 6 mice per group). C, Active caspase-3 immunodetection in epithelial compartment of wild-type and ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice. D, ER $\alpha$  immunodetection in stromal and epithelial compartment. E, mRNA levels of Vegf-a in wild-type littermates, ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice were measured by quantitative PCR and normalized to HPRT1 expression. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*\*\*,  $P < .001$ ). F, PR immunodetection in stromal and epithelial compartment.



**Figure 5.** ER $\alpha$ AF-1 Is Necessary for the Uterine Transcriptional Proliferative Response to E2 Chronic Exposure in Vivo but Is Dispensable for Water Imbibition. Ovariectomized ER $\alpha$ AF-1 $^{+/+}$  and ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (7 wk of age) were given placebo (PLB) or 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg/d) for 4 weeks. mRNA levels of *PR* (A), *CCNE* (B), *IGFBP3* (C), *BIRC1A* (D), *LTF* (E), *MUC1* (F) in wild-type littermates and in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice were measured by quantitative PCR and normalized to *HPRT1* expression. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*,  $P < .05$ ; \*\*,  $P < .01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; n = 4 to 6 mice per group).

appeared in the stroma as compared with ER $\alpha$  $^{-/-}$  mice. E2 thus caused a partial redistribution, PR being found in both epithelial and stromal compartments (Figure 4F), but *Pr* mRNA level was not regulated by E2 in whole uterus of deficient mice (Figure 5A). As expected from the absence of epithelial proliferation, the regulation of genes implicated in uterine proliferation, such as cyclin E (*Ccne*) (Figure 5B) and IGF-binding protein 3 (*Igfbp3*) (Figure 5C) (13), by chronic E2 treatment was abrogated in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice. Interestingly, the regulation of 3 other genes known to be regulated by epithelial ER $\alpha$  (37), baculoviral inhibitors of apoptosis repeat-containing 1 (*Birc1a*) (Figure 5D), lactotransferrin (*Ltf*) (Figure 5E), and mucin-1

(*Muc-1*) (Figure 5F), was abrogated by E2 in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice.

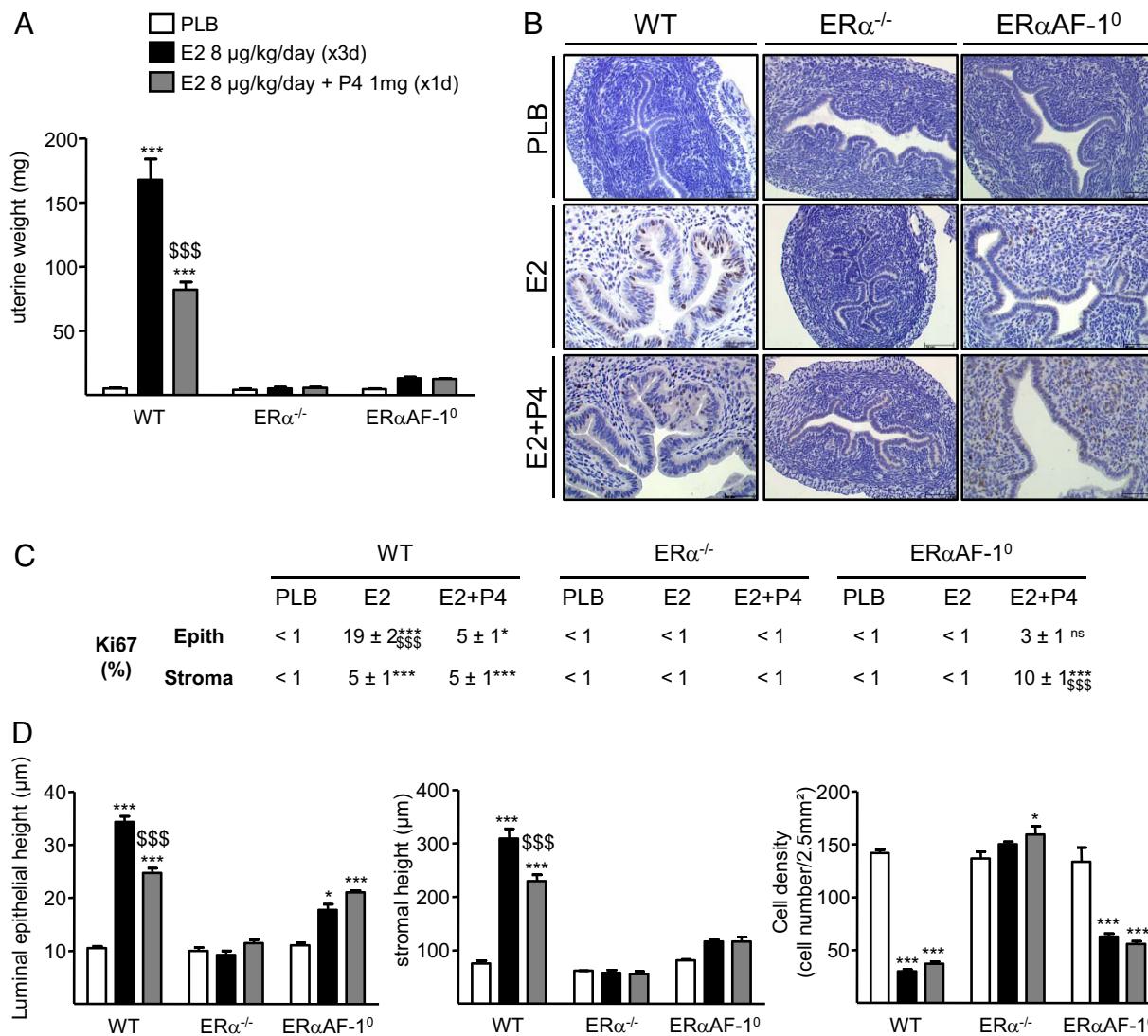
Taken together, these results demonstrate that ER $\alpha$ AF-1 is necessary for the proliferation of luminal epithelial cells in the uterus but partially dispensable for the induction of stromal edema.

#### P4 fails to inhibit the residual uterine E2 effect in the absence of ER $\alpha$ AF-1

The role of ER $\alpha$ AF-1 in the inhibition of E2-induced uterine proliferation by P4 in uterus was studied using ovariectomized mice injected sc with placebo, E2 alone (3 d), or E2 (3 d) together with P4. As expected, after 3 days of treatment, E2 uterine effects were attenuated by a single injection of P4 in wild-type mice (38) (Figure 6). The P4 inhibitory effect on uterine weight growth in response to E2 treatment was not observed in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (Figure 6A), and P4 injection had no significant effect on epithelial proliferation in E2-treated ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice (Figure 6, B and C). Moreover, we observed a significant increase in stromal proliferation under E2 and P4 cotreatment in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice compared with wild-type mice (Figure 6, B and C) but without impact on the stromal height (Figure 6D). Detection of ER $\alpha$  by immunohistochemistry showed similar protein expression level in epithelium and stroma of wild-type and mutant mice (Supplemental Figure 10).

#### Discussion

In this work using pharmacologic and genetic approaches, we confirmed that ER $\alpha$  and its AF-2 function are absolutely required for the uterine response to E2 stimulation and demonstrated, for the first time, the crucial role of AF-1 in uterine luminal epithelial proliferation. However, a moderate uterine hypertrophy was still observed in ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice after chronic administration of E2, essentially due to stromal edema in the absence of epithelial and stromal proliferation.



**Figure 6.** P4 Fails to Inhibit the Residual Uterine E2 Effect in the Absence of ER $\alpha$ AF-1. Ovariectomized wild-type (WT), ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> mice (7 wk of age) were given placebo (PLB), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg/d) for 3 days or 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8  $\mu$ g/kg/d) for 3 days followed by a single injection of P4 (1 mg). A, Uterine weight. B, Ki-67 immunodetection in transverse uterus sections (scale bar, 50  $\mu$ m). C, Percentage of Ki-67 positive cells in uterine stroma and epithelium (epith) were calculated. D, LEH, stromal height (SH), and stromal cell density (number of cells/2.5 mm $^2$ ) were calculated. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*,  $P < .05$  vs PLB, \*\*\*,  $P < .001$  vs PLB; \$\$\$,  $P < .001$  vs E2; n = 4 to 6 mice per group).

So far, the specific roles of ER $\alpha$ AF-1 and ER $\alpha$ AF-2 have been explored mainly in vitro in cultured overexpressed cell lines. These studies have shown that the relative involvement of ER $\alpha$ AF-1 and ER $\alpha$ AF-2 in ER $\alpha$  activity depends on the type and the differentiation stage of the cells and requires specific cofactors and posttranslational modifications (12, 39). ER $\alpha$ AF-1 and ER $\alpha$ AF-2 can synergize for the recruitment of different cofactors (40–43), and this functional synergism depends strongly on the promoter context (44). In addition, an interaction between the A and E domains has been identified (45), suggesting that “re-positioning” of helix 12 in response to E2 binding to the ligand pocket not only unmasks ER $\alpha$ AF-2 activation, but

also allows the activation of ER $\alpha$ AF-1 through the release of the A domain.

An important role of the nuclear, “genomic,” transcriptional action of ER $\alpha$  was previously demonstrated in vivo. Indeed, the EAAE mice, which harbor mutations in 4 amino acids crucial for ER $\alpha$  DNA binding activity are characterized by full abrogation of E2-dependent uterine gene expression and growth (46). Moreover, in the mouse model where 2-point mutations of leucine 543 and 544 to alanine (L543A, L544A) have been introduced in helix 12 (also named AF2ERKI mouse), Korach and coworkers (18) previously demonstrated that ER $\alpha$ AF-2 mutation results in an abrogation of the E2 action in the uterus. How-

ever, in this model, tamoxifen still induced endometrial proliferation and ER-mediated gene responses. In another model of ER $\alpha$ AF2 in which 7 amino acids, 543–549 in the helix 12, were deleted (33), we report here that the proliferative effect of both E2 and tamoxifen on the endometrial epithelium are abrogated. Thus, whereas 2-point mutations (L543A, L544A) in ER $\alpha$  allow to tamoxifen to act as an agonist, a more extensive alteration of helix 12 (deletion of 7 amino acids in the helix 12) abrogates the effect of tamoxifen. These discrepancies may be a consequence of an altered synergism between ER $\alpha$ AF-1 and ER $\alpha$ AF-2, at least on endometrial proliferation. On the other hand, E2 can also induce a rapid nongenomic response through the activation of a pool of ERs localized at the plasma membrane (47). However, the selective activation of this response using an estrogen-dendrimer conjugate has no effect on uterine growth (48), demonstrating that the “nongenomic”/membrane-initiated activation of ER $\alpha$  is not sufficient to elicit uterine growth or cell proliferation. Altogether, these findings demonstrate that endometrial proliferation induced by E2 is highly dependent on the ER $\alpha$  genomic actions and requires the recruitment of ER $\alpha$ AF-1. We demonstrate here that ER $\alpha$ AF-1 is required for the uterine transcriptional and proliferative responses to E2. Indeed, although the expression of 2 genes remained significantly regulated in early response to E2 in *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice, the magnitude of their induction or repression was strongly attenuated compared with wild-type littermates. Similarly, we show that ER $\alpha$ AF-1 is required for E2 induction of C3 (ERE)- and AP-1-dependent luciferase activity in a human endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa cells), suggesting a crucial role of ER $\alpha$ AF-1 in this cell type. We then provide the first evidence that ER $\alpha$ AF-1 is necessary for luminal epithelial cell proliferation in response to both acute and chronic E2 treatment *in vivo*. Tamoxifen, known as a selective activator of AF-1, further emphasizes the crucial role of AF-1 because the specific induced endometrial proliferation by tamoxifen is lost in *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice.

It was previously demonstrated that activation of ER $\alpha$  in the uterine stromal cells elicits the release of paracrine factors that are required to induce epithelial cells proliferation (49). However, ER $\alpha$  of the uterine epithelial cells is dispensable for their proliferative response (37). Similarly, tissue recombination studies (50) and genetic approach with epithelial ER $\alpha$ -deficient mice (37) indicated that down-regulation of epithelial PR by E2 requires stromal, but not epithelial, ER $\alpha$ . Here, we report that the complete redistribution of PR expression from epithelium to stroma under E2 treatment is lost in *ER $\alpha$* <sup>−/−</sup> mice, but partially preserved in the *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice. Whereas epithelial proliferation is completely abrogated in *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup>

mice, these data suggest that stromal ER $\alpha$ AF-1 activation could play a crucial role for endometrial epithelial proliferation and a significant role in PR redistribution. During the female reproductive cycle, a balance between proliferation and subsequent elimination of proliferative cells by apoptosis is regulated, in particular, by E2. In wild-type mice, an increase in active caspase-3 is a key actor of this balance. Epithelial ER $\alpha$  contributes to prevent uterine epithelial apoptosis after E2 stimulation and, at its targeted deletion, doubles the level of apoptosis without directly altering the proliferative response (37). Here, we report that the level of epithelial apoptosis is strongly attenuated in *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice compared with wild-type controls, and the precise role of ER $\alpha$ AF-1 in the proliferation-apoptosis balance should be delineated in future studies.

In contrast to the crucial role in endometrial proliferation, we found that ER $\alpha$ AF-1 was partially dispensable to the E2 effect on the uterine vascular permeability. Indeed, E2 was still able to increase uterine weight in *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice, a response essentially due to an interstitial tissue infiltration. The persistence of the normal regulation of some E2-dependent gene at 4 weeks, in particular *Vegf-a* known vascular permeability factor, probably plays a significant role in this residual vascular action. Importantly, this dissociation between endometrial proliferation and uterine weight highlights the limitation of this later parameter as a marker of the pathophysiologic impact of E2 on the uterus.

We and others previously showed that the beneficial effects of estrogens on cortical bone (51) and atheroma (19, 33) are ER $\alpha$ AF-1 independent and ER $\alpha$ AF-2 dependent. We provide evidence here that ER $\alpha$ AF-1 plays a crucial role in uterine cell proliferation and could thereby contribute to the physiopathology of endometrial cancer, in line with the harmful action of tamoxifen on this target. Finally, we confirm here that full ER $\alpha$ AF-1 activity is required for E2-dependent proliferation of cultured MCF-7 breast cancer cells (52–54).

Prevention of breast cancer, type 2 diabetes, osteoporosis, and cardiovascular diseases by novel selective ER modulators (SERMs) represents the major challenge for the future treatment of menopause (55). We hypothesize that a SERM that preferentially stimulates ER $\alpha$ AF-2 and has a minimal effect on ER $\alpha$ AF-1 would retain many of the E2-protective responses, but would not elicit uterine and breast cell proliferation. This SERM would not require the addition of a progestin to prevent uterine proliferation, thereby offering an optimized therapeutic profile for menopausal women. Alternatively, strategies aiming at blocking ER $\alpha$ AF-1 in the presence of E2 would confer a similar benefit, as already reported for inhibitors of the androgen receptor AF-1 (56).

## Acknowledgments

We thank Professor P. Chambon and Dr. A. Krust (Strasbourg, France) for kindly providing the ER $\alpha^{+/-}$ , ER $\alpha$ AF-1 $^{+/-}$ , and ER $\alpha$ AF-2 $^{+/-}$  mice. We thank the staff of the animal facility (J.-C. Albouys and M.J. Fouque), F. Boudou, and C. Bleuart for skillful technical assistance. We also thank J.J. Maoret and F. Martins for their excellent technical assistance and contribution to quantitative RT-PCR experiments carried out at GeT-TQ Genopole Toulouse Facility.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean François Arnal, INSERM U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. E-mail: Jean-François.Arnal@inserm.fr.

The work at the INSERM unit U1048 is supported by INSERM, Université de Toulouse III, and Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil, Agence Nationale de la Recherche, Fondation de France, Conseil Régional Midi-Pyrénées and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). A.A. was supported by a grant from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire.

**Disclosure Summary:** We declare no conflict of interest.

## References

- Das RM. The effects of oestrogen on the cell cycle in epithelial and connective tissues of the mouse uterus. *J Endocrinol*. 1972;55:21–30.
- Rockwell LC, Pillai S, Olson CE, Koos RD. Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol Reprod*. 2002;67:1804–1810.
- Large MJ, DeMayo FJ. The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;358:155–165.
- 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.
- Lenfant F, Trémolières F, Gourdy P, Arnal JF. Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: why protective early, and not when delayed? *Maturitas*. 2011;68:165–173.
- 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.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:1701–1712.
- Tora L, White J, Brou C, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989;59:477–487.
- Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 2006;7:497–508.
- McKenna NJ, O'Malley BW. Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann NY Acad Sci*. 2001;949:3–5.
- Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev*. 2004;25:45–71.
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*. 2003;115:751–763.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, et al. Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol*. 2003;17:2070–2083.
- Katzenellenbogen BS, Bhakoo HS, Ferguson ER, et al. Estrogen and antiestrogen action in reproductive tissues and tumors. *Recent Prog Horm Res*. 1979;35:259–300.
- Griffith JS, Jensen SM, Lunceford JK, et al. Evidence for the genetic control of estradiol-regulated responses. Implications for variation in normal and pathological hormone-dependent phenotypes. *Am J Pathol*. 1997;150:2223–2230.
- Hewitt SC, Kissling GE, Fieselman KE, Jayes FL, Gerrish KE, Korach KS. Biological and biochemical consequences of global deletion of exon 3 from the ER  $\alpha$  gene. *FASEB J*. 2010;24:4660–4667.
- Sinkevicius KW, Burdette JE, Woloszyn K, et al. An estrogen receptor- $\alpha$  knock-in mutation provides evidence of ligand-independent signaling and allows modulation of ligand-induced pathways in vivo. *Endocrinology*. 2008;149:2970–2979.
- Arao Y, Hamilton KJ, Ray MK, Scott G, Mishina Y, Korach KS. Estrogen receptor  $\alpha$  AF-2 mutation results in antagonist reversal and reveals tissue selective function of estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:14986–14991.
- Billon-Gales A, Fontaine C, Filipe C, et al. The transactivating function 1 of estrogen receptor  $\alpha$  is dispensable for the vasculoprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:2053–2058.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. *Development*. 2000;127:4277–4291.
- Spurgeon SL, Jones RC, Ramakrishnan R. High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PloS one*. 2008;3:e1662.
- Laurell H, Iacovoni JS, Abot A, et al. Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:e51.
- Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *J Mol Endocrinol*. 2003;30:347–358.
- Moggs JG, Tinwell H, Spurway T, et al. Phenotypic anchoring of gene expression changes during estrogen-induced uterine growth. *Environ Health Perspect*. 2004;112:1589–1606.
- Suzuki A, Urushitani H, Watanabe H, Sato T, Iguchi T, Kobayashi T, Ohta Y. Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland. *J Vet Med Sci*. 2007;69:725–731.
- Waters KM, Safe S, Gaido KW. Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR in reproductive tissues of female mice. *Toxicol Sci*. 2001;63:47–56.
- Ivanga M, Labrie Y, Calvo E, et al. Temporal analysis of E2 transcriptional induction of PTP and MKP and downregulation of IGF-I pathway key components in the mouse uterus. *Physiol Genomics*. 2007;29:13–23.
- McDonnell DP. The molecular pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol Metab*. 1999;10:301–311.
- Heldring N, Nilsson M, Buehrer B, Treuter E, Gustafsson JA. Identification of tamoxifen-induced coregulator interaction surfaces within the ligand-binding domain of estrogen receptors. *Mol Cell Biol*. 2004;24:3445–3459.
- Zhang H, McElrath T, Tong W, Pollard JW. The molecular basis of tamoxifen induction of mouse uterine epithelial cell proliferation. *J Endocrinol*. 2005;184:129–140.

31. Fong CJ, Burgoon LD, Williams KJ, Forgacs AL, Zacharewski TR. Comparative temporal and dose-dependent morphological and transcriptional uterine effects elicited by tamoxifen and ethynodiol in immature, ovariectomized mice. *BMC Genomics*. 2007;8:151.
32. Kazi AA, Koos RD. Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology*. 2007;148:2363–2374.
33. Billon-Galés A, Krust A, Fontaine C, et al. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor- $\alpha$  is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:13311–13316.
34. Curtis Hewitt S, Goulding EH, Eddy EM, Korach KS. Studies using the estrogen receptor  $\alpha$  knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod*. 2002;67:1268–1277.
35. Kurita T, Lee KJ, Cooke PS, Lydon JP, Cunha GR. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol Reprod*. 2000;62:831–838.
36. Tibbets TA, Mendoza-Meneses M, O’Malley BW, Conneely OM. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod*. 1998;59:1143–1152.
37. Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS. Uterine epithelial estrogen receptor  $\alpha$  is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:19272–19277.
38. Martin L, Das RM, Finn CA. The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse. *J Endocrinol*. 1973; 57:549–554.
39. Mérot Y, Métivier R, Penot G, et al. The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor  $\alpha$  transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem*. 2004;279:26184–26191.
40. Onate SA, Boonyaratnakornkit V, Spencer TE, et al. The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem*. 1998;273:12101–12108.
41. Benecke A, Champon P, Gronemeyer H. Synergy between estrogen receptor  $\alpha$  activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep*. 2000;1:151–157.
42. Kobayashi Y, Kitamoto T, Masuhiro Y, et al. p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem*. 2000;275:15645–15651.
43. Métivier R, Penot G, Flouriot G, Pakdel F. Synergism between ER $\alpha$  transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1  $\alpha$ -helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1953–1970.
44. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*. 1994;8:21–30.
45. Métivier R, Stark A, Flouriot G, et al. A dynamic structural model for estrogen receptor- $\alpha$  activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell*. 2002; 10:1019–1032.
46. Ahlborg-Dieker DL, Stride BD, Leder G, et al. DNA binding by estrogen receptor- $\alpha$  is essential for the transcriptional response to estrogen in the liver and the uterus. *Mol Endocrinol*. 2009;23:1544–1555.
47. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005;19:1951–1959.
48. Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, et al. Non-nuclear estrogen receptor  $\alpha$  signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:2319–2330.
49. Cooke PS, Buchanan DL, Young P, et al. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:6535–6540.
50. Kurita T, Lee KJ, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod*. 2000;62:821–830.
51. Börjesson AE, Windahl SH, Lagerquist MK, et al. Roles of transactivating functions 1 and 2 of estrogen receptor- $\alpha$  in bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:6288–6293.
52. Fujita T, Kobayashi Y, Wada O, et al. Full activation of estrogen receptor  $\alpha$  activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2003;278:26704–26714.
53. Flouriot G, Brand H, Denger S, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor- $\alpha$  (hER- $\alpha$ ) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- $\alpha$  activation function 1. *EMBO J*. 2000;19:4688–4700.
54. Penot G, Le Péron C, Mérot Y, et al. The human estrogen receptor- $\alpha$  isoform hER $\alpha$ 46 antagonizes the proliferative influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146:5474–5484.
55. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Biomedicine. Defining the “S” in SERMs. *Science*. 2002;295:2380–2381.
56. Sadar MD. Small molecule inhibitors targeting the “achilles’ heel” of androgen receptor activity. *Cancer Res*. 2011;71:1208–1213.

**Supplemental Figure 1A:** List of the genes of interest (GOI) extracted from previously published studies. References and experimental conditions are listed.

**Supplemental Figure 1B:** List of primers used in expression profiling of the genes of interest (GOI).

**Supplemental Figure 2:** Seven-week-old ovariectomized C57Bl/6J, *ERα<sup>+/+</sup>* and *ERα<sup>-/-</sup>* mice were subcutaneously injected with placebo (PLB, castor oil), 17β-estradiol (E2, 8μg/kg) or the ERα agonist 16α-LE2 (28.8 μg/kg) and were euthanized (**A**) 6 hours or (**B-C**) 24 hours after treatment. (**A**) Data obtained from 96.96 Dynamic Arrays were used to generate a cluster diagram of the significant gene expression changes. Each horizontal line represents a single gene. Each vertical line represents an individual sample. Genes that were up-regulated at least 2-fold following E2 administration relative to placebo are in red, whereas down-regulated genes are in green. The color intensity indicates the degree of variation in expression. (**B**) Ki-67 detection in transverse uterus sections (scale bar = 100μm). (**C**) Uterine weight, luminal epithelial height (LEH) and percentage of Ki-67 positive epithelial cells. Results are expressed as mean +/- SEM. To test the respective roles of each treatment, a 1-way ANOVA was performed and a Bonferroni's multiple comparison test (E2 or ERα agonist, 16α-LE2, *versus* placebo: \*\*= p-value <0.01 and \*\*\*= p value <0.001; n = 4 mice/group).

**Supplemental Figure 3: Fold changes in genes expression in WT and *ERα<sup>-/-</sup>* mice**

(**A**) Analysis of regulated gene expression by qPCR and (**B-C**) number of genes up-regulated (>2) or down-regulated (<0.5) that are at least 2-fold in the uterus from seven-week-old ovariectomized C57Bl/6J, *ERα<sup>+/+</sup>* and *ERα<sup>-/-</sup>* mice 6 hours after a subcutaneous injection with 17β-estradiol (E2, 8μg/kg) or the ERα agonist 16α-LE2 (28.8 μg/kg). Data are mean values +/- SEM.

**Supplemental Figure 4:** Seven-week-old ovariectomized C57Bl/6J mice were subcutaneously injected with placebo (PLB, castor oil), 17β-estradiol (E2, 8μg/kg) or tamoxifen (TMX, 4mg/kg) and were euthanized at different time points (2h, 6h, 12h and 24h) labelled 1 to 40. mRNA level of the E2-regulated genes were measured by quantitative PCR and normalized to *HPRT1*. Results are expressed as mean +/- SEM. To test the respective roles of each treatment, a 1-way ANOVA was performed and

a Bonferroni's multiple comparison test (\* = E2 *versus* placebo, § = TMX *versus* placebo, § = E2 *versus* TMX: \*= p-value <0.05, \*\*= p-value <0.01 and \*\*\*= p value <0.001; n = 4 mice/group).

**Supplemental Figure 5: Fold changes in gene expression in *ERαAF-1<sup>+/+</sup>*and*ERαAF-1<sup>0</sup>* mice.**

Analysis of regulated gene expression by qPCR up-regulated (>2) or down-regulated (<0.5) at least 2-fold in the uterus from seven-week/old ovariectomized *ERαAF-1<sup>+/+</sup>*or *ERαAF-1<sup>0</sup>* mice 6 hours after a subcutaneous injection with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8 $\mu$ g/kg) or tamoxifen (TMX, 4mg/kg). Data are mean values +/- SEM.

**Supplemental Figure 6:** Human endometrial adenocarcinoma Ishikawa cells were transiently co-transfected with the **(A)** C3(ERE)-LUC or **(B)** (AP1)TK-LUC reporter construct and pCR-ER $\alpha$ , pCR-ER $\alpha$ AF-1 $^0$  or empty pCR vector. Transfected cells were incubated with 10 nM E2 or vehicle (control) for 24h. Normalized luciferase activities were expressed as fold increase above the values measured in cells transfected with empty pCRvector and incubated with vehicle. Data correspond to the mean values +/- SEM of at least three separate transfection experiments.

**Supplemental Figure 7: Fold changes in gene expression in *ERαAF-1<sup>+/+</sup>*and*ERαAF-1<sup>0</sup>* mice.**

Analysis of regulated gene expression by qPCR that are at least 2-fold up-regulated (>2) or down-regulated (<0.5) in the uterus of seven-week/old ovariectomized *ERαAF-1<sup>+/+</sup>*or *ERαAF-1<sup>0</sup>* mice that were subcutaneously injected with 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8 $\mu$ g/kg) or tamoxifen (TMX, 4mg/kg) and euthanized 24 hours later. Data are mean values +/- SEM.

**Supplemental Figure 8:** Seven-week-old ovariectomized *ERαAF-2<sup>+/+</sup>* and *ERαAF-2<sup>0</sup>* mice were subcutaneously injected with placebo (PLB, castor oil), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8 $\mu$ g/kg) or tamoxifen (TMX, 4mg/kg) and euthanized 24 hours later. **(A)** Ki-67 immunodetection in transverse uterus sections (scale bar = 50 $\mu$ m). **(B)** Uterine weight, luminal epithelial height (LEH) and percentage of Ki-67 positive cells in luminal epithelial were calculated. Results are expressed as mean +/- SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. As an interaction

was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*\*\*= p value <0.001, n = 4 to 5 mice/group).

**Supplemental Figure 9:** MCF7 cells were transfected with an inducible ER $\alpha$ AF1 $^0$  construct (Tet-On plasmid) in which ER $\alpha$ AF-1 can be specifically deleted from full length ER $\alpha$  upon incubation with tetracycline (tet). **(A)** Expression of the full length and truncated ER $\alpha$ isoform (ER $\alpha$ AF1 $^0$ ) analyzed by western blotting. **(B)** The proliferative effect of E2 was analyzed by counting cells after five days of stimulation with 10 nM E2.

**Supplemental Figure 10:** ER $\alpha$  immunodetection in stromal and epithelial compartments from transverse uterus sections of ovariectomized wild type (WT), ER $\alpha$  $^{-/-}$  and ER $\alpha$ AF-1 $^0$  mice treated by placebo (PLB), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8 $\mu$ g/kg/day) for 3 days or 17 $\beta$ -estradiol (E2, 8 $\mu$ g/kg/day) for 3 days and a single injection of progesterone (P4, 1mg).

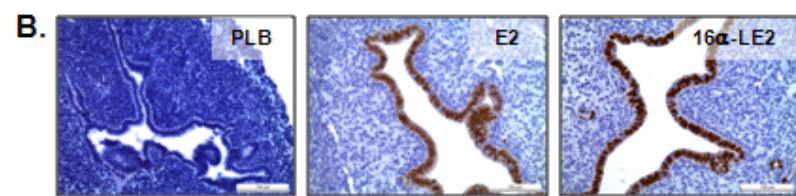
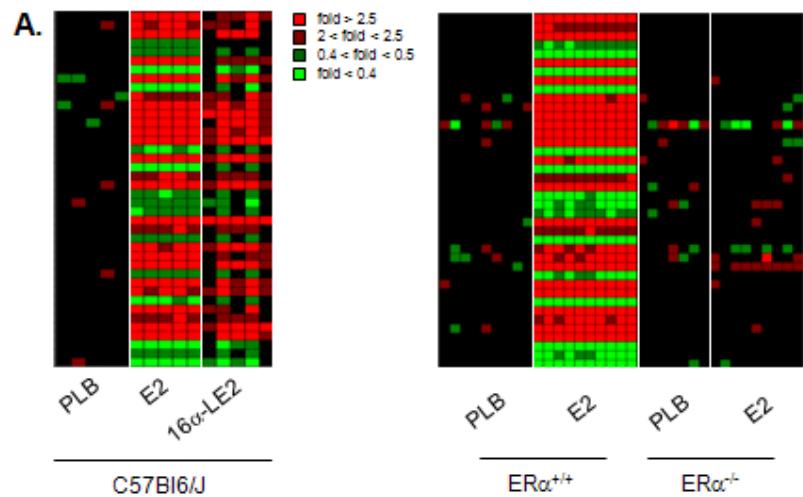
GOI	gene name
1	aars
2	akt1
3	aldh1a2
4	ar
5	bcl2
6	cars
7	ccng2
8	cepb
9	ctsf
10	cxcr7
11	errf1
12	fam65b
13	fos
14	gadd45a
15	gadd45g
16	gpr30
17	hbegf
18	hdac5
19	hspa5
20	igf1
21	igf1r
22	igfbp3
23	igfbp6
24	inhbb
25	ipo5
26	lepr
27	ler2
28	lcn2
29	mad2l1
30	mapk3
31	p21
32	pgr
33	pik3r2
34	psat1
35	ptp1b
36	ramp3
37	rasd1
38	sox4
39	tnxb
40	txnip

references	E2 (Dose µg/kg)	Timing	known ERα dependance
Watanabe et al. Journal of mol endoc 2003	5	between 4h and 6h	yes
Moggs et al. toxicogenomics 2004	400	between 1h and 24h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Waters et al. toxicological sciences 2001	50	3*3 days	no
Ivanga et al. physiolgenomics 2007	2.5	between 3h and 24h	no
Watanabe et al. Journal of mol endoc 2003	5	between 2h and 6h	yes
Watanabe et al. Journal of mol endoc 2004	5	between 2h and 6h	yes
Moggs et al. toxicogenomics 2004	400	between 1h and 24h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Kim TH et al. biology of reproduction 2010	5	between 4h and 40h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 30min and 2h	yes
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Watanabe et al. Journal of mol endoc 2003	5	between 2h and 6h	yes
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 8h and 24h	yes
Ivanga et al. physiolgenomics 2007	2.5	between 1h and 24h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 12h and 24h	yes
Ivanga et al. physiolgenomics 2007	2.5	between 3h and 24h	no
Hewitt S et al endocrinology 2006	50	3*3 days	yes
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Watanabe et al. Journal of mol endoc 2004	5	between 1h and 6h	yes
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Moggs et al. toxicogenomics 2004	400	between 4h and 72h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 2h and 24h	yes
Ivanga et al. physiolgenomics 2007	2.5	3h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 30min and 12h	yes
Waters et al. toxicological sciences 2001	50	3*3 days	no
Ivanga et al. physiolgenomics 2007	2.5	between 1h and 24h	no
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Ivanga et al. physiolgenomics 2007	2.5	3h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 30min and 24h	yes
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 2h and 24h	yes
Suzuki et al. J Vet Med Sci. 2007	5	6h	no
Hewitt S et al mol endoc 2003	50	between 2h and 24h	yes

**Supplemental Figure 1A**

GOI	ID	Primer forward	Primer reverse
aars	NM_146217.3	TGGATGACCGTGTGGGCCT	CACAAAAGCCCTGCCTGGC
akt1	NM_009652.3	AGTCGGGACCAGGGAGC	GCGGTGCCGCCACAGGA
aldh1a2	NM_009022.4	CGCATTGGGGAGCCCTT	CTTGGCCGCCCTCAGCCACAC
ar	NM_013476	TTGCATGGGTGGCGTCC	TCCGAGACTTGTGATCGGT
bcl2	NM_009741.3	TGAACCGGCATCTGCACACCT	AAACAGAGGTCGCATGCTGG
birc1a	NM_008670.2	CAAACCTTCCGTGCATGGT	GCTCTGCTTCTCCCTCAGGT
cars	NM_013742.4	GGCTCTCACGTGGCTGG	CCACTGAGGCTGCACTCGCC
cncg2	NM_007635.4	TGGCACGTAAACTTCGCTCTGGCT	AGCAGCAGACCCAATGCAG
cepbp	NM_009883.3	CAAACCTGGCTGAGGGGTG	TACTCAGGGGCCGGCTGACA
ctsf	NM_019861.1	TGCCCCGCCGTAAATGGACT	CTGGCCCTCCACGTTGCCCTG
cxcr7	NM_007722.3	ACCACAGCCCAGGAAGCCCT	CCATGGCTTGGAGAGAGCGACC
errf1	NM_13753.1	GGACGGACATGGCCGGAG	TGCCCCACTCTGGGATGCCT
esr1	NM_007956.4	TGATGCCAGGAGAGGGCAATGC	TGTCGCCAGAGACTGCCTTCTT
esr2	NM_207707.1	GCCAGCCCTGTTACTAGTCCAA	CAGACGGCGCAGAAGTGA
fam65b	NM_029679.1	AGGAGGCGCAGACTCCGTG	ACCCCTGGCTTCCGGGTGAA
fos	NM_010234.2	AAGGGGCCAAGTAGACGAGCTA	GATCTGTCTCCCTGGAGTGT
gadd45a	NM_007836.1	CGCACCATTCAGCTGGCGT	CAGCACCCAGCAGGCAAGT
gadd45g	NM_0011817.2	AGTCCTGAATGTGGACCCGTACA	GCAGAACGCCGTAAATCAACGTG
gpr30	NM_029771.3	GCTGCTGGAAATTGGCCAAGC	GCACACCTGCTGCCCTCTCA
hbgef	NM_010415.2	CCCAAGGGAGGTGATCGTC	GTGGCCAGGCCCTGTGGCTT
hdac5	NM_001077696.1	GGCATGTCAGGCCGGGAACC	CCATGGAGCTGGGCATGGCT
hprt1	NM_013556	GCTTCTCTCAGACCCCTT	ATCGCTAATCACGACGCTGG
hspa5	NM_001163434.1	TGCGTGTGTGTGAGACCAAGAAC	ATCATGCCGGCCTGAGGAC
igf1	NM_00111276.1	GCTCTTCAGTTCTGTGTGGAC	AGCCTGTGGCTTGTGAAGTA
igf1r	NM_010513.2	TATCACAGCTGCAACACAGAG	CATCTGCTCTCTGCTGGCAT
igfbp2	NM_008342.2	CGCGGGTACCTGTGAAAAAGAGA	TGGTCGTCTACTGTCGCAA
igfbp3	NM_008343.2	TGTTGGACAAGTATGGCAGC	TGAGCTCCATATTATGTGGCACGG
igfbp6	NM_008344.3	AAAGCAGCAGTGTCTTCCTCG	ATCTGGAGACACTGGCAAAGGC
inhbb	NM_008381.3	TTTGCAGAGACAGATGGCTCG	GCTGCAACCACGAAAGGTTCT
ipo5	NM_023579	CCTCCTTCTCTCTCACGCCCTAGC	AGCAGGTTCCCAGGAGCAGGTA
lepr	NM_146146.2	ATTCCTCGGCCCTT	ACAGCTGCTGCTCAGGGAT
ler2	NM_010499.4	TGCTGGTGCAGCTGTGTT	TTGCCCTGGGTGTGGTTTC
lcn2	NM_008491	CTACAAACCTTCGCATGGTA	TCCCTGGTTCTCCATACAGGG
ltf	NM_008522.3	ACCGAGGCCCTGAAGCAGTG	AGCGCAGGCTTCCAGGAGTGT
mad2l1	NM_019499.4	GAGAGCAGGGAGGACAGCTT	CCTCGTTTCAGGCCACCAAA
mapk3	NM_011952	TCAGAGGCCACCTGGAA	TGAGGCCCCGGAGGATCTG
muc1	NM_013605.1	ACCCAGCTCCAACTAACCA	CACGGAGCCTGACTGAACCTG
p21	NM_007669.4	CAGCGCAGATCCACAGCGA	GCACACTTGTCTCTGTGGGA
pgr	NM_008829.2	GGGGTGCTCAAGGACAGCCT	ACTGTGGGCTCTGGCTGGCT
pik3r2	NM_008841.2	TGACTCAGGCCACATACTCCCA	AGCTGTGCTGCTCAATGGCTT
psat1	NM_177420.1	GGGCCGAGCCATGGAGAAG	TCTGGCCCTCCACTGGCAT
ptgs2	NM_011198.3	ACCTCTGCGATGCTCTCCGA	CAGCAAGGATTGTGCTGCC
ptp1b	NM_011201	GACATTGACATGAAGCCAGCG	CGACTGTGTCAAAAGGGCTGA
ramp3	NM_019511	GTTGCTGCTTGTTGTGAGTGT	AGACAGCCACCTCTGCATCAT
rasd1	NM_009026.4	ACGACCCCTCAGCGTTGCC	TGGCCATGGCAAAGAGCGCA
sox4	NM_009238.2	TGGCCACCCCAGCAAAACAC	CGAAGCCCCAGCTTCCAA
tnxb	NM_031176	CGAGCTCCCGTCTGTGGA	GCTGAGGCGAGAGCTGGCAC
txnip	NM_001009935.2	AGAGCAGCCTACAGCAGGTGAGA	CCTTGAGGAAGCTGAAGCCGA
vegfa	NM_001110267.1	GGCCTCGAAACCATGAA	GTGGAGGTACAGCAGTAAGCCA
vegfb	NM_001185164.1	GAGCTCAACCCAGACACCTGTA	GTGGAGGTCTGAAAGCAGCTG
vegfc	NM_009506.2	GACGTTCTCTGCCAGAACATT	TCCATTGGTTGAGTCATCTCAACA

**Supplemental Figure 1B**



**C.**

	PLB	E2	16 $\alpha$ -LE2
Uterine weight (mg)	5.7 ± 0.7	24.0 ± 1.2***	16.3 ± 1.7**
LEH ( $\mu$ m)	6.9 ± 1.0	18.7 ± 1.4***	19.5 ± 0.7***
Ki67 (%)	< 1	87 ± 2***	93 ± 1***

## Supplemental Figure 2

**A.**

GOI	C57Bl6J		$\text{ER}\alpha^{+/+}$		GOI	C57Bl6J		$\text{ER}\alpha^{+/+}$	
	E2	16 $\alpha$ -LE2	E2	E2		E2	16 $\alpha$ -LE2	E2	E2
aars	7.90 ± 0.78	12.41 ± 0.75	10.61 ± 0.33	1.02 ± 0.04	igf1r	0.38 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.31 ± 0.01	1.09 ± 0.03
akt1	2.51 ± 0.30	2.53 ± 0.20	2.59 ± 0.16	1.14 ± 0.05	igfbp3	0.43 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.27 ± 0.02	1.26 ± 0.14
aldh1a2	11.16 ± 0.91	11.97 ± 0.95	10.96 ± 0.57	1.06 ± 0.04	igfbp6	0.45 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.01	1.01 ± 0.05
ar	0.49 ± 0.03	0.39 ± 0.02	0.38 ± 0.02	1.07 ± 0.05	inhbb	14.34 ± 1.09	10.77 ± 0.83	21.51 ± 1.57	1.18 ± 0.07
bcl2	0.43 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	1.06 ± 0.03	ipos5	2.22 ± 0.21	2.35 ± 0.13	2.46 ± 0.06	1.01 ± 0.03
cars	3.70 ± 0.30	4.69 ± 0.40	4.67 ± 0.19	1.10 ± 0.03	lepr	0.41 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.99 ± 0.06
ccng2	0.22 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.99 ± 0.03	ler2	4.58 ± 0.83	1.15 ± 0.05	3.14 ± 0.18	0.78 ± 0.09
cepbp	7.66 ± 0.29	3.38 ± 0.26	6.49 ± 0.30	1.22 ± 0.06	lnc2	3.44 ± 0.40	7.14 ± 0.92	4.26 ± 0.46	1.37 ± 0.22
ctsf	0.26 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.99 ± 0.04	mad2l1	31.50 ± 2.01	8.19 ± 0.42	26.93 ± 1.45	1.52 ± 0.06
cxcr7	2.42 ± 0.28	2.48 ± 0.20	3.41 ± 0.23	0.96 ± 0.06	mapk3	0.41 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.33 ± 0.01	1.11 ± 0.03
errfi1	7.66 ± 1.03	4.37 ± 0.32	6.95 ± 0.78	0.90 ± 0.04	p21	12.00 ± 1.47	10.26 ± 0.71	14.14 ± 0.67	1.29 ± 0.10
fam65b	13.33 ± 0.52	13.76 ± 0.62	18.35 ± 0.95	1.17 ± 0.05	pgr	3.14 ± 0.12	3.42 ± 0.28	4.44 ± 0.13	0.97 ± 0.05
fos	10.27 ± 1.78	1.54 ± 0.09	4.91 ± 0.61	0.55 ± 0.14	pik3r2	0.33 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	1.02 ± 0.01
gadd45a	5.16 ± 0.41	4.09 ± 0.22	7.58 ± 0.32	1.06 ± 0.05	psat1	6.20 ± 0.35	9.47 ± 0.70	6.81 ± 0.38	1.15 ± 0.05
gadd45g	25.84 ± 1.59	7.60 ± 0.51	21.64 ± 0.74	0.89 ± 0.05	ptp1b	2.61 ± 0.15	2.66 ± 0.14	2.81 ± 0.08	1.20 ± 0.02
gpr30	0.33 ± 0.04	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1.07 ± 0.05	ramp3	24.29 ± 1.40	30.83 ± 2.07	30.55 ± 2.63	1.05 ± 0.06
hbegf	5.32 ± 0.67	2.05 ± 0.14	4.20 ± 0.34	1.11 ± 0.08	rasd1	7.39 ± 0.57	4.02 ± 0.21	7.55 ± 0.35	1.01 ± 0.05
hdac5	0.27 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.01	1.02 ± 0.04	sox4	0.25 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.97 ± 0.06
hspa5	2.68 ± 0.28	3.14 ± 0.26	2.47 ± 0.09	1.10 ± 0.05	tnxb	0.46 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.95 ± 0.04
igf1	4.46 ± 0.26	5.03 ± 0.30	4.85 ± 0.24	1.04 ± 0.05	txnip	0.19 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.01 ± 0.08

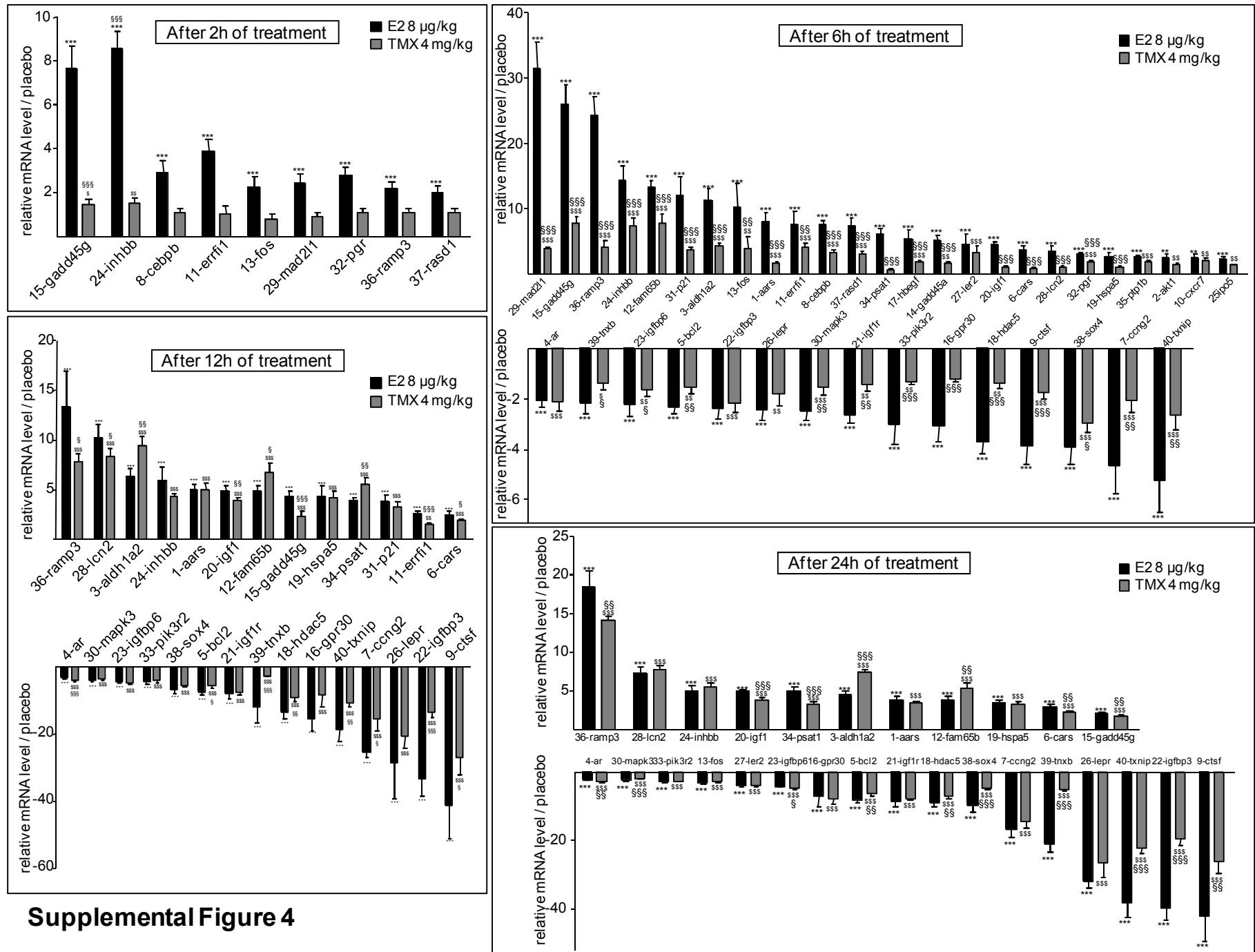
**B.**

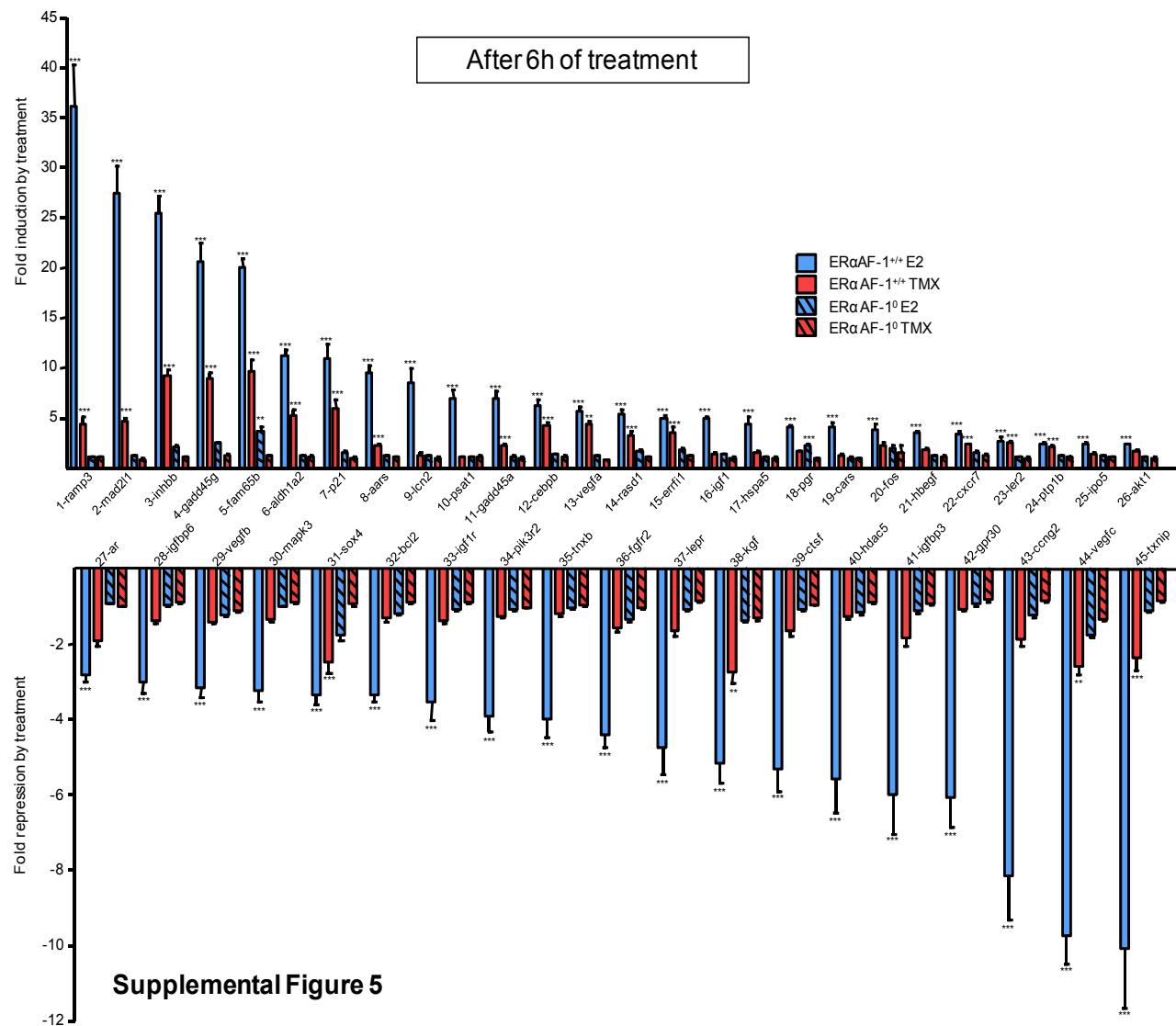
	E2	16 $\alpha$ -LE2
> 2	25	23
< 0.5	15	15

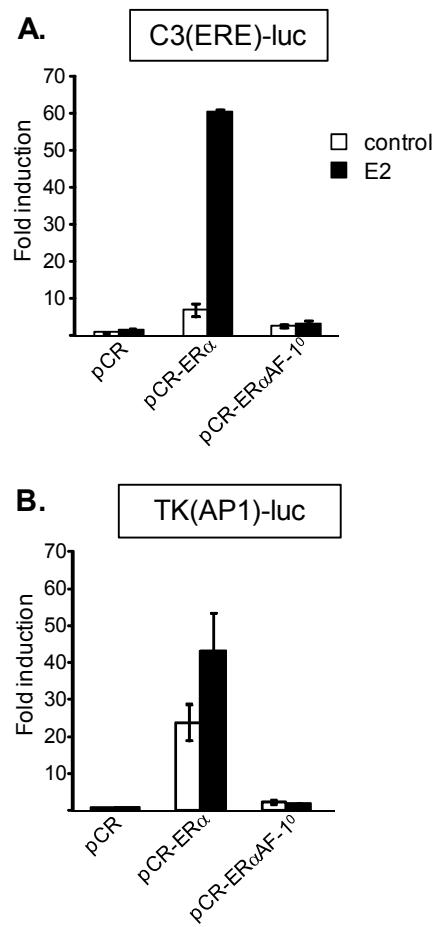
**C.**

	$\text{ER}\alpha^{+/+}$ E2	$\text{ER}\alpha^{-/-}$ E2
> 2	25	0
< 0.5	15	0

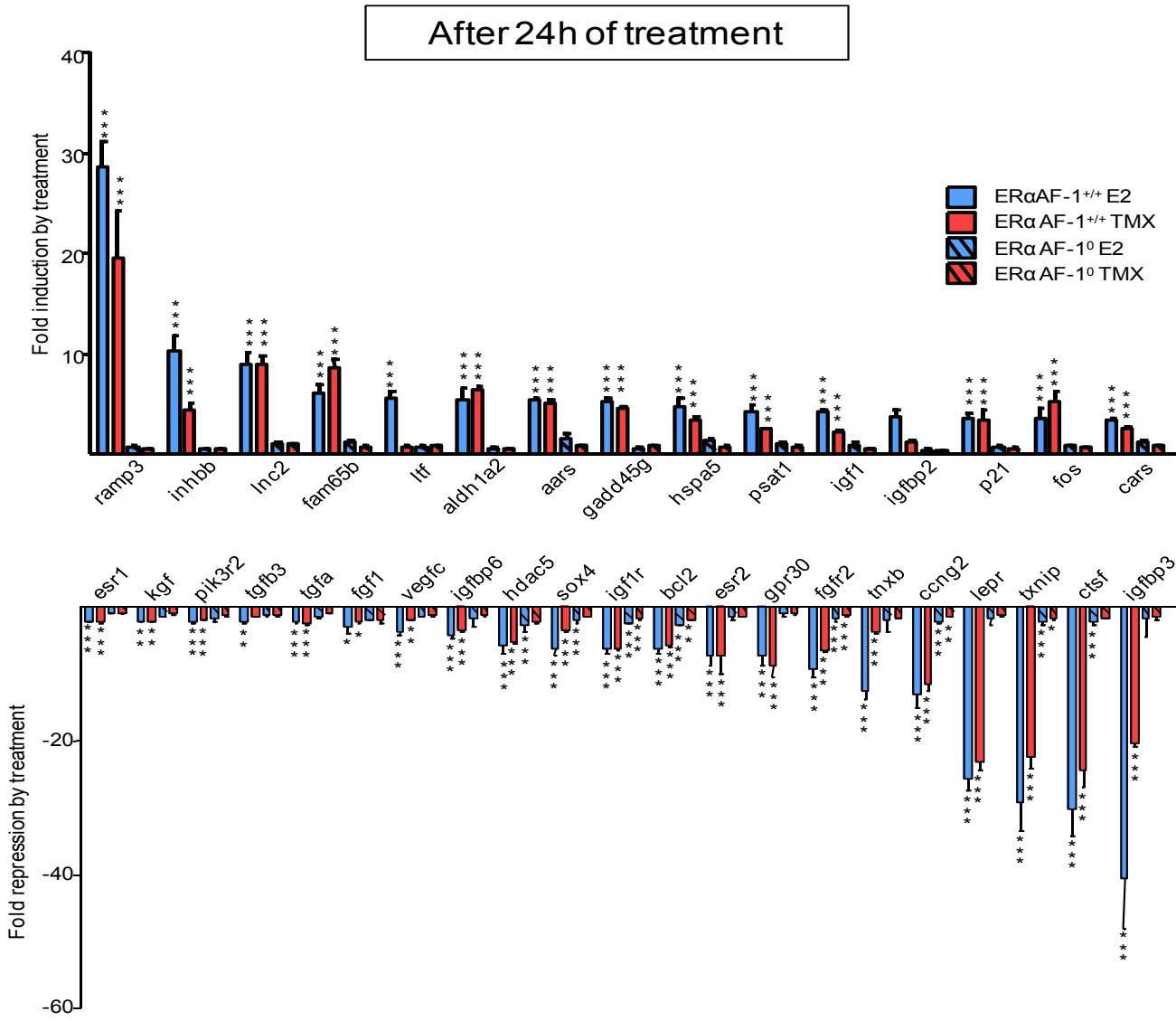
**Supplemental Figure 3**



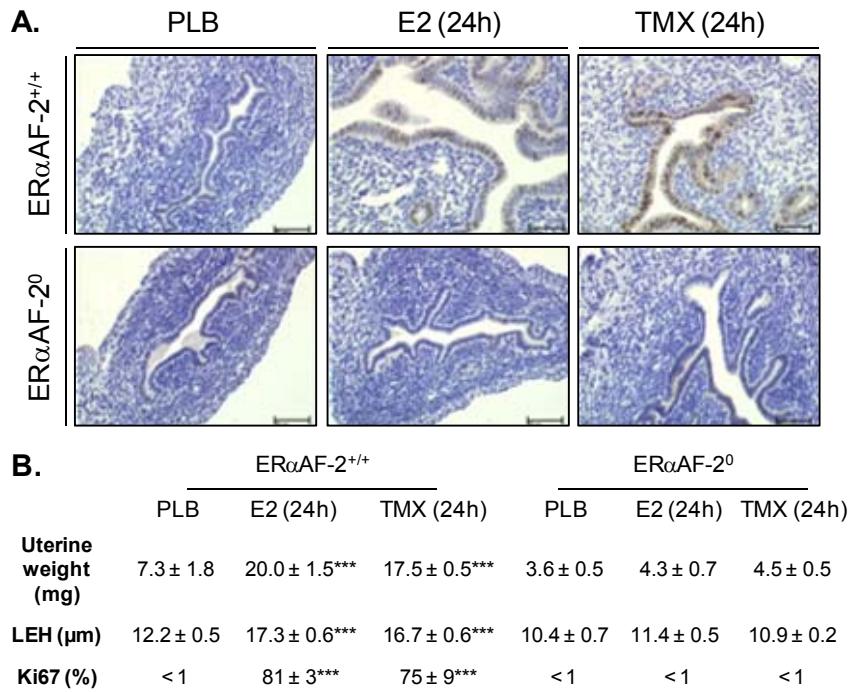




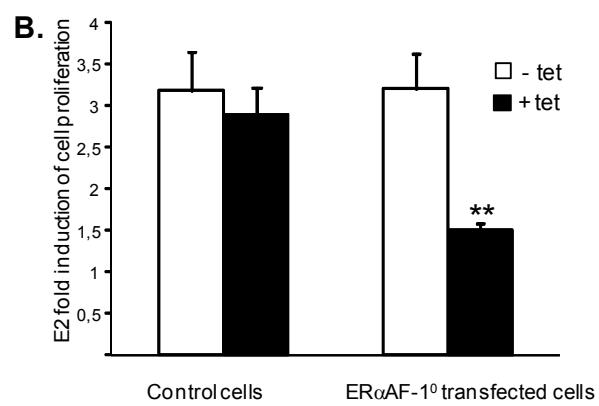
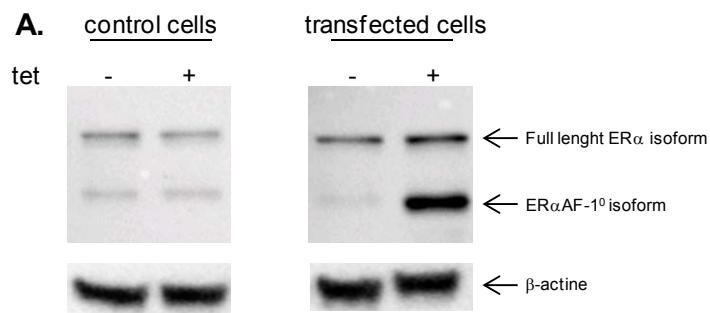
**Supplemental Figure 6**



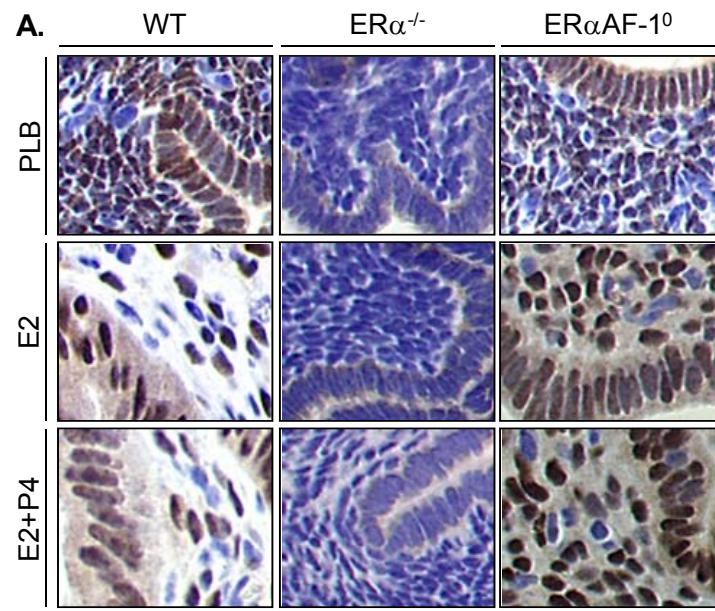
**Supplemental Figure 7**



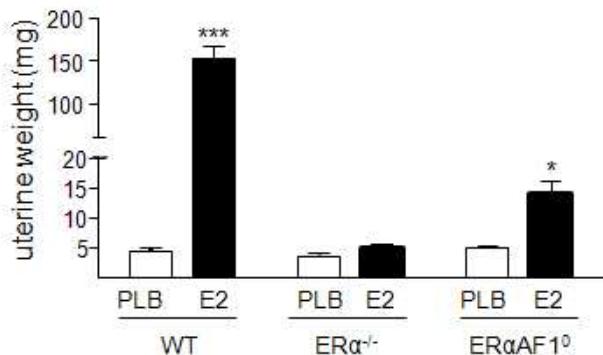
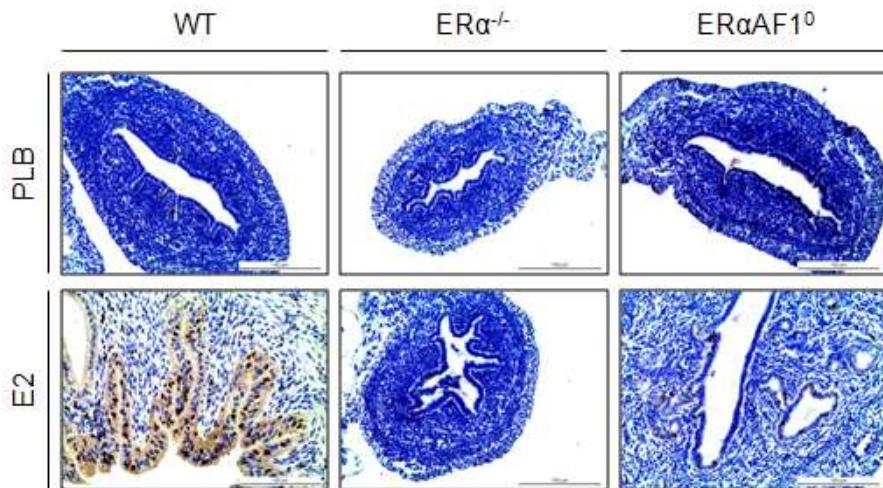
**Supplemental Figure 8**



**Supplemental Figure 9**



**Supplemental Figure 10**

**A.****B.****C.**

	WT		$ER\alpha^{-/-}$		$ER\alpha AF1^0$	
	PLB	E2	PLB	E2	PLB	E2
LEH ( $\mu m$ )	7.0 $\pm$ 0.1	25.0 $\pm$ 1.7***	6.5 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 0.9	8.5 $\pm$ 2.5	13.3 $\pm$ 0.7
%Ki67 epith	<1	39 $\pm$ 4***	<1	<1	<1	13 $\pm$ 3*
SH ( $\mu m$ )	37.5 $\pm$ 5.5	227.2 $\pm$ 18.1***	36.0 $\pm$ 4.0	34.7 $\pm$ 7.2	57.5 $\pm$ 4.5	137.7 $\pm$ 10.8**
%Ki67 strom	<1	17 $\pm$ 3***	<1	<1	<1	<1
Stromal cell density (nb cell/2.5mm $^2$ )	218 $\pm$ 11	62 $\pm$ 1	283 $\pm$ 30	160 $\pm$ 31	225 $\pm$ 32	101 $\pm$ 13

Seven-week-old ovariectomized wild type (WT),  $ER\alpha^{-/-}$  and  $ER\alpha AF1^0$  mice were given placebo (PLB) or 17 $\beta$ -estradiol (E2, 80  $\mu g/kg/day$ ) for six weeks. (A) Uterine weight (B) Ki-67 immunodetection in transverse uterus sections. (C) luminal epithelial height (LEH), percentage of Ki-67 positive cells in uterine epithelium (epith), stromal height (SH), percentage of Ki-67 positive cells in stroma (strom) and stromal cell density (number of cells/2.5 mm $^2$ ) were calculated. Results are expressed as mean +/- SEM. To test the respective roles of treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. As an interaction was observed between the two factors, the effect of treatment was studied in each genotype using Bonferroni post test (\*= p-value <0.05 \*\*\*= p value <0.001) except for stromal cell density : no interaction was found p-value<sub>INTERACTION</sub>=0.717, p-value<sub>GENOTYPE</sub><0.05, p-value<sub>TREATMENT</sub><0.001; n = 3 to 4 mice/group).



**DISCUSSION  
&  
PERSPECTIVES**



Notre démarche visait à étudier les effets de l'E2 et de SERM (notamment du tamoxifène) dans des modèles murins invalidés pour différentes fonctions clés du ER $\alpha$  sur le plan vasculaire d'une part (accélération de la ré-endothélialisation et athéroprotection) et sur le plan utérin (prolifération épithéliale et œdème stromal) d'autre part. La combinaison de ces approches nous a permis de démontrer la possibilité d'un découplage des effets bénéfiques de l'E2 au niveau vasculaire et de ses effets sur l'hypertrophie utérine. Ces résultats s'inscrivent dans une démarche plus globale de l'équipe qui permet d'affirmer que l'athéroprotection, la prévention de l'insulino-résistance et de l'obésité en réponse à l'E2 dépendent d'ER $\alpha$ AF-2 mais pas d'ER $\alpha$ AF1. ER $\alpha$ AF1 est par ailleurs dispensable pour les effets bénéfiques de l'E2 sur le métabolisme de l'os cortical qui compose 80 % du squelette (Borjesson et al., 2011a). En revanche, les effets de l'E2 sur la prolifération cellulaire dans l'utérus nécessitent le recrutement et un synergisme entre ces deux AF (tableau 5 bis).

	Effets ER $\alpha$ AF-1 Dépendants	Effets ER $\alpha$ AF-2 Dépendants	Références
<b>Prévention de l'athérome</b>	NON	OUI	Billon A. et al. PNAS 2009, 2011
<b>Prévention de l'insulino-résistance et de l'obésité</b>	NON	OUI	Handgraaf S. et al. Revised in Diabetes
<b>Ostéoporose</b>	NON	OUI	Borjesson AE. et al. PNAS 2011
<b>Prolifération endométriale</b>	OUI	OUI	Abot A. et al. Endocrinology 2013

**Tableau 5 bis : Tableau récapitulatif de l'implication *in vivo* des fonctions activatrices ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 concernant les principaux effets bénéfiques et délétères de l'E2.**

Cependant les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que cette dichotomie est à nuancer en fonction de la pharmacocinétique et de la nature des SERMS. Dans cette partie de mon manuscrit, nous discuterons plus précisément de ces différents points et des perspectives émanant de ce travail.

### Rôle d'ER $\alpha$ AF-1 dans l'effet athéroprotecteur de l'E2 et du tamoxifène

Contrairement à l'E2 qui active pleinement ER $\alpha$ , le tamoxifène est connu pour activer sélectivement la fonction ER $\alpha$ AF-1 et antagoniser la fonction ER $\alpha$ AF-2 et. Ceci a été largement décrit dans la littérature, où il a été établi le rôle clé de ER $\alpha$ AF-1 pour relayer les effets transcriptionnels du tamoxifène *in vitro* (Berry et al., 1990; Metzger et al., 1995b; Shiau et al., 1998; Smith and O'Malley, 2004). Nous démontrons, pour la première fois *in vivo*, le rôle clé de cette fonction dans les effets du tamoxifène au niveau de l'athéroprotection, contrairement à l'E2, pour lequel ER $\alpha$ AF-1 n'est pas nécessaire à l'effet athéroprotecteur (Billon-Gales et al., 2009b). Ainsi, ces résultats illustrent le fait qu'un SERM peut induire les effets biologiques de l'E2 en recrutant des fonctions activatrices différentes (Tableau 6).

De plus, nous avons observé que ces deux molécules modulent différemment l'activité transcriptionnelle, à court terme dans l'aorte. Ceci est illustré par l'analyse de l'expression de quelques gènes sur aorte entière après 6h de traitement par l'une ou l'autre de ces molécules. Ainsi, malgré une activité transcriptionnelle différente en réponse à l'E2 ou au tamoxifène, ces deux molécules sont capables d'induire une athéroprotection chez la souris. Au niveau du vaisseau, l'expression génique en réponse à ces molécules ne serait donc pas prédictive de leur réponse physiologique. Cette hypothèse devra néanmoins être vérifiée en utilisant une approche plus large (par RT-qPCR à haut débit ou par puce à ADN), en tenant compte de paramètres pharmacocinétiques. En effet, il serait pertinent d'étudier la cinétique de la réponse transcriptionnelle au tamoxifène, dans l'aorte, qui pourrait présenter une régulation génique décalée dans le temps par rapport à l'E2, comme nous l'avons mis en évidence dans l'utérus.

Bien que tous deux athéroprotecteurs, l'E2 et le tamoxifène ne sont toutefois pas équivalents en terme de vasculoprotection puisque le tamoxifène n'est pas capable, contrairement à l'E2, d'induire une accélération de la cicatrisation endothéliale après agression électrique de la carotide. L'amélioration de la ré-endothélialisation, en réponse à l'E2, est indépendante à la fois du ER $\alpha$ AF-1 (Billon-Gales et al., 2009b) et de du ER $\alpha$ AF-2 (Billon-Gales et al., 2011a), suggérant une implication des effets MISS (Tableau 6). Chambliss *et al* ont d'ailleurs confirmé l'implication du ER $\alpha$  membranaire dans le processus de ré-endothélialisation, grâce à l'utilisation de l'EDC (Chambliss et al., 2010). Il semblerait donc que le tamoxifène, ne soit pas capable d'initier les effets membranaires dans ce contexte. Il serait ainsi intéressant de continuer la dissection moléculaire des effets vasculoprotecteurs de l'E2 et du tamoxifène en étudiant l'implication des effets non-génomiques. Ceci est rendu possible grâce à une souris transgénique, récemment disponible au laboratoire, qui présente une mutation du site de palmitoylation de ER $\alpha$  (C451A) de manière à empêcher l'adressage membranaire du

récepteur (Accocia et al., 2004). Nous étudierons l'effet sur l'accélération de la ré-endothélialisation en réponse à l'E2 chez ces souris afin de confirmer le rôle crucial des effets non-génomiques dans cette fonction. Le croisement de ces souris avec les souris  $LDLr^{-/-}$  permettra d'étudier l'implication de ces effets membranaires dans l'athéroprotection en réponse à l'E2 et au tamoxifène.

Les travaux antérieurs de mon équipe ont montré que le potentiel athéroprotecteur de l'E2 dépend du ER $\alpha$  endothérial (Billon-Gales et al., 2009a) et nos résultats préliminaires montrent une indépendance des effets athéroprotecteurs du tamoxifène vis-à-vis du ER $\alpha$  endothérial (données non publiées). Ainsi, outre les fonctions du ER $\alpha$ , les cibles cellulaires impliquées dans les effets athéroprotecteurs de l'E2 et du tamoxifène sont également différentes. Un faisceau d'arguments est en faveur d'un rôle clé des cellules musculaires lisses (CML) dans l'effet athéroprotecteur du tamoxifène (Tableau 6) :

- Les données de la littérature démontrent que la vasorelaxation observée en réponse au tamoxifène est toujours effective sur un segment aortique dénué d'endothélium (Figtree et al., 2000). De plus, l'augmentation de la sécrétion de TGF $\beta$  par les CML, en réponse au tamoxifène, a été proposée comme un mécanisme participant à son effet athéroprotecteur (Grainger et al., 1993)
- Nos données non publiées montrent que :
  - le tamoxifène induit une accélération de la ré-endothélialisation, au niveau de la carotide, lorsque les CML sont présentes (agression endo-vasculaire) mais pas en absence de ces cellules (agression péri-vasculaire)
  - le tamoxifène exerce un effet inhibiteur sur la prolifération des CML après une agression endovasculaire de l'artère fémorale

La différence de cible cellulaire de l'E2 et du tamoxifène pouvant conduire à l'athéroprotection pourrait expliquer le caractère dispensable de la fonction ER $\alpha$ AF-1 dans le premier cas et son caractère nécessaire dans le second. En effet, l'implication des différentes AF varie selon le type cellulaire. Ainsi, il a été démontré que les cellules HepG2 présentent une réponse transcriptionnelle en recrutant préférentiellement ER $\alpha$ AF-1, à la différence des cellules Hela, qui présentent un contexte ER $\alpha$ AF-2 préférentiel (Merot et al., 2004; Tora et al., 1989; Tzukerman et al., 1994).

Afin de tester directement l'implication du ER $\alpha$  des CML, dans ces différents effets vasculo-protecteurs du tamoxifène (et de l'E2), nous utiliserons le modèle murin SMA-Cre $^+$ ER $T^2$ , qui après croisement avec les souris ER $\alpha^{flox/flox}$  permettra la délétion sélective du ER $\alpha$  dans les CML (Wendling et al., 2009). Par ailleurs, nous chercherons à déterminer l'implication de

l'ER $\alpha$ AF-1 dans les autres effets vasculoprotecteurs du tamoxifène décrits auparavant, à savoir : l'accélération de la ré-endothélialisation après lésion endovasculaire de la carotide et la prévention de l'hyperplasie néo-intimale dans l'artère fémorale, en utilisant le modèle murin ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>.

	Athéroprotection	Accélération de la ré-endothélialisation
E2	ER $\alpha$ AF-2 dépendant dans l'endothélium	ER $\alpha$ MISS dépendant
Tamoxifène	ER $\alpha$ AF-1 dépendant dans les CML?	Pas d'effet

**Tableau 6 : rôle respectif de ER $\alpha$ AF-1 et ER $\alpha$ AF-2 dans l'athéroprotection et l'accélération de la ré-endothélialisation de l'E2 et du tamoxifène.**

#### Rôle d'ER $\alpha$ AF-1 dans la prolifération utérine en réponse à l'E2 et au tamoxifène

Dans une deuxième partie de mon travail de thèse, nous avons démontré que l'ER $\alpha$ AF-1 est nécessaire pour la régulation de la transcription et de la prolifération cellulaire dans l'utérus en réponse à l'E2 et au tamoxifène. L'apoptose des cellules épithéliales utérines ainsi que la réponse à la progestérone sont également largement perturbées chez les souris déficientes pour cette fonction (ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>). Toutefois, une hypertrophie utérine résiduelle en réponse à un traitement chronique d'E2 persiste chez les souris déficientes pour l'ER $\alpha$ AF-1, due à l'oedème stromal. Ainsi, alors que l'ER $\alpha$ AF-1 joue un rôle crucial dans la prolifération épithéliale en réponse à une dose physiologique d'E2 (8 µg/kg/jour), cette fonction n'est que partiellement impliquée dans les mécanismes de perméabilité vasculaire et d'hyperémie conduisant à l'oedème stromal à long terme. Ces résultats témoignent pour la première fois, *in vivo*, du découplage entre les effets vasculaires et la prolifération épithéliale dans l'utérus. Ce découplage souligne que l'induction du poids utérin n'est pas un critère suffisant pour caractériser la réponse utérine puisqu'il ne permet pas de différencier les deux effets. De plus, ces données confortent le rôle de l'ER $\alpha$ AF-1 dans la prolifération cellulaire déjà rapporté *in vitro* (Penot et al., 2005) et son importance moindre dans le vaisseau comme démontré dans la vasculoprotection en réponse à l'E2 (Billon-Gales et al., 2009b).

Le caractère indispensable de l'ER $\alpha$ AF-1 dans la prolifération épithéliale en réponse à l'E2 est toutefois à nuancer car nous observons une prolifération épithéliale résiduelle en réponse

à un traitement chronique d'E2 à une dose supraphysiologique (80 µg/kg/jour). Nous confirmons l'implication de l'ER $\alpha$ AF-1 dans ce processus puisque l'indice de prolifération épithéliale est 60% inférieur à l'indice observé chez les souris contrôles. Ces résultats nous amènent toutefois à intégrer une donnée supplémentaire dans notre réflexion, à savoir l'implication de l'ER $\alpha$ AF-1 en fonction de la dose de ligand. L'hétérogénéité de conformation du ER $\alpha$  décrit dans la littérature pourrait expliquer cette absence d'impact d'ER $\alpha$ AF-1 à des concentrations faibles d'E2 et son implication lors de l'utilisation d'une dose d'E2 plus élevée. (Marsigliante et al., 1999; Horjales et al., 2007). A contrario, chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>, aucune réponse utérine, en terme d'induction du poids utérin, de prolifération épithéliale ou d'œdème stromal, n'a été observée dans l'utérus en réponse au tamoxifène (4mg/kg/jour, dose très élevée), témoignant une nouvelle fois du caractère crucial de ER $\alpha$ AF-1 pour relayer l'action de cette molécule (Abot et al., 2013; Fontaine et al., 2013) (+ données non publiées) et de la spécificité d'action de chaque SERM.

L'implication de l'ER $\alpha$ AF2 dans la réponse utérine à l'E2 et au tamoxifène a également été évaluée dans ce travail, en utilisant le modèle murin ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> (délétion des acides aminés 543 à 550). Parallèlement, cette approche a été rapportée par une équipe américaine qui a utilisé le modèle AF2ERKI (substitution de deux acides aminés L543A et L544A) (Arao et al., 2011). Ces deux modèles sont caractérisés par une abolition de la réponse utérine à l'E2, en terme de régulation transcriptionnelle et de prolifération épithéliale, témoignant ainsi du rôle crucial de l'ER $\alpha$ AF2. Ainsi, les deux AF du ER $\alpha$  agissent en synergie pour relayer la prolifération cellulaire dans l'utérus en réponse à l'E2. A la différence des souris AF2ERKI, les souris ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> sont insensibles au tamoxifène. Il semblerait donc qu'en plus d'inactiver la fonction ER $\alpha$ AF-2, la délétion des 8 acides aminés dans notre mutant ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup>, empêche également le synergisme entre les deux AF. Notre hypothèse est que le mutant ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> pourrait être, en réalité, un mutant d'invalidation des effets génomiques. Des résultats préliminaires concernant l'analyse de l'activité transcriptionnelle précoce en réponse à l'E2 et au tamoxifène montre une abolition totale de la régulation de l'expression d'une centaine de gènes cibles, chez les souris ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup>. Ceci sera confirmé par l'analyse transcriptionnelle à plus large échelle par une approche de puce à ADN.

Après avoir discriminé, dans la réponse utérine, le rôle de chaque AF du ER $\alpha$  impliquée dans les effets génomiques, nous pouvons continuer la dissection des mécanismes moléculaires dans cette fonction biologique en étudiant l'implication des effets relayés par le ER $\alpha$  membranaire. L'approche pharmacologique avec l'EDC, ne montre aucun effet uterotrophique chez les souris ovariectomisées (Chambliss et al., 2010). Ainsi, la simple induction des effets MISS ne suffit pas à relayer la prolifération épithéliale utérine. Cependant, cela n'exclut pas que les effets MISS pourraient potentialiser les effets

transcriptionnels. Ainsi, l'analyse différentielle de la réponse utérine chez les souris ER $\alpha$ AF-2<sup>0</sup> et ER $\alpha$ <sup>C451A</sup> permettra de discriminer les gènes cibles dont la régulation est potentialisée par l'activation du ER $\alpha$  membranaire.

Les acteurs cellulaires, impliqués dans la réponse utérine sont multiples. Cependant, le ER $\alpha$  des cellules stromales joue un rôle crucial dans la réponse proliférative des cellules épithéliales *via* des mécanismes paracrines mettant en jeu les facteurs de croissance (Cunha et al., 2004). Ces facteurs de croissance, tels que l'EGF ou l'IGF-1, entraînent une activation de ER $\alpha$  de manière ligand-indépendante *via* l'ER $\alpha$ AF-1, appuyant, à nouveau, l'importance de cette fonction dans la prolifération cellulaire *in vitro* (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995). Il serait ainsi pertinent d'évaluer, *in vivo*, le rôle de l'ER $\alpha$ AF-1 en réponse à ces facteurs de croissance chez les souris ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>. Notre démarche expérimentale en ce sens a malheureusement échoué du fait de difficultés techniques (problème de délivrance des facteurs de croissance *in vivo*). Par ailleurs, Métivier R. et al ont démontré *in vitro* que les interactions dynamiques entre le domaine A et le domaine E du ER $\alpha$  régulent l'activation ligand-indépendante (Metivier et al., 2002). Il est important de noter que notre modèle murin ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup> est délété pour l'ensemble du domaine A/B. On ne peut donc pas exclure une implication de ces domaines et notamment du domaine A dans les phénotypes observés. C'est pourquoi, nous projetons de continuer la dissection plus fine de l'implication de l'activité ligand-indépendante de ER $\alpha$ AF-1 dans la prolifération utérine grâce à un nouveau modèle murin muté sur le résidu sérine 118 du ER $\alpha$  (S118A). Cet acide aminé est phosphorylé par des protéines du cycle cellulaire comme la cycline H/cdk7 mais également par Akt et les MAPK, en réponse à l'E2 ou aux facteurs de croissance. La phosphorylation de cette sérine permet de moduler le potentiel activateur de ER $\alpha$ AF-1 en régulant l'activation transcriptionnelle ligand-indépendante et la stabilité du récepteur (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995; Valley et al., 2005). Ainsi en analysant la réponse utérine chez ces souris ovariectomisées et traitées à l'E2, il sera possible d'étudier la convergence entre les effets ligand-dépendants et ligand-indépendants impliquant cette sérine 118.

#### Vers une modulation sélective du ER $\alpha$ : les stratégies envisageables

- Stratégie 1 : recruter préférentiellement ER $\alpha$ AF-2

La dissection moléculaire *in vivo* des effets de l'E2 impliquant ER $\alpha$ AF-1 et/ou ER $\alpha$ AF-2 dans les principales pathologies liées à la ménopause, renvoie à l'opportunité de développer de nouveaux SERM afin d'améliorer la balance bénéfices/risques des traitements hormonaux. Ainsi, les résultats obtenus avec l'E2 sur nos différents modèles de souris semblent indiquer

qu'un SERM qui stimulerait préférentiellement ER $\alpha$ AF-2 en limitant l'activité d'ER $\alpha$ AF-1 pourrait relayer les effets protecteurs de l'E2 sur le métabolisme, le système vasculaire et osseux sans induire de prolifération cellulaire dans l'utérus. Toutefois, cette approche reste limitée car nos résultats obtenus avec le tamoxifène, aussi bien sur le plan vasculaire que sur l'utérus indiquent que chaque SERM présente ses propres spécificités d'action pouvant faire intervenir des cibles cellulaires et des fonctions moléculaires qui lui sont propres. Ainsi l'extrapolation d'un SERM idéal à partir des données expérimentales en réponse à l'E2, n'est pas forcément prédictive.

➤ Stratégie 2 : favoriser les effets initiés à la membrane

Des expériences *in vivo* montrent que l'EDC, composé œstrogénique capable seulement d'activer le ER $\alpha$  membranaire, induit une accélération de la cicatrisation endothéliale et prévient l'hyperplasie néo-intimale sans stimuler la prolifération utérine et mammaire. Ainsi, l'EDC ou tout autre composé activant préférentiellement les effets initiés à la membrane présenterait un intérêt thérapeutique en relayant les effets protecteurs vasculaires sans induire les effets activateurs de la prolifération des cellules non vasculaires ou de la croissance cancéreuse mammaire. L'utilisation d'un tel composé permettrait d'éviter l'utilisation d'un progestatif associé qui comporte des risques (Chambliss et al., 2010; Mendelsohn and Karas, 2010). Toutefois, cette hypothèse reste prématurée dans l'état actuel des connaissances. Il sera important d'étudier l'implication des effets initiés par le ER $\alpha$  membranaire dans d'autres effets protecteurs de l'E2 comme l'athéroprotection, la prévention de l'insulino-résistance et la déminéralisation osseuse.

➤ Stratégie 3 : induire l'expression de l'isoforme de ER $\alpha$  46 kDa

L'isoforme ER $\alpha$ 46, dépourvue du domaine A/B et donc de ER $\alpha$ AF-1, est naturellement exprimée dans l'organisme. Nous avons confirmé son expression, notamment dans l'aorte et l'utérus de souris sauvages. *In vitro*, la sur-expression de ER $\alpha$ 46 dans une lignée cellulaire de cancer mammaire permet d'antagoniser l'activité prolifératrice induite par l'E2 (Penot et al., 2005). Par ailleurs, nous avons démontré que l'isoforme de ER $\alpha$ 49 pouvant s'apparenter à ER $\alpha$ 46 (dans le modèle ER $\alpha$ AF-1<sup>0</sup>) ne permet pas l'induction, ou seulement partiellement, de la prolifération épithéliale utérine, selon la dose d'E2 utilisée. L'ensemble de ces observations suggère qu'il serait intéressant de développer une stratégie originale visant à induire l'expression de cette isoforme tronquée de la fonction ER $\alpha$ AF-1.

Afin d'étayer cette hypothèse, il paraît essentiel d'étudier au préalable le rôle physiologique et la régulation *in vivo* de l'isoforme ER $\alpha$ 46. Dans ce but, nous étudions actuellement les mécanismes de génération de cette isoforme dans différents tissus (épissage alternatif ou

IRES) ainsi que la régulation de cette isoforme dans l'utérus dans différentes conditions expérimentales.

➤ Stratégie 4 : bloquer ER $\alpha$ AF-1

Nos résultats suggèrent que le blocage d'ER $\alpha$ AF-1 permettrait de conserver les effets de l'E2 sur la prévention de l'athérome, de l'ostéoporose et du diabète de type II en limitant la formation de lésions hyperplasiques au niveau de l'endomètre.

Cette stratégie est déjà développée concernant le AR. Chez l'homme, le cancer de la prostate peut être traité par castration chirurgicale ou chimique combinée à la radiothérapie localisée. Cependant, approximativement 20 à 40% des patients atteints d'un cancer de la prostate et orchidectomisés sont exposés à des phénomènes de récidives entraînant un fort taux de mortalité. Le développement de molécules qui visent à altérer la signalisation androgénique est donc un enjeu majeur. Les stratégies thérapeutiques développées à ce jour visent préférentiellement à inhiber l'AF-1 de AR :

- la molécule EPI-001, molécule analogue du domaine N-terminal, issue d'un extrait d'éponge marine, empêche l'interaction entre le AR et le facteur de transcription CBP recruté au niveau du domaine N-terminal (Andersen et al., 2010; Sadar, 2011)
- la surexpression d'un peptide, dont la séquence est identique au domaine N-terminal de AR, permet de capturer les cofacteurs qui interagissent avec ce domaine par compétition (Quayle et al., 2007)

Ces exemples de modulation de la signalisation androgénique démontre bien qu'il est possible de développer des molécules, autres que des modulateurs sélectifs, qui permettent de bloquer la fonction activatrice AF-1.

➤ Stratégie 5 : associer l'E2 avec un SERM

La combinaison de l'E2 avec un SERM est théoriquement séduisante dans l'idée d'obtenir une synergie entre les effets bénéfiques de l'E2 et le blocage concomitant de son action dans l'utérus. Ainsi, plusieurs approches pourraient être envisagées :

- Avec un agoniste spécifique de ER $\beta$

En effet, notre hypothèse de limiter le recrutement d'AF-1 renvoie au faible pouvoir activateur de ER $\beta$ AF-1. Après la découverte d'ER $\beta$ , de nombreux travaux de recherche ont été menés sur les ligands spécifiques de ce ER et leurs potentiels thérapeutiques en se basant sur le nombre limité d'acides aminés conservés entre le LBD de ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Minutolo et al., 2011). Au niveau expérimental, l'administration d'agonistes sélectifs de ER $\beta$  (8 $\beta$ -VE2 ou

DPN) ne présente pas d'activité uterotrophique, ni mammotrophique chez les souris ovariectomisées, ce qui présenterait l'avantage d'éviter l'utilisation d'un progestatif associé (Harris et al., 2002; Helguero et al., 2005; Hertrampf et al., 2008; Nilsson and Gustafsson, 2011; Nilsson et al., 2011). Cependant, son faible pouvoir athéroprotecteur, son action marginale sur le métabolisme et l'absence d'effet sur l'os font qu'à l'heure actuelle, ER $\beta$  n'est pas une cible validée pour le traitement de pathologies et ainsi aucun agent thérapeutique spécifique de ER $\beta$  n'est utilisé en clinique. Toutefois, son association avec un autre SERM pourrait s'avérer efficace (Barros and Gustafsson, 2011; Hertrampf et al., 2008; Nilsson et al., 2011; Rayner et al., 2009; Sun et al., 2011).

- Avec l'E4

L'estétrol (E4), découvert en 1965, est un œstrogène faible, exclusivement synthétisé par le foie du fœtus humain (Hagen et al., 1965). Sa capacité à inhiber l'ovulation et à diminuer le risque thrombo-embolique en comparaison avec l'EE, en fait une molécule de choix dans la contraception (Coelingh Bennink et al., 2008c; Hammond et al., 2008). Cependant ses propriétés bénéfiques, évaluées expérimentalement *in vivo*, sur la prévention des bouffées de chaleur (Holinka et al., 2008), l'ostéoporose (Coelingh Bennink et al., 2008a), l'athérome (données non publiées) et la vasorelaxation (Hilgers et al., 2012) suggèrent une application possible dans le THS à la ménopause. Son activité proliférative est 50 fois plus faible que l'E2 dans les MCF-7 (Jozan et al., 1981). De plus, l'E4 exerce un effet inhibiteur sur la croissance tumorale, au même titre que le tamoxifène (Coelingh Bennink et al., 2008b). Au niveau utérin, l'E4 induit une faible augmentation du poids corrélée à un faible indice mitotique (Heegaard et al., 2008; Holinka and Gorpide, 1979). Une étude ancienne a montré, par ailleurs, que l'E4 peut entrer en compétition avec l'E2 au niveau de l'endomètre humain en phase proliférative (Tseng and Gorpide, 1976).

- Avec le bazedoxifène

Le co-traitement du CEE et du bazedoxifène est la seule combinaison entre un œstrogène et un SERM testée en clinique à ce jour. Ce double traitement diminue les bouffées de chaleur, prévient l'ostéoporose sans stimulation de l'endomètre, ni activité mammotrophique, après un an de traitement chez les femmes ménopausées (Pinkerton et al., 2013; Taylor and Ohleth, 2012). Ainsi, cette association semble être une alternative pour s'affranchir de l'association à un progestatif. Les mécanismes d'action de cette association œstrogénique sont inconnus, au niveau moléculaire. Nos modèles expérimentaux pourraient participer à leur compréhension.

### Conclusion

En conclusion, la dissection des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu par l'E2 et les SERM reste un enjeu majeur pour comprendre la modulation de l'activité transcriptionnelle relayée par ER $\alpha$ . Mon projet de thèse confirme toute la difficulté d'extrapoler les résultats expérimentaux à la clinique. En effet, le développement d'un SERM à visée thérapeutique doit tenir compte de son action spécifique dans chaque tissu et de ses propriétés pharmacocinétiques. Cependant, la combinaison des approches pharmacologiques et génétiques, par des souris transgéniques mutées totalement ou ponctuellement pour ER $\alpha$ , sont des outils complémentaires et originaux, présents au laboratoire, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu par l'E2 ou par les SERM, en complément de la recherche clinique.

# ANNEXES

**Annexe 1 : ERαAF-2 est nécessaire pour l'effet athéroprotecteur de l'E2 mais pas pour accélérer la ré-endothélialisation.**

**Annexe 2 : Correction du signal dérivé de l'ADN génomique dans les données de qPCR en temps réel avec ValidPrime.**

**Annexe 3 : Leçon sur la dissection des fonctions activatrices ERαAF-1 et ERαAF-2 *in vivo*.**

# Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor- $\alpha$ is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing

Audrey Billon-Galés<sup>a,1</sup>, Andrée Krust<sup>b,1</sup>, Coralie Fontaine<sup>a,1</sup>, Anne Abot<sup>a</sup>, Gilles Flouriot<sup>c</sup>, Céline Toutain<sup>a</sup>, Hortense Berges<sup>a</sup>, Alain-Pierre Gadeau<sup>d</sup>, Françoise Lenfant<sup>a</sup>, Pierre Gourdy<sup>a</sup>, Pierre Chambon<sup>b</sup>, and Jean-François Arnal<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Université Paul Sabatier, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, 31432 Toulouse, France; <sup>b</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Louis Pasteur, Collège de France, 67404 Illkirch, France; <sup>c</sup>Université de Rennes I, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche 6026, Équipe Récepteur des oestrogénines et destinée cellulaire, 35042 Rennes, France; and <sup>d</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U828 Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, Équipe Maturation du néo-vaisseau, 33607 Pessac, France

Edited by Jan-Åke Gustafsson, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden, and approved June 22, 2011 (received for review April 12, 2011)

**17 $\beta$ -Estradiol (E2) regulates estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) target gene transcription through the two independent activation functions (AFs), AF1 and AF2, located in the N-terminal and ligand binding domain of ER $\alpha$ , respectively. We previously reported that ER $\alpha$  is required for the E2 atheroprotective action as well as for its accelerative action on endothelial healing, but its AF1 function is dispensable. Here, we investigated the role of ER $\alpha$ AF2 in these two major beneficial actions of E2 by electively targeting ER $\alpha$ AF2 (named ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>). Our results prove four points. (i) Compared with WT ER $\alpha$ , the ability of ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> to stimulate the C3 complement or the estrogen response element-thymidine kinase promoter in two cell lines was dramatically decreased, confirming the importance of AF2 in the E2-induced transcriptional activity of ER $\alpha$ . (ii) The uterotrophic action of E2 was totally absent in ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> mice, showing the crucial role of ER $\alpha$ AF2 in E2-induced uterus hyperplasia. (iii) ER $\alpha$ AF2 was dispensable for the accelerative action of E2 on endothelial healing, underlining the functionality of ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> in vivo. (iv) Finally, the atheroprotective effect of E2 was abrogated in ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> LDL- $r^{-/-}$  mice. Thus, whereas ER $\alpha$ AF1 and ER $\alpha$ AF2 are both required for the uterotrophic action of E2, we show that only ER $\alpha$ AF2 is necessary for its atheroprotective effect.**

atherosclerosis | nuclear receptor | transactivating function

Estrogens, and particularly, 17 $\beta$ -estradiol (E2), play a pivotal role in sexual development and reproduction and are also implicated in a large number of physiological processes, particularly in the cardiovascular system. Although epidemiological studies (1, 2) and the Nurses' Health Study (3) suggested and all animal models of early atheroma (4, 5) clearly showed a vasculoprotective action of both endogenous and exogenous estrogens, the Women's Health Initiative did not confirm the preventive action of estrogens against coronary heart disease (CHD) (6, 7). However, women who initiate hormone therapy closer to menopause have reduced CHD risk compared with the increase in CHD risk among women more distant from menopause (8). It is clear that these hormones have important effects on vascular physiology and pathophysiology, with potential therapeutic implications such as acceleration of endothelial healing (9) and atheroprotection (10). Interestingly, a delay between ovariectomy and E2 replacement abrogates the prevention of atheroma in the monkey (4) as well as the mouse (11), suggesting that these animal models of atheroma could mimic the problem of timing observed in women in terms of coronary artery risk (2, 4, 12).

The action of E2 is mediated by two nuclear receptors, estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  (13), encoded by two distinct genes, *Esr1* and *Esr2*, respectively. Both ERs belong to the nuclear receptor subfamily of ligand-inducible transcription factors whose members, based on structural and functional similarities, can be subdivided into six distinct regions termed A to F (13). Ligand-induced transcription of ER involves the action of two distinct activation functions (AF), AF1 and AF2, located in the

N-terminal A/B and C-terminal E domains, respectively (14). On estrogen binding, ERs undergo a conformational change that facilitates the recruitment of coactivators and the direct (or indirect) binding to *cis*-acting elements, thereby activating the transcription of target genes (13). These AFs exhibit distinct transactivation properties, and the full transcriptional activity of ER $\alpha$  is thought to proceed through a synergism between these two functions, although only AF2 activity is entirely dependent on ligand binding (15). The time lag between steroid administration and observable effects produced by newly synthesized protein is typically in the order of hours to days, eliciting cascades of gene expression changes. However, rapid effects of E2, such as vaso-dilation, occur within minutes of steroid administration and involve a fraction of ER localized to the plasma membrane. These fast-acting membrane-initiated steroid signaling (MISS) effects lead to the modification of existing proteins and cells, including calcium and protein kinases (such as MAPK or PI3K) modulation (reviewed in refs. 16 and 17).

Mouse models targeted for either ER $\alpha$  or - $\beta$  allowed us and others to show that ER $\alpha$  is absolutely necessary to the beneficial actions of E2 in reendothelialization (18), medial hyperplasia (19), and atheroma (20, 21). Indeed, all these actions are fully abrogated in ER $\alpha^{-/-}$  mice that unambiguously lack ER $\alpha$  (18, 19, 22, 23). In addition, ER $\alpha$ AF1 is dispensable for two major vasculoprotective effects of E2, namely the acceleration of the reendothelialization process and the prevention of atheroma (24). The aim of the present work was to directly evaluate the involvement of ER $\alpha$ AF2 in these two major vasculoprotective effects of E2. To this end, we developed a mouse model deleted of 7 amino acids of the helix 12 and thereby, deficient in ER $\alpha$ AF2 (named ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>).

## Results

**Generation of ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> Mice.** ER $\alpha$ AF2 activity requires a region in the C terminus of the mouse receptor at the level of the hormone binding domain between residues 539 and 554, which is conserved among many nuclear receptors (25). Different point mutagenesis or deletion of this conserved region showed that this function is essential for E2-induced transcriptional activation (25). To study the role of ER $\alpha$ AF2 in vivo, a mouse model was generated using a knock-in strategy in which amino acids 543–549

Author contributions: A.K., P.G., P.C., and J.-F.A. designed research; A.B.-G., C.F., A.A., G.F., C.T., and H.B. performed research; A.K., A.-P.G., and P.C. contributed new reagents/analytic tools; A.B.-G., C.F., G.F., C.T., A.-P.G., F.L., P.G., and J.-F.A. analyzed data; and A.B.-G., A.K., C.F., G.F., P.G., P.C., and J.-F.A. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>A.B.-G., A.K., and C.F. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: Jean-François.Arnal@inserm.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1105632108/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1105632108/-DCSupplemental).

of ER $\alpha$  were deleted (Fig. 1 and Fig. S1). Beforehand, we examined the effect of deleting these residues from ER $\alpha$  on its ability to stimulate ERE-thymidine kinase (TK) (Fig. 2A) or C3 complement (Fig. 2B) promoters in transient transfection assays in two cell lines, HeLa and HepG2, previously characterized as devoid of endogenous ERs (26). As expected, whereas E2 induced ~10- to 35-fold transcriptional activity using WT ER $\alpha$  construct, this action was dramatically reduced (less than two-fold) using the ER $\alpha$ AF2 $^0$  mutant (Fig. 2A and B). These results showed the importance of AF2 in two cellular reporter models of the E2 transcriptional activity.

Both ER $\alpha$ AF1 and AF2 have been shown to exert their transcriptional activity in a cell-specific manner. Accordingly, cell contexts can be defined as ER $\alpha$ AF1- or AF2-permissive depending on which AF is principally involved in ER $\alpha$  activity. For instance, the hepatocarcinoma cell line HepG2 is frequently used to assess ER $\alpha$ AF1 activity (26), and we found transcriptional activity of the ER $\alpha$ AF1-selective agonist tamoxifen (27) on C3 complement promoter in ER $\alpha$ -transfected cells (Fig. S2). Interestingly, transcriptional activity of tamoxifen is totally maintained using the ER $\alpha$ AF2 $^0$  mutant in HepG2 cells, whereas it is totally abolished with the ER $\alpha$ AF1 $^0$  construct (Fig. S2), showing that AF1 of the ER $\alpha$ AF2 $^0$  construct is functional.

**ER $\alpha$ AF2 Is Necessary for the E2 Uterotrophic Action.** We then assessed ER $\alpha$  protein expression level in uteri from ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  and ER $\alpha$ AF2 $^0$  mice by Western blot. We found that the protein abundance of the ~65-kDa ER $\alpha$  in the uterus from ER $\alpha$ AF2 $^0$  mutant mice was quite similar to the 66-kDa ER $\alpha$  in control mice (Fig. 3A). We next explored the importance of ER $\alpha$ AF2 in the uterotrophic action of E2. Whereas E2 treatment elicited a major uterine hypertrophy in ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  mice, this effect was completely abrogated in ER $\alpha$ AF2 $^0$  mice (Fig. 3B), showing the crucial role of ER $\alpha$ AF2 in the E2-induced uterus growth.

**ER $\alpha$ AF2 Is Dispensable for the Effect of E2 on Reendothelialization.** We previously reported that ER $\alpha$ , but not its AF1, is necessary to induce the accelerative effect of E2 in vivo (24). We then

explored the role of ER $\alpha$ AF2 in this known vasculoprotective action of E2. As previously described (18), E2 accelerated the reendothelialization after carotid electric injury in WT mice (ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$ ). This beneficial action of E2 was similarly observed in ER $\alpha$ AF2 $^0$  mice, showing that ER $\alpha$ AF2 is dispensable for the acceleration of reendothelialization in response to E2 (Fig. 4). Importantly, this result underlines the functionality of ER $\alpha$ AF2 $^0$  protein in vivo.

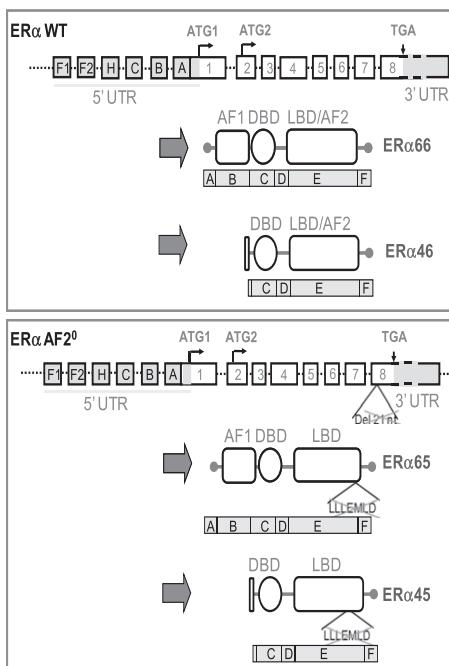
**ER $\alpha$ AF2 Is Necessary for the E2 Atheroprotective Effect.** We then explored the role of ER $\alpha$ AF2 in a second well-known vasculoprotective action of E2 (i.e., the prevention of atherosclerosis). We previously reported that ER $\alpha$ , but not its AF1, is necessary to induce the atheroprotective effect of E2 in vivo (24). To evaluate the role of ER $\alpha$ AF2 in this process, we bred ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  mice with LDL $r^{-/-}$  mice to compare ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  with ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$  ovarioectomized mice. Level of fatty streak deposit tended to be lower in ovarioectomized ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice compared with ovarioectomized ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$  mice. Interestingly, we previously reported that ovarioectomized ER $\alpha^{-/-}$  LDL $r^{-/-}$  also developed less lesion compared with ER $\alpha^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$  mice (21) and that deletion of ER $\alpha$  in the endothelium (using TieCRE+ER $\alpha$ lox/lox LDL $r^{-/-}$  mice) also had attenuated fatty streak deposit (20, 21). As expected, exogenous E2 significantly decreased fatty streak deposits at the aortic sinus in ovarioectomized 18-wk-old ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$  mice fed with an hypercholesterolemic diet (Fig. 5A and B and Table 1). In contrast, the atheroprotective effect of E2 was totally abrogated in ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice. Furthermore, E2 also decreased macrophage infiltration and collagen accumulation in ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$  but not in ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice (Fig. S3). Altogether, these results show the crucial role of ER $\alpha$ AF2 in the atheroprotective effect of E2.

To explore the potential mechanisms of the atheroprotective effect of estrogens downstream ER $\alpha$ , we assessed the expression of several key genes at the aorta level. First, we and others reported that E2 down-regulates vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, a key molecular actor of monocyte recruitment in atheroma (28, 29). We now show that this regulation by E2 is completely abolished in ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice (Fig. 6A). Second, we also show that E2 decreases intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, another important adhesion molecule, in LDL $r^{-/-}$  but not in ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice (Fig. 6B). Finally, O'Lone et al. (30) reported that two genes [i.e., Gremlin 2 and UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2 (Galnt2)] are among the most induced in the aorta from E2-treated mice. We now show that these genes are also highly induced by E2 in ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$  control mice (Fig. 6C and D) but not in ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice, showing thereby that ER $\alpha$ AF2 is crucial for this E2-mediated transcription (Fig. 6C and D).

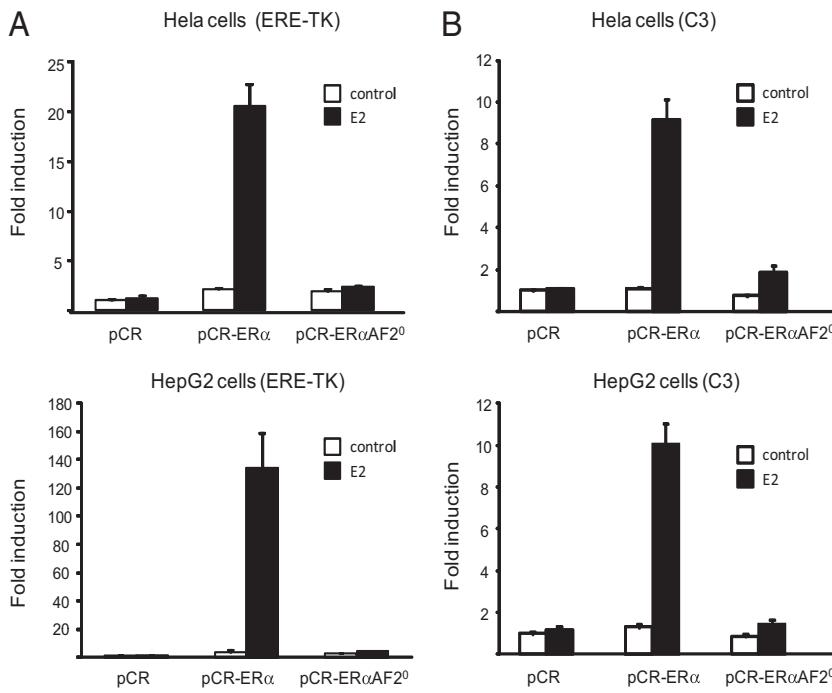
We also assessed the role of ER $\alpha$ AF2 in the lipid profile (Table 1). Total plasma cholesterol and HDL cholesterol as well as cholesterol on HDL cholesterol ratio were not influenced by the genotype in the absence of E2. As previously described (21), E2 decreased both total plasma cholesterol and HDL cholesterol fraction in ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  LDL $r^{-/-}$ , whereas this E2 effect is abolished in ER $\alpha$ AF2 $^0$  LDL $r^{-/-}$  mice (Table 1). However, the total cholesterol/HDL cholesterol ratio was similar in the four groups, whatever the genotype and treatment.

## Discussion

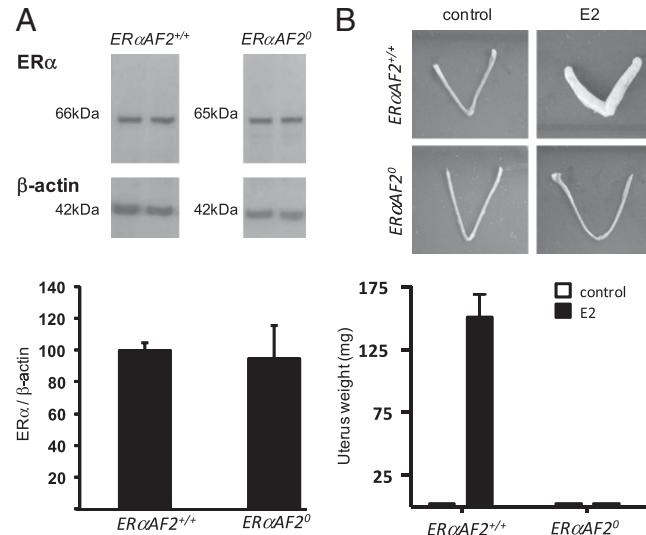
Based on structural and functional similarities, the sequences of nuclear receptors were divided into six functional domains designated A to F (31). The central well-conserved cysteine-rich C domain mediates DNA binding, and hormone lodges into a hydrophobic pocket located within the C-terminal E/F domains that constitute the ligand binding domain. Ligand-induced transcription involves the action of distinct AFs, which are located in the N-terminal A/B (AF1) and the C-terminal E/F (AF2) domains. The respective contributions that these AFs make to the activity of the full-length ER $\alpha$  are both promoter- and cell-specific (27, 32, 33). For instance, a maximal transcriptional activity of ER $\alpha$  can re-



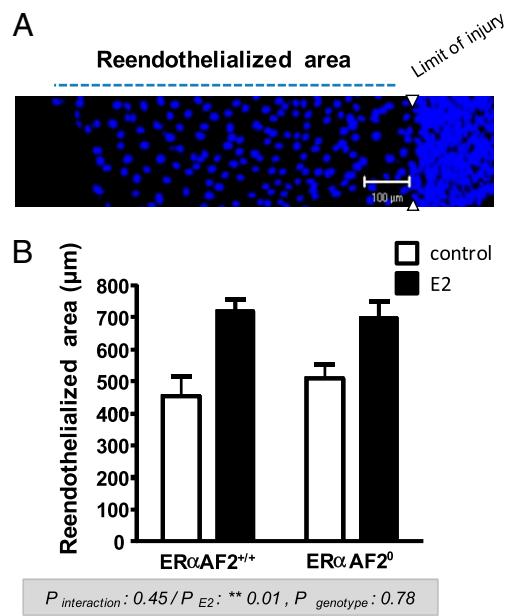
**Fig. 1.** Generation of ER $\alpha$ AF2 $^0$  null mutant mice. Schematic representation of the ER $\alpha$  gene: the transcripts and proteins expressed in WT mice (*Upper*) and mice with specific inactivation of the activation function AF2 in ER $\alpha$  (ER $\alpha$ AF2 $^0$  mutant mice; *Lower*).



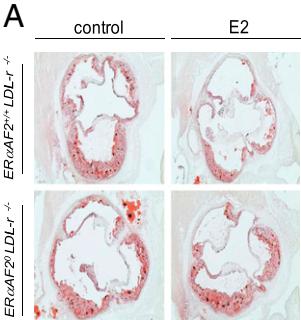
quire both AFs in some cells but only a specific AF in others. This finding suggests that ER $\alpha$  does not interact with the transcriptional machinery in an identical manner in all cells. Functional and physical links between ER $\alpha$  and the transcriptional machinery involve the sequential recruitment by ER $\alpha$  of a group of proteins, called coactivators, on the target promoter, on which they build large protein complexes (34). Structurally, these recruitments occur after ligand binding and induce specific conformational changes within the protein. Two classes of nuclear receptor coactivator complexes, directly interacting with AF2 in a ligand-dependent manner, have been identified. However, several of



them primarily identified as AF2-specific have now been shown to also interact with the N-terminal region of ER $\alpha$  and mediate AF1 activity (35–38). We recently reported the role of ER $\alpha$ AF1 in the E2 action on atherosclerosis and reendothelialization (24), but the role of ER $\alpha$ AF2 still remained unknown.



**Fig. 4.** ER $\alpha$ AF2 is dispensable for the effect of E2 on endothelial healing. (A) Representative en face confocal immunohistochemical analysis of the intima tunica of the carotid artery from an E2-treated mouse 72 h after surgery with designation of the regenerative endothelial area. Nuclei, stained with propidium iodide, appear in dark blue. (B) The effect of E2 was studied in the ER $\alpha$ AF2 $^{+/+}$  and ER $\alpha$ AF2 $^0$  ovariectomized mice. Quantification (mean  $\pm$  SEM) of the regenerative endothelial area was from an average of four mice per group. Analysis by a two-way ANOVA: effect of exogenous E2,  $P = 0.01$ ; effect of genotype, not significant ( $P = 0.78$ ); interaction, not significant ( $P = 0.45$ ).



**Fig. 5.** ER $\alpha$ AF2 is necessary for the effect of exogenous E2 on fatty streak deposit prevention in 18-wk-old mice. Four-week-old ovariectomized ER $\alpha$ AF2<sup>+/+</sup>LDL-r<sup>-/-</sup> and ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>LDL-r<sup>-/-</sup> mice were given either placebo or E2 (80  $\mu$ g/kg per d during 12 wk) and switched to an atherogenic diet from the age of 6–18 wk. (A) Representative micrographs of oil red-O lipid-stained cryosections of the aortic sinus. (B) Quantification of lesion area at the aortic sinus. Analysis was performed with a two-way ANOVA; because an interaction was observed between the two factors, effect of E2 treatment was studied in each genotype using a Bonferroni posttest ( $***P < 0.001$ ).

To assess the role of ER $\alpha$ AF2 in the vascular effects of estrogens in vivo, we have generated a targeted deletion of amino acids 543–549 in the helix 12 using a knock-in strategy in mouse (Fig. S1). We found that, although the expression of ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> mutant is quite similar to the WT in the uterus, the uterotrophic action of E2 is abolished in ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> mice, showing the crucial role of ER $\alpha$ AF2 in the E2-induced uterus hypertrophy (Fig. 3). Thus, it seems that, in addition to ER $\alpha$ AF1, AF2 is also required for the transcriptional mechanisms leading to the uterotrophic action of E2, underlining the complementarity action of the two AFs in this classic tissue target of E2. In addition, ER $\alpha$ AF2 was recently shown to be necessary for the beneficial effect of estrogens on bone, whereas the role of ER $\alpha$ AF1 is tissue-specific, with a crucial role in trabecular but not in cortical bone (39).

We then sought to explore the role of ER $\alpha$ AF2 on the acceleration of endothelial healing, a recognized vasculoprotective action of E2. Indeed, E2 was found to accelerate endothelial healing after vascular injury in several animal models such as rabbit, rat and mice (9, 18). We previously showed that this E2 action is mediated through ER $\alpha$  (18) but that ER $\alpha$ AF1 is dispensable (24). Here, we report that ER $\alpha$ AF2 is also dispensable to mediate the E2-induced accelerative effect (Fig. 4), raising the question as to which mechanism is involved in this action of E2. First, there could be a redundancy between ER $\alpha$ AF1 and AF2, a mechanism that is difficult to explore in vivo using the presently available genetic tools because of the difficulty in generating both AF1 and AF2 mutations on the same chromosome. Second, in

addition to the classic transcriptional actions mediated through ER $\alpha$ AF1 and/or AF2, E2 may also induce rapid nongenomic (MISS) actions involving the activation of a pool of ERs localized at the plasma membrane. Such nongenomic effects were essentially studied in cell culture models, such as endothelial cells, but also osteoblasts and breast cancer cell lines (reviewed in refs. 16 and 17). Chambliss et al. (40) recently provided evidence supporting the physiological relevance of this pathway in vascular pathophysiology using an estrogen-dendrimer conjugate, a selective estrogen receptor modulator that selectively activates non-nuclear ERs in vivo. Indeed, they showed that estrogen-dendrimer conjugate is able to accelerate reendothelialization using the same model of carotid electric injury as the model used in the present study. Thus, although we cannot exclude a possible redundancy between ER $\alpha$ AF1 and AF2, our present data may support the conclusion proposed by Chambliss et al. (40) (i.e., an important role of MISS in the E2 accelerative effect on endothelial healing).

Ovariectomy of *apoE*<sup>-/-</sup> or *LDL-r*<sup>-/-</sup> mice is followed by an increase in fatty streak lesion area, and exogenous E2 prevents the fatty streak deposit in both models (10). The atheroprotective effect of E2 is abolished in ER $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice in these two main models of atherosclerosis (20, 21). Moreover, we previously showed that ER $\alpha$ AF1 is dispensable to mediate the atheroprotective effect of estrogens (24). We now show that the atheroprotective action of E2 is abolished in ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> LDL-r<sup>-/-</sup> female mice (Fig. 5 and Table 1), showing the absolute requirement of ER $\alpha$ AF2 for this action.

Although these two major vasculoprotective effects of E2, namely atheroprotection and acceleration of endothelial healing, are clearly both mediated by ER $\alpha$ , our results show that they involve profoundly different cellular and molecular mechanisms. Indeed, we previously reported that ER $\alpha$  expression in both endothelial and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of E2 on reendothelialization (41), whereas ER $\alpha$  expression in the endothelial compartment is necessary to mediate the atheroprotective effect of E2 (21). We also previously published that FGF2 (42) and osteopontin (43) are absolutely necessary for the accelerative effect of E2 on endothelial healing. We found that these two cytokines are dispensable for the E2 atheroprotective effect (Table S1). Finally, this mechanistic divergence was also previously underlined at the level of the endothelial NO synthase, which was found to be required for the E2 action on endothelial healing (44) but not for atheroprotection (45).

Because ER $\alpha$ AF1 (24, 39) and ER $\alpha$ AF2 (39) are both required for the E2 uterotrophic action, we hypothesize that a SERM stimulating ER $\alpha$ AF2 with minimal activation of ER $\alpha$ AF1 would not stimulate uterus growth. Such a molecule should, however, retain protective effects on arteries and cortical bone (39). Altogether, these results could help to pave the way for the development of new SERMs that are urgently needed in regard to the lack of optimal treatment of menopause (46).

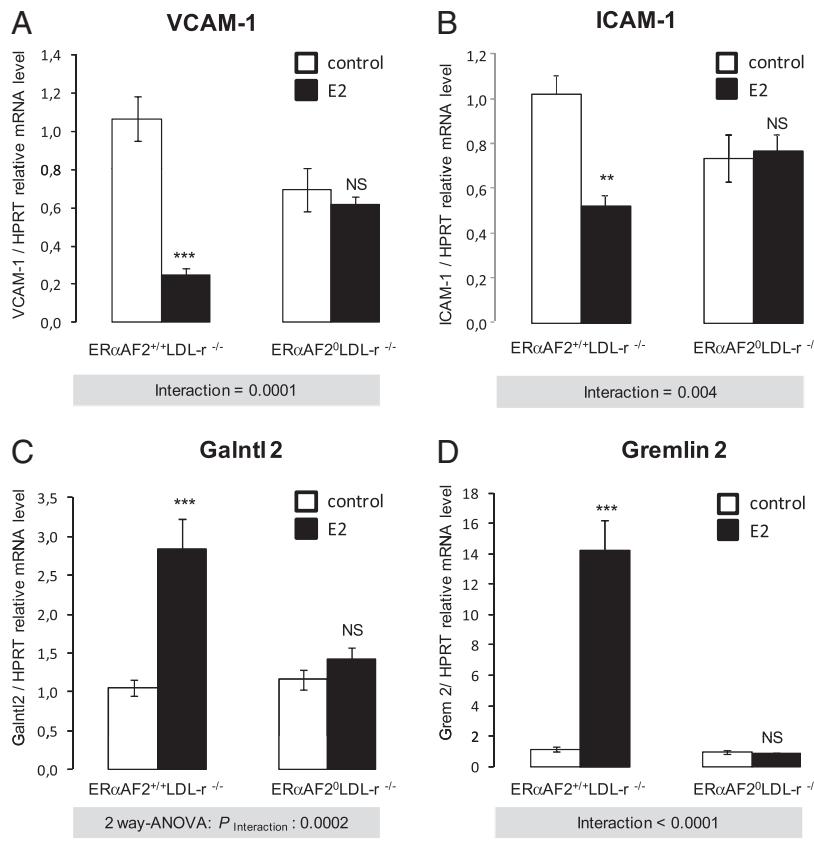
**Table 1.** Effect of E2 treatment on body weight, uterine weight, plasma lipid concentrations, and fatty streak lesion size on 18-wk-old AF2<sup>+/+</sup> LDL-r<sup>-/-</sup> and AF2<sup>0</sup> LDL-r<sup>-/-</sup> mice

	AF2 <sup>+/+</sup> LDL-r <sup>-/-</sup>		AF2 <sup>0</sup> LDL-r <sup>-/-</sup>		P (two-factor ANOVA)		
	Control (n = 9)	E2 (n = 6)	Control (n = 9)	E2 (n = 11)	Genotype	E2	Interaction
Body weight (g)	22.8 ± 0.6	22.4 ± 0.4	21.6 ± 0.5	23.1 ± 0.5	0.62	0.37	0.09
Uterine weight (mg)	<5	151 ± 18	<5	<5	—	—	—
Total cholesterol (mg/dL)	1,292 ± 153	732* ± 38	1,147 ± 120	1,167 ± 88			0.02
HDL cholesterol (mg/dL)	214 ± 19	143* ± 11	197 ± 10	198 ± 10			0.02
Cholesterol/HDL cholesterol	6.4 ± 11	5.1 ± 0.5	6.4 ± 0.8	5.9 ± 0.5	0.57	0.25	0.61
Triglycerides (mg/dL)	93.5 ± 11.4	84.6 ± 10.4	90.9 ± 8.4	93.0 ± 8.8	0.78	0.74	0.60
Lesion ( $\mu$ m <sup>2</sup> )	385,444 ± 32,280	118,783 <sup>†</sup> ± 12,100	253,226 ± 29,358	282,321 ± 20,466			<0.0001

Results are expressed as means ± SEM. To test the respective roles of E2 treatment and genotype, a two-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the two factors, the effect of E2 treatment was studied in each genotype using a Bonferroni posttest. ER $\alpha$ , estrogen receptor- $\alpha$ ; AF, activation function; E2, 17 $\beta$ -estradiol.

\* $P < 0.01$ .

<sup>†</sup> $P < 0.001$ .



**Fig. 6.**  $ER\alpha AF2$  is necessary for the effect of exogenous E2 on aorta gene regulation in vivo. Four-week-old ovariectomized  $ER\alpha AF2^{+/+} LDL-r^{-/-}$  and  $ER\alpha AF2^0 LDL-r^{-/-}$  mice were given either placebo or E2 (80  $\mu$ g/kg per d during 12 wk) and switched to an atherogenic diet from the age of 6–18 wk. VCAM-1 (A), ICAM-1 (B), UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2 (Galnt1 2) (C), and Gremlin 2 (D) mRNA levels from aortas were quantified by quantitative PCR and normalized to HPRT mRNA levels. Results are expressed according to the level in aortas from the  $ER\alpha AF2^{+/+} LDL-r^{-/-}$  set as one. Analysis was with a two-way ANOVA; because an interaction was observed between the two factors, effect of E2 treatment was studied in each genotype using a Bonferroni posttest (\*\*P < 0.001).

## Methods

**Mice.** All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and were approved by the local Animal Care and Use Committee. Mice (C57BL/6J strain) were housed in cages in groups of five and kept in a temperature-controlled facility on a 12-h light to dark cycle.  $ER\alpha AF2$ -deficient ( $ER\alpha AF2^0$ ) mice were generated as described and depicted in Fig. S1. WT littermates ( $ER\alpha AF2^{+/+}$ ) of the same age as the homozygous mutants were used as control. To generate the double-deficient mice,  $LDL-r^{-/-}$  mice, purchased from Charles River, were crossed with  $ER\alpha AF2^{+/+}$ . Heterozygous  $LDL-r^{-/-}ER\alpha AF2^{+/+}$  mice were used to generate  $LDL-r^{-/-}ER\alpha AF2^{+/+}$  mice, which were used as genitors.

Ovariectomy was performed at 4 wk of age, and concomitantly (for carotid artery injury), the mice received s.c. pellets releasing either placebo or E2 [0.1 mg, 60 d release (i.e., 80  $\mu$ g/kg per d); Innovative Research of America]. We systematically checked that placebo-treated ovariectomized mice had an atrophied uterus (<10 mg), nondetectable circulating levels of E2 (<5 pg/mL or <20 pM), and for those mice implanted with an E2-releasing pellet, a significant increase in uterine weight and serum E2 concentrations (100–150 pg/mL), irrespective of the genotype. In atherosclerosis experiments, mice were implanted with the first pellet at week 6, and then, a second pellet was implanted at week 14. At 6 wk of age, the mice were switched to an hypercholesterolemic diet (1.25% cholesterol, 6% fat, no cholate, TD96335; Harlan Teklad) until 18 wk.

**Transfection Assays.** HeLa and HepG2 cells were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS (Biowest) and antibiotics (Sigma-Aldrich) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Transfections were carried out using jetPEI reagent according to manufacturer's instructions (Polyplus). One day before transfection, cells were plated in 24-well plates at 50% confluence. One hour before transfection, the medium was replaced with phenol red-free DMEM (Sigma-Aldrich) containing 2.5% charcoal-stripped FCS (Biowest). Transfection was carried out with 100 ng C3-LUC or ERE-TK reporter genes, 100 ng CMV- $\beta$ Gal internal control, and 50 ng pCR, pCR- $ER\alpha$ , or pCR- $ER\alpha AF2^0$  expression vectors. After an overnight incubation, cells were treated for 24 h with E2 (10 nM) or ethanol (vehicle control). Cells were then harvested, and luciferase and  $\beta$ -galactosidase assays were performed as previously described (47).

**Western Blot Analysis.** Dissected uteri were homogenized using a Qiagen Tissue Lyser (Qiagen) in lysis buffer [20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, pH 8, 20 mM NaF, proteinase inhibitors (complete EDTA-free; Roche), 1 mM PMSF, 2 mM orthovanadate], sonicated, and centrifuged at 13,000  $\times g$  for 10 min at 4 °C; 20  $\mu$ g protein of the supernatant were separated by SDS/PAGE (10%) and transferred onto a nitrocellulose membrane. Blocking (1 h at room temperature) and incubation with primary rabbit anti-mouse  $ER\alpha$  antibody (o/n, 4 °C, 04-820; Millipore) and secondary antibody (1 h at room temperature, goat HRP-conjugated anti-rabbit IgG; Cell Signaling Technology) were done in Tris-Buffered Saline Tween 20 containing 3% dry milk. ECL West Pico (Pierce) was used to reveal signals.

**Morphometric and Immunohistochemical Analyses of Fatty Streak Lesions.** Fatty streak lesion size was estimated at the aortic sinus as previously described (10). Counter coloration was carried out using Mayer's hemalum. At least six sections per animal were analyzed for each staining.

**Determination of Serum Lipids.** Overnight fasted mice were anesthetized, and samples were collected from the retro-orbital venous plexus. Total plasma cholesterol was assayed using the CHOD-PAD kit (Horiba). The HDL fraction was isolated from 10  $\mu$ L serum and assayed using the C-HDL + third generation kit (Roche).

**Mouse Carotid Injury and Quantification of Reendothelialization.** The carotid electric injury was performed as previously described (18). Briefly, surgery was carried out with a stereomicroscope (SMZ800; Nikon), and the left common carotid artery was exposed through an anterior incision in the neck. The electric injury was applied to the distal part (4 mm precisely) of the common carotid artery with a bipolar microregulator. Three days postinjury, carotid arteries were stained with propidium iodide, and preparations were mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck). Microscopy imagery was performed on a ZEISS LSM 510 confocal microscope, and quantification was performed with ZEISS LSM 510 software. The reendothelialized area was scanned with special emphasis on endothelial cells (z stacks of about 1.5  $\mu$ m). The lengths of the reendothelialized area are means of at least 10 measures of endo-

thelial cells that have maximal migration from the line of injury spanning the carotid obtained with the software ZEISS LSM image Borswer v.3.1 (48).

**Analysis of mRNA Levels by Quantitative RT-PCR.** Dissected aortas were homogenized using a Precellys tissue homogenizer (Bertin Technology), and total RNA from tissues was prepared using TRIzol reagent (Invitrogen). One microgram was reverse-transcribed for 10 min at 25 °C and 2 h at 37 °C in a 20 µL final volume using the High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCRs were performed on stenope (Applied Biosystem). Primers were validated by testing PCR efficiency using standard curves (95% ≤ efficiency ≤ 105%). Gene expression was quantified using the comparative Ct (threshold cycle) method, and hypoxanthinephosphoribosyltransferase was used as reference.

**Statistical Analyses.** Results are expressed as means ± SEM. To test the respective roles of E2 treatment and genotype (ER $\alpha$ AF2 deficiency), a two-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the

two factors, the effect of E2 treatment was studied in each genotype using a Bonferroni posttest. A value of  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

**ACKNOWLEDGMENTS.** The staffs of the animal facilities (C. Evra) and the Plateforme d'expérimentation fonctionnelle (A. Desquesnes) are acknowledged for skillful technical assistance. We also thank Mrs. M. J. Fouque and Mr. J. C. Alboys for technical support. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1048 by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Toulouse III and Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil, the Agence Nationale de la Recherche (Endoth-ER-E2), the Fondation de France, the Conseil Régional Midi-Pyrénées, the Société and the Fondation Française de Cardiologie and the Fondation Coeur et Artère, and the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire by the European project EWA (Estrogen in Women Aging Contract LSHM-CT-2005-518245). A.A. was supported by a grant from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire.

1. Kalin MF, Zumoff B (1990) Sex hormones and coronary disease: A review of the clinical studies. *Steroids* 55:330–352.
2. Dubey RK, Imthurn B, Barton M, Jackson EK (2005) Vascular consequences of menopause and hormone therapy: Importance of timing of treatment and type of estrogen. *Cardiovasc Res* 66:295–306.
3. Grodstein F, et al. (1996) Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 335:453–461.
4. Mikkola TS, Clarkson TB (2002) Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* 53:605–619.
5. Arnal JF, et al. (2010) Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1506–1512.
6. Rossouw JE, et al. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321–333.
7. Anderson GL, et al. (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: The Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291:1701–1712.
8. Rossouw JE, et al. (2007) Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 297:1465–1477.
9. Krasinski K, et al. (1997) Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95:1768–1772.
10. Elhage R, et al. (1997) 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2679–2684.
11. Rosenfeld ME, et al. (2002) Estrogen inhibits the initiation of fatty streaks throughout the vasculature but does not inhibit intra-plaque hemorrhage and the progression of established lesions in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 164:251–259.
12. Stevenson JC (2009) Type and route of estrogen administration. *Climacteric* 12(Suppl 1):86–90.
13. Ascenzi P, Bozedi A, Marino M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: Impact on human health. *Mol Aspects Med* 27:299–402.
14. Tora L, et al. (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477–487.
15. Métivier R, Penot G, Flouriot G, Pakdel F (2001) Synergism between ER $\alpha$  transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: Requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 15:1953–1970.
16. Levin ER (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19:1951–1959.
17. Kim KH, Bender JR (2009) Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 308:3–8.
18. Bouchet L, et al. (2001) Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* 103:423–428.
19. Pare G, et al. (2002) Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 90:1087–1092.
20. Hodgin JB, et al. (2001) Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe-/ mice. *J Clin Invest* 107:333–340.
21. Billon-Galés A, et al. (2009) Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 120:2567–2576.
22. Dupont S, et al. (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127:4277–4291.
23. Pendares C, et al. (2002) The AF-1 activation-function of ER $\alpha$  may be dispensable to mediate the effect of estradiol on endothelial NO production in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2205–2210.
24. Billon-Galés A, et al. (2009) The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2053–2058.
25. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11:1025–1033.
26. Mérot Y, et al. (2004) The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem* 279:26184–26191.
27. Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9:2811–2818.
28. Gourdy P, et al. (2003) The atheroprotective effect of 17 beta-estradiol is not altered in P-selectin- or ICAM-1-deficient hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis* 166:41–48.
29. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G (1999) Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo : Possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res* 85:377–385.
30. O'Lone R, et al. (2007) Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* 21:1281–1296.
31. Green S, et al. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: Sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134–139.
32. Tzukerman MT, et al. (1994) Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8:21–30.
33. Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P (1995) Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* 270:9535–9542.
34. McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465–474.
35. Webb P, et al. (1998) Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol* 12:1605–1618.
36. Onate SA, et al. (1998) The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 273:12101–12108.
37. Benecke A, Chambon P, Gronemeyer H (2000) Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep* 1:151–157.
38. Kobayashi Y, et al. (2000) p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem* 275:15645–15651.
39. Borjesson AE, et al. (2011) Roles of transactivating functions 1 and 2 of estrogen receptor-alpha in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:6288–6293.
40. Chambliss KL, et al. (2010) Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest* 120:2319–2330.
41. Toutain CE, et al. (2009) Estrogen receptor alpha expression in both endothelium and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of estradiol on reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1543–1550.
42. Fontaine V, et al. (2006) Essential role of bone marrow fibroblast growth factor-2 in the effect of estradiol on reendothelialization and endothelial progenitor cell mobilization. *Am J Pathol* 169:1855–1862.
43. Leen LL, et al. (2008) Estrogen-stimulated endothelial repair requires osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2131–2136.
44. Billon A, et al. (2008) The estrogen effects on endothelial repair and mitogen-activated protein kinase activation are abolished in endothelial nitric-oxide (NO) synthase knockout mice, but not by NO synthase inhibition by N-nitro-L-arginine methyl ester. *Am J Pathol* 172:830–838.
45. Hodgin JB, Knowles JV, Kim HS, Smithies O, Maeda N (2002) Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *J Clin Invest* 109:541–548.
46. Lenfant F, Trémolières F, Gourdy P, Arnal JF (2011) Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: Why protective early, and not when delayed? *Maturitas* 68:165–173.
47. Penot G, et al. (2005) The human estrogen receptor-alpha isoform hER $\alpha$ 46 antagonizes the proliferative influence of hER $\alpha$ 46 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:5474–5484.
48. Filipe C, et al. (2008) Estradiol accelerates endothelial healing through the retrograde commitment of uninjured endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2822–H2830.

# Supporting Information

Billon-Galés et al. 10.1073/pnas.1105632108

## SI Text

**Fig. S1: Schematic Representation of the Strategy Used to Generate Estrogen Receptor- $\alpha$  Activation Function 2 Null Mutants Mice.** Mouse estrogen receptor- $\alpha$  (mER $\alpha$ ) genomic clones were isolated by screening a 129/Sv ES cell DNA library with an mER $\alpha$  cDNA probe (nucleotides 177–2007) (1). A genomic 16-kb NotI fragment, containing the mER $\alpha$  exons 7 and 8 sequences, was identified with the cDNA probe encoding amino acids 539–552 (nucleotides 1805–1846). A motif essential for the transcriptional activation function 2 (AF2) present in the E region of ER $\alpha$  (exon 8) has been previously characterized as an amphipathic  $\alpha$ -helix, and its main features are conserved between transcriptionally active members of the nuclear receptor family (2, 3). We generated the targeting vector XhoI-KpnI encoding the amino acids LLLEMLD motif (nucleotides 1817–1837 and amino acids 543–549) (1). We isolated and subcloned the EcoRI fragment into the Bluescript II plasmid and performed the deletion of the LLLEMLD motif by PCR-based site-directed mutagenesis using primers P1 (5'-ctctacaacatgaaatgcagaacgtgtggccctatgagccccac-gcccttcatccccagccatgcgtggagg-3') and P2 (5'-cactccatgcact-ggctggggataggcggtggcgcatagagggcacaacgtctgcatttcatgttgat-gag-3'; nucleotides 1775–1816 and 1838–1876 and amino acids 529–542 and 550–562) (1). We reconstituted the XhoI-KpnI targeting vector and checked the success of the mutation by sequencing. The TKneo cassette from pHR56<sup>−</sup> (4) was cloned into the PshAI site. The 8-kb XhoI-KpnI fragment of the targeting vector was electroporated into 129/SvPas H1 ES cells (5), and G418 neomycin-resistant clones were expanded (6). ES cells containing a targeted ER $\alpha$ AF2 allele were identified by Southern blot analysis of BamHI- or XhoI-digested ES cell genomic DNA using 5' (P5': 5'-atgaattcgagggcaagtggaggatggag-3' and 5'-taaagtttccctt-ggagggacagagaga-3') and 3' (P3': 5'-atgaattctggtaaagaatccaggatgg-at-3' and 5'-taaagcttcactacggagactgaaac-3') external probes. The expected sizes of DNA fragments are given in the table. Targeted ES cells were injected into C57BL/6 blastocysts and implanted into pseudopregnant mice hosts of the same strain. Chimeric males were obtained that transmitted the mutation through crosses with C57BL/6 females, yielding heterozygous ER $\alpha$ AF-2<sup>+/−</sup> mice. Then, ER $\alpha$ AF-2<sup>+/−</sup> mice were bred with homozygous CMV-Cre transgenic mice (7) to delete the selectable marker. Inbreeding of ER $\alpha$ AF-2<sup>+/−</sup> mice yielded ER $\alpha$ AF-2<sup>−/−</sup> (also designated as ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> or ER $\alpha$ AF-2 KO) mice homozygous for the deletion of the transactivating function 2 core motif. Genotyping on tail biopsy DNA was performed by PCR using primers A1 (5'-atgaattttaatagttaaaaatgact-3') and A2 (5'-gatccctttgcctgtccc-3'). The size of the A1-A2 fragment from the WT allele is 355 bp, and the size of the fragment from the ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> allele is 313 bp.

- White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M (1987) Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1:735–744.
- Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG (1992) Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11:1025–1033.
- Durand B, et al. (1994) Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: Presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J* 13:5370–5382.
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6991–6995.
- Dierich AD, Dollé P (1997) Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods in Development Biology/Toxicology*, eds Klug S, Thiel R (Blackwell, Oxford), pp 111–123.

Male and female ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> are infertile, and ER $\alpha$ AF2<sup>+/−</sup> mice were used as parental progenitors. The litter sizes from this cross are normal, and offspring are produced with equal sex frequency.

**Fig. S2: ER $\alpha$ AF1 Activity Is Preserved in the ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> Mutant.** HepG2 cells were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS (Biowest) and antibiotics (Sigma-Aldrich) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Transfections were carried out using jetPEI reagent according to manufacturer's instructions (Polyplus). One day before transfection, cells were plated in 24-well plates at 50% confluence. One hour before transfection, the medium was replaced with phenol red-free DMEM (Sigma-Aldrich) containing 2.5% charcoal-stripped FCS (Biowest). Transfection was carried out with 100 ng C3-LUC reporter gene, 100 ng CMV- $\beta$ Gal internal control, and 50 ng pCR, pCR-ER $\alpha$ , pC-ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup> (pCR hER $\alpha$ 46) (8), or pC-ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> expression vectors. After an overnight incubation, cells were treated for 24 h with 4-hydroxytamoxifen (2 μM) or vehicle (control). Cells were then harvested, and luciferase and  $\beta$ -galactosidase assays were performed as previously described (8).

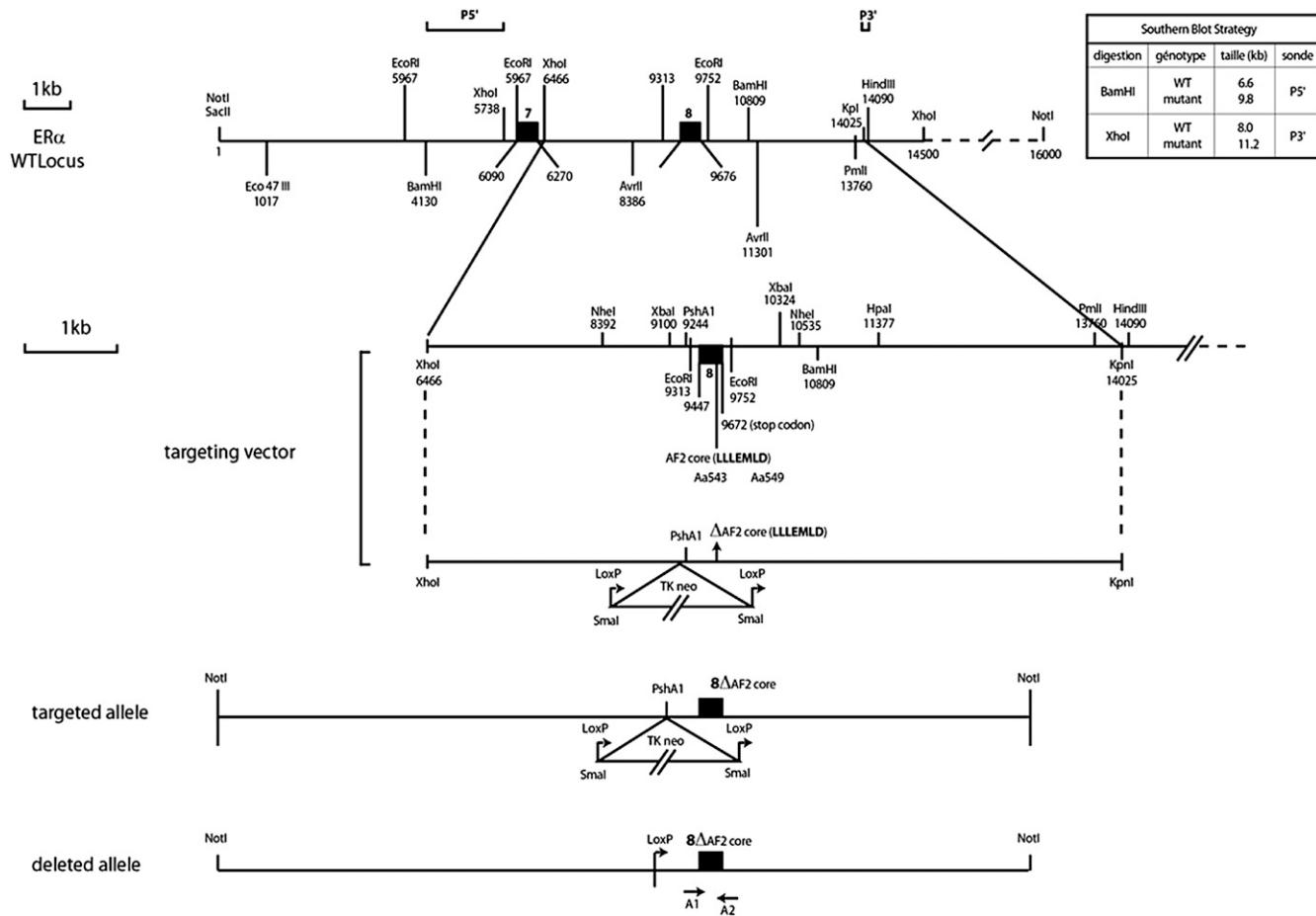
**Fig. S3: ER $\alpha$ AF2 Is Necessary for the Effect of Exogenous E2 on Atherosclerosis Prevention in 18-Wk-Old Mice.** Four-week-old ovariectomized ER $\alpha$ AF2<sup>+/+</sup> LDL-r<sup>−/−</sup> and ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> LDL-r<sup>−/−</sup> mice were given either placebo or 17 $\beta$ -estradiol (E2; 80 μg/kg per d for 12 wk) and were switched to atherogenic diet from the age of 6–18 wk. For immunohistochemical staining of macrophages, a rat polyclonal anti-CD68 antibody (117–5521; AbCys) was used. Collagen fibers were stained with Sirius red. Quantification (mean ± SEM) was performed for CD68 and Sirius red-positive staining areas at the aortic sinus. A two-way ANOVA factor indicated an interaction between E2 treatment and genotype (\*\*P < 0.0001), and the protective action of E2 was present only in ER $\alpha$ AF2<sup>+/+</sup> LDL-r<sup>−/−</sup> mice (\*\*P < 0.0001).

**Table S1: FGF2 and Osteopontin Are Absolutely Necessary for the Accelerative Effect of E2 on Endothelial Healing but Dispensable for the E2 Atheroprotective Effect.** Mice were ovariectomized at 4 wk and implanted or not with s.c. pellets releasing E2 (9, 10) at 0.1 mg for a 60-d release (i.e., 80 μg kg<sup>−1</sup>d<sup>−1</sup>; Innovative Research of America). The results are expressed as means ± SEM.

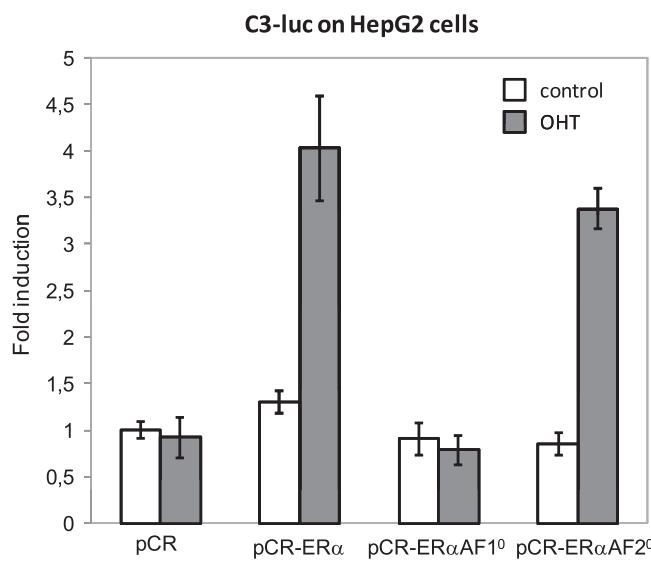
E2 treatment affects uterine weight and fatty streak lesion size in 24-wk-old osteopontin (OPN)<sup>−/−</sup>apoE<sup>−/−</sup> and FGF2<sup>−/−</sup>apoE<sup>−/−</sup> mice.

E2 treatment affects uterine weight and endothelialized area on OPN<sup>−/−</sup> and FGF2<sup>−/−</sup> mice. E2 treatment was initiated 2 wk before carotid injury and continued until the sacrifice.

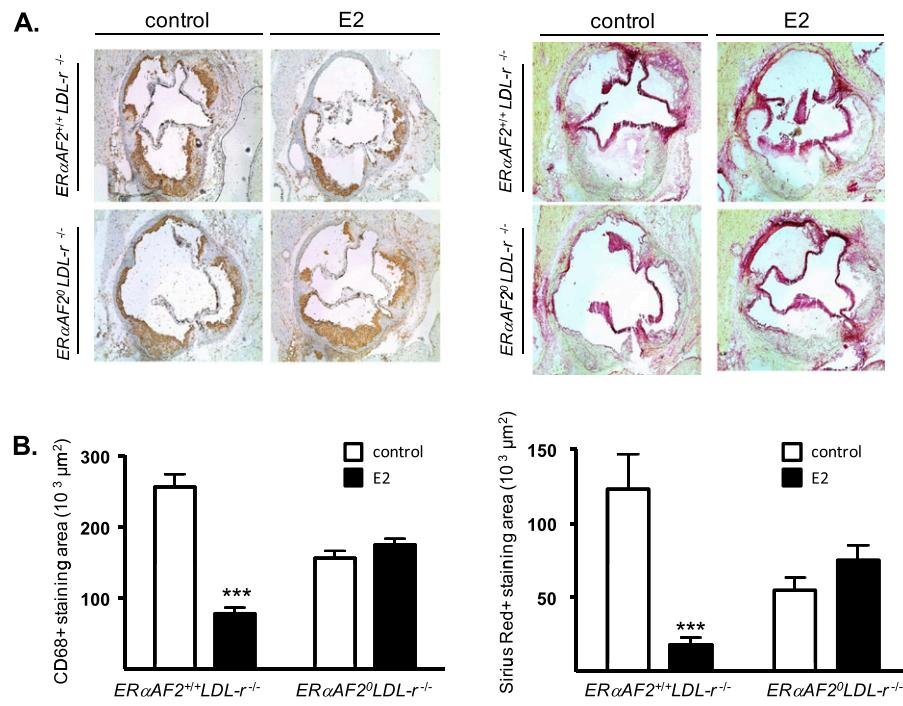
- Lufkin T, Dierich A, LeMeur M, Mark M, Chambon P (1991) Disruption of the Hox-1.6 homeobox gene results in defects in a region corresponding to its rostral domain of expression. *Cell* 66:1105–1119.
- Dupé V, et al. (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124:399–410.
- Penot G, et al. (2005) The human estrogen receptor-alpha isoform hER $\alpha$ 46 antagonizes the proliferative influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:5474–5484.
- Fontaine V, et al. (2006) Essential role of bone marrow fibroblast growth factor-2 in the effect of estradiol on reendothelialization and endothelial progenitor cell mobilization. *Am J Pathol* 169:1855–1862.
- Leen LL, et al. (2008) Estrogen-stimulated endothelial repair requires osteopontin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2131–2136.



**Fig. S1.** Schematic representation of the strategy used to generate estrogen receptor- $\alpha$  activation function 2 null mutants mice.



**Fig. S2.** ER $\alpha$ AF1 activity is preserved in the ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> mutant.



**Fig. S3.** *ER $\alpha$ AF2* is necessary for the effect of exogenous E2 on atherosclerosis prevention in 18-wk-old mice.

**Table S1.** FGF2 and osteopontin are absolutely necessary for the accelerative effect of E2 on endothelial healing but dispensable for the E2 atheroprotective effect

	Placebo	E2	Placebo	E2
Uterine weight (mg)	<5	123 ± 17*	<5	182 ± 37*
Percent atherosclerotic lesion vs. placebo	100 ± 12	46.6 ± 8.3*	100 ± 9.3	39.9 ± 9.9*
OPN <sup>-/-</sup> apoE <sup>-/-</sup>			OPN <sup>-/-</sup>	FGF2 <sup>-/-</sup>
Uterine weight (mg)	<5	148 ± 13*	<5	141 ± 12*
Endothelialized area (percent of carotid area)	25.0 ± 2.9	26.1 ± 1.9	22.8 ± 1.9	21.7 ± 2.0

# Correction of RT-qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime

Henrik Laurell<sup>1,\*</sup>, Jason S. Iacovoni<sup>1</sup>, Anne Abot<sup>1</sup>, David Svec<sup>2,3</sup>, Jean-José Maoret<sup>1,4</sup>, Jean-François Arnal<sup>1,5</sup> and Mikael Kubista<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm/Université Paul Sabatier UMR1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France, <sup>2</sup>Laboratory of Gene Expression, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, <sup>3</sup>TATAA Biocenter AB, Göteborg, Sweden, <sup>4</sup>Plateforme GeT (Génome et Transcriptome) du Génopole Toulouse, Toulouse, France and <sup>5</sup>Faculté de Médecine, Université de Toulouse III and CHU de Toulouse

Received September 17, 2011; Revised November 21, 2011; Accepted December 5, 2011

## ABSTRACT

**Genomic DNA (gDNA) contamination is an inherent problem during RNA purification that can lead to non-specific amplification and aberrant results in reverse transcription quantitative PCR (RT–qPCR). Currently, there is no alternative to RT(–) controls to evaluate the impact of the gDNA background on RT-PCR data. We propose a novel method (ValidPrime) that is more accurate than traditional RT(–) controls to test qPCR assays with respect to their sensitivity toward gDNA. ValidPrime measures the gDNA contribution using an optimized gDNA-specific ValidPrime assay (VPA) and gDNA reference sample(s). The VPA, targeting a non-transcribed locus, is used to measure the gDNA contents in RT(+) samples and the gDNA reference is used to normalize for GOI-specific differences in gDNA sensitivity. We demonstrate that the RNA-derived component of the signal can be accurately estimated and deduced from the total signal. ValidPrime corrects with high precision for both exogenous (spiked) and endogenous gDNA, contributing ~60% of the total signal, whereas substantially reducing the number of required qPCR control reactions. In conclusion, ValidPrime offers a cost-efficient alternative to RT(–) controls and accurately corrects for signals derived from gDNA in RT-qPCR.**

## INTRODUCTION

Accurate gene expression analysis by reverse transcription (RT) quantitative PCR (qPCR) requires assays with high specificity for the target cDNA/reference gene, collectively

referred to herein as the Gene-Of-Interest (GOI). It is important to have negligible signal contribution from experimental artifacts, such as primer-dimers and contaminating genomic DNA (gDNA). Traditionally, primer-dimer formation is tested using a ‘no template control’ (NTC) and gDNA contamination levels are measured with RT(–) controls [which differ from regular RT(+) reactions in that no reverse transcriptase is added]. Contamination of gDNA is an inherent problem during RNA purification due to the similar physicochemical properties of RNA and DNA. Since gDNA contamination levels are frequently not uniform between samples (1) and the sensitivity toward gDNA differs greatly between GOI assays, RT(–) controls are needed for each sample/assay pair, which substantially adds to the cost and labor in RT-qPCR profiling studies. A difference of at least five quantification cycles ( $C_q$ ) between RT(+) and RT(–) reactions indicates that <3% of the total signal originates from gDNA, and is commonly used as limit to ensure accurate estimation of GOI expression. Smaller differences typically call for DNase treatment of samples.

The accuracy of gDNA background estimation, as measured with RT(–) reactions, is compromised due to the fact that GOI assays, designed to amplify target transcripts, are used even though they are not optimized for gDNA amplification. Furthermore, intrinsic characteristics of RT(–)-qPCRs that influence the result of the correction, such as amplification efficiencies, are difficult to assess. In addition, as proposed theoretically (2) and shown experimentally (3,4), a low initial number of target molecules leads to a large variability between replicates, mainly due to stochastic effects. All together, this explains the low reproducibility frequently observed in RT(–) reactions.

The qPCR assays can be either gDNA sensitive or insensitive. Whereas qPCR assays can be designed to be

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 561323128; Fax: +33 561322141; Email: henrik.laurell@inserm.fr

gDNA insensitive, such as those designed to target exons flanking a long intron or with primers that cross exon-exon junctions, qPCR assays for single-exon genes will readily amplify contaminating gDNA. The gDNA background signal is even further amplified in the presence of multiple genomic copies or pseudogenes. The latter are particularly troublesome since they may originate from retrotransposons without introns that are amplified even with intron-spanning assays. Thus, there exists both variation in the degree of contamination between samples and large differences between assays in terms of their sensitivity to gDNA. Therefore, general methods of controlling and correcting for gDNA contamination are essential for accurate measurements of gene expression.

As an alternative to RT(–) reactions, we have developed a procedure that determines the impact of the gDNA contamination on the measured signal much more accurately and allows validation of qPCR primers with respect to their sensitivity toward gDNA. We show in proof-of-principle experiments that efficient background correction can be performed with gDNA contamination representing ~60% of the total signal.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

All samples were from mouse (C57Bl/6J) tissues (kidney, liver, adipose tissue, uterus, peritoneal macrophages). All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (Inserm) and were approved by the local Animal Care and Use Committee. Prior to sampling, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine ( $100\text{ mg kg}^{-1}$ ) and xylazine ( $10\text{ mg kg}^{-1}$ ). Tissues were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Isolation of peritoneal macrophages has been described elsewhere (5). Macrophages were in some cases treated with 20 ng/ml LPS *ex vivo* for 4 h prior to RNA extraction.

### DNA extraction

C57Bl/6J mouse gDNA was extracted from whole blood using the PerfectPure DNA Blood Cell Kit, according to the recommended protocol (5'PRIME GmbH, Hamburg, Germany). Good results were also obtained with gDNA purified from mouse tails by phenol/chloroform extraction after Proteinase K digestion (6). The DNA concentration was determined spectroscopically (NanoDrop).

### RNA extraction

Total RNA was extracted using a double purification protocol. Briefly, TRIreagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA) was added to the frozen tissue sample, which was homogenized in a Precellys 24 homogenizer (Bertin Technologies, France). After the extraction step, the supernatant was gently mixed with 1 Vol 70% ethanol and applied on a total RNA miniprep Genelute column, where it was washed and eluted following the instructions from the manufacturer (Sigma-Aldrich). The integrity and

quality of the RNA was tested by capillary microelectrophoresis [MultiNA (Shimadzu) or Experion (BioRad)] and spectrophotometrically (NanoDrop). A fraction of the RNA was DNase treated using the DNasefree kit from Ambion. To avoid inhibition of the reverse transcriptase, the volume of DNase treated RNA did not exceed 25% of the total volume during RT.

### RT

Total RNA ( $1.0\text{--}5.0\text{ }\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed in  $20\text{--}50\text{ }\mu\text{l}$  using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) using random hexamers. The reaction mixture was incubated for 10 min at  $25^{\circ}\text{C}$ , 120 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and finally for 5 min at  $85^{\circ}\text{C}$ , according to instructions from the manufacturer (Applied Biosystems). RT reactions were diluted 5–10-fold prior to qPCR.

### Real-time qPCR

*Conventional qPCR.* All reactions (except when indicated) were performed in duplicate  $10\text{ }\mu\text{l}$  volumes using 20 ng reverse transcribed total RNA in a StepOnePlus system (Applied Biosystems) with the SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) and an assay concentration of 300 nM using the cycling parameters:  $95^{\circ}\text{C}$  (20 s) followed by 40 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  (3 s) and  $60^{\circ}\text{C}$  (20 s). Melting curve analysis:  $95^{\circ}\text{C}$  (15 s);  $60^{\circ}\text{C}$  (60 s) and a progressive increase up to  $95^{\circ}\text{C}$  ( $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Analysis of the data was performed with the StepOne software v.2.2.

*High-throughput qPCR.* The 96.96 Dynamic Arrays for the microfluidic BioMark<sup>TM</sup> system (Fluidigm Corporation, CA, USA) (7) were used to study gene expression in 6.5 ng cDNA from mouse peritoneal macrophages or mouse uterus, as described below.

*Specific target amplification.* Pre-amplification of cDNA (produced from 25 to 65 ng of total RNA) was performed in the StepOnePlus cycler (Applied Biosystems) [at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min activation step followed by 14 cycles:  $95^{\circ}\text{C}$ , (15 s),  $60^{\circ}\text{C}$ , (4 min)] in a total volume of  $5\text{ }\mu\text{l}$  in the presence of all primers at a concentration of 50 nM. After pre-amplification, 20  $\mu\text{l}$  Low EDTA TE Buffer [10 mM Tris pH8 (Ambion), 0.1 mM EDTA pH8 (Sigma)] was added to each sample.

*Sample Mix for BioMark analysis.* The pre-sample mix contained 66.7% 2X Taqman<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), 6.67% 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm), 6.67% 20X EvaGreen<sup>TM</sup> (Biotium), 20% Low EDTA TE Buffer. Sample mix was obtained by mixing 5.6  $\mu\text{l}$  of the pre-sample mix with 1.9  $\mu\text{l}$  of diluted cDNA.

*Assay Mix.* A quantity of 3.8  $\mu\text{l}$  2X Assay Loading Reagent (Fluidigm) and 1.9  $\mu\text{l}$  Low EDTA TE Buffer were mixed with 1.9  $\mu\text{l}$  of primers (20  $\mu\text{M}$  of each forward and reverse primer).

*qPCR conditions.* After priming of the 96.96 Dynamic Array in the NanoFlex<sup>TM</sup> 4-Integrated Fluidic Circuits

(IFC) Controller (Fluidigm), 5 µl of each sample and 5 µl of each assay mix were added to dedicated wells. The dynamic array was then placed again in the IFC Controller for loading and mixing under the following conditions: 50°C (2 min); 70°C (30 min) and 25°C (10 min). The loaded Dynamic Array was transferred to the BioMark™ real-time PCR instrument. After initial incubation at 50°C (2 min) and activation of the Hotstart enzyme at 95°C (10 min) cycling was performed using 95°C (15 s), and 60°C (1 min) for 35 cycles, followed by melting curve analysis (1°C/3 s).

**Data analysis.** Initial data analysis was performed with the Fluidigm real-time PCR analysis software v. 3.0.2 with linear derivative baseline correction and a quality correction set to 0.65.

### Design of ValidPrime assays

Intergenic regions in the mouse genome with no known transcriptional activity were selected using the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>). In total, 30 assays targeting 10 different regions on 5 chromosomes were designed using PrimerBlast (NCBI). Amplification efficiencies were determined with a dilution series of gDNA (50–5000 haploid genome copies). PCR products were analyzed for purity by recording melting curves and by capillary micro-electrophoresis (MultiNA, Shimadzu), leading to the selection of five assays for limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) determination.

### LOD and LOQ determination of ValidPrime assays

Five assays were selected for determination of LOD and LOQ using eight concentrations (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 copies) in the presence of 50 ng/µl carrier yeast tRNA (Roche Molecular Biochemicals). Sequence information for the two best candidates, in terms of sensitivity and specificity, is provided in Supplementary Table S1. Except when stated otherwise, mVPA1 was used as the VPA.

### GOI assay design and validation

Non-commercial GOI assays were either taken from previously published studies (5,8,9) or designed with the Primer-BLAST utility at NCBI. Sequences are reported in Supplementary Table S1. Specificity was evaluated by BLAST (mouse RefSeq database) during design and by *in silico* PCR (UCSC Genome Browser). Amplification efficiencies were evaluated in the BioMark system on dilutions series of both cDNA and gDNA.

### Exogenous gDNA spiking experiments

Quantities ranging from 50 to 5000 haploid genome copies (corresponding to 0.15–15 ng gDNA) or water were added to 20 ng (StepOnePlus) or 6.5 ng (BioMark) cDNA. Non-spiked samples had low, but detectable gDNA levels. For the BioMark runs, the gDNA was added prior to the pre-amplification step. Genome copy number calculations were based on the NCBI m37 assembly of the C57Bl/6 mouse genome (2 716 965 481 bp) assuming an average molecular weight of 660 g/mol/bp.

The mass of a haploid mouse genome was thus estimated to be 2.98 pg.

### Data analysis and statistics

$Cq_{DNA}$ ,  $Cq_{RNA}$  and %DNA were calculated using the gh-validprime software (<https://code.google.com/p/gh-validprime>). The GenEx software (v.5.3, [www.multID.se](http://www.multID.se)) was used for one-way ANOVA analysis and to calculate LOD. Data are presented as mean ± SD.

## RESULTS

### The ValidPrime method

We developed ValidPrime to estimate and correct for gDNA contribution in RT(+)–qPCR measurements in a more reliable manner than that afforded by RT(–) controls. We refer to the signal measured in an RT(+)–qPCR as  $Cq_{NA}$  (NA : Nucleic Acids) [Equation (1)], indicating contributions from RNA ( $Cq_{RNA}$ ) as well as gDNA ( $Cq_{DNA}$ ) as shown in Equation (2), expressed in relative quantities.

$$Cq_{RT+} = Cq_{NA} \quad (1)$$

$$2^{-Cq_{NA}} = 2^{-Cq_{RNA}} + 2^{-Cq_{DNA}} \quad (2)$$

Traditionally, determination of the RNA component using RT(–) controls would be achieved using Equation (3). However, as detailed in the introduction, low reproducibility and other factors detract from the accuracy of this approach. We propose that Equation (4), derived in Supplementary Figure S1A, provides an accurate solution provided that  $Cq_{DNA}$  is estimated using ValidPrime, Equation (5), in which GOI refers to any transcribed ‘GOI’, including reference genes, studied in a RT–qPCR experiment.  $Cq_{RNA}$  and  $Cq_{DNA}$  refer to the signal contribution derived from RNA (cDNA) and DNA (gDNA), respectively, in a RT+ sample.

$$Cq_{RNA} = -\log_2(2^{-Cq_{RT+}} - 2^{-Cq_{RT-}}) \quad (3)$$

$$Cq_{RNA} = -\log_2(2^{-Cq_{NA}} - 2^{-Cq_{DNA}}) \quad (4)$$

$$Cq_{DNA} = Cq_{Sample}^{VPA} + Cq_{gDNA}^{GOI} - Cq_{gDNA}^{VPA} \quad (5)$$

For the determination of  $Cq_{DNA}$  [Equation (5)], the gDNA contamination level in a RT(+) sample (referred to as ‘Sample’) is measured with a gDNA-specific ValidPrime assay (VPA) ( $Cq_{Sample}^{VPA}$ ). The VPA targets a non-transcribed locus present in one copy per normal haploid genome. However, since the gDNA sensitivity can be highly variable between GOI assays, the capacity of the GOI assay to amplify gDNA is compared with that of the VPA. In ValidPrime, this difference is tested on purified gDNA, yielding the delta  $Cq$  component in Equation (5) ( $Cq_{gDNA}^{GOI} - Cq_{gDNA}^{VPA}$ ). Despite a formulaic resemblance to the  $\Delta\Delta Ct$  equation developed by Livak and Schmittgen (10), these calculations are distinct (Supplementary Figure S1B).

Figure 1 depicts a typical grid of qPCR data including the required controls for ValidPrime estimation of  $Cq_{DNA}$  and the subsequent correction of  $Cq_{NA}$  into  $Cq_{RNA}$ . Apart

$$2^{-Cq_{NA}} = 2^{-Cq_{RNA}} + 2^{-Cq_{DNA}} \quad (Eq\ 2)$$

	$Cq_{NA}$	GOI 1	GOI 2	GOI 3	VPA
RT+	Sample 1	27.22	25.78	28.67	29.02
	Sample 2	26.73	25.54	28.02	26.97
	Sample 3	26.42	25.31	27.68	26.34
	gDNA	29.62	29.41	30.60	28.61

$$Cq_{DNA} = Cq_{Sample}^{VPA} + Cq_{gDNA}^{GOI} - Cq_{gDNA}^{VPA} \quad (Eq\ 5)$$

$$Cq_{DNA}^{GOI} = 29.02 + 29.62 - 28.61 = 30.03$$

$$Cq_{RNA} = -\log_2(2^{-Cq_{NA}} - 2^{-Cq_{DNA}}) \quad (Eq\ 3)$$

$$Cq_{NA}^{GOI} = 27.22$$

$$Cq_{RNA}^{GOI} = -\log_2(2^{-27.22} - 2^{-30.03}) = 27.44$$

$$\%DNA = (2^{-Cq_{DNA}} / 2^{-Cq_{NA}}) * 100 \quad (Eq\ 6)$$

$$\%DNA^{GOI} = (2^{-30.03} / 2^{-27.22}) * 100 = 14.3\%$$

**Figure 1.** ValidPrime: principles and exemplifying equations. ValidPrime uses the annotation  $Cq_{NA}$  for the signal measured in a (RT+) qPCR sample, to which both Nucleic Acids, RNA and DNA contribute, corresponding to  $Cq_{RNA}$  and  $Cq_{DNA}$  [Equation (2)]. The grid shows an example of an experimental design with 3 RT+ samples and 3 GOI assays, plus the controls required for the ValidPrime estimation of  $Cq_{DNA}$  and the subsequent correction of  $Cq_{NA}$  to obtain  $Cq_{RNA}$ . The term GOI is used in ValidPrime for both target transcripts and reference genes, since the calculations are independent of the gene type. The VPA column contains the data obtained with the VPA and the gDNA row contains measurements using purified gDNA as a sample. The equations under the grid illustrate the determination of  $Cq_{DNA}$ ,  $Cq_{RNA}$  and %DNA for GOI 1 in sample 1 according to the color code in the grid.

from the GOI assays, that are specific for each study, the VPA has been added among the assays. In addition to samples 1–3, which correspond to any RT+ samples in qPCR study, one or several gDNA samples are added in the experimental design. The equations under the grid exemplify the calculations for GOI 1 in Sample 1. The gDNA contribution can also be expressed as a percentage of relative quantities [Equation (6)].

$$\%DNA = \left( \frac{2^{-Cq_{DNA}}}{2^{-Cq_{NA}}} \right) \times 100 \quad (6)$$

### Assay validation

In order to determine the accuracy of the ValidPrime method, we first designed and characterized candidate VPAs. Among 30 candidates from 10 different regions on five chromosomes, 26 amplified gDNA with efficiencies between 90 and 110%. Among the tested assays, mVPA1 (amplifying an 87-bp sequence in the qB region of chromosome 1) and mVPA5 (amplifying an 87-bp sequence in the qF region of chromosome 5) had the best characteristics in terms of sensitivity and specificity. LOD was 3.2 copies for mVPA1 (GenEx; Cut-off  $Cq$  37;

95% CI; mean of two determinations) and 3.7 copies for mVPA5 (GenEx; Cut-off  $Cq$  37; 95% CI) and the LOQ ( $SD < 45\%$ ) was 4 copies for both assays (Supplementary Figure S2). In four out of eight NTC reactions, a signal ( $Cq$   $38.1 \pm 0.9$ ) was detected with the mVPA5 assay, indicating formation of primer-dimers. However, the primer-dimer product was never observed in samples containing gDNA, as evaluated by melting curve analyses and by capillary micro-electrophoresis (MultiNA, Shimadzu).

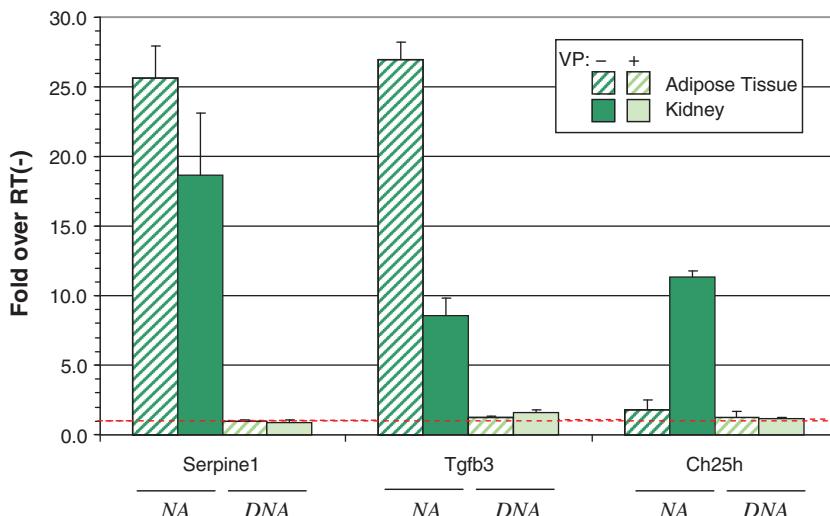
Efficiency analysis for GOI assays was performed in the BioMark system. No amplification was observed in the NTC controls, except for Sprr2f ( $Cq$  28.6), which was 10 cycles above the  $Cq$  measured in the sample with the lowest Sprr2f expression ( $Cq$  18.5) and thus, far more than the proposed accepted minimal difference of five cycles between NTC and RT(+) sample (11,12). The generally low  $Cq$  values obtained with the BioMark system are explained by the 14-cycle pre-amplification step used in this protocol. The amplification efficiency was similar between assays as measured with a cDNA dilution series ( $95.5 \pm 6.1\%$ ; mean  $R^2$ : 0.9932) and a gDNA dilution series for gDNA-sensitive assays ( $100.4 \pm 7.7\%$ ; mean  $R^2$ : 0.9962) (data not shown). All RNA samples used in the study had A260/A280 ratios between 1.9 and 2.0 (mean: 1.97); A260/A230 between 1.5 and 2.5 (mean: 2.13) and A260/A270 above 1.17 (mean: 1.23), where the latter tests for phenol contamination.

### Equivalence between $Cq_{DNA}$ estimated with ValidPrime and RT(−) controls

We next verified that the  $Cq_{DNA}$  values calculated with ValidPrime agree with those measured directly in RT(−)-qPCRs. Since a direct comparison is difficult, due to the poor reproducibility of RT(−) controls (see above), the following test was performed: RT(+) and RT(−) samples from two different tissues were spiked with 0.30 ng of gDNA (approximately 100 haploid genome copies) and measured using three gDNA-sensitive GOI assays. The data in Figure 2 are ratios of relative quantities (RQ) between either the total signal ( $Cq_{NA}$ ) in RT(+) reactions or the corresponding  $Cq_{DNA}$  calculated by ValidPrime over the RQ in RT(−) reactions. As shown, tissue-dependent differences in the expression levels of the three target genes were observed [from 1.8- to 27-fold compared with RT(−) samples]. Independent of the expression level, the estimation by ValidPrime of the gDNA-derived signal levels ( $Cq_{DNA}$ ) in RT(+) samples was in excellent agreement with the data from RT(−) samples, with the ratio of the relative quantities ( $1.20 \pm 0.29$ ) close to the theoretically expected value of 1.

### Calculation of $Cq_{RNA}$ in RT(+) samples through the correction of signals derived from exogenously added gDNA

Given the good correlation between ValidPrime estimation of  $Cq_{DNA}$  and RT(−) measurements, we next tested the accuracy of the calculation of the RNA-derived component  $Cq_{RNA}$  in RT(+) samples using Equation (4). In a first set of experiments, different amounts of gDNA were



**Figure 2.** Equivalence between  $C_{q\text{DNA}}$  calculated by ValidPrime and RT(−) measurements. Fold ratios in linear scale ( $2^{C_{q(\text{RT}+)}}/2^{C_{q(\text{RT}-)}$ ) between either the total signal (NA) measured in spiked RT(+) reactions (dark bars) or the gDNA signal (DNA) estimated by ValidPrime (VP) from RT(+) reactions (light bars) compared to the signal in RT(−) reactions. A quantity of 20 ng of cDNA from adipose tissue (hatched bars) or from kidney, were spiked with 0.30 ng gDNA to decrease the variability due to stochastic amplification observed in RT(−) reactions. Independently of the expression level of the three genes studied in RT(+) samples, the estimations by ValidPrime of the gDNA-derived signals in RT(+) were very similar to the signals measured in RT(−) reactions, as the ratio was close to 1 (illustrated by the red dashed line; mean  $1.20 \pm 0.29$ ). Data are mean  $\pm$  SD from two experiments in duplicate on the StepOnePlus.

added to cDNA test samples with low, but detectable, endogenous gDNA levels. All 32 GOI assays were gDNA-sensitive (Supplementary Table S1) and had gDNA amplification efficiencies similar to the VPA (i.e. passed the ValidPrime high confidence criteria detailed in Supplementary Figure S3). Both the traditional StepOnePlus microtiter plate-based qPCR (Figure 3A) and the microfluidic BioMark system (7) (Figure 3B) were used to collect raw data ( $C_{q\text{NA}}$ ) as input for ValidPrime estimations of the RNA-derived signal ( $C_{q\text{RNA}}$ ). Samples were grouped according to the level of DNA contribution. Using ValidPrime, we could accurately estimate the RNA-derived signal ( $C_{q\text{RNA}}$ ) even in samples with elevated gDNA-derived signals. However, the correction was less precise when the gDNA background exceeded 60% of the total signal. The demonstration that with ValidPrime we can identify and correct for signals derived from exogenous DNA in experimental RT-qPCR samples, using two different qPCR platforms, was first step toward a ‘proof-of-principle’. The correction is virtually independent of gene copy number since it works well both for GOI assays targeting one single locus and for genes with multiple pseudogenes (Supplementary Figure S4).

#### Correction of signals derived from endogenous gDNA

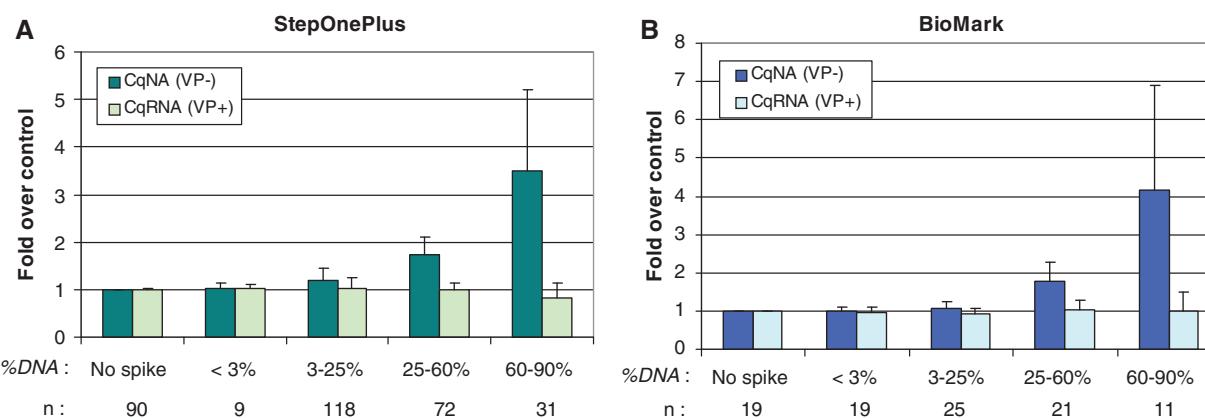
In order to evaluate the capacity of ValidPrime to correct for endogenous gDNA present in typical RNA preparations, a different strategy was applied. We used a gDNA-sensitive and a gDNA-insensitive assay for each GOI, with comparable amplification efficiencies. Three genes (*Il1b*, *Serpine1* and *Chi3l3*) expressed in mouse macrophages were chosen as targets. Using the BioMark system, qPCR data were collected from 81 RNA

preparations and the ValidPrime correction was applied. Despite identical overall gDNA content, the impact of the gDNA on the total signal obtained with the gDNA-sensitive assays differed considerably between the three genes. When the impact was limited (i.e. low %DNA), as in the case for *Il1b*, the effect of the ValidPrime correction was modest (Supplementary Figure S5). With increasing %DNA, as observed for *Serpine1* and *Chi3l3* (Figure 4A), the result of the correction becomes clearer, even in log2 scale (Figure 4B). Theoretically, given identical amplification efficiencies for the two assays and the absence of gDNA amplification, the  $C_{q\text{NA}}$  data in the scatter plots in Figure 4B should fall on a straight line with a slope of 1. The presence of gDNA will contribute to the signal measured with gDNA sensitive assays (x-axis) and the uncorrected  $C_{q\text{NA}}$  data will therefore produce a slope  $>1$ . Even though the impact of the correction differs for the three genes, the  $C_{q\text{RNA}}$  values estimated using ValidPrime restore linearity, especially for samples with a DNA contribution  $<60\%$  (summarized in Figure 4C).

These data demonstrate that using ValidPrime, efficient correction of RT-qPCR data for the presence of endogenous gDNA is possible, as long as the DNA contribution to the total signal is  $<60\%$ .

#### DISCUSSION

Since its invention in the early/mid 1990s (13,14), qPCR has undergone considerable methodological and technological advances (15). However, despite its direct impact on qPCR results, no alternative to RT(−) controls has, to our knowledge, been proposed to assess gDNA-derived contributions to the signals in RT-qPCR.



**Figure 3.** Correction of exogenous (spiked) gDNA with ValidPrime. The data are presented in linear scale as fold ratio ( $2^{-Cq}/2^{-Cq_{ref}}$ ), where  $Cq_{ref}$  is the  $Cq_{NA}$  measured on non-spiked controls and  $Cq$  refers to  $Cq_{RNA}$  (light bars) or  $Cq_{NA}$  (dark bars) depending on whether or not ValidPrime correction was applied (VP-/VP+). The data are grouped based on the impact of exogenous DNA, expressed as percentage of the total signal (%DNA) in each sample. Data were collected with either 17 GOI assays on a StepOnePlus (Applied Biosystems) using mVPA1 and mVPA5 (A), or with 19 assays on a BioMark (Fluidigm) using mVPA1 (B). All assays passed the high confidence ValidPrime criteria (Supplementary Figure S3). Data are presented as the mean  $\pm$  SD, with (n) designating the number of samples in each group. cDNAs were from mouse kidney or liver for the StepOnePlus studies and mouse uterus for the BioMark study.

ValidPrime is a cost-efficient alternative to RT(–) controls to test for the presence of gDNA in samples. It is superior to RT(–) controls not only because of a higher accuracy, but also because fewer control reactions are required, eliminating the need for additional test reactions in the RT step. While the traditional approach for a study based on  $m$  samples and  $n$  genes requires  $m$  reverse transcription control reactions (RT–) and  $m \times n$  extra qPCRs, ValidPrime only requires  $m+n+1$  control qPCRs and no RT(–) reactions (Table 1). As an example, in a BioMark 96.96 Dynamic Array experiment, ValidPrime reduces the number of controls by >95%.

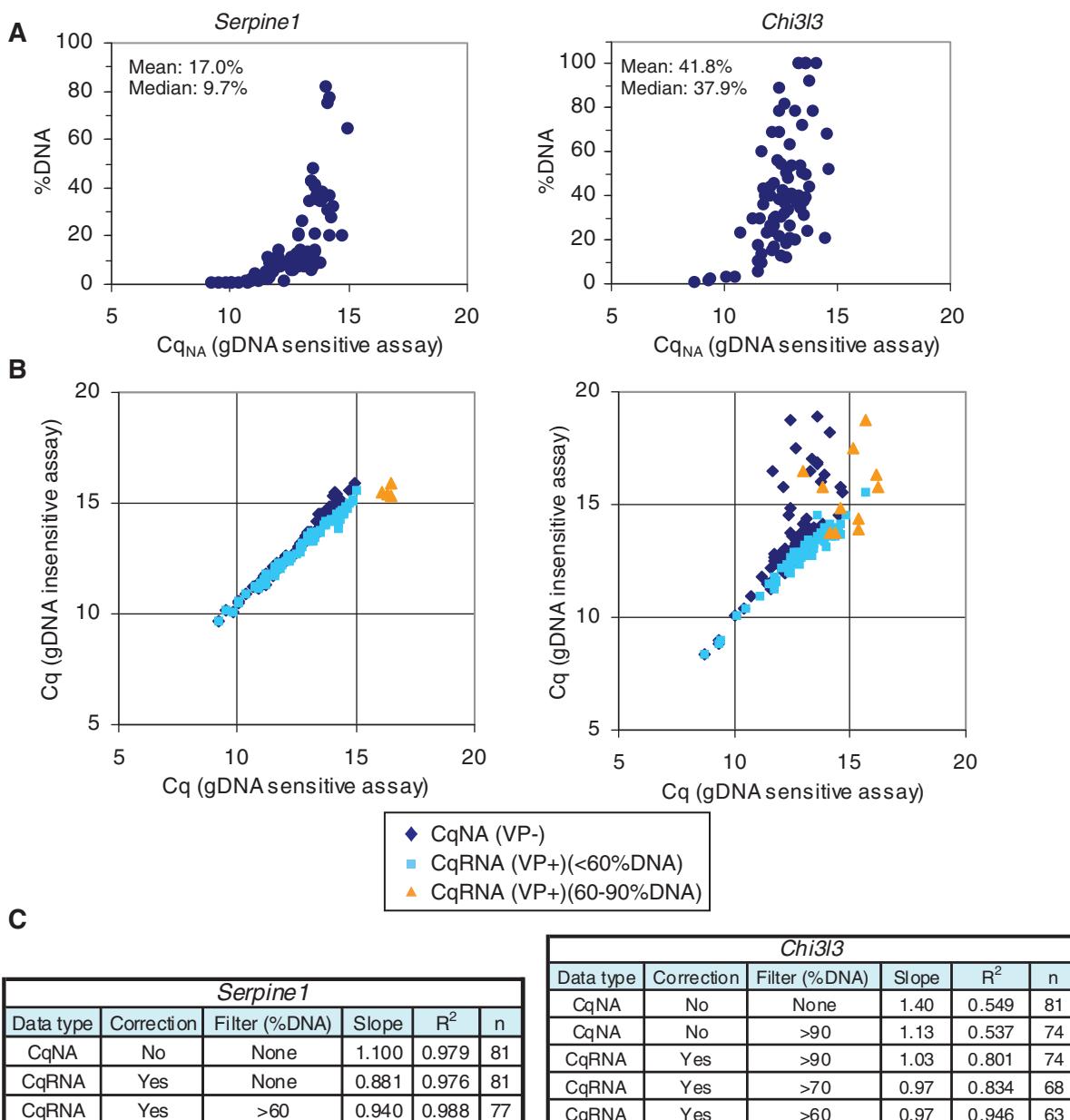
ValidPrime is also the first method that proposes to correct for qPCR signals originating from contaminating gDNA. It is possible that the lack of accuracy and low reproducibility generally observed in RT(–) reactions has previously restrained the development of a correction-based model similar to that proposed in Equation (3). The present study includes data obtained with cDNA from five different mouse tissues analyzed with two qPCR instrument platforms, providing support for the general validity of ValidPrime.

It is important not to confuse gDNA contamination levels with the actual contribution of gDNA to the total signal, herein expressed as %DNA [Equation (6)]. Indeed, we did not observe any correlation between gDNA levels (as estimated by qPCR with the VPA) and the total signal ( $Cq_{NA}$ ) measured in RT(+) qPCR reactions with GOI assays (Supplementary Figure S6). However, as evidenced from the data shown in Figure 4A and Supplementary Figure S5A, there is a clear positive correlation between %DNA and  $Cq_{NA}$  with the gDNA sensitive assay, which demonstrates the increased impact of contaminating gDNA in samples with low GOI expression levels.

The primer design strategy also strongly influences the impact of gDNA on the qPCR signal. Given the multi-exonic nature of most eukaryotic genes (16), it is conceivable that gDNA-insensitive assays can be

designed for most targets in vertebrates. Regardless of the primer design strategy, the inability of a GOI assay to amplify gDNA needs to be validated experimentally. ValidPrime offers this possibility. However, for certain targets it is impossible to design transcript-specific assays. This can be due to either the presence of intronless pseudogenes or the absence of introns in single-exon genes. In order to assure a good accuracy for the ValidPrime correction, these gDNA sensitive assays should behave similarly to VPA against gDNA. In analogy with the comparative Ct method (or  $\Delta\Delta Ct$  method) (10), in which similar amplification efficiencies for the GOI and reference gene assays are presumed, estimation of  $Cq_{RNA}$  in ValidPrime assumes similar efficiencies for the GOI and gDNA assays.

When validated according to the Minimal Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments (MIQE) guidelines (17), gDNA-sensitive assays are in general perfectly compatible with ValidPrime. Nevertheless, when using a GOI assay for the first time with ValidPrime, and especially when  $Cq$  adjustment is requested, we recommend the inclusion of a gDNA dilution series with concentrations covering at least three  $\log_{10}$  (e.g. 5–5000 haploid genomic copies). Consistent relation to VPA across the dilution series indicates similar amplification efficiencies of the two assays, which sanctions  $Cq$  correction with high confidence (Supplementary Figure S3). For VPAs, as well as for high confidence GOI assays, we generally observed perfectly linear amplifications from 5 to 10 000 haploid genomic copies (corresponding to 0.015–30 ng) (Supplementary Figures S2 and S3). Even though it is possible that higher gDNA concentrations (i.e. >30 ng per reaction) could influence qPCR amplification efficiencies (18), such gDNA contamination levels are rarely, if ever, encountered in RT-qPCR experiments. Furthermore, we did not observe any differences in the VPA amplification between samples with purified gDNA



**Figure 4.** Correction of endogenous gDNA with ValidPrime. Comparison of results obtained with two assays targeting *Serpine1* (left) or *Chi3l3* (right) in cDNA prepared from mouse peritoneal macrophages and measured in the BioMark qPCR system. The ‘gDNA-sensitive’ assays amplify both gDNA and cDNA, while the ‘gDNA-insensitive’ assays only recognize the transcript. (A) Scatter plots showing the correlation between the %DNA [as defined in Equation (6)] and Cq<sub>NA</sub> data obtained in each of 81 independent RNA preparations (means of duplicates). The positive correlation between %DNA and Cq illustrates the increasing impact of the gDNA contamination with decreasing total signal. Mean and median values refer to %DNA levels. (B) Cq<sub>NA</sub> data measured with the gDNA-insensitive assays plotted against the corresponding Cq<sub>RNA</sub> data (dark blue) or ValidPrime-estimated Cq<sub>RNA</sub> (light blue and orange), obtained with the gDNA-sensitive assays. Samples with a DNA contribution of 60–90 % are shown in orange and those with <60% in light blue. (C) Tables summarizing the effect of ValidPrime correction and data filtering on the slope and the coefficient of determination ( $R^2$ ).

and mixed samples, spiked with cDNA or RNA (Supplementary Table S2).

Even though we consistently observed very low variability between replicates in VPA-gDNA amplifications over a wide range of initial gDNA concentrations (Supplementary Figure S2 and Supplementary Table S2), it is advisable to use 1–10 ng gDNA (i.e.  $\approx$ 300–3000 haploid genome copies) per qPCR, when only one gDNA concentration is included in the design. This

range favors reliable and distinct gDNA amplification with the VPA and the ‘high confidence’ gDNA-sensitive GOI assays. It also increases the confidence when verifying the absence of gDNA amplification with GOI assays that are presumed to be ‘gDNA-insensitive’.

In this study, we used a maximal 0.3 SD for the  $\Delta Cq$  between VPA and GOI gDNA amplifications as criterion for high confidence gDNA-sensitive GOI assays. Alternatively, an efficiency ( $E$ ) based criterion can be

**Table 1.** ValidPrime reduces the number of required control reactions in RT-qPCR

No. of controls	Assays ( <i>n</i> )					
	1	10	24	48	96	
Samples ( <i>m</i> )						
1	2	3	11	12	25	26
10	20	12	110	21	250	35
24	48	26	264	35	600	49
48	96	50	528	59	1200	73
96	192	98	1056	107	2400	121
						2328
						4656
						145
						9312
						193

The roman values indicates Traditional RT– strategy:  $(m \times n) + m$  and the bold values indicates ValidPrime:  $(m + n + 1)$ . ValidPrime replaces the need to perform RT(–) controls for all RT(+) reactions and reduces substantially the number of controls compared to a conventional set up. In an expression profiling experiment based on *m* samples and *n* assays, the RT(–) approach requires *m* RT(–) reactions followed by  $m \times n$  qPCR controls, whereas ValidPrime only requires  $m + n + 1$  controls. The numbers in the table are based on single measurements for both approaches. Even when *p* gDNA samples/concentrations are included in the experimental setup using ValidPrime, the number of control reactions  $[m + (p \times n) + p]$  is still largely inferior to the RT(–) approach.

used. Indeed, similar results to those shown in Figure 3, were obtained when a maximal difference of 0.15 in *E* (defined as  $10^{1/\text{slope}} - 1$ ) was used as inclusion criterion (data not shown). If a gDNA-sensitive GOI assay has a suboptimal, but confidently estimated *E* and cannot be replaced with a better assay, Equation (7) (19), or equivalent (20), can be used to correct the  $Cq_{\text{NA}}$ . Procedures for confident determination of amplification efficiencies are described elsewhere (21).

$$Cq_{\text{NA}}^{\text{new}} = Cq_{\text{NA}}^{\text{old}} \left( \frac{\log(1+E)}{\log(2)} \right) \quad (7)$$

Coherency of PCR product melting curve profiles from cDNA and gDNA samples should also be considered prior to  $Cq_{\text{RNA}}$  calculations. If a GOI assay generates gDNA-specific products that are not observed in cDNA samples,  $Cq_{\text{RNA}}$  adjustment of  $Cq_{\text{NA}}$  will not be reliable and is not recommended or even needed. Electrophoresis-based analysis of PCR-products is an alternative informative tool to verify that the same products are formed from cDNA and gDNA templates.

Caution should also be taken if differences in ploidy are expected, such as in cancer biopsies, since the number of VPA and GOI targets per cell could vary between samples. However, homogenous populations of aneuploid samples can be analyzed with ValidPrime, such as cancer cell lines, given that the VPA and GOI target loci are each present at least in one copy per cell.

To make ValidPrime readily available, we have developed a software application (gh-validprime) (H. L. and J. I., manuscript in preparation), that is free of charge for academic use. ValidPrime  $Cq_{\text{RNA}}$  calculation is also available within the data pre-processing workflow of the GenEx software (version 5.3, www.multid.se). The gh-validprime software assigns grades to assays/samples based on the impact of the genomic background (Supplementary Figure S7). The gDNA-insensitive

assays are classified as A+. Other assays are attributed the grades A, B, C and F, where the assignment is sample-dependent. While A (<3 %DNA) does not require correction, B and C samples (3–25 and 25–60 %DNA, respectively) are corrected, provided the assays pass the high confidence criteria. If gDNA contribution exceeds 60%, correction is not recommended. RT+ samples with gDNA concentrations below the limit of detection, in which the VPA fail to generate a signal, are attributed the grade A\*. The default output from the ValidPrime software is either  $Cq_{\text{NA}}$  (for A+ assays, A\* and A samples),  $Cq_{\text{RNA}}$  (for B and C samples) or ‘HIGHDNA’ for F samples. The output data are ready for further pre-processing, such as normalization against reference genes. The general ValidPrime workflow is summarized in Figure 5. The gDNA sensitivity and confidence evaluation of GOI assays can be performed independently, as outlined in Figure 5A, or together with RT(+) samples, which facilitates the specificity assessment. Figure 5B illustrates the flowchart for previously validated GOI assays.

The ValidPrime source code is available through the gh-validprime project at <https://code.google.com/p/gh-validprime>. This software depends on the Qt framework (<http://qt.nokia.com>) and the GeneHuggers library (<https://code.google.com/p/genehuggers>). A windows installer and test files are available at <http://code.google.com/p/gh-validprime/downloads/list>.

ValidPrime assays targeting different species (including human, mouse and a general vertebrate) have been developed by the TATAA Biocenter ([www.tataa.com](http://www.tataa.com)).

## CONCLUSION

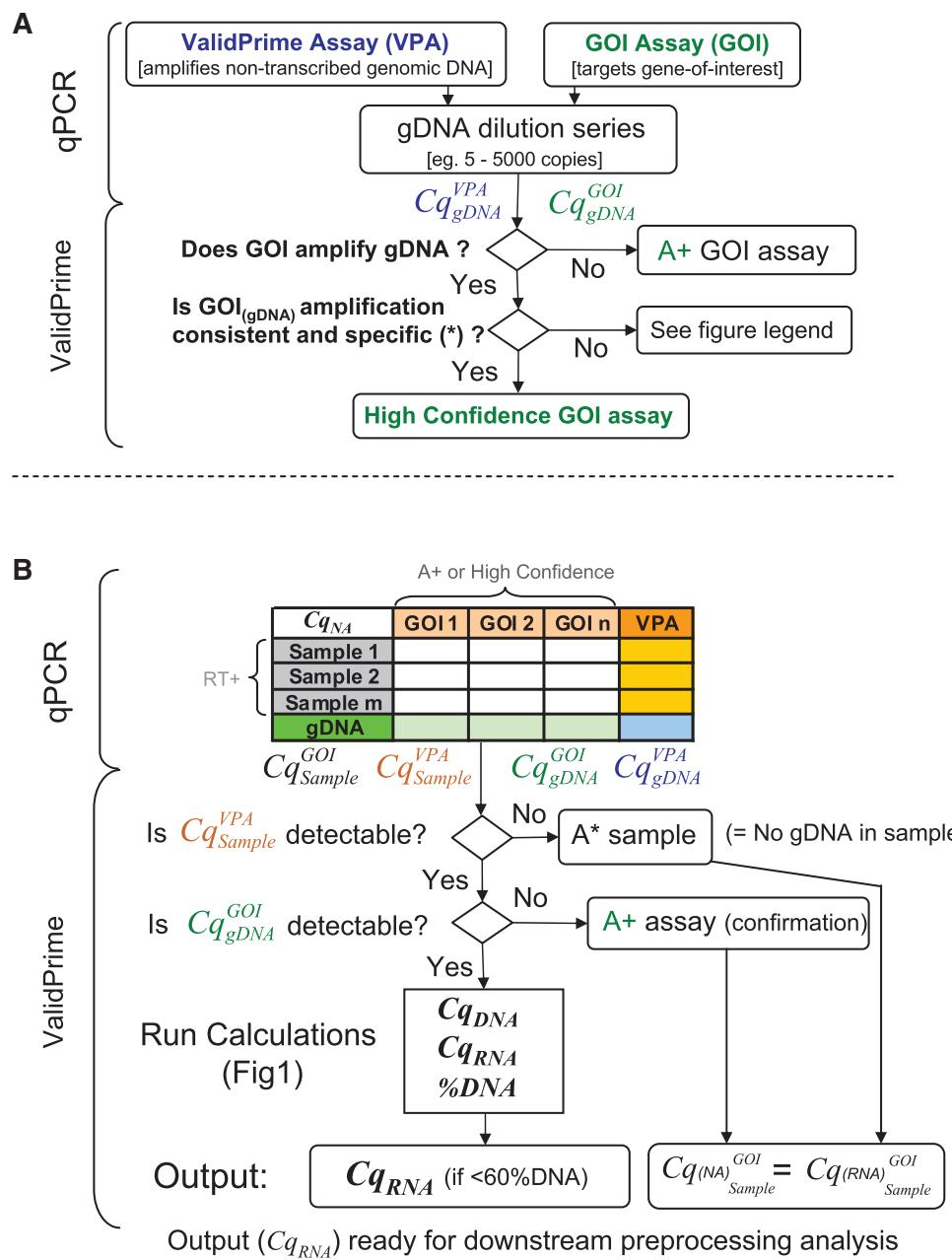
ValidPrime provides, for the first time, the opportunity to correct reliably for gDNA background in qPCR. Correction is possible for any GOI assay that consistently amplifies gDNA, given that the DNA contribution does not exceed 60% of the signal. ValidPrime is superior to traditional RT(–) controls because of its higher accuracy and the lower number of controls required, which leads to a substantial cost savings.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Tables 1 and 2, Supplementary Figures 1–7 and Supplementary References [1,10,17,22–25].

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for critical comments from Drs Pascal Martin, Sébastien Déjean, Coralie Fontaine and Anders Ståhlberg. Drs Geneviève Tavernier and Elodie Riant provided mouse blood and tissue samples and Hortense Bergès provided technical assistance during the isolation of mouse macrophages.



**Figure 5.** ValidPrime flowchart. ValidPrime GOI assay validation. ValidPrime can be used as a reliable, cost-efficient alternative to RT(−) controls to survey gDNA background in RT-qPCR, and as a tool to determine the RNA-derived signal ( $Cq_{RNA}$ ) in RT(+)qPCR reactions. To optimize its accuracy when  $Cq_{RNA}$  calculation is desired, validation of GOI assays in gDNA samples is recommended, as outlined in (A). Asterisks indicates the efficiency evaluation and melting curve/electrophoresis-based analysis. This includes an evaluation of the gDNA sensitivity of GOI assays using dilution series with gDNA samples spanning at least three  $\log_{10}$  in copy number. GOI assays that do not amplify gDNA are attributed the grade A+. The amplification of gDNA by high-confidence assays should be specific and with an efficiency similar to that of the VPA (see ‘Discussion’ section and Supplementary Figure S3). For GOI assays with suboptimal, but confidently determined (17,21) efficiency, Equation (7) could be applied to adjust  $Cq_{NA}$  data. To optimize specificity, there should also be consistency between the melting curves of PCR products in gDNA and cDNA samples. (B)  $Cq_{RNA}$  calculation with ValidPrime-validated GOI assays. High confidence and A+ assays can be used with less gDNA samples for  $Cq_{RNA}$  determination. It is recommended to confirm the absence of gDNA amplification at least once for A+ assays. Samples that do not contain sufficient gDNA to generate a signal with the VPA are attributed A\*. As for gDNA insensitive A+ assays,  $Cq_{RNA}$  equals  $Cq_{NA}$  (i.e. output = input) in A\* samples, since the DNA-derived signal is negligible [see Equations (2 and 4)]. For gDNA-sensitive GOI assays,  $Cq_{RNA}$  is calculated by a  $Cq_{DNA}$ -based correction of  $Cq_{NA}$  using Equations (4 and 5). To minimize the risk of jeopardizing the accuracy of the  $Cq_{RNA}$  estimation, it is not advisable to perform correction on samples where the DNA-derived signal exceeds 60%. The calculations are facilitated using the ValidPrime software. Details on additional assay/sample grading and data output formats employed by the software are provided in Supplementary Figure S7. The  $Cq_{RNA}$  output data can be used for downstream data processing, such as normalization against reference genes.

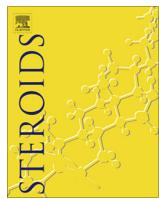
## FUNDING

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Funding for the open access charge: Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France.

*Conflict of interest statement.* M.K. and D.S. are employees of TATAA Biocenter AB, a commercial source for the ValidPrime assays.

## REFERENCES

1. Bustin,S.A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, **29**, 23–39.
2. Peccoud,J. and Jacob,C. (1996) Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction. *Biophys. J.*, **71**, 101–108.
3. Nordgård,O., Kvaloy,J.T., Farmen,R.K. and Heikkila,R. (2006) Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: the balance between accuracy and precision. *Anal. Biochem.*, **356**, 182–193.
4. Bengtsson,M., Hemberg,M., Rorsman,P. and Ståhlberg,A. (2008) Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise. *BMC Mol. Biol.*, **9**, 63.
5. Calippe,B., Douin-Echinard,V., Laffargue,M., Laurell,H., Rana-Poussine,V., Pipy,B., Guery,J.C., Bayard,F., Arnal,J.F. and Gourdy,P. (2008) Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Immunol.*, **180**, 7980–7988.
6. Hofstetter,J.R., Zhang,A., Mayeda,A.R., Guscar,T., Nurnberger,J.I. Jr and Lahiri,D.K. (1997) Genomic DNA from mice: a comparison of recovery methods and tissue sources. *Biochem. Mol. Med.*, **62**, 197–202.
7. Spurgeon,S.L., Jones,R.C. and Ramakrishnan,R. (2008) High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One*, **3**, e1662.
8. Riant,E., Waget,A., Cogo,H., Arnal,J.F., Burcelin,R. and Gourdy,P. (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology*, **150**, 2109–2117.
9. Giulietti,A., Overbergh,L., Valckx,D., Decallonne,B., Bouillon,R. and Mathieu,C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, **25**, 386–401.
10. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402–408.
11. Bustin,S.A. and Nolan,T. (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.*, **15**, 155–166.
12. Nolan,T., Hands,R.E. and Bustin,S.A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.*, **1**, 1559–1582.
13. Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G. and Watson,R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026–1030.
14. Gibson,U.E., Heid,C.A. and Williams,P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, **6**, 995–1001.
15. Pfaffl,M.W. (2010) The ongoing evolution of qPCR. *Methods*, **50**, 215–216.
16. Roy,S.W. and Gilbert,W. (2006) The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nat. Rev. Genet.*, **7**, 211–221.
17. Bustin,S.A., Benes,V., Garson,J.A., Hellemans,J., Huggett,J., Kubista,M., Mueller,R., Nolan,T., Pfaffl,M.W., Shipley,G.L. *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
18. Yun,J.J., Heisler,L.E., Hwang,I.I.L., Wilkins,O., Lau,S.K., Hyrcza,M., Jayabalasingham,B., Jin,J., McLaurin,J., Tsao,M.S. *et al.* (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e85.
19. Kubista,M., Sindelka,R., Tichopad,A., Bergkvist,A., Lindh,D. and Forootan,A. (2007) The Prime Technique. Real-time PCR data analysis. *GIT Lab. J.*, **9–10**, 33–35.
20. Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.
21. Tholen,D.W., Kroll,M., Astles,J.R., Caffo,A.L., Happé,T.M., Krouwer,J. and Lasky,F. (2003) *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: a Statistical Approach; Approved Guideline*, Vol. 23, CLSI EP6-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, pp. 1–60.
22. Vandesompele,J., De Preter,K., Pattyn,F., Poppe,B., Van Roy,N., De Paepe,A. and Speleman,F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, **3**, RESEARCH0034.
23. Andersen,C.L., Jensen,J.L. and Orntoft,T.F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, **64**, 5245–5250.
24. Hellemans,J., Mortier,G., De Paepe,A., Speleman,F. and Vandesompele,J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*, **8**, R19.
25. Liu,Y.J., Zheng,D., Balasubramanian,S., Carriero,N., Khurana,E., Robilotto,R. and Gerstein,M.B. (2009) Comprehensive analysis of the pseudogenes of glycolytic enzymes in vertebrates: the anomalously high number of GAPDH pseudogenes highlights a recent burst of retrotrans-positional activity. *BMC Genomics*, **10**, 480.



## Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor alpha *in vivo*

Jean-François Arnal <sup>\*</sup>, Coralie Fontaine, Anne Abot, Marie-Cécile Valera, Henrik Laurell, Pierre Gourdy, Françoise Lefrant

INSERM U1048-I2MC, Faculté de Médecine, Université de Toulouse et CHU de Toulouse, 31432 Toulouse, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 September 2012  
Received in revised form 24 October 2012  
Accepted 2 November 2012  
Available online 29 November 2012

#### Keywords:

Estrogen  
Estrogen receptor  
Uterus  
Menopause

### ABSTRACT

Estrogens influence most of the physiological processes in mammals, including but not limited to reproduction, cognition, behavior, vascular system, metabolism and bone integrity. Given this widespread role for estrogen in human physiology, it is not surprising that estrogen influence the pathophysiology of numerous diseases, including cancer (of the reproductive tract as breast, endometrial but also colorectal, prostate,...), as well as neurodegenerative, inflammatory-immune, cardiovascular and metabolic diseases, and osteoporosis.

These actions are mediated by the activation of estrogen receptors (ER) alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ), which regulate target gene transcription (genomic action) through two independent activation functions (AF)-1 and AF-2, but can also elicit rapid membrane initiated steroid signals (MISS). Targeted ER gene inactivation has shown that although ER $\beta$  plays an important role in the central nervous system and in the heart, ER $\alpha$  appears to play a prominent role in most of the other tissues.

Pharmacological activation or inhibition of ER $\alpha$  and/or ER $\beta$  provides already the basis for many therapeutic interventions, from hormone replacement at menopause to prevention of the recurrence of breast cancer. However, the use of these estrogens or selective estrogen receptors modulators (SERMs) have also induced undesired effects. Thus, an important challenge consists now to uncouple the beneficial actions from other deleterious ones. The *in vivo* molecular “dissection” of ER $\alpha$  represents both a molecular and integrated approach that already allowed to delineate in mouse the role of the main “subfunctions” of the receptor and that could pave the way to an optimization of the ER modulation.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Although estrogens are viewed as reproductive hormones, they induce cellular changes in almost of the tissues of the body in mammalian species. From fish to birds and mammals, the biological effects of estrogens are mediated through binding and activation of intracellular receptors, the estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ , NR3A1) and  $\beta$  (ER $\beta$ , NR3A2) [1]. The ancestral status of estrogen receptor (ER) in the family of the steroid receptors has probably contributed to the pleiotropic actions of estrogens [2].

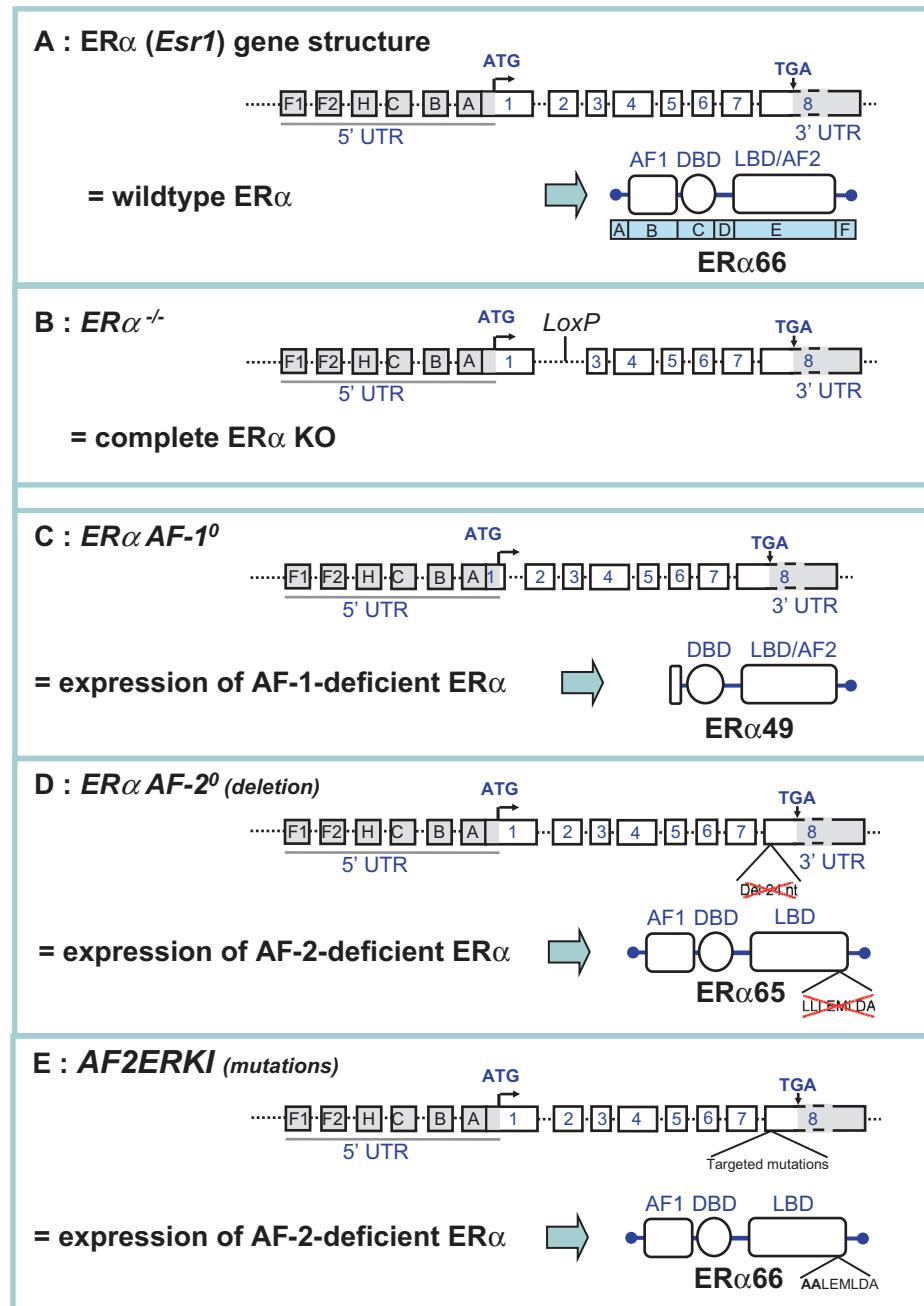
ER belong to the nuclear receptor subfamily of ligand-inducible transcription factors whose members, based on structural and functional similarities, can be subdivided into six distinct regions termed A to F [1,3–5] (Fig. 1A): an N-terminal A/B region bearing the ligand-independent activation function (AF-1), a DNA-binding domain (DBD) composed of two zinc fingers, a hinge region containing the nuclear localization signal and a domain E harboring

the ligand-binding domain (LBD) and the ligand-dependent activation function (AF-2). The adjacent F domain, located at the C-terminus of the receptors, is as the A/B and D domains considered as flexible. Its length is phylogenetically preserved but vary between different nuclear receptors [6]. At least in the case of the ER $\alpha$ , the F domain is involved in coactivator interactions and its presence and positioning influence the transcriptional activity of the receptor in response to both estrogens and anti-estrogens [6–8]. ER $\alpha$  and ER $\beta$  have a certain homology, 98% in the DBD and 53% in their LBD, which influences affinities for the various ligands. ER $\alpha$  and ER $\beta$  have distinct tissue expression patterns in both humans and rodents and gene-targeted mouse models lacking either ER $\alpha$  or ER $\beta$  exhibit distinct phenotypes and provide some of the most definitive experimental models for evaluating the physiological role of each ER [9,10].

In the “classical” mechanism of estrogen action, estrogens diffuse into the cell and bind to the ER, which translocated into the nucleus. The complex binds to estrogen response element (ERE) sequences directly or indirectly through protein–protein interactions with activator protein 1 (AP1) or Sp1, resulting in recruitment of coregulatory proteins (coactivators or corepressors) to the

\* Corresponding author.

E-mail address: [Jean-Francois.Arnal@inserm.fr](mailto:Jean-Francois.Arnal@inserm.fr) (J.-F. Arnal).



**Fig. 1.** Schematic representation of the mouse estrogen receptor  $\alpha$  (*Esr1*) gene structure and the strategies of complete partial *Esr1* gene inactivation. (A) The *Esr1* gene encompasses 8 coding exons and at least six non-coding 5' exons. The ER $\alpha$  protein is composed of six domains (A to F), comprising a DNA binding domain (DBD), a ligand-binding domain (LBD), and two activation functions (AF-1 and AF-2). (B) The first complete knock-out (referred to as *ER $\alpha^{-/-}$*  mice) consisted in introducing LoxP sites and then excising the second coding exon of *Esr1* gene coding for parts of the DBD [60]. This strain does not allow the expression of any functional ER $\alpha$ . Accordingly, the vascular effects of E2 in that persisted *ER $\alpha$ -NeoKO* were completely abolished in *ER $\alpha^{-/-}$* , demonstrating that ER $\alpha$  does mediate most of the vascular effects of E2 [63,66]. (C) *ER $\alpha$ AF-1 $^0$*  mice consist in targeting the first exon of *Esr1* gene coding for the A and most of the B domains and thereby AF-1 (deletion corresponding to amino acids 2–148) [72]. The phenotype of *ER $\alpha$ AF-1 $^0$*  mice is reminiscent to that of *ER $\alpha$ -NeoKO* mice, although the leakage and thereby the expression of chimeric 55 kDa isoform was found to be highly variable [73]. (D) A first model of *ER $\alpha$ AF-2 $^0$*  mice was generated through the deletion of 7 amino acids in the helix 12 that constitute the core of AF-2 (deletion corresponding to amino acids 543–549 in mouse ER $\alpha$ ) [74] abrogated most of the actions of E2, except the acceleration of reendothelialization which thus appears to rely essentially on MISS. (E) A second *ER $\alpha$ AF-2* targeted mouse model (AF2ERKI) was generated by mutating leucines 543 and 544 in the helix 12 into alanines [75]. These two point mutations minimized estrogen-dependent transcriptional activation and reversed the activity of the estrogen antagonists ICI182780 (ICI) and tamoxifen into agonists in a similar manner that tamoxifen activated WT ER $\alpha$  through AF-1 activation.

promoter of estrogen-responsive genes, increase or decrease of mRNA levels and associated protein production, and a physiological response. This classical, or “genomic,” mechanism typically occurs over the course of hours. In contrast, estrogens can act more quickly (within seconds or minutes) via “nongenomic” mechanisms, through the ER located in or adjacent to the plasma mem-

brane, resulting in cellular responses such as increase in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> levels or activation of various kinases, which in turn can interfere with gene transcription [11]. These aspects are detailed in another paper of the present issue. Non-ER plasma membrane-associated estrogen-binding proteins have also been proposed, but are out of the scope of this review [11].

Although the ambition of exogenous estrogens at menopause is to relieve the climacteric symptoms, another expectation is to prolong the various beneficial homeostatic action elicited by endogenous estrogens as close as possible as the premenopausal state. However, it is recognized that estrogen “replacement” therapy has two major drawbacks: it increases the risk of cancers, mainly breast and endometrium, and it increases the risk of venous thrombo-embolism and of stroke.

## 2. Estrogens and cancer

In mammals, estrogens are a potent stimulus for the growth of its target organs: uterus, vagina, and breast. It is well established that unopposed estrogen therapy is associated with endometrial hyperplasia leading to an increased risk of endometrial cancer [12]. Since the stimulatory action of estrogens in the uterus can be neutralized by combining estrogens (CEE) with a progestin (such as progesterone or medroxyprogesterone acetate, (MPA)), such combination was thus used in hormone therapy (HT) by patients to prevent menopausal symptoms and osteoporosis, and was found to abrogate the increased risk of endometrial cancer.

The link between estrogens and breast cancer growth served as the incentive to develop anti-estrogenic treatments, leading to an important therapeutic advance. ER antagonists, Selective ER modulators (SERMs which act as ER agonists in some tissues and as antagonists in other tissues) and aromatase inhibitors were developed. In particular, the drug ICI-46474, known as tamoxifen, is a SERM blocking estrogen action at the level of the ER in ER-positive breast cancer cells and thereby used in the treatment and prevention of such cancers [13]. Five years of adjuvant tamoxifen is known to reduce the local recurrence and distant metastatic disease by approximately 50% in patients whose breast cancer is ER-positive [14].

The comparison of the two arms of Women's Health Initiative (WHI) (2002 and 2004) underlined the complex relationship between estrogen and progestin not only in terms of coronary heart disease (CHD) as further mentioned, but also of breast cancers [15,16]. Whereas CEE combined with MPA increased the incidence of breast cancer in non-hysterectomized women [17], CEE alone unexpectedly decreased this risk in hysterectomized women [18]. However, this latter result was questioned when more detailed analyses were conducted of overall hormone use, emphasizing cumulative hormone exposure as related to breast cancer risk [19].

Altogether, according to the harmful action of at least some progestins, it is accepted that the strategy to develop new HT is to avoid the association of progestins to SERMs. Consequently, these SERMs should be devoid of endometrium action. For this purpose, a better understanding of the molecular mechanisms of ER activation is required to allow the design of molecules which would preserve the beneficial effects of estrogens detailed above, while being devoid of any deleterious effects on the breast and endometrium [12].

Finally, it should be pointed out that estrogens directly promote the growth of breast cancers that express the ER $\alpha$ , but can also modulate tumor microenvironment. Using different mouse models of ER $\alpha$ -negative cancer cells grafted subcutaneously into syngeneic ovariectomized immunocompetent mice, we found that 17 $\beta$ -estradiol (E2) potentiates tumor growth, increases intratumoral vessel density and modifies tumor vasculature into a more regularly organized structure, thereby improving vessel stabilization to prevent tumor hypoxia and necrosis [20]. These E2-induced effects were completely abrogated in ER $\alpha$ -deficient mice, demonstrating a critical role of host ER $\alpha$ . It should also be pointed out that, as E2 also influences the immune system, estrogens probably impact tumor immunosurveillance and rejection probably in a very complex manner [21,22].

## 3. Controversies about estrogens and coronary heart disease (CHD): a question of timing

Epidemiological studies and Nurses' Health Study [23] suggested, and all animal models of early atheroma clearly demonstrated a vasculoprotective action of both endogenous and exogenous estrogens [24–26].

Although HT is considered as the most efficient treatment of climacteric symptoms, its overall benefit was questioned since the publication of the WHI in 2002 [17]. As for the risk of breast cancer (see above), the WHI trial reported that postmenopausal women receiving CEE with MPA had an increased frequency of CHD compared to women taking placebo [17]. Interestingly, the risk of CHD in hysterectomized postmenopausal women given CEE alone was quite similar to those receiving placebo [18], pointing out again, as for breast cancer, the deleterious effect of the association of estrogens with the progestin MPA. This is in concordance with the early demonstration in 1997 by Miyagawa et al. who showed that E2 alone or E2 plus progesterone prevented coronary endothelial dysfunction in ovariectomized rhesus monkeys, whereas the combination of E2 plus MPA failed to exert this protective effect [27].

It should be also underlined that in WHI, HT was prescribed in average 11 years after menopause, whereas HT in everyday life are given at the onset of menopause, at a time where more than 70% of the women suffer from climacteric symptoms. Noteworthy, women of the WHI study who initiated HT closer to menopause tended to have reduced CHD risk compared with increased CHD risk among women receiving HT more distant from menopause, showing that the outcomes of women under age 60 years or within 10 years of menopause closely resemble those from observational cohorts [15,16]. Our understanding of the potential cellular targets and mechanisms of the vasculoprotective actions of estrogens, as well as of the lack of action of estrogens when administered after a period of hormonal deprivation, have been recently reviewed [15,28,29].

## 4. The deleterious actions of oral estrogens on thrombosis

Both oral HT and oral contraceptives increase the risks of venous thrombosis and stroke [30,31], but the route of estrogen administration might be a key determinant of these deleterious effects probably due to systemic hypercoagulability. In particular, smoking appears to be a risk factor for venous thrombosis with the greatest relative effect among young women using oral contraceptives [32].

Transdermally-administered estrogen has less or no effect on circulating coagulation factors, as well as no effect on lipids and lipoproteins. This minimal effect on hepatic metabolism, compared to oral HT administration, is attributable to the bypass of the portal circulation. Indeed, in the ESTHER case/control study, transdermal estrogen alone or combined with either progesterone/dydrogesterone or pregnane derivatives did not increase the risk of venous thrombo-embolism, which was not the case with the oral route [33]. Furthermore, the type of progestin may also and again be a determinant factor since combinations with 19-norpregnanes were found to be associated with an increased venous thrombosis risk even when the estrogen is given by the transdermal route [33]. More recently, transdermal HT did not appear to increase the risk of stroke in another independent case/control study, especially with regimens using low doses of estrogens [34]. Thus, although these findings should be confirmed by randomized clinical trials, they strongly suggest that both the route of estrogen administration and the type of progestin may be important determinants of the overall benefit-risk profile of HT.

## 5. The unanticipated action of high circulating E2 on platelet function in mouse

Although estrogens are known to have a deleterious effect on the venous thrombosis risk and a preventive action on the development of arterial atheroma, their effect on platelet function *in vivo* remains unclear. Endogenous estrogens had no significant influence on platelet function but a chronic high physiological dose of E2 ( $200 \mu\text{g E2 kg}^{-1} \text{d}^{-1}$  subcutaneously) decreased platelet responsiveness *ex vivo*, increased tail bleeding time and protected animals against thromboembolism [35]. Hematopoietic chimeric mice harbouring a selective deletion of ER $\alpha$  or  $\beta$  were used to demonstrate that the effects of E2 were exclusively due to hematopoietic ER $\alpha$ . It should be underlined that the hepatic coagulation factors are only marginally regulated in mice, in contrast to the induction of hepatic coagulation factors observed in humans. This difference should be taken into account when extrapolating the relationship between estrogens and thrombosis. Our recent data also demonstrate a previously unrecognized role for E2 in regulating the platelet proteome and platelet function and point to new potential antithrombotic and vasculoprotective therapeutic strategies. Interestingly, these effects appeared to be essentially AF-1-independent [35].

## 6. Genomic and non-genomic/MISS actions of ER

As previously mentioned, the structure of ER $\alpha$  and of ER $\beta$  can be subdivided into six distinct regions termed A to F [1,3–5] (Fig. 1A). The C and E domains are responsible for DNA and ligand binding, respectively (DBD and LBD). Ligand-induced transcriptional activation by ER involves the action of two distinct transactivation functions (AFs), located in the N-terminal A/B (AF-1) and the C-terminal E (AF-2) domains [4] (Fig. 1A). Upon estrogen binding, ER undergoes a conformational change that facilitates its recruitment to the promoter regions of target genes either directly through interaction with cognate DNA sequences (ERE, Estrogen Responsive Elements), or through protein/protein interaction with other transcriptional factors such as AP1 and SP1 [1,5,36]. The subsequent recruitment of transcriptional coactivators via one or both AFs follows an ordered, cyclical and combinatorial process that leads to the activation of target gene transcription [37]. Transcriptional activation by the ER can thus be promoted through functional cooperation between both AFs or through each AF independently. The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 on the transcriptional activity of ER $\alpha$  varies in a promoter- and cell type-specific manner [4,38,39]. Even though the mechanisms responsible for the differential sensitivity to both AFs still remain incompletely elucidated, tissue-dependent expression and/or activation of coregulators is likely to play a key role [40].

Although expression pattern of most coregulators are widely expressed in cells and tissues, several examples of coactivators with selective expression pattern in a tissue restricted manner have been reported [41]. Moreover, it has been postulated that differences in the AFs activities are mainly due to differences in their ability to interact with coregulators. AF-2 plays a critical role for regulating the interaction of ER $\alpha$  with most of the co-regulatory proteins [40] but several AF-1 specific coactivators such as p68/p72 [42] and MMS19 [43] have been described. The interaction of p72/68 with the ER $\alpha$  A/B domain was potentiated by phosphorylation of the Ser118 residue in the ER $\alpha$  A/B domain by MAPK, leading to the enhancement of ER $\alpha$  AF-1 activity [42]. Transcriptional activity of ER $\alpha$  could also involve synergistic action of AF-1 and AF-2 mediating a cooperative recruitment of coactivators by both AFs [44,45].

Beside these classic transcriptional actions, also named «genomic» actions, E2 also triggers many intracellular signaling path-

ways in a variety of cell types. For instance, E2 rapidly and transiently induces the activation of several kinases (MAPK, PI3K or PKC), phosphatases and the adenylyl cyclase as well as changes in calcium level [46]. These “Membrane Initiated Steroid Signaling” (MISS) are mediated by a pool of intracellular receptors localized at the plasma membrane in caveolae rafts. Here, liganded ER initiates MISS by transactivating receptor (growth factor receptors) and non-receptor (Src) tyrosine kinases as well as G proteins, depending upon cell context [47]. The A/B domain is clearly dispensable to elicit these MISS actions [46], and the E domain of ER $\alpha$  could be even sufficient for membrane localization and signalling [48]. Notably, among the diverse post-translational modifications [49], palmitoylation of cysteine 447 appears important for membrane location via a physical interaction with caveolin-1 [50,51]. Finally, other proteins such as the adaptor protein MNAR or striatin were also shown to participate to membrane estrogen action [52,53]. Several recent reviews (including the one by Ueda and Karas in the present issue) have been devoted to these MISS actions in vascular cells [46,47,54,55].

## 7. Lessons from estrogen receptors targeting in mice

Mouse models targeted for either ER $\alpha$  or ER $\beta$  were first published in 1993 and 1998, respectively, but their respective roles remained elusive or even controversial for many years, in particular on the vascular effects. Why all these uncertainties?

The first mouse model of ER $\alpha$  gene disruption was generated by K. Korach's group, consisting in the insertion of the Neomycin resistance gene in the first coding exon, thus named *ER $\alpha$ -NeoKO mice* [56]. As expected, these mice are infertile when homozygous, and many of the actions of E2 on the reproductive targets were abrogated. Studies of mice harbouring single gene targeting of either ER $\alpha$  or ER $\beta$  showed that E2 treatment of ovariectomized female mice inhibits the vascular injury-induced medial hyperplasia to the same extent than in wild-type mice [57,58]. The authors suggested that ER $\alpha$  and ER $\beta$  are able to complement one another such that each receptor alone is sufficient to mediate the vascular protective effects of estrogen. To test this hypothesis, they studied the effect of E2 on vascular injury in *ER $\alpha$ -NeoKO/ER $\beta$ KO* mice: E2 no longer inhibited the increase in medial carotid area after injury, but still inhibited vascular smooth muscle cell proliferation after injury, raising the possibility of an unidentified third ER [59].

However, at the same time, Krust and Chambon in Strasbourg generated a second mouse model of ER $\alpha$  gene disruption, consisting in floxing the second exon allowing the deletion of the C domain [60] (Fig. 1B). These mice were demonstrated to be unambiguously and fully deficient in ER $\alpha$ , and only these mice can be considered as a real *ER $\alpha$  knock out* or *ER $\alpha$ <sup>-/-</sup>*. As expected, these mice are infertile when homozygous, and allowed to demonstrate that ER $\alpha$  is absolutely necessary to the beneficial actions of E2 on reendothelialization [61], on endothelial NO production [62] on medial hyperplasia after vascular injury [63] and on prevention of atheroma [64]. We clarified the mechanisms accounting for the discrepancy between the two models of ER $\alpha$  gene targeting. Korach et al. suggested as early as 1995 the possibility of the expression of a chimeric truncated 55 kDa isoform due to a non-natural alternative splicing of the ER $\alpha$  mRNA in the *ER $\alpha$ -NeoKO* mice [65], and we evidenced later the extent and the functional consequences of this transcriptional leakage [66]. Such an ER $\alpha$  isoform, lacking a major part of the B domain and thus probably functional AF-1, was sufficient to mediate the E2 effect on endothelial NO production [66], on post-injury medial hyperplasia [57], as well as on reendothelialization [67]. Furthermore, it appears that all these actions are fully abrogated in the second mouse model unambiguously and fully deficient in ER $\alpha$  [60,61,63,66]. Thus,

along with pharmacological approaches using selective ER $\alpha$  or ER $\beta$  agonists [68], it is now clear that ER $\alpha$ , but not ER $\beta$ , is absolutely necessary for and thereby mediates most of the beneficial vascular actions of E2 [69], whereas “the AF-1 activation-function of ER $\alpha$  may be dispensable” in some beneficial vascular actions of E2 [66].

More recently, we directly explored the role of ER $\alpha$ AF-1 in the vascular actions of E2 *in vivo* using a mouse deficient in ER $\alpha$ AF-1 (named *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup>). As depicted in Fig. 1C, it should be underlined that *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice lack all three AF1-boxes in domain B [70,71] but functions other than transactivation function could also be deleted in these mice since they also lack the entire A domain. We found that ER $\alpha$  AF-1 was necessary for the reproductive actions of E2 while it is dispensable for three major vasculoprotective actions of E2, including E2-accelerated re-endothelialization, NO production and prevention of atheroma [72]. This last result probably explains why E2 prevented fatty streak in a fraction (4 out of 14) of *ApoE*<sup>-/-</sup> *ER $\alpha$ -NeoKO* mice [56], since the leakage of the chimeric truncated 55 kDa ER $\alpha$  isoform was reported to be highly variable [73]. To assess the role of ER $\alpha$ AF-2, a targeted deletion of 7 amino acids (543–549) [74] (Fig. 1D), or two point mutations L543A and L544A [75] have been introduced in the helix 12 using knock-in strategies in mice (Fig. 1E). Using these mice models, ER $\alpha$ AF-2 was found to be absolutely required for both the atheroprotective action of E2 [74], but in contrast to ER $\alpha$ AF-1, as well as for many other actions at the level of the reproductive track [74,75]. Börjeson et al. [76] have also dissected the respective roles of ER $\alpha$ AF-1 and ER $\alpha$ AF-2 in bone. They demonstrated that ER $\alpha$ AF-2 is absolutely required for the estrogenic effects of all parameters evaluated, whereas ER $\alpha$ AF-1 is tissue specific with a crucial role in trabecular bone and uterus, but not for cortical bone. These results, in particular to which extent AF-1 and AF-2 are necessary for the actions of E2, is summarized in Table 1. A membrane only ER $\alpha$  (MOER, in fact expressing only the E domain of ER $\alpha$ ) transgenic mouse was also generated [77], and their breeding with *ER $\alpha$* <sup>-/+</sup> mice suggested that many physiological functions require nuclear ER $\alpha$ . However, the role of MISS should now be determined thanks to the design of appropriate ER $\alpha$  gene targeted mice.

Several models of ER $\beta$  gene inactivation have also been generated and all concluded to an important role in male and female reproduction. However, they also provided divergent phenotypes [9,78,79], the more recent one [80] lacking many of the previously described phenotypes. Even though the reason for these discrepancies is still unclear, it could partly be due to leakage of expression [80] in analogy with the observations made in *ER $\alpha$ -NeoKO* and *ER $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice [66]. Nonetheless, ER $\beta$  appears to play a major role in the physio- and pathophysiology of the central nervous system [81] and of the heart [11]. For instance, cardiac fibroblast ER $\beta$  appears to be an important target for preventing cardiac hypertrophic and fibrosis [82]. Pharmacological approaches using receptor-specific agonists also support this view [68]. At the molecular level, ER $\beta$  is known to inhibit both the E2-induced ER $\alpha$ -transcription

and the proliferation of T47D and MCF7 cancer cells [83]. The mechanism of this antagonizing effect of ER $\beta$  on the function of ER $\alpha$  is still not well known, since ER $\alpha$  dominates ER $\beta$  in chromatin binding and that heterodimers are rare at common binding sites [84].

## 8. Conclusions and perspectives

Various classes of estrogens and SERMs have been described according to their molecular actions through ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Due to the complexity of the mechanisms of actions of ERs, the *in vivo* effects of estrogens and of SERMs in various cell types and tissues cannot be predicted from *in vitro* studies. To date, the only SERMs currently available (tamoxifen, raloxifene, bazedoxifene) are characterized by an estrogen-agonist effect on bone as well as an estrogen-antagonist effect on the breast, but are devoid of positive effect on menopause symptoms and in general on cardiovascular risk. Theoretically, it is conceivable to design a SERM (or a combination of molecules) devoid of the undesirable effects of E2 (mainly uterus and breast cancer) which would retain more desired effects of E2 (such as prevention of atheroma or type 2 diabetes) than do the SERMs presently available. Due to the increasing incidence of these pathologies in women's health with age, these aspects should now be seriously taken into account.

Hence, integrated mouse models allowing an “*in vivo* dissection” of ER, and in particular of ER $\alpha$ , could represent an attractive way to conceive new tools to screen future SERMs in terms of beneficial and deleterious effects. For instance, as previously mentioned, the phenotype of *ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup> mice [72] suggests that SERMs stimulating ER $\alpha$  with minimal activation of ER $\alpha$  AF-1 could retain beneficial vascular actions, while minimizing the sexual effects. The estrogen-dendrimer conjugate, a selective activator of membrane ER $\alpha$ , could also provide vasculoprotection, although only acceleration of reendothelialization was demonstrated so far [67]. Prevention of breast cancer, type 2 diabetes and cardiovascular diseases by novel SERMs thus represents the major challenge of the future treatment of menopause [85].

## Acknowledgments

We are grateful to Prof. F. Bayard and P. Chambon and Drs A. Krust, J.C. Guery and G. Flouriot for their input in the work as well as to all the members of our team for their invaluable contributions over the years. This work at INSERM U1048 was supported by INSERM, Université de Toulouse III and Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil, ANR, Fondation de France, Conseil Régional Midi-Pyrénées and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). A.A. was supported by a grant from the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vaculaire.

**Table 1**

Implication of genomic and non-genomic effects in the main beneficial and deleterious actions of E2. Using mice either fully deficient in ER $\alpha$  (*ER $\alpha$* <sup>-/-</sup>), or selectively deficient in ER $\alpha$ AF-1 (*ER $\alpha$ AF-1*<sup>0</sup>) or AF-2 (*ER $\alpha$ AF-2*<sup>0</sup>), it can be concluded that ER $\alpha$ AF-1 is dispensable for several protective effects of 17 $\beta$ -estradiol (E2), and necessary for the proliferation of the two main reproductive targets, uterus and breast. In contrast, ER $\alpha$ AF-2 is necessary for all the actions with the exception of acceleration of endothelial healing by E2. A pharmacological approach allowed to show that the selective activation of the MISS (Membrane-Initiated Steroid Signaling) effects by an estrogen-dendrimer conjugate (EDC) was sufficient to accelerate endothelial healing.

Requirement of these subfunctions in the action of estradiol (E2) in	ER $\alpha$ necessary	ER $\alpha$ AF-1 necessary	ER $\alpha$ AF-2 necessary	MISS sufficient (EDC)
<i>Beneficial</i>				
Atheroma prevention	Yes	No	Yes	?
Endothelial healing	Yes	No	No	Yes
Osteoporosis prevention	Yes	No	Yes	?
<i>Deleterious</i>				
Uterine growth	Yes	Yes	Yes	No
MCF7 proliferation ( <i>in vitro</i> )	Yes	Yes	?	No

## References

- [1] Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 2006;27:299–402.
- [2] Thornton JW, Need E, Crews D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 2003;301:1714–7.
- [3] Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P. The chicken oestrogen receptor sequence. Homology with verba and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 1986;5:891–7.
- [4] Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 1989;59:477–87.
- [5] McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 2002;108:465–74.
- [6] Nichols M, Rientjes JM, Stewart AF. Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the f domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J* 1998;17:765–73.
- [7] Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal f domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995;9:814–25.
- [8] Koide A, Zhao C, Naganuma M, Abrams J, Deighton-Collins S, Skafar DF, Koide S. Identification of regions within the f domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein–protein interactions. *Mol Endocrinol* 2007;21:829–42.
- [9] Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice. What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999;20:358–417.
- [10] Arnal JF, Lenfant F, Flouriot G, Tremolieres F, Laurell H, Fontaine C, Krust A, et al. From in vivo gene targeting of estrogen receptors to optimisation of their modulation in menopause. *Br J Pharmacol* 2012;165:57–66.
- [11] Hammes SR, Levin ER. Minireview: recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 2011;152:4489–95.
- [12] Jordan VC. The past, present, and future of selective estrogen receptor modulation. *Ann N Y Acad Sci* 2001;949:72–9.
- [13] Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:205–13.
- [14] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687–1717.
- [15] Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 2007;297:1465–77.
- [16] Stevenson JC, Hodis HN, Pickar JH, Lobo RA. Coronary heart disease and menopause management: the swinging pendulum of HRT. *Atherosclerosis* 2009;207:336–40.
- [17] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, 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;288:321–33.
- [18] Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291:1701–12.
- [19] Anderson GL, Chlebowski RT, Rossouw JE, Rodabough RJ, McTiernan A, Margolis KL, et al. Prior hormone therapy and breast cancer risk in the women's health initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas* 2006;55:103–15.
- [20] Pequeux C, Raymond-Letron I, Blacher S, Boudou F, Adlanmerini M, Fouque MJ, et al. Stromal ER-alpha promotes tumor growth by normalizing an increased angiogenesis. *Cancer Res* 2012;72:3010–9.
- [21] Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007;28:521–74.
- [22] Seillet C, Laffont S, Tremolieres F, Rouquie N, Ribot C, Arnal JF, et al. The TLR-mediated response of plasmacytoid dendritic cells is positively regulated by estradiol in vivo through cell-intrinsic estrogen receptor alpha-signaling. *Blood* 2012;119:454–64.
- [23] Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, et al. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;335:453–61.
- [24] Clarkson TB, Appt SE. Controversies about HRT – lessons from monkey models. *Maturitas* 2005;51:64–74.
- [25] Holm P, Andersen HL, Andersen MR, Erhardtsen E, Stender S. The direct antiatherogenic effect of estrogen is present, absent, or reversed, depending on the state of the arterial endothelium. A time course study in cholesterol-clamped rabbits. *Circulation* 1999;100:1727–33.
- [26] Arnal JF, Scarabin PY, Tremolieres F, Laurell H, Gourdy P. Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr Opin Lipidol* 2007;18:554–60.
- [27] Miyagawa K, Rosch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K. Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 1997;3:324–7.
- [28] Barrett-Connor E. Hormones and heart disease in women: the timing hypothesis. *Am J Epidemiol* 2007;166:506–10.
- [29] Lenfant F, Tremolieres F, Gourdy P, Arnal JF. Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: why protective early, and not when delayed? *Maturitas* 2011;68:165–73.
- [30] Herrington DM, Klein KP. Invited review: pharmacogenetics of estrogen replacement therapy. *J Appl Physiol* 2001;91:2776–84.
- [31] Koh KK, Yoon BK. Controversies regarding hormone therapy: insights from inflammation and hemostasis. *Cardiovasc Res* 2006;70:22–30.
- [32] Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJ. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use. *Am J Hematol* 2008;83:97–102.
- [33] Canonico M, Oger E, Plu-Bureau G, Conard J, Meyer G, Levesque H, et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the esther study. *Circulation* 2007;115:840–5.
- [34] Renoux C, Dell'aniello S, Garbe E, Suissa S. Transdermal and oral hormone replacement therapy and the risk of stroke: a nested case-control study. *BMJ* 2010;340:c2519.
- [35] Valera MC, Gratacap MP, Gourdy P, Lenfant F, Cabou C, Toutain CE, et al. Chronic estradiol treatment reduces platelet responses and protects mice from thromboembolism through the haematopoietic estrogen receptor alpha. *Blood* 2012.
- [36] Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 2005;67:335–76.
- [37] Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 2003;115:751–63.
- [38] Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 1994;8:21–30.
- [39] Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 1990;9:2811–8.
- [40] Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004;25:45–71.
- [41] Knutti D, Kaul A, Kralli A. A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. *Mol Cell Biol* 2000;20:2411–22.
- [42] Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, et al. Purification and identification of p68 rna helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 1999;19:5363–72.
- [43] Wu X, Li H, Chen JD. The human homologue of the yeast DNA repair and TFIH regulator MMS19 is an AF-1-specific coactivator of estrogen receptor. *J Biol Chem* 2001;276:23962–8.
- [44] Kobayashi Y, Kitamoto T, Masuhiro Y, Watanabe M, Kase T, Metzger D, et al. P300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the n-terminal a/b domains. *J Biol Chem* 2000;275:15645–51.
- [45] Metivier R, Penot G, Flouriot G, Pakdel F. Synergism between eralpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the n- and c-terminal domains. *Mol Endocrinol* 2001;15:1953–70.
- [46] Kim KH, Bender JR. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 2009;308:3–8.
- [47] Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005;19:1951–9.
- [48] Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104:719–30.
- [49] Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 2011;32:597–622.
- [50] Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003;278:2701–12.
- [51] Accconci F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, et al. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 2005;16:231–7.
- [52] Wong CW, McNally C, Nickborg E, Komm BS, Cheskins BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crossstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14783–8.
- [53] Lu Q, Pallas DC, Surka HK, Bauer WE, Mendelsohn ME, Karas RH. Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17126–31.
- [54] Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005;308:1583–7.
- [55] Simoncini T. Mechanisms of action of estrogen receptors in vascular cells: relevance for menopause and aging. *Climacteric* 2009;12(Suppl. 1):6–11.
- [56] Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11162–6.

- [57] Iafrati MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan Jr TR, Lubahn DB, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med* 1997;3:545–8.
- [58] Karas RH, Hodgin JB, Kwoon M, Krege JH, Aronovitz M, Mackey W, et al. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:15133–6.
- [59] Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, et al. Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res* 2001;89:534–9.
- [60] Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000;127:4277–91.
- [61] Bouchet 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;103:423–8.
- [62] Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 2002;90:413–9.
- [63] Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, et al. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 2002;90:1087–92.
- [64] Billon-Gales A, Fontaine C, Douin-Echinard V, Delpy L, Berges H, Calippe B, et al. Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2009;120:2567–76.
- [65] Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, et al. Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995;9:1441–54.
- [66] Pendaries C, Darblade B, Rochaix P, Krust A, Chambon P, Korach KS, 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;99:2205–10.
- [67] Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, Konanahia ES, Umetani M, Korach KS, et al. Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest* 2010;120:2319–30.
- [68] Bolego C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Pellegatta F, Puglisi L, et al. The acute estrogenic dilation of rat aorta is mediated solely by selective estrogen receptor-alpha agonists and is abolished by estrogen deprivation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:1203–8.
- [69] Arnal JF, Fontaine C, Billon-Gales A, Favre J, Laurell H, et al. Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1506–12.
- [70] McInerney EM, Katzenellenbogen BS. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J Biol Chem* 1996;271:24172–8.
- [71] Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* 1995;270:9535–42.
- [72] Billon-Gales A, Fontaine C, Filipe C, Douin-Echinard V, Fouque MJ, Flouriot G, et al. The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17{beta}-estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2053–8.
- [73] Kos M, Denger S, Reid G, Korach KS, Gannon F. Down but not out? A novel protein isoform of the estrogen receptor alpha is expressed in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *J Mol Endocrinol* 2002;29:281–6.
- [74] Billon-Gales A, Krust A, Fontaine C, Abot A, Flouriot G, Toutain C, et al. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor-{alpha} is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:13311–6.
- [75] Arao Y, Hamilton KJ, Ray MK, Scott G, Mishina Y, Korach KS. Estrogen receptor alpha AF-2 mutation results in antagonist reversal and reveals tissue selective function of estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14986–91.
- [76] Borjesson AE, Windahl SH, Lagerquist MK, Engdahl C, Frenkel B, Moverare-Skrtic S, et al. Roles of transactivating functions 1 and 2 of estrogen receptor-{alpha} in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6288–93.
- [77] Pedram A, Razandi M, Kim JK, O'Mahony F, Lee EY, Luderer U, et al. Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor alpha (MOER) mouse. *J Biol Chem* 2009;284:3488–95.
- [78] Arias-Loza PA, Jazbutyte V, Pelzer T. Genetic and pharmacologic strategies to determine the function of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in cardiovascular system. *Gend Med* 2008;5(Suppl. A):S34–45.
- [79] Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 2008;6:e003.
- [80] Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2433–8.
- [81] Handa RJ, Ogawa S, Wang JM, Herbison AE. Roles for oestrogen receptor beta in adult brain function. *J Neuroendocrinol* 2012;24:160–73.
- [82] Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 2010;24:2152–65.
- [83] Gougelet A, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM. Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER)beta-mediated transcriptional repression of ER alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:110–22.
- [84] Charn TH, Liu ET, Chang EC, Lee YK, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors alpha and beta: mutual restriction and competitive site selection. *Mol Endocrinol* 2010;24:47–59.
- [85] Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Biomedicine. Defining the “s” in serms. *Science* 2002;295:2380–1.



# BIBLIOGRAPHIE



(1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 351, 1451-1467.

Abot, A., Fontaine, C., Raymond-Letron, I., Flouriot, G., Adlanmerini, M., Buscato, M., Otto, C., Berges, H., Laurell, H., Gourdy, P., et al. (2013). The AF-1 Activation Function of Estrogen Receptor alpha Is Necessary and Sufficient for Uterine Epithelial Cell Proliferation In Vivo. *Endocrinology* 154, 2222-2233.

Accocia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., and Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16, 231-237.

Accocia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P., and Marino, M. (2004). S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 878-883.

Adesanya, O.O., Zhou, J., Samathanam, C., Powell-Braxton, L., and Bondy, C.A. (1999). Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3287-3291.

Agarwal, A.K., Durani, S., and Setty, B.S. (1982). Dose dependent modulation of receptor dynamics and uterine growth in immature rat by estradiol: importance of an additional nuclear binding at 24 hr for long-term (72 hr) uterine growth. *Endokrinologie* 79, 235-241.

Ahlbory-Dieker, D.L., Stride, B.D., Leder, G., Schkoldow, J., Trolenberg, S., Seidel, H., Otto, C., Sommer, A., Parker, M.G., Schutz, G., et al. (2009). DNA binding by estrogen receptor-alpha is essential for the transcriptional response to estrogen in the liver and the uterus. *Mol Endocrinol* 23, 1544-1555.

Amant, C., Holm, P., Xu Sh, S.H., Tritman, N., Kearney, M., and Losordo, D.W. (2001). Estrogen receptor-mediated, nitric oxide-dependent modulation of the immunologic barrier function of the endothelium: regulation of fas ligand expression by estradiol. *Circulation* 104, 2576-2581.

Andersen, R.J., Mawji, N.R., Wang, J., Wang, G., Haile, S., Myung, J.K., Watt, K., Tam, T., Yang, Y.C., Banuelos, C.A., et al. (2010). Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell* 17, 535-546.

Anderson, G.L., Judd, H.L., Kaunitz, A.M., Barad, D.H., Beresford, S.A., Pettinger, M., Liu, J., McNeely, S.G., Lopez, A.M., and Women's Health Initiative, I. (2003). Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 290, 1739-1748.

Anderson, G.L., Limacher, M., Assaf, A.R., Bassford, T., Beresford, S.A., Black, H., Bonds, D., Brunner, R., Brzyski, R., Caan, B., et al. (2004). Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 291, 1701-1712.

Anisimov, V.N., Ukrainseva, S.V., and Yashin, A.I. (2005). Cancer in rodents: does it tell us about cancer in humans? *Nat Rev Cancer* 5, 807-819.

Anolik, J.H., Klinge, C.M., Bambara, R.A., and Hilf, R. (1993). Differential impact of flanking sequences on estradiol- vs 4-hydroxytamoxifen-ligated estrogen receptor binding to estrogen responsive element DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46, 713-730.

Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., and Mark, M. (2008). Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2433-2438.

Arao, Y., Hamilton, K.J., Ray, M.K., Scott, G., Mishina, Y., and Korach, K.S. (2011). Estrogen receptor alpha AF-2 mutation results in antagonist reversal and reveals tissue selective function of estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14986-14991.

Arnal, J.F., Clamens, S., Pechet, C., Nègre-Salvayre, A., Allera, C., Girolami, J.P., Salvayre, R., and Bayard, F. (1996). Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4108-4113.

Arnal, J.F., Fontaine, C., Abot, A., Valera, M.C., Laurell, H., Gourdy, P., and Lenfant, F. (2013). Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor alpha in vivo. *Steroids* **78**, 576-582.

Arnal, J.F., Lenfant, F., Flouriot, G., Tremolieres, F., Laurell, H., Fontaine, C., Krust, A., Chambon, P., and Gourdy, P. (2012). From in vivo gene targeting of Estrogen Receptors to Optimisation of their Modulation in Menopause. *Br J Pharmacol* **165**, 57-66.

Arnal, J.F., Scarabin, P.Y., Tremolieres, F., Laurell, H., and Gourdy, P. (2007). Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr Opin Lipidol* **18**, 554-560.

Aronica, S.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* **7**, 743-752.

Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J., and Nilsson, S. (1998). Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular pharmacology* **54**, 105-112.

Baraille, P., Chinestra, P., Bayard, F., and Faye, J.C. (1999). Alternative initiation of translation accounts for a 67/45 kDa dimorphism of the human estrogen receptor ERalpha. *Biochem Biophys Res Commun* **257**, 84-88.

Barrett-Connor, E. (2007). Hormones and heart disease in women: the timing hypothesis. *Am J Epidemiol* **166**, 506-510.

Barrett-Connor, E., and Stuenkel, C. (1999). Hormones and heart disease in women: Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study in perspective. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1848-1853.

Barros, R.P., and Gustafsson, J.A. (2011). Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell Metab* **14**, 289-299.

Barton, H.A., Andersen, M.E., and Allen, B.C. (1998). Dose-response characteristics of uterine responses in rats exposed to estrogen agonists. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **28**, 133-149.

Bergman, L., Beelen, M.L., Galle, M.P., Hollema, H., Benraadt, J., and van Leeuwen, F.E. (2000). Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer.

Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. *Lancet* 356, 881-887.

Bergman, M.D., Schachter, B.S., Karelus, K., Combatsiaris, E.P., Garcia, T., and Nelson, J.F. (1992). Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 130, 1923-1930.

Berry, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *Embo J* 9, 2811-2818.

Billon-Gales, A., Fontaine, C., Douin-Echinard, V., Delpy, L., Berges, H., Calippe, B., Lenfant, F., Laurell, H., Guery, J.C., Gourdy, P., et al. (2009a). Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 120, 2567-2576.

Billon-Gales, A., Fontaine, C., Filipe, C., Douin-Echinard, V., Fouque, M.J., Flouriot, G., Gourdy, P., Lenfant, F., Laurell, H., Krust, A., et al. (2009b). The transactivating function 1 of estrogen receptor {alpha} is dispensable for the vasculoprotective actions of 17{beta}-estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2053-2058.

Billon-Gales, A., Krust, A., Fontaine, C., Abot, A., Flouriot, G., Toutain, C., Berges, H., Gadeau, A.P., Lenfant, F., Gourdy, P., et al. (2011b). Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor-alpha is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 13311-13316.

Billon, A., Lehoux, S., Lam Shang Leen, L., Laurell, H., Filipe, C., Benouaich, V., Bouchet, L., Dessy, C., Gourdy, P., Gadeau, A.P., et al. (2008). The Estrogen Effects on Endothelial Repair and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Are Abolished in Endothelial Nitric-Oxide (NO) Synthase Knockout Mice, but Not by NO Synthase Inhibition by N-Nitro-L-arginine Methyl Ester. *Am J Pathol* 172, 830-838.

Binko, J., Murphy, T.V., and Majewski, H. (1998). 17Beta-oestradiol enhances nitric oxide synthase activity in endothelium-denuded rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 120-127.

Bjornstrom, L., and Sjoberg, M. (2002). Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. *Mol Endocrinol* 16, 2202-2214.

Bjornstrom, L., and Sjoberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19, 833-842.

Blackwood, E.M., and Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281, 60-63.

Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* 17, 2581-2595.

Borjesson, A.E., Windahl, S.H., Lagerquist, M.K., Engdahl, C., Frenkel, B., Moverare-Skrtic, S., Sjogren, K., Kindblom, J.M., Stubelius, A., Islander, U., et al. (2011a). Roles of transactivating functions 1 and 2 of estrogen receptor-{alpha} in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 6288-6293.

Bourassa, P.A., Milos, P.M., Gaynor, B.J., Breslow, J.L., and Aiello, R.J. (1996). Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10022-10027.

Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Gannon, F., White, J.H., and Mader, S. (2004). Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol* 18, 1411-1427.

Braithwaite, R.S., Chlebowski, R.T., Lau, J., George, S., Hess, R., and Col, N.F. (2003). Meta-analysis of vascular and neoplastic events associated with tamoxifen. *Journal of general internal medicine* 18, 937-947.

Brasier, A.R., Recinos, A., 3rd, and Eleftheriadi, M.S. (2002). Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1257-1266.

Brouchet, L., Krust, A., Dupont, S., Champon, P., Bayard, F., and Arnal, J.F. (2001). Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* 103, 423-428.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.

Buchanan, D.L., Setiawan, T., Lubahn, D.B., Taylor, J.A., Kurita, T., Cunha, G.R., and Cooke, P.S. (1999). Tissue compartment-specific estrogen receptor-alpha participation in the mouse uterine epithelial secretory response. *Endocrinology* 140, 484-491.

Bulger, M., and Groudine, M. (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* 13, 2465-2477.

Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174-2183.

Burns, K.A., Li, Y., Arao, Y., Petrovich, R.M., and Korach, K.S. (2011). Selective mutations in estrogen receptor alpha D-domain alters nuclear translocation and non-estrogen response element gene regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 286, 12640-12649.

Calippe, B., Douin-Echinard, V., Laffargue, M., Laurell, H., Rana-Poussine, V., Pipy, B., Guery, J.C., Bayard, F., Arnal, J.F., and Gourdy, P. (2008). Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 180, 7980-7988.

Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276, 9817-9824.

Cann, J.A., Register, T.C., Adams, M.R., St Clair, R.W., Espeland, M.A., and Williams, J.K. (2008). Timing of estrogen replacement influences atherosclerosis progression and plaque leukocyte populations in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Atherosclerosis* 201, 43-52.

Carmeliet, P., Moos, L., Stassen, J., De Mol, M., Bouché, A., van den Oord, J., Kocks, M., and Collen, D. (1997). Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol* 150, 761-776.

Carr, M.C. (2003). The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404-2411.

Carroll, J.S., Liu, X.S., Brodsky, A.S., Li, W., Meyer, C.A., Szary, A.J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E.V., Geistlinger, T.R., et al. (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122, 33-43.

Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoute, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F., et al. (2006). Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38, 1289-1297.

Castellano-Diaz, E., Gonzalez-Quijano, M.I., Liminana, J.M., and Diaz-Chico, B.N. (1989). Tamoxifen decreases the estradiol induced progesterone receptors by interfering with nuclear estrogen receptor accumulation. *Journal of steroid biochemistry* 33, 133-139.

Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M.V., and Auricchio, F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20, 6050-6059.

Cathapermal, S., Lavigne, M.C., Leong-Son, M., Alibadi, T., and Ramwell, P.W. (1998). Stereoisomer-specific inhibition of superoxide anion-induced rat aortic smooth-muscle cell proliferation by 17beta-estradiol is estrogen receptor dependent. *J Cardiovasc Pharmacol* 31, 499-505.

Caulin-Glaser, T., Garcia-Cardenas, G., Sarrel, P., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (1997). 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 81, 885-892.

Caulin-Glaser, T., Watson, C.A., Pardi, R., and Bender, J.R. (1996). Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 98, 36-42.

Chamberlain, N.L., Driver, E.D., and Miesfeld, R.L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 22, 3181-3186.

Chambliss, K.L., and Shaul, P.W. (2002). Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 23, 665-686.

Chambliss, K.L., Wu, Q., Oltmann, S., Konaniah, E.S., Umetani, M., Korach, K.S., Thomas, G.D., Mineo, C., Yuhanna, I.S., Kim, S.H., et al. (2010). Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest* 120, 2319-2330.

Chang, E.C., Charn, T.H., Park, S.H., Helferich, W.G., Komm, B., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2008). Estrogen Receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding. *Mol Endocrinol* 22, 1032-1043.

Chang, J., Powles, T.J., Ashley, S.E., Iveson, T., Gregory, R.K., and Dowsett, M. (1998). Variation in endometrial thickening in women with amenorrhea on tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 48, 81-85.

Charn, T.H., Liu, E.T., Chang, E.C., Lee, Y.K., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2010). Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors alpha and beta: mutual restriction and competitive site selection. *Mol Endocrinol* 24, 47-59.

Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., and Shaul, P.W. (1999). Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103, 401-406.

Cheskis, B.J., Greger, J., Cooch, N., McNally, C., McLarney, S., Lam, H.S., Rutledge, S., Mekonnen, B., Hauze, D., Nagpal, S., et al. (2008). MNAR plays an important role in ER $\alpha$  activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids* 73, 901-905.

Chung, D., and Das, S.K. (2011). Mouse primary uterine cell coculture system revisited: ovarian hormones mimic the aspects of in vivo uterine cell proliferation. *Endocrinology* 152, 3246-3258.

Clarkson, T.B., and Appt, S.E. (2005). Controversies about HRT--lessons from monkey models. *Maturitas* 51, 64-74.

Coelingh Bennink, H.J., Heegaard, A.M., Visser, M., Holinka, C.F., and Christiansen, C. (2008a). Oral bioavailability and bone-sparing effects of estetrol in an osteoporosis model. *Climacteric* 11 Suppl 1, 2-14.

Coelingh Bennink, H.J., Holinka, C.F., and Diczfalusy, E. (2008b). Estetrol review: profile and potential clinical applications. *Climacteric* 11 Suppl 1, 47-58.

Coelingh Bennink, H.J., Skouby, S., Bouchard, P., and Holinka, C.F. (2008c). Ovulation inhibition by estetrol in an in vivo model. *Contraception* 77, 186-190.

Colditz, G.A., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rosner, B., Speizer, F.E., and Hennekens, C.H. (1987). Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 316, 1105-1110.

Collins, P., Rosano, G.M., Sarrel, P.M., Ulrich, L., Adamopoulos, S., Beale, C.M., McNeill, J.G., and Poole-Wilson, P.A. (1995). 17 beta-Estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary heart disease. *Circulation* 92, 24-30.

Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Young, P., Setiawan, T., Brody, J., Korach, K.S., Taylor, J., Lubahn, D.B., and Cunha, G.R. (1997). Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6535-6540.

Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., Lindzey, J., Golding, T.S., Lubahn, D.B., Smithies, O., and Korach, K.S. (1995). Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 9, 1441-1454.

Couse, J.F., and Korach, K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20, 358-417.

Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M.G. (1997). Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272, 19858-19862.

Cunha, G.R., Cooke, P.S., and Kurita, T. (2004). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67, 417-434.

Cunningham, K.S., and Gotlieb, A.I. (2005). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 85, 9-23.

Curtis Hewitt, S., Goulding, E.H., Eddy, E.M., and Korach, K.S. (2002). Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod* 67, 1268-1277.

Curtis, S.W., Clark, J., Myers, P., and Korach, K.S. (1999). Disruption of estrogen signaling does not prevent progesterone action in the estrogen receptor alpha knockout mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3646-3651.

Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., Lindzey, J., Couse, J.F., and Korach, K.S. (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12626-12630.

Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A., and Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 11, 1025-1033.

Darblade, B., Pendaries, C., Krust, A., Dupont, S., Fouque, M.J., Rami, J., Chambon, P., Bayard, F., and Arnal, J.F. (2002). Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 90, 413-419.

Das, S.K., Taylor, J.A., Korach, K.S., Paria, B.C., Dey, S.K., and Lubahn, D.B. (1997). Estrogenic responses in estrogen receptor-alpha deficient mice reveal a distinct estrogen signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12786-12791.

de Medina, P., Payre, B.L., Bernad, J., Bosser, I., Pipy, B., Silvente-Poirot, S., Favre, G., Faye, J.C., and Poirot, M. (2004). Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 1165-1173.

Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M., and Gustafsson, J.A. (2000). Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Molecular pharmacology* 58, 584-590.

Della Torre, S., Rando, G., Meda, C., Stell, A., Chambon, P., Krust, A., Ibarra, C., Magni, P., Ciana, P., and Maggi, A. (2011). Amino acid-dependent activation of liver estrogen receptor alpha integrates metabolic and reproductive functions via IGF-1. *Cell Metab* 13, 205-214.

Denger, S., Reid, G., Kos, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K.S., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2001). ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* 15, 2064-2077.

Dharma, S.J., Kholkute, S.D., and Nandedkar, T.D. (2001). Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle. *Indian journal of experimental biology* 39, 218-222.

Di Cristofano, A., and Ellenson, L.H. (2007). Endometrial carcinoma. Annual review of pathology 2, 57-85.

DiAugustine, R.P., Petrusz, P., Bell, G.I., Brown, C.F., Korach, K.S., McLachlan, J.A., and Teng, C.T. (1988). Influence of estrogens on mouse uterine epidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 122, 2355-2363.

Dietz, S.C., and Carroll, J.S. (2008). Interrogating the genome to understand oestrogen-receptor-mediated transcription. *Expert reviews in molecular medicine* 10, e10.

Doesburg, P., Kuil, C.W., Berrevoets, C.A., Steketee, K., Faber, P.W., Mulder, E., Brinkmann, A.O., and Trapman, J. (1997). Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor. *Biochemistry* 36, 1052-1064.

Dong, X., Challis, J.R., and Lye, S.J. (2004). Intramolecular interactions between the AF3 domain and the C-terminus of the human progesterone receptor are mediated through two LXXLL motifs. *J Mol Endocrinol* 32, 843-857.

Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277-4291.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717.

Edwards, D.P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67, 335-376.

Egan, K.M., Lawson, J.A., Fries, S., Koller, B., Rader, D.J., Smyth, E.M., and Fitzgerald, G.A. (2004). COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306, 1954-1957.

Elhage, R., Arnal, J.F., Pierragi, M.-T., Duverger, N., Fiévet, C., Faye, J.C., and Bayard, F. (1997a). Estradiol-17b prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 17, 2679-2684.

Elhage, R., Bayard, F., Richard, V., Holvoet, P., Duverger, N., Fievet, C., and Arnal, J.F. (1997b). Prevention of fatty streak formation of 17beta-estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 96, 3048-3052.

Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., and Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19, 5363-5372.

Faye, J.C., Fargin, A., and Bayard, F. (1986). Dissimilarities between the uterine estrogen receptor in cytosol of castrated and estradiol-treated rats. *Endocrinology* 118, 2276-2283.

Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., and West, B.L. (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280, 1747-1749.

Figtree, G.A., Webb, C.M., and Collins, P. (2000). Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium-, nitric oxide-, and estrogen receptor-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 519-523.

Filipe, C., Lam Shang Leen, L., Brouchet, L., Billon, A., Benouaich, V., Fontaine, V., Gourdy, P., Lenfant, F., Arnal, J.F., Gadeau, A.P., et al. (2008). Estradiol accelerates endothelial healing through the retrograde commitment of uninjured endothelium. *Am J Physiol* 294, H2822-2830.

Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *Embo J* 19, 4688-4700.

Fong, C.J., Burgoon, L.D., Williams, K.J., Forgacs, A.L., and Zacharewski, T.R. (2007). Comparative temporal and dose-dependent morphological and transcriptional uterine effects elicited by tamoxifen and ethynodiol in immature, ovariectomized mice. *BMC Genomics* 8, 151.

Fong, C.J., Burgoon, L.D., Williams, K.J., Jones, A.D., Forgacs, A.L., and Zacharewski, T.R. (2010). Effects of tamoxifen and ethynodiol cotreatment on uterine gene expression in immature, ovariectomized mice. *J Mol Endocrinol* 45, 161-173.

Fontaine, C., Abot, A., Billon-Gales, A., Fouriot, G., Berges, H., Grunenwald, E., Vinel, A., Valera, M.C., Gourdy, P., and Arnal, J.F. (2013). Tamoxifen Elicits Atheroprotection through Estrogen Receptor alpha AF-1 But Does Not Accelerate Reendothelialization. *Am J Pathol*.

Fontaine, V., Filipe, C., Werner, N., Gourdy, P., Billon, A., Garmy-Susini, B., Brouchet, L., Bayard, F., Prats, H., Doetschman, T., et al. (2006). Essential role of bone marrow fibroblast growth factor-2 in the effect of estradiol on reendothelialization and endothelial progenitor cell mobilization. *Am J Pathol* 169, 1855-1862.

Frasor, J., Barnett, D.H., Danes, J.M., Hess, R., Parlow, A.F., and Katzenellenbogen, B.S. (2003). Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology* 144, 3159-3166.

Fu, X.D., Cui, Y.H., Lin, G.P., and Wang, T.H. (2007). Non-genomic effects of 17beta-estradiol in activation of the ERK1/ERK2 pathway induces cell proliferation through upregulation of cyclin D1 expression in bovine artery endothelial cells. *Gynecol Endocrinol* 23, 131-137.

Fullwood, M.J., Liu, M.H., Pan, Y.F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y.B., Orlov, Y.L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P.H., et al. (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* 462, 58-64.

Garban, H.J., Marquez-Garban, D.C., Pietras, R.J., and Ignarro, L.J. (2005). Rapid nitric oxide-mediated S-nitrosylation of estrogen receptor: regulation of estrogen-dependent gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2632-2636.

Geraldes, P., Sirois, M.G., Bernatchez, P.N., and Tanguay, J.F. (2002). Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1585-1590.

- Gerschenson, L.E., Conner, E., and Murai, J.T. (1977). Regulation of the cell cycle by diethylstilbestrol and progesterone in cultured endometrial cells. *Endocrinology* 100, 1468-1471.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Gisclard, V., Miller, V.M., and Vanhoutte, P.M. (1988). Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 244, 19-22.
- Glass, C.K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15, 391-407.
- Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Gosden, J.R., Middleton, P.G., and Rout, D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. *Cytogenetics and cell genetics* 43, 218-220.
- Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., and Charo, I.F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 103, 773-778.
- Gourdy, P., Araujo, L.M., Zhu, R., Garmy-Susini, B., Diem, S., Laurell, H., Leite-de-Moraes, M., Dy, M., Arnal, J.F., Bayard, F., et al. (2005). Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-{gamma} production by invariant natural killer T cells. *Blood* 105, 2415-2420.
- Grady, D., Gebretsadik, T., Kerlikowske, K., Ernster, V., and Petitti, D. (1995). Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 85, 304-313.
- Graham, J.D., and Clarke, C.L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18, 502-519.
- Grainger, D.J., Weissberg, P.L., and Metcalfe, J.C. (1993). Tamoxifen decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth-muscle cells in culture by inducing production of transforming growth factor beta. *The Biochemical journal* 294 (Pt 1), 109-112.
- Grainger, D.J., Witchell, C.M., and Metcalfe, J.C. (1995). Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat Med* 1, 1067-1073.
- Grandien, K., Backdahl, M., Ljunggren, O., Gustafsson, J.A., and Berkenstam, A. (1995). Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology* 136, 2223-2229.
- Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. (1988). The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J* 7, 3037-3044.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.

Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154.

Grodstein, F., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Willett, W.C., Rosner, B., Speizer, F.E., and Hennekens, C.H. (1996). Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 335, 453-461.

Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Nuclear receptors. How to finger DNA. *Nature* 375, 190-191.

Groothuis, P.G., Dassen, H.H., Romano, A., and Punyadeera, C. (2007). Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human reproduction update* 13, 405-417.

Haas, E., Meyer, M.R., Schurr, U., Bhattacharya, I., Minotti, R., Nguyen, H.H., Heigl, A., Lachat, M., Genoni, M., and Barton, M. (2007). Differential effects of 17 $\beta$ -estradiol on function and expression of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta, and GPR30 in arteries and veins of patients with atherosclerosis. *Hypertension* 49, 1358-1363.

Hackshaw, A., Roughton, M., Forsyth, S., Monson, K., Reczko, K., Sainsbury, R., and Baum, M. (2011). Long-term benefits of 5 years of tamoxifen: 10-year follow-up of a large randomized trial in women at least 50 years of age with early breast cancer. *J Clin Oncol* 29, 1657-1663.

Hagen, A.A., Barr, M., and Diczfalusy, E. (1965). Metabolism of 17-Beta-Oestradiol-4-14-C in Early Infancy. *Acta endocrinologica* 49, 207-220.

Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ER $\beta$ ) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578.

Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 5, 343-357.

Hammond, G.L., Hogeveen, K.N., Visser, M., and Coelingh Bennink, H.J. (2008). Estetrol does not bind sex hormone binding globulin or increase its production by human HepG2 cells. *Climacteric* 11 Suppl 1, 41-46.

Harada, N., Mitani, T., Higashimura, Y., Yamaji, R., Okamoto, K., Nakano, Y., and Inui, H. (2010). Involvement of three glutamine tracts in human androgen receptor transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118, 77-84.

Harrington, W.R., Kim, S.H., Funk, C.C., Madak-Erdogan, Z., Schiff, R., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2006). Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol* 20, 491-502.

Harris, H.A., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2002). Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , in estrogen target tissues *in vivo* through the use of an ER $\alpha$ -selective ligand. *Endocrinology* 143, 4172-4177.

Hayashi, T., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J., and Chaudhuri, G. (1992). Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11259-11263.

He, B., Bai, S., Hnat, A.T., Kalman, R.I., Minges, J.T., Patterson, C., and Wilson, E.M. (2004). An androgen receptor NH<sub>2</sub>-terminal conserved motif interacts with the COOH terminus of the Hsp70-interacting protein (CHIP). *J Biol Chem* 279, 30643-30653.

He, B., Kemppainen, J.A., and Wilson, E.M. (2000). FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH<sub>2</sub>-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem* 275, 22986-22994.

Heegaard, A.M., Holinka, C.F., Kenemans, P., and Coelingh Bennink, H.J. (2008). Estrogenic uterovaginal effects of oral estetrol in the modified Allen-Doisy test. *Climacteric* 11 Suppl 1, 22-28.

Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.

Helguero, L.A., Faulds, M.H., Gustafsson, J.A., and Haldosen, L.A. (2005). Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24, 6605-6616.

Henttu, P.M., Kalkhoven, E., and Parker, M.G. (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 17, 1832-1839.

Hertrampf, T., Seibel, J., Laudenbach, U., Fritzemeier, K.H., and Diel, P. (2008). Analysis of the effects of oestrogen receptor alpha (ERalpha)- and ERbeta-selective ligands given in combination to ovariectomized rats. *Br J Pharmacol* 153, 1432-1437.

Hewitt, S.C., Collins, J., Grissom, S., Deroo, B., and Korach, K.S. (2005). Global uterine genomics in vivo: microarray evaluation of the estrogen receptor alpha-growth factor cross-talk mechanism. *Mol Endocrinol* 19, 657-668.

Hewitt, S.C., Deroo, B.J., Hansen, K., Collins, J., Grissom, S., Afshari, C.A., and Korach, K.S. (2003). Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol* 17, 2070-2083.

Hewitt, S.C., Kissling, G.E., Fieselman, K.E., Jayes, F.L., Gerrish, K.E., and Korach, K.S. (2010a). Biological and biochemical consequences of global deletion of exon 3 from the ER alpha gene. *FASEB J* 24, 4660-4667.

Hewitt, S.C., Li, L., Grimm, S.A., Chen, Y., Liu, L., Li, Y., Bushel, P.R., Fargo, D., and Korach, K.S. (2012). Research resource: whole-genome estrogen receptor alpha binding in mouse uterine tissue revealed by ChIP-seq. *Mol Endocrinol* 26, 887-898.

Hewitt, S.C., Li, Y., Li, L., and Korach, K.S. (2010b). Estrogen-mediated regulation of Igf1 transcription and uterine growth involves direct binding of estrogen receptor alpha to estrogen-responsive elements. *J Biol Chem* 285, 2676-2685.

Hewitt, S.C., O'Brien, J.E., Jameson, J.L., Kissling, G.E., and Korach, K.S. (2009). Selective disruption of ER{alpha} DNA-binding activity alters uterine responsiveness to estradiol. *Mol Endocrinol* 23, 2111-2116.

- Hilgers, R.H., Oparil, S., Wouters, W., and Coelingh Bennink, H.J. (2012). Vasorelaxing effects of estetrol in rat arteries. *J Endocrinol* 215, 97-106.
- Hilser, V.J., and Thompson, E.B. (2011). Structural dynamics, intrinsic disorder, and allostery in nuclear receptors as transcription factors. *J Biol Chem* 286, 39675-39682.
- Hittelman, A.B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J.A., Freedman, L.P., and Garabedian, M.J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 18, 5380-5388.
- Hodgin, J., and Maeda, N. (2002). Estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 143, 4495-4501.
- Hodgin, J.B., Knowles, J.W., Kim, H.S., Smithies, O., and Maeda, N. (2002). Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *J Clin Invest* 109, 541-548.
- Holinka, C.F., Brincat, M., and Coelingh Bennink, H.J. (2008). Preventive effect of oral estetrol in a menopausal hot flush model. *Climacteric* 11 Suppl 1, 15-21.
- Holinka, C.F., and Gorpide, E. (1979). In vivo effects of estetrol on the immature rat uterus. *Biol Reprod* 20, 242-246.
- Hollenberg, S.M., and Evans, R.M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899-906.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., and Evans, R.M. (1987). Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* 49, 39-46.
- Holm, P., Andersen, H.L., Andersen, M.R., Erhardtzen, E., and Stender, S. (1999). The direct antiatherogenic effect of estrogen is present, absent, or reversed, depending on the state of the arterial endothelium. A time course study in cholesterol-clamped rabbits. *Circulation* 100, 1727-1733.
- Holm, P., Korsgaard, N., Shalmi, M., Andersen, H.L., Hougaard, P., Skouby, S.O., and Stender, S. (1997). Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits. *J Clin Invest* 100, 821-828.
- Hom, Y.K., Young, P., Wiesen, J.F., Miettinen, P.J., Derynck, R., Werb, Z., and Cunha, G.R. (1998). Uterine and vaginal organ growth requires epidermal growth factor receptor signaling from stroma. *Endocrinology* 139, 913-921.
- Hong, S.H., Nah, H.Y., Lee, J.Y., Gye, M.C., Kim, C.H., and Kim, M.K. (2004). Analysis of estrogen-regulated genes in mouse uterus using cDNA microarray and laser capture microdissection. *J Endocrinol* 181, 157-167.
- Huet-Hudson, Y.M., Chakraborty, C., De, S.K., Suzuki, Y., Andrews, G.K., and Dey, S.K. (1990). Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol* 4, 510-523.
- Huet, G., Merot, Y., Le Dily, F., Kern, L., Ferriere, F., Saligaut, C., Boujrad, N., Pakdel, F., Metivier, R., and Flouriot, G. (2008). Loss of E-cadherin-mediated cell contacts reduces estrogen receptor alpha (ER alpha) transcriptional efficiency by affecting the respective

contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions. *Biochem Biophys Res Commun* 365, 304-309.

Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., and Vittinghoff, E. (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group*. *Jama* 280, 605-613.

Hyder, S.M., Stancel, G.M., Chiappetta, C., Murthy, L., Boettger-Tong, H.L., and Makela, S. (1996). Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. *Cancer Res* 56, 3954-3960.

Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., and Korach, K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4658-4662. Ihionkhan, C.E., Chambliss, K.L., Gibson, L.L., Hahner, L.D., Mendelsohn, M.E., and Shaul, P.W. (2002). Estrogen causes dynamic alterations in endothelial estrogen receptor expression. *Circ Res* 91, 814-820.

Ikonen, T., Palvimo, J.J., and Janne, O.A. (1997). Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 272, 29821-29828.

Improta-Brears, T., Whorton, A.R., Codazzi, F., York, J.D., Meyer, T., and McDonnell, D.P. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4686-4691.

Ince, B.A., Zhuang, Y., Wrenn, C.K., Shapiro, D.J., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Powerful dominant negative mutants of the human estrogen receptor. *J Biol Chem* 268, 14026-14032.

Ivanga, M., Labrie, Y., Calvo, E., Belleau, P., Martel, C., Luu-The, V., Morissette, J., Labrie, F., and Durocher, F. (2007). Temporal analysis of E2 transcriptional induction of PTP and MKP and downregulation of IGF-I pathway key components in the mouse uterus. *Physiological genomics* 29, 13-23.

Iwakura, A., Luedemann, C., Shastry, S., Hanley, A., Kearney, M., Aikawa, R., Isner, J.M., Asahara, T., and Losordo, D.W. (2003). Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 108, 3115-3121.

Jakacka, M., Ito, M., Martinson, F., Ishikawa, T., Lee, E.J., and Jameson, J.L. (2002). An estrogen receptor (ER) $\alpha$  deoxyribonucleic acid-binding domain knock-in mutation provides evidence for nonclassical ER pathway signaling in vivo. *Mol Endocrinol* 16, 2188-2201.

Jakacka, M., Ito, M., Weiss, J., Chien, P.Y., Gehm, B.D., and Jameson, J.L. (2001). Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway. *J Biol Chem* 276, 13615-13621.

Jensen, E.V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspectives in biology and medicine* 6, 47-59.

Jenster, G., van der Korput, H.A., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (1995). Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 270, 7341-7346.

Jiang, H.P., Teng, R.Y., Wang, Q., Zhang, X., Wang, H.H., Cao, J., and Teng, L.S. (2008). Estrogen receptor alpha variant ERalpha46 mediates growth inhibition and apoptosis of human HT-29 colon adenocarcinoma cells in the presence of 17beta-oestradiol. *Chinese medical journal* 121, 1025-1031.

Jordan, V.C. (2004). Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 5, 207-213.

Jozan, S., Kreitmann, B., and Bayard, F. (1981). Different effects of oestradiol, oestriol, oestetrol and of oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture. *Acta endocrinologica* 98, 73-80.

Kalin, M.F., and Zumoff, B. (1990). Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55, 330-352.

Kallas Hueb, C., Aldrighi, J.M., Kallas, E., and Franchini Ramires, J.A. (2005). Repercussions of raloxifen, tamoxifen and estrogen on aortic atherosclerotic lesions of female rabbits submitted to ovariectomy and hypercholesterol diet. *Maturitas* 50, 30-38.

Karas, R.H., Hodgin, J.B., Kwoun, M., Krege, J.H., Aronovitz, M., Mackey, W., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., Smithies, O., and Mendelsohn, M.E. (1999). Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15133-15136.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.

Katzenellenbogen, B.S., Sun, J., Harrington, W.R., Kraichely, D.M., Ganessunker, D., and Katzenellenbogen, J.A. (2001). Structure-function relationships in estrogen receptors and the characterization of novel selective estrogen receptor modulators with unique pharmacological profiles. *Ann N Y Acad Sci* 949, 6-15.

Kedar, R.P., Bourne, T.H., Powles, T.J., Collins, W.P., Ashley, S.E., Cosgrove, D.O., and Campbell, S. (1994). Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomised breast cancer prevention trial. *Lancet* 343, 1318-1321.

Kedjouar, B., de Medina, P., Oulad-Abdelghani, M., Payre, B., Silvente-Poirot, S., Favre, G., Faye, J.C., and Poirot, M. (2004). Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. *J Biol Chem* 279, 34048-34061.

Kim, M.Y., Woo, E.M., Chong, Y.T., Homenko, D.R., and Kraus, W.L. (2006). Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 20, 1479-1493.

Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.

Klinge, C.M., Jernigan, S.C., Mattingly, K.A., Risinger, K.E., and Zhang, J. (2004). Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol* 33, 387-410.

Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Ciana, P., Raviscioni, M., Lindzey, J.K., Foley, J., Maggi, A., DiAugustine, R.P., and Korach, K.S. (2002). Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem* 277, 8531-8537.

Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Korach, K.S., and Diaugustine, R.P. (2000). Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 141, 3430-3439.

Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem* 275, 15645-15651.

Kockx, M.M., and Knaapen, M.W. (2000). The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 190, 267-280.

Kolodgie, F.D., Jacob, A., Wilson, P.S., Carlson, G.C., Farb, A., Verma, A., and Virmani, R. (1996). Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol* 148, 969-976.

Kos, M., Denger, S., Reid, G., Korach, K.S., and Gannon, F. (2002). Down but not out? A novel protein isoform of the estrogen receptor alpha is expressed in the estrogen receptor alpha knockout mouse. *J Mol Endocrinol* 29, 281-286.

Kos, M., O'Brien, S., Flouriot, G., and Gannon, F. (2000). Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor alpha gene. *FEBS Lett* 477, 15-20.

Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15, 2057-2063.

Kraichely, D.M., Sun, J., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2000). Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology* 141, 3534-3545.

Krasinski, K., Spyridopoulos, I., Asahara, T., van der Zee, R., Isner, J.M., and Losordo, D.W. (1997). Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95, 1768-1772.

Kraus, W.L., McInerney, E.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12314-12318.

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15677-15682.

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

Kumar, P., Wu, Q., Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Mumby, S.M., Mineo, C., Tall, G.G., and Shaul, P.W. (2007). Direct interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 21, 1370-1380.

Kumar, R., and Thompson, E.B. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* 17, 1-10.

Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.

Kurita, T., Lee, K.J., Cooke, P.S., Lydon, J.P., and Cunha, G.R. (2000a). Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol Reprod* 62, 831-838.

Kurita, T., Lee, K.J., Cooke, P.S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., and Cunha, G.R. (2000b). Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* 62, 821-830.

Kurita, T., Wang, Y.Z., Donjacour, A.A., Zhao, C., Lydon, J.P., O'Malley, B.W., Isaacs, J.T., Dahiya, R., and Cunha, G.R. (2001). Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system. *Cell Death Differ* 8, 192-200.

La Rosa, P., Pesiri, V., Leclercq, G., Marino, M., and Acconcia, F. (2012). Palmitoylation regulates 17beta-estradiol-induced estrogen receptor-alpha degradation and transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 26, 762-774.

Lannigan, D.A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1-9.

Lantin-Hermoso, R.L., Rosenfeld, C.R., Yuhanna, I.S., German, Z., Chen, Z., and Shaul, P.W. (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273, L119-126.

Lawn, R.M., Pearle, A.D., Kunz, L.L., Rubin, E.M., Reckless, J., Metcalfe, J.C., and Grainger, D.J. (1996). Feedback mechanism of focal vascular lesion formation in transgenic apolipoprotein(a) mice. *J Biol Chem* 271, 31367-31371.

Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 32, 597-622.

Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Boucheikioua-Bouzaghou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31, 212-221.

Lecce, G., Meduri, G., Ancelin, M., Bergeron, C., and Perrot-Applanat, M. (2001). Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1379-1386.

Lees, J.A., Fawell, S.E., and Parker, M.G. (1989). Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *Nucleic Acids Res* 17, 5477-5488.

Lemon, B.D., and Freedman, L.P. (1999). Nuclear receptor cofactors as chromatin remodelers. *Current opinion in genetics & development* 9, 499-504.

Lenfant, F., Tremolieres, F., Gourdy, P., and Arnal, J.F. (2011). Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: why protective early, and not when delayed? *Maturitas* 68, 165-173.

Lerner, D.J., and Kannel, W.B. (1986). Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 111, 383-390.

Levin, E.R. (2003). Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 17, 309-317.

Levin, E.R. (2005). Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 19, 1951-1959.

Levin, E.R. (2011). Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. *Mol Endocrinol* 25, 377-384.

Li, L., Haynes, M.P., and Bender, J.R. (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4807-4812.

Li, L., Hisamoto, K., Kim, K.H., Haynes, M.P., Bauer, P.M., Sanjay, A., Collinge, M., Baron, R., Sessa, W.C., and Bender, J.R. (2007). Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16468-16473.

Li, X., Huang, J., Yi, P., Bambara, R.A., Hilf, R., and Muyan, M. (2004). Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol Cell Biol* 24, 7681-7694.

Lin, A.H., Li, R.W., Ho, E.Y., Leung, G.P., Leung, S.W., Vanhoutte, P.M., and Man, R.Y. (2013). Differential Ligand Binding Affinities of Human Estrogen Receptor-alpha Isoforms. *PLoS One* 8, e63199.

Liou, C.M., Yang, A.L., Kuo, C.H., Tin, H., Huang, C.Y., and Lee, S.D. (2010). Effects of 17beta-estradiol on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. *Cell biochemistry and function* 28, 521-528.

Losordo, D.W., Kearney, M., Kim, E.A., Jekanowski, J., and Isner, J.M. (1994). Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 89, 1501-1510.

Love, R.R., Wiebe, D.A., Feyzi, J.M., Newcomb, P.A., and Chappell, R.J. (1994). Effects of tamoxifen on cardiovascular risk factors in postmenopausal women after 5 years of treatment. *J Natl Cancer Inst* 86, 1534-1539.

Lu, Q., Pallas, D.C., Surks, H.K., Baur, W.E., Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (2004). Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic

activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 17126-17131.

Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90, 11162-11166.

Lupien, M., Jeyakumar, M., Hebert, E., Hilmi, K., Cotnoir-White, D., Loch, C., Auger, A., Dayan, G., Pinard, G.A., Wurtz, J.M., et al. (2007). Raloxifene and ICI182,780 increase estrogen receptor-alpha association with a nuclear compartment via overlapping sets of hydrophobic amino acids in activation function 2 helix 12. Mol Endocrinol 21, 797-816.

Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. Genes Dev 9, 2266-2278.

Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., and Chambon, P. (1989). Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. Nature 338, 271-274.

Magnani, L., and Lupien, M. (2013). Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. Mol Cell Endocrinol.

Mahfoudi, A., Roulet, E., Daurois, S., Parker, M.G., and Wahli, W. (1995). Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 4206-4210.

Maret, A., Coudert, J.D., Garidou, L., Foucras, G., Gourdy, P., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Druet, P., Bayard, F., et al. (2003). Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. Eur J Immunol 33, 512-521.

Marino, M., and Ascenzi, P. (2008). Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation. Steroids 73, 853-858.

Marino, M., Ascenzi, P., and Accocia, F. (2006). S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. Steroids 71, 298-303.

Marino, M., Ficca, R., Ascenzi, P., and Trentalance, A. (2001). Nitric oxide inhibits selectively the 17beta-estradiol-induced gene expression without affecting nongenomic events in HeLa cells. Biochem Biophys Res Commun 286, 529-533.

Mark-Kappeler, C.J., Martin, D.S., and Eyster, K.M. (2011). Estrogens and selective estrogen receptor modulators regulate gene and protein expression in the mesenteric arteries. Vascul Pharmacol 55, 42-49.

Marsh, M.M., Walker, V.R., Curtiss, L.K., and Banka, C.L. (1999). Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. J Lipid Res 40, 893-900.

Martin, L., Das, R.M., and Finn, C.A. (1973). The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse. J Endocrinol 57, 549-554.

Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E., and Stoica, A. (2000). A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 141, 4503-4511.

Mason, C.E., Shu, F.J., Wang, C., Session, R.M., Kallen, R.G., Sidell, N., Yu, T., Liu, M.H., Cheung, E., and Kallen, C.B. (2010). Location analysis for the estrogen receptor-alpha reveals binding to diverse ERE sequences and widespread binding within repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 38, 2355-2368.

McDonnell, D.P., and Norris, J.D. (2002). Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296, 1642-1644.

McEwan, I.J. (2001). Structural and functional alterations in the androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy. *Biochemical Society transactions* 29, 222-227.

McEwan, I.J., Lavery, D., Fischer, K., and Watt, K. (2007). Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nucl Recept Signal* 5, e001.

McInerney, E.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J Biol Chem* 271, 24172-24178.

McInerney, E.M., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10069-10073.

McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-344.

McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* 143, 2461-2465.

Menasce, L.P., White, G.R., Harrison, C.J., and Boyle, J.M. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* 17, 263-265.

Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (2010). Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling. *J Clin Invest* 120, 2277-2279.

Merot, Y., Metivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O., and Flouriot, G. (2004). The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem* 279, 26184-26191.

Metivier, R., Penot, G., Carmouche, R.P., Hubner, M.R., Reid, G., Denger, S., Manu, D., Brand, H., Kos, M., Benes, V., et al. (2004). Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *Embo J* 23, 3653-3666.

Metivier, R., Penot, G., Flouriot, G., and Pakdel, F. (2001). Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 15, 1953-1970.

Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763.

Metivier, R., Petit, F.G., Valotaire, Y., and Pakdel, F. (2000). Function of N-terminal transactivation domain of the estrogen receptor requires a potential alpha-helical structure and is negatively regulated by the A domain. *Mol Endocrinol* 14, 1849-1871.

Metivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hubner, M.R., Brand, H., Penot, G., Manu, D., Denger, S., Reid, G., Kos, M., et al. (2002). A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* 10, 1019-1032.

Metzger, D., Ali, S., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1995a). Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* 270, 9535-9542.

Metzger, D., Berry, M., Ali, S., and Chambon, P. (1995b). Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 9, 579-591.

Micevych, P., Kuo, J., and Christensen, A. (2009). Physiology of membrane oestrogen receptor signalling in reproduction. *J Neuroendocrinol* 21, 249-256.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15, 1292-1300.

Miller, V.M., Jayachandran, M., and Owen, W.G. (2007). Ageing, oestrogen, platelets and thrombotic risk. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 814-821.

Minutolo, F., Macchia, M., Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (2011). Estrogen receptor beta ligands: recent advances and biomedical applications. *Medicinal research reviews* 31, 364-442.

Miyagawa, K., Rosch, J., Stanczyk, F., and Hermsmeyer, K. (1997). Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 3, 324-327.

Moggs, J.G., Tinwell, H., Spurway, T., Chang, H.S., Pate, I., Lim, F.L., Moore, D.J., Soames, A., Stuckey, R., Currie, R., et al. (2004). Phenotypic anchoring of gene expression changes during estrogen-induced uterine growth. *Environmental health perspectives* 112, 1589-1606. Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012.

Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 9, 814-825.

Morley, P., Whitfield, J.F., Vanderhyden, B.C., Tsang, B.K., and Schwartz, J.L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 131, 1305-1312.

Mosca, L., Grady, D., Barrett-Connor, E., Collins, P., Wenger, N., Abramson, B.L., Paganini-Hill, A., Geiger, M.J., Dowsett, S.A., Amewou-Atisso, M., et al. (2009). Effect of raloxifene on

stroke and venous thromboembolism according to subgroups in postmenopausal women at increased risk of coronary heart disease. *Stroke* 40, 147-155.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.

Mourits, M.J., Ten Hoor, K.A., van der Zee, A.G., Willemse, P.H., de Vries, E.G., and Hollema, H. (2002). The effects of tamoxifen on proliferation and steroid receptor expression in postmenopausal endometrium. *Journal of clinical pathology* 55, 514-519.

Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., and Conneely, O.M. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289, 1751-1754.

Murphy, A.J., Guyre, P.M., Wira, C.R., and Pioli, P.A. (2009). Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS One* 4, e5539.

Murphy, L.J., and Ghahary, A. (1990). Uterine insulin-like growth factor-1: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* 11, 443-453.

Nakai, K., Itoh, C., Hotta, K., Itoh, T., Yoshizumi, M., and Hiramori, K. (1994). Estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci* 54, PL221-227.

Nakamura, Y., Suzuki, T., Miki, Y., Tazawa, C., Senzaki, K., Moriya, T., Saito, H., Ishibashi, T., Takahashi, S., Yamada, S., et al. (2004). Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 219, 17-26.

Nathan, L., Pervin, S., Singh, R., Rosenfeld, M., and Chaudhuri, G. (1999). Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo : possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res* 85, 377-385.

Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1858-1862.

Nelson, K.G., Takahashi, T., Bossert, N.L., Walmer, D.K., and McLachlan, J.A. (1991). Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 21-25.

Nichols, M., Rientjes, J.M., and Stewart, A.F. (1998). Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J* 17, 765-773.

Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (2011). Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clinical pharmacology and therapeutics* 89, 44-55.

Nilsson, S., Koehler, K.F., and Gustafsson, J.A. (2011). Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10, 778-792.

Norris, J.D., Fan, D., Kerner, S.A., and McDonnell, D.P. (1997). Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 11, 747-754.

O'Brien, J.E., Peterson, T.J., Tong, M.H., Lee, E.J., Pfaff, L.E., Hewitt, S.C., Korach, K.S., Weiss, J., and Jameson, J.L. (2006). Estrogen-induced proliferation of uterine epithelial cells is independent of estrogen receptor alpha binding to classical estrogen response elements. *J Biol Chem* 281, 26683-26692.

O'Lone, R., Knorr, K., Jaffe, I.Z., Schaffer, M.E., Martini, P.G., Karas, R.H., Bienkowska, J., Mendelsohn, M.E., and Hansen, U. (2007). Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol Endocrinol* 21, 1281-1296.

O'Malley, B.W., and McGuire, W.L. (1968). Studies on the mechanism of estrogen-mediated tissue differentiation: regulation of nuclear transcription and induction of new RNA species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 1527-1534.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998). 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* 243, 122-126.

Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R.C., and Ali, S. (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 272, 25832-25838.

Padron, A., Li, L., Kofoed, E.M., and Schaufele, F. (2007). Ligand-selective interdomain conformations of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 21, 49-61.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508-1510.

Paige, L.A., Christensen, D.J., Gron, H., Norris, J.D., Gottlin, E.B., Padilla, K.M., Chang, C.Y., Ballas, L.M., Hamilton, P.T., McDonnell, D.P., et al. (1999). Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3999-4004.

Pappas, T.C., Gametchu, B., and Watson, C.S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9, 404-410.

Pare, G., Krust, A., Karas, R.H., Dupont, S., Aronovitz, M., Chambon, P., and Mendelsohn, M.E. (2002). Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 90, 1087-1092.

Pedram, A., Razandi, M., Kim, J.K., O'Mahony, F., Lee, E.Y., Luderer, U., and Levin, E.R. (2009). Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor alpha (MOER) mouse. *J Biol Chem* 284, 3488-3495.

Pedram, A., Razandi, M., O'Mahony, F., Lubahn, D., and Levin, E.R. (2010). Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 24, 2152-2165.

Pendaries, C., Darblade, B., Rochaix, P., Krust, A., Chambon, P., Korach, K.S., Bayard, F., and Arnal, J.F. (2002). 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 99, 2205-2210.

Penot, G., Le Peron, C., Merot, Y., Grimaud-Fanouillere, E., Ferriere, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Metivier, R., et al. (2005). The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. Endocrinology 146, 5474-5484.

Peters, G.A., and Khan, S.A. (1999). Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. Mol Endocrinol 13, 286-296.

Philips, A., Teyssier, C., Galtier, F., Rivier-Covas, C., Rey, J.M., Rochefort, H., and Chalbos, D. (1998). FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. Mol Endocrinol 12, 973-985.

Pietras, R.J., Levin, E.R., and Szego, C.M. (2005). Estrogen receptors and cell signaling. Science 310, 51-53; author reply 51-53.

Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature 265, 69-72.

Pinkerton, J.V., Harvey, J.A., Pan, K., Thompson, J.R., Ryan, K.A., Chines, A.A., and Mirkin, S. (2013). Breast effects of bazedoxifene-conjugated estrogens: a randomized controlled trial. Obstet Gynecol 121, 959-968.

Pinna, C., Cignarella, A., Sanvito, P., Pelosi, V., and Bolego, C. (2008). Prolonged ovarian hormone deprivation impairs the protective vascular actions of estrogen receptor alpha agonists. Hypertension 51, 1210-1217.

Pollock, J.S., Forstermann, U., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Schmidt, H.H., Nakane, M., and Murad, F. (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 88, 10480-10484.

Pollock, J.S., Nakane, M., Buttery, L.D., Martinez, A., Springall, D., Polak, J.M., Forstermann, U., and Murad, F. (1993). Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. Am J Physiol 265, C1379-1387.

Quarmby, V.E., and Korach, K.S. (1984). Differential regulation of protein synthesis by estradiol in uterine component tissues. Endocrinology 115, 687-697.

Quayle, S.N., Mawji, N.R., Wang, J., and Sadar, M.D. (2007). Androgen receptor decoy molecules block the growth of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 1331-1336.

Rando, G., Horner, D., Biserni, A., Ramachandran, B., Caruso, D., Ciana, P., Komm, B., and Maggi, A. (2010). An innovative method to classify SERMs based on the dynamics of estrogen receptor transcriptional activity in living animals. Mol Endocrinol 24, 735-744.

Rayner, K., Sun, J., Chen, Y.X., McNulty, M., Simard, T., Zhao, X., Wells, D.J., de Belleroche, J., and O'Brien, E.R. (2009). Heat shock protein 27 protects against atherogenesis via an estrogen-dependent mechanism: role of selective estrogen receptor beta modulation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29, 1751-1756.

Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., and Levin, E.R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16, 100-115.

Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L., and Levin, E.R. (1999). 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* 13, 307-319.

Razandi, M., Pedram, A., and Levin, E.R. (2000). Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. *J Biol Chem* 275, 38540-38546.

Razandi, M., Pedram, A., Park, S.T., and Levin, E.R. (2003). Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278, 2701-2712.

Reckless, J., Metcalfe, J.C., and Grainger, D.J. (1997). Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 95, 1542-1548.

Reid, G., Denger, S., Kos, M., and Gannon, F. (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* 59, 821-831.

Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11, 695-707.

Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J.F., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2009). Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150, 2109-2117.

Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cellular signalling* 15, 355-366.

Rodriguez, E., Lopez, R., Paez, A., Masso, F., and Montano, L.F. (2002). 17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription. *Life Sci* 71, 2181-2193.

Romano, A., Adriaens, M., Kuenen, S., Delvoux, B., Dunselman, G., Evelo, C., and Groothuis, P. (2010). Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-estradiol and tamoxifen. *Mol Cell Endocrinol* 314, 90-100.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-125.

Rossner, S., and Wallgren, A. (1984). Serum lipoproteins and proteins after breast cancer surgery and effects of tamoxifen. *Atherosclerosis* 52, 339-346.

Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288, 321-333.

Rossouw, J.E., Prentice, R.L., Manson, J.E., Wu, L., Barad, D., Barnabei, V.M., Ko, M., LaCroix, A.Z., Margolis, K.L., and Stefanick, M.L. (2007). Postmenopausal hormone therapy

and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Jama* 297, 1465-1477.

Rubanyi, G.M., Johns, A., and Kauser, K. (2002). Effect of estrogen on endothelial function and angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 38, 89-98.

Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J.M., and Moras, D. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res* 2, 353-359.

Sadar, M.D. (2011). Small molecule inhibitors targeting the "achilles' heel" of androgen receptor activity. *Cancer Res* 71, 1208-1213.

Sader, M.A., and Celermajer, D.S. (2002). Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 53, 597-604.

Safe, S., and Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 41, 263-275.

Schnoes, K.K., Jaffe, I.Z., Iyer, L., Dabreo, A., Aronovitz, M., Newfell, B., Hansen, U., Rosano, G., and Mendelsohn, M.E. (2008). Rapid recruitment of temporally distinct vascular gene sets by estrogen. *Mol Endocrinol* 22, 2544-2556.

Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M.C., and Corbo, L. (2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 19, 2671-2684.

Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., et al. (2009). Expression of ER-{alpha}36, a novel variant of estrogen receptor {alpha}, and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 27, 3423-3429.

Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.

Simental, J.A., Sar, M., Lane, M.V., French, F.S., and Wilson, E.M. (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* 266, 510-518.

Simon, T., Boutouyrie, P., Simon, J.M., Laloux, B., Tournigand, C., Tropeano, A.I., Laurent, S., and Jaillon, P. (2002). Influence of tamoxifen on carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Circulation* 106, 2925-2929.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.

Sinkevicius, K.W., Burdette, J.E., Woloszyn, K., Hewitt, S.C., Hamilton, K., Sugg, S.L., Temple, K.A., Wondisford, F.E., Korach, K.S., Woodruff, T.K., et al. (2008). An estrogen receptor-alpha knock-in mutation provides evidence of ligand-independent signaling and allows modulation of ligand-induced pathways in vivo. *Endocrinology* 149, 2970-2979.

Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25, 45-71.

Sobrino, A., Mata, M., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Oviedo, P.J., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., and Hermenegildo, C. (2009). Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS One* 4, e8242.

Song, R.X., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., and Santen, R.J. (2004). The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2076-2081.

Sorescu, D., and Griendling, K.K. (2002). Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congestive heart failure* 8, 132-140.

Sourla, A., Luo, S., Labrie, C., Belanger, A., and Labrie, F. (1997). Morphological changes induced by 6-month treatment of intact and ovariectomized mice with tamoxifen and the pure antiestrogen EM-800. *Endocrinology* 138, 5605-5617.

Spyridopoulos, I., Sullivan, A.B., Kearney, M., Isner, J.M., and Losordo, D.W. (1997). Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation* 95, 1505-1514.

Stamatelopoulos, K.S., Lekakis, J.P., Poulakaki, N.A., Papamichael, C.M., Venetsanou, K., Aznaouridis, K., Protopgerou, A.D., Papaioannou, T.G., Kumar, S., and Stamatelopoulos, S.F. (2004). Tamoxifen improves endothelial function and reduces carotid intima-media thickness in postmenopausal women. *Am Heart J* 147, 1093-1099.

Steinberg, D. (1997). A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 131 Suppl, S5-7.

Stender, J.D., Kim, K., Charn, T.H., Komm, B., Chang, K.C., Kraus, W.L., Benner, C., Glass, C.K., and Katzenellenbogen, B.S. (2010). Genome-wide analysis of estrogen receptor alpha DNA binding and tethering mechanisms identifies Runx1 as a novel tethering factor in receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 30, 3943-3955.

Stevenson, J.C., Crook, D., Godsland, I.F., Collins, P., and Whitehead, M.I. (1994). Hormone replacement therapy and the cardiovascular system. Nonlipid effects. *Drugs* 47 Suppl 2, 35-41.

Stevenson, J.C., Hodis, H.N., Pickar, J.H., and Lobo, R.A. (2009). Coronary heart disease and menopause management: the swinging pendulum of HRT. *Atherosclerosis* 207, 336-340.

Stirone, C., Boroujerdi, A., Duckles, S.P., and Krause, D.N. (2005). Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects. *Molecular pharmacology* 67, 105-113.

Sudhir, K., Chou, T.M., Messina, L.M., Hutchison, S.J., Korach, K.S., Chatterjee, K., and Rubanyi, G.M. (1997). Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet* 349, 1146-1147.

Sullivan, T.R., Jr., Karas, R.H., Aronovitz, M., Faller, G.T., Ziar, J.P., Smith, J.J., O'Donnell, T.F., Jr., and Mendelsohn, M.E. (1995). Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model. *J Clin Invest* 96, 2482-2488.

Sun, J., Ma, X., Chen, Y.X., Rayner, K., Hibbert, B., McNulty, M., Dhaliwal, B., Simard, T., Ramirez, D., and O'Brien, E. (2011). Attenuation of atherogenesis via the anti-inflammatory effects of the selective estrogen receptor beta modulator 8beta-VE2. *J Cardiovasc Pharmacol* 58, 399-405.

Suzuki, A., Urushitani, H., Watanabe, H., Sato, T., Iguchi, T., Kobayashi, T., and Ohta, Y. (2007). Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 69, 725-731.

Takimoto, G.S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M.G., Sartorius, C.A., Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Bain, D.L., and Horwitz, K.B. (2003). Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85, 209-219.

Tateishi, Y., Kawabe, Y., Chiba, T., Murata, S., Ichikawa, K., Murayama, A., Tanaka, K., Baba, T., Kato, S., and Yanagisawa, J. (2004). Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J* 23, 4813-4823.

Taylor, H.S., and Ohleth, K. (2012). Using bazedoxifene plus conjugated estrogens for treating postmenopausal women: a comprehensive review. *Menopause* 19, 479-485.

Taylor, S.E., Martin-Hirsch, P.L., and Martin, F.L. (2010). Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett* 288, 133-148.

Tetel, M.J., Giangrande, P.H., Leonhardt, S.A., McDonnell, D.P., and Edwards, D.P. (1999). Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13, 910-924.

Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., and Chalbos, D. (2001). Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J Biol Chem* 276, 36361-36369.

Therrien, E., Englebienne, P., Arrowsmith, A.G., Mendoza-Sanchez, R., Corbeil, C.R., Weill, N., Campagna-Slater, V., and Moitessier, N. (2012). Integrating medicinal chemistry, organic/combinatorial chemistry, and computational chemistry for the discovery of selective estrogen receptor modulators with Forecaster, a novel platform for drug discovery. *Journal of chemical information and modeling* 52, 210-224.

Thornton, J.W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5671-5676.

Thornton, J.W., Need, E., and Crews, D. (2003). Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301, 1714-1717.

Tibbetts, T.A., Mendoza-Meneses, M., O'Malley, B.W., and Conneely, O.M. (1998). Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod* 59, 1143-1152.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59, 477-487.

Tremblay, G.B., Tremblay, A., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol* 19, 1919-1927.

Tseng, L., and Gurpide, E. (1976). Competition of estetrol and ethynodiol with estradiol for nuclear binding in human endometrium. *Journal of steroid biochemistry* 7, 817-822.

Tung, L., Shen, T., Abel, M.G., Powell, R.L., Takimoto, G.S., Sartorius, C.A., and Horwitz, K.B. (2001). Mapping the unique activation function 3 in the progesterone B-receptor upstream segment. Two LXXLL motifs and a tryptophan residue are required for activity. *J Biol Chem* 276, 39843-39851.

Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W., and McDonnell, D.P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8, 21-30.

Valley, C.C., Metivier, R., Solodin, N.M., Fowler, A.M., Mashek, M.T., Hill, L., and Alarid, E.T. (2005). Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus. *Mol Cell Biol* 25, 5417-5428.

Van Den Berg, G.J., Kuiper, G.G., Pols, H.A., and Van Leeuwen, J.P. (1999). Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 1-5.

Varricchio, L., Migliaccio, A., Castoria, G., Yamaguchi, H., de Falco, A., Di Domenico, M., Giovannelli, P., Farrar, W., Appella, E., and Auricchio, F. (2007). Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Molecular cancer research : MCR* 5, 1213-1221.

Vasudevan, N., and Pfaff, D.W. (2007). Membrane-initiated actions of estrogens in neuroendocrinology: emerging principles. *Endocr Rev* 28, 1-19.

Wada-Hiraike, O., Hiraike, H., Okinaga, H., Imamov, O., Barros, R.P., Morani, A., Omoto, Y., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2006). Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18350-18355.

Wakeling, A.E., Dukes, M., and Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51, 3867-3873.

Wall, E.H., Hewitt, S.C., Liu, L., Del Rio, R., Case, L.K., Lin, C.Y., Korach, K.S., and Teuscher, C. (2013). Genetic control of estrogen-regulated transcriptional and cellular responses in mouse uterus. *FASEB J* 27, 1874-1886.

Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., and Nelson, K.G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131, 1458-1466.

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeletsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., et al. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7889-7893.

Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., *et al.* (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276, 18375-18383.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1023-1027.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- $\alpha$ , hER- $\alpha$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9063-9068.

Warnholtz, A., Nickenig, G., Schulz, E., Macharzina, R., Brasen, J.H., Skatchkov, M., Heitzer, T., Stasch, J.P., Griendling, K.K., Harrison, D.G., *et al.* (1999). Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99, 2027-2033.

Warnmark, A., Wikstrom, A., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Hard, T. (2001). The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *J Biol Chem* 276, 45939-45944.

Watanabe, H., Suzuki, A., Kobayashi, M., Takahashi, E., Itamoto, M., Lubahn, D.B., Handa, H., and Iguchi, T. (2003). Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *J Mol Endocrinol* 30, 347-358.

Weatherman, R.V., and Scanlan, T.S. (2001). Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) at AP-1 sites. *J Biol Chem* 276, 3827-3832.

Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., and Kushner, P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9, 443-456.

Webb, P., Nguyen, P., and Kushner, P.J. (2003). Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. *J Biol Chem* 278, 6912-6920.

Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., *et al.* (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13, 1672-1685.

Webster, N.J., Green, S., Jin, J.R., and Chambon, P. (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54, 199-207.

Weigel, N.L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *The Biochemical journal* 319 (Pt 3), 657-667.

Weihua, Z., Saji, S., Makinen, S., Cheng, G., Jensen, E.V., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2000). Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5936-5941.

Welshons, W.V., Cormier, E.M., Wolf, M.F., Williams, P.O., Jr., and Jordan, V.C. (1988). Estrogen receptor distribution in enucleated breast cancer cell lines. *Endocrinology* 122, 2379-2386.

Wendling, O., Bornert, J.M., Chambon, P., and Metzger, D. (2009). Efficient temporally-controlled targeted mutagenesis in smooth muscle cells of the adult mouse. *Genesis* 47, 14-18.

White, R., Lees, J.A., Needham, M., Ham, J., and Parker, M. (1987). Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1, 735-744.

Wijayaratne, A.L., and McDonnell, D.P. (2001). The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem* 276, 35684-35692.

Williams, C., Edvardsson, K., Lewandowski, S.A., Strom, A., and Gustafsson, J.A. (2008). A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27, 1019-1032.

Williams, J.K., Wagner, J.D., Li, Z., Golden, D.L., and Adams, M.R. (1997). Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 403-408.

Wing, L.Y., Chen, Y.C., Shih, Y.Y., Cheng, J.C., Lin, Y.J., and Jiang, M.J. (2009). Effects of oral estrogen on aortic ROS-generating and -scavenging enzymes and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Experimental biology and medicine* 234, 1037-1046.

Winuthayanon, W., Hewitt, S.C., Orvis, G.D., Behringer, R.R., and Korach, K.S. (2010). Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19272-19277.

Wong, C.W., McNally, C., Nickbarg, E., Komm, B.S., and Cheskis, B.J. (2002). Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14783-14788.

Wood, G.A., Fata, J.E., Watson, K.L., and Khokha, R. (2007). Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* 133, 1035-1044.

Wood, J.R., Likhite, V.S., Loven, M.A., and Nardulli, A.M. (2001). Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 15, 1114-1126.

Yi, P., Driscoll, M.D., Huang, J., Bhagat, S., Hilf, R., Bambara, R.A., and Muyan, M. (2002). The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta. *Mol Endocrinol* 16, 674-693.

Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11, 3681-3694.

Zhang, H., McElrath, T., Tong, W., and Pollard, J.W. (2005). The molecular basis of tamoxifen induction of mouse uterine epithelial cell proliferation. *J Endocrinol* 184, 129-140.

Zhang, X.T., Kang, L.G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., and Wang, Z.Y. (2011). A positive feedback loop of ER-alpha36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30, 770-780.

Zhang, Z., Cerghet, M., Mullins, C., Williamson, M., Bessert, D., and Skoff, R. (2004). Comparison of in vivo and in vitro subcellular localization of estrogen receptors alpha and beta in oligodendrocytes. *Journal of neurochemistry* 89, 674-684.

Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., Karas, R.H., Bao, L., Cox, D., Hodgin, J., Shaul, P.W., Thoren, P., Smithies, O., et al. (2002). Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295, 505-508.

Zwart, W., de Leeuw, R., Rondaij, M., Neefjes, J., Mancini, M.A., and Michalides, R. (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of cell science* 123, 1253-1261.

# **MOLECULAR DISSECTION OF ACTIVATION FUNCTION AF-1 OF ESTROGEN RECEPTOR IN VASCULAR PHYSIOPATHOLOGY AND UTERINE PROLIFERATION**

---

Estrogens influence most of the physiological processes in mammals, in particular reproduction and vascular system. Thus, it is not surprising that these steroid hormones influence numerous diseases, including breast and endometrium cancers, as well as cardiovascular diseases. These actions are mediated by two nuclear receptors, estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which regulate target gene transcription through two independent activation functions AF-1 and AF-2. Using ER $\alpha$  deficient mice or electively targeting AF-1, my team has previously demonstrated that ER $\alpha$  is required for the E2 vasculoprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol (E2), the main natural estrogen. In contrast, activation of AF-1 of ER $\alpha$  is dispensable for atheroprotection, increase of NO relaxation and endothelial healing. During my PhD, we have shown that:

- 1) tamoxifen, a selective ER modulator, used more than 30 years for breast cancer treatment in premenopausal women, prevents atherosclerosis but not accelerates endothelial healing. This atheroprotective effect is ER $\alpha$ -dependant and in contrast to E2, needs its AF-1.
- 2) AF-1 of ER $\alpha$  is necessary to the regulation of gene transcription and cell proliferation in the uterus in response to E2 or tamoxifen. However a residual uterine hypertrophy after chronic E2 treatment persists in mice lacking AF-1 of ER $\alpha$ , potentially due to a stromal edema resulting to the persistence of Vegf-a induction. Furthermore uterine epithelial apoptosis and response to progesterone are largely altered in these mice.

Thus, my PhD contributes to the molecular dissection of ER $\alpha$  activation in vivo, which could pave the way of an optimized ER $\alpha$  modulation. Indeed, the selective activation of ER $\alpha$  inducing beneficial effects of E2 without stimulating deleterious effects represents a major therapeutic interest.

Anne ABOT

**DISSECTION MOLECULAIRE DE LA FONCTION  
ACTIVATRICE AF-1 DU RECEPTEUR AUX OESTROGENES  
ALPHA DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE VASCULAIRE ET  
LA PROLIFERATION UTERINE**

Directeurs de thèse : Pr. Jean-François ARNAL et Dr. Coralie FONTAINE

UNIVERSITE TOULOUSE III, LE 12 SEPTEMBRE 2013

---

Les œstrogènes influencent de nombreuses maladies comme le cancer de l'endomètre et les maladies cardiovasculaires. Leurs actions majeures sont relayées par le récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$ , régulant la transcription de gènes cibles *via* deux fonctions activatrices AF-1 et AF-2. Grâce à l'utilisation de souris invalidées pour AF-1, mon équipe a rapporté que l'AF-1 n'était pas nécessaire pour l'action vasculoprotectrice du 17 $\beta$ -œstradiol (E2), principal œstrogène naturel. Durant ma thèse, nous avons démontré que : i) le tamoxifène, modulateur sélectif des ERs, protège de l'athérosclérose *via* AF-1, contrairement à l'effet de l'E2 mais n'accélère pas la ré-endothélialisation, ii) l'AF-1 du ER $\alpha$  est nécessaire pour la régulation de la transcription et de la prolifération cellulaire dans l'utérus en réponse à l'E2 et au tamoxifène. Ainsi, ce travail contribue à la dissection moléculaire de l'action du ER $\alpha$  *in vivo*, qui pourrait poser les bases d'une optimisation de la modulation du ER $\alpha$ .

---

Mots-clés : Œstrogènes, Tamoxifène, Vasculoprotection, Prolifération utérine.

---

Discipline : Physiopathologie

Unité de recherche : INSERM UMR1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Toulouse, France