

## MISE AU POINT/UPDATE

# Dissection *in vivo* du Récepteur des Œstrogènes en vu d'une optimisation de sa modulation en clinique

F. Lenfant\*, A. Abot\*, C. Vaysse#, E. Chantelat#, F. Tremollières\*#, P. Gourdy\*#, J.-F. Arnal\*#

\* INSERM U1048-I2MC, Faculté de Médecine, Université de Toulouse ; # CHU de Toulouse, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4 France

Correspondence : Jean-Francois.Arnal@inserm.fr

**RÉSUMÉ :** Le statut ancestral des récepteurs des œstrogènes (ER) de la famille des récepteurs aux stéroïdes a probablement contribué aux actions pléiotropes des œstrogènes, dont le principal est 17β-œstradiol (E2). En effet, en plus de leur rôle dans le développement des caractères sexuels et de la reproduction, les œstrogènes influencent la plupart des processus physiologiques. Le pendant physiopathologique de ces effets comprend la prévention par les œstrogènes de l'ostéoporose, de l'athérosclérose, du diabète de type 2, le revers de la médaille étant de favoriser le développement des cancers de l'endomètre et du sein. Ainsi, le défi majeur consiste à optimiser le découplage de ces actions bénéfiques et de ces actions néfastes par une modulation sélective des

ER. Le tamoxifène et le raloxifène sont déjà largement utilisés, car ils empêchent la récurrence du cancer du sein et miment l'action des œstrogènes principalement sur les os. Cependant, l'E2 et le tamoxifène entraînent une prolifération de l'endomètre et favorisent par là une action pro-tumorale.

Sur le plan mécanistique, l'activation de ERα et ERβ régule la transcription de nombreux gènes cibles (effets génomiques) par le biais de deux fonctions de transactivation (AFs) indépendantes, AF-1 et AF-2, mais peut également induire de signaux stéroïdiens rapides initiés à la membrane (MISS, aussi appelés effets non génomiques).

Dans cette revue, nous avons tenté de résumer l'état actuel de nos connaissances expérimentales et cliniques con-

cernant les effets des œstrogènes et la modulation de leur principal récepteur ERα. En particulier, des travaux récents obtenus grâce aux manipulations génétiques du ERα chez la souris montrent qu'il est conceptuellement possible d'optimiser le découplage des effets bénéfiques et indésirables découlant de l'activation de ERα, ouvrant potentiellement la voie à une modulation sélective de ER.

**Mots-clés :** Récepteurs des œstrogènes (ER) – Hormonothérapie (HT) – Athérome – Cancer du sein – Souris transgénique

## From *in vivo* gene targeting of Estrogen Receptors to Optimisation of their Modulation in clinical practice

**ABSTRACT:** The ancestral status of estrogen receptor (ER) in the family of the steroid receptors has probably contributed to the pleiotropic actions of estrogens, and in particular of 17β-estradiol (E2). Indeed, in addition to their well described role in sexual development and reproduction, they influence most of the physiological processes. The pathophysiological counterpart of these actions includes prevention of osteoporosis, atheroma and type 2 diabetes..., but also promotion of uterus and breast cancer growth. Thus, the major challenge consists in uncoupling some beneficial actions from other deleterious ones, i.e. selective ER modu-

lation. Tamoxifen and raloxifen are already used as they prevent the recurrence of breast cancer, and mimic estrogen action mainly on bone. Both E2 and tamoxifen exhibit a proliferative and thus protumoral action on the endometrium.

From a mechanistic point of view, activation of ERα and ERβ regulates transcription of many target genes (genomic effects) through two independent transactivation functions (AFs) AF-1 and AF-2, but can also elicit rapid membrane-initiated steroidal signal (MISS, also called non-genomic effects).

In this review, we have attempted to summarize our current knowledge regarding experimental and clinical effects of estrogen and modulation of their main receptor ERα. In particular, recent works obtained through genetic manipulation of ERα in mice show that it is conceptually possible to optimize the uncoupling of beneficial and adverse effects resulting from activation of ERα, potentially paving the way for a new selective modulation of ER.

**Keywords:** Estrogen receptor – Atheroma – Uterus – Breast cancer – Transgenic mouse

## Introduction

Après un siècle de progrès sanitaires, alimentaires et médicaux (vaccination, antibiotiques...), l'espérance de vie des femmes est passée de 48 ans en 1900 à plus de 80 ans aujourd'hui [1]. Ainsi, la prise en charge de la ménopause qui survient en moyenne à 52 ans, perçue principalement par les bouffées de chaleur, reste un défi relativement récent pour les femmes. L'hormonothérapie (HT) se compo-

sait initialement d'œstrogènes sous forme orale, dérivés d'œstrogènes de juments en gestation (Premarin®), également connus sous le nom « œstrogènes conjugués équins » (CEE), et remplaçait la production endogène qui cesse à la ménopause. Les œstrogènes combinés à un progestatif ont été utilisés systématiquement pour les plus de 50 ans afin d'améliorer les symptômes de la ménopause et, par la suite, pour maintenir la densité osseuse ou empêcher l'apparition de la ma-

ladie coronarienne (CHD), chez les femmes à un âge plus avancé. Plus généralement, les œstrogènes et, en particulier le 17 b-œstradiol (E2), sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques, tel que le système cardiovasculaire, le métabolisme énergétique, les os et le système nerveux central. Ainsi, l'ambition de l'HT est de maintenir l'homéostasie physiologique après la ménopause, de façon quasi similaire à l'état pré-ménopausique.

De plus, les œstrogènes sont un puissant stimulus pour le développement de ses organes cibles, tels que l'utérus, le vagin mais également pour les cancers du sein hormonosensibles. Aussi, le lien entre les œstrogènes et le développement du cancer du sein a incité à développer des traitements anti-œstrogéniques, menant à une avancée thérapeutique importante. Ainsi, les antagonistes des ER, les modulateurs sélectifs des ERs (SERMs) et les inhibiteurs de l'aromatase ont été développés, mais leur effet au long cours supprime également les actions bénéfiques des œstrogènes.

**Controverses sur les œstrogènes et les maladies coronariennes : une question de « timing »**

Bien que l'HT est reconnue comme étant le traitement le plus efficace contre les symptômes climactériques, son bénéfice global a été remis en question depuis la publication de la « Women's Health Initiative » (WHI) [2] en 2002, étant donné que cette étude n'a pas confirmé l'action protectrice des œstrogènes contre les maladies coronariennes. La conclusion d'un effet globalement néfaste a conduit à une baisse spectaculaire dans le monde entier de son utilisation [3]. Auparavant, les études épidémiologiques et l'étude des infirmières américaines [4], ainsi que toutes les études réalisées sur les modèles animaux d'athérome ont démontré un effet vasculoprotecteur des œstrogènes endogènes et exogènes [5-7]. En revanche, l'étude de la WHI a signalé que les femmes ménopausées recevant les CEE avec l'acétate de médroxyprogestérone (MPA) avaient une fréquence accrue de maladies coronariennes par rapport aux femmes prenant un placebo [2]. De manière intéressante, le risque de développer une maladie coronarienne chez les femmes ménopausées hystérectomisées prenant les CEE seuls était similaire à celui recevant un placebo [8]. Au total, ces résultats montrent l'effet délétère de la combinaison d'œstrogènes oraux avec le progestatif MPA. Un progestatif est en effet nécessaire pour contrebalancer l'effet prolifératif et protumoral des œstrogènes sur l'endomètre [3]. Le problème posé par le MPA avait déjà été signalé dès 1997 [9]

dans une étude portant sur des singes ovariectomisés : l'E2 prévient la dysfonction endothéliale coronaire, tandis que la combinaison de l'E2 et de la MPA n'a plus cet effet protecteur. En revanche, la prévention du spasme coronaire par l'E2 n'était pas altérée par l'association à la progestérone.

Il convient également de souligner que, dans la WHI, l'HT était prescrite en moyenne 11 ans après la ménopause, tandis que, en pratique clinique, l'HT est normalement initiée en début de ménopause, à un moment où plus de 70 % des femmes souffrent de symptômes climactériques. À noter que les femmes de la WHI qui ont débuté l'HT près de la ménopause avaient tendance à avoir le risque coronarien diminué, tandis que ce risque était d'autant plus accru que ce traitement était initié à un âge tardif, montrant que les résultats basés sur des femmes de moins de 60 ans ou qui ont moins de 10 ans de ménopause sont très proches de ceux des cohortes d'observation [3, 10]. Nos connaissances sur les cibles cellulaires potentielles et les mécanismes d'actions vasculoprotecteurs des œstrogènes, ainsi que l'absence d'action des œstrogènes lorsqu'ils sont administrés après une longue période de privation hor-

monale, ont fait l'objet de plusieurs revues récentes [3, 11].

**Les actions bénéfiques des œstrogènes**

La raison principale de l'instauration d'une HT à la ménopause est son effet spectaculaire sur les symptômes climactériques, ainsi que sur la qualité de vie. L'HT a été motivée pour soulager les bouffées de chaleur, les sueurs nocturnes, l'insomnie, la sécheresse vaginale et donc pour améliorer la qualité de vie des femmes ménopausées. Elle n'a cessé d'être la thérapie la plus efficace pour réduire ces symptômes. Néanmoins, après la publication des résultats de la WHI, l'impact de l'HT sur la santé et le devenir de la qualité de vie a été remis en question [12-13]. Bien que l'étude ait rapporté une amélioration significative dans les performances physiques chez les femmes prenant une HT par rapport à un placebo, les différences sont faibles. Toutefois, lorsque les analyses ont été restreintes aux femmes avec des symptômes liés à la ménopause, il y avait une amélioration significative de la qualité de vie subjective. Des études récentes [14-15] ont confirmé que l'HT est toujours le traitement de

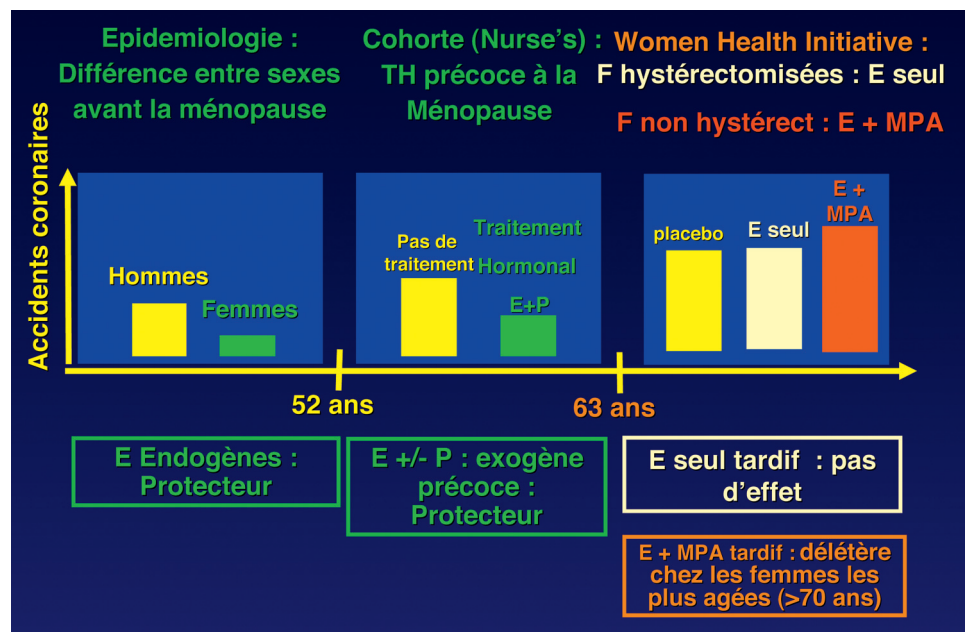


Fig. 1. Tentative de synthèse du risque d'accident coronarien en fonction du statut hormonal dans les études épidémiologiques, dans l'étude de cohorte des Infirmières américaines (Nurse's) [4] et dans l'étude d'intervention américaine Women Health Initiative (WHI) [2, 8] parue en 2002 et 2004. La juxtaposition de ces trois grandes approches fait ressortir l'impact majeur de l'âge et/ou d'une période sans imprégnation hormonale (voir texte). E : œstrogènes, P : progestatif, TH : traitement hormonal.

choix pour maintenir une qualité de vie et une activité sexuelle satisfaisantes. Les femmes du groupe HT avaient une réduction des symptômes vasomoteurs et leur sommeil était amélioré. Elles signalaient également moins de douleurs articulaires et musculaires, moins de sécheresse vaginale et une activité sexuelle améliorée. Il est à noter que les effets bénéfiques sur le sommeil et l'activité sexuelle sont généralement indépendants de la présence de symptômes vasomoteurs.

Outre les actions vasculoprotectrices des œstrogènes lorsqu'ils sont administrés dès l'installation de la ménopause (cf. supra), nous nous focaliserons sur deux actions bénéfiques importantes induites par les œstrogènes : la prévention de l'ostéoporose et du diabète de type 2.

L'ostéoporose touche plus de 80 millions de personnes dans le monde et favorise la survenue fractures. La carence en œstrogènes associée à la ménopause provoque l'accélération de la perte osseuse ainsi que des altérations de la microarchitecture osseuse [16-17]. Les effets bénéfiques de l'HT pour prévenir la perte osseuse post-ménopausique sont indéniables. Une méta-analyse de 57 études randomisées [18] montre que l'HT a eu un effet favorable sur tous les sites (le rachis lombaire, les os de l'avant-bras, et le col fémoral). Les 2 ans de suivi montraient une différence de densité minérale osseuse chez les femmes traitées par HT en moyenne + 6,8 % au niveau de la colonne vertébrale et + 4,1 % au niveau du col fémoral par rapport au placebo. L'efficacité était indépendante de l'âge ou de la durée de la ménopause. En outre, dans les études qui intégraient également les fractures, il y avait une tendance à la diminution de l'incidence des fractures vertébrales mais aussi non vertébrales. La WHI [8] a confirmé l'effet bénéfique de l'HT pour réduire le risque fracturaire. Il est important de souligner que la plupart des femmes incluses dans la WHI avaient un faible risque ostéoporotique. L'incidence de la fracture était 10 à 15 fois plus faible que dans la plupart des essais sur la prévention de l'ostéoporose, avec les bisphosphonates ou le raloxifène.

Dans une étude contrôlée réalisée sur cinq ans, l'HT combinée administrée aux

femmes après la ménopause de façon précoce induit une réduction de 70 % du risque de fractures non vertébrales par rapport à un placebo [19]. Par conséquent, il a été suggéré que l'HT fournit le meilleur effet protecteur contre les fractures chez les femmes à haut risque comme celles qui, par exemple, débutent la ménopause avec une densité minérale osseuse faible et un taux élevé de perte osseuse après la ménopause.

Une observation moins attendue était la prévention sans équivoque du diabète de type 2 par l'HT chez les femmes ménopausées. Il est bien reconnu que les femmes avant la ménopause sont beaucoup plus insulino-sensibles que les hommes de même âge [20-21], et que la ménopause favorise les dépôts de graisse viscérale et la résistance à l'insuline, conduisant à une augmentation significative du risque de diabète de type 2 [22]. Ainsi, en plus de l'occidentalisation du mode de vie, notamment d'une diète enrichie en matières grasses et de la sédentarité, la ménopause doit être considérée comme un risque non négligeable de syndrome métabolique et de diabète de type 2. Comme suggéré par les études observationnelles [23], le principal essai randomisé contrôlé HT contre placebo a démontré que l'HT a fortement réduit l'incidence du diabète de type 2 chez les femmes ménopausées. Une diminution de 21 à 35 % de l'apparition de diabète de type 2 a été signalée chez les femmes ménopausées recevant l'association de CEE et MPA, dans la WHI et dans l'étude « Heart and Estrogen/Progestin Replacement » (HERS), respectivement [24-25]. De nombreuses études chez les rongeurs ont également suggéré l'existence d'un effet stimulant sur la sécrétion d'insuline et sur la préservation des cellules bêta du pancréas [26], en accord avec les études cliniques et expérimentales indiquant que les œstrogènes contribuent principalement à l'homéostasie du glucose par le biais de leurs actions positives sur la sensibilité à l'insuline [22]. Par exemple, au cours du suivi de la WHI, la glycémie à jeun et la sensibilité à l'insuline ont été nettement améliorées par l'HT [24, 27].

Enfin, le rôle crucial d'ER $\alpha$  sur l'homéostasie du glucose et sur la distribution de la masse grasse a été suggéré par le cas

clinique unique d'un homme porteur d'une mutation inactivatrice du gène d'ER $\alpha$  qui a développé un syndrome métabolique précoce et sévère associé à une dysfonction endothéliale et des lésions précoces d'athérome [28]. Quelques années plus tard, l'inactivation du gène ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -/-) chez la souris conduit à un phénotype similaire, qui se caractérise par la prise de poids, une adiposité viscérale, une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose chez les femelles comme chez les mâles [29-30]. Nous avons récemment démontré l'effet protecteur exercé par l'E2 sur l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline induite par les régimes riches en graisse, tandis que cet effet protecteur de l'E2 est aboli chez les souris ER $\alpha$ -/- [31]. Au total, ces observations suggèrent que, en plus de la recommandation classique visant à encourager l'activité physique et à réduire les apports caloriques, la modulation de ER $\alpha$  pourrait constituer une cible thérapeutique pour lutter contre le développement du diabète de type 2.

## Effets délétères des œstrogènes

Que ce soit lors du traitement par HT ou lors de la prise de contraceptifs oraux, le risque de thrombose veineuse et d'accidents vasculaires cérébraux est augmenté [32-33]. Mais la voie d'administration des œstrogènes pourrait être un facteur déterminant de ces effets préjudiciables, probablement à cause de l'hypercoagulabilité systémique entraînée. L'administration par voie transcutanée des œstrogènes n'a pas ou peu d'influence sur les taux circulants des facteurs de la coagulation, et aucun effet sur les lipides et les lipoprotéines.

Cet effet minime sur le métabolisme hépatique est attribuable à l'absence de premier passage hépatique du fait de l'évitement de la circulation portale. En effet, dans l'étude ESTHER cas/témoins portant sur les œstrogènes et le risque thromboembolique, les œstrogènes transcutanés seuls ou combinés avec des dérivés de la progestérone (dydrogestérone ou prégnane) n'augmentent pas le risque thromboembolique (VTE), à la différence de la voie orale [34]. Il faut aussi signaler l'intérêt potentiellement majeur d'un nouveau SERM naturel, l'estrotol, synthétisé par le foie fœtal

au cours de la grossesse. En effet, cet œstrogène partiel n'a pas effet inducteur sur les facteurs de la coagulation hépatique (JM Foidart, communication personnelle) (Fig. 4).

En outre, le type de progestatif peut aussi être un facteur déterminant puisque les combinaisons avec la 19-norpregnane (progestatif de 1<sup>re</sup> génération) ont été décrites comme étant associées à un risque accru de maladie thromboembolique, même lorsque l'œstrogène est donné par voie transcutanée [34]. Plus récemment, l'HT transcutanée ne semble pas augmenter le risque d'accident vasculaire cérébral dans une autre étude cas/témoin, particulièrement avec les schémas thérapeutiques utilisant de faibles doses d'œstrogènes [35]. Ainsi, bien que devant être confirmés par des essais cliniques randomisés, ces résultats suggèrent fortement que la voie d'administration de l'œstrogène et le type de progestatif utilisé peuvent être déterminants sur la balance bénéfice risque de l'HT.

Cependant, l'effet le plus redouté de l'HT, en particulier dans l'œdème, porte sur l'augmentation du risque de cancer du sein. Il est bien établi que l'administration des œstrogènes seuls est associée à une hyperplasie endométriale conduisant à un risque accru de cancer de l'endomètre [36]. Cette action stimulatrice peut être neutralisée en combinant l'œstrogène à un progestatif (comme la progestérone ou MPA).

Surtout, l'inhibition de l'activité d'ER dans le cancer du sein a conduit à un succès thérapeutique majeur. Il y a plus d'un siècle George Beaton a été le premier à signaler l'intérêt de l'ovariectomie chez une jeune femme ayant un cancer métastatique avancé inopérable [37]. L'identification des ER par Jensen et Jacobson [38] a permis de démontrer que la présence d'ER dans une tumeur du sein augmentait la probabilité de l'efficacité du blocage des œstrogènes. La drogue ICI-46474, connue sous le nom de tamoxifène (Fig. 4, découvert dans Programme de contraception à Imperial Chemical Industries, ICI maintenant AstraZeneca), a été décrite par Craig Jordan [39] comme étant efficace dans le traitement et la prévention du cancer du sein en bloquant l'action des œstrogènes au niveau d'ER. Cinq années de traitement

adjuvant par tamoxifène permettent de réduire la récurrence locale et la maladie métastatique à distance d'environ 50 % chez les patientes dont le cancer du sein est ER-positif [40]. Le traitement adjuvant par tamoxifène réduit le risque de mortalité par cancer du sein d'environ un tiers.

La comparaison entre les deux bras de la WHI (2002 et 2004) a souligné la relation complexe entre les œstrogènes et les progestatifs non seulement en termes de maladie coronarienne comme précédemment mentionné, mais aussi dans le cancer du sein [3]. Alors que la CEE, combinée à la MPA a augmenté l'incidence du cancer du sein chez les femmes non hystérectomisées [2], de façon inattendu et surprenante, la CEE seule diminue ce risque chez les femmes hystérectomisées [8].

Cependant, ce dernier résultat doit être nuancé par des analyses détaillées dont il ressort un risque de cancer du sein lié l'exposition cumulative aux œstrogènes [41]. Ces discordances soulignent que l'effet de l'HT sur le cancer du sein demeure extrêmement controversé.

Enfin, Horwitz [42] a ainsi émis l'hypothèse que les progestatifs systémiques pourraient contribuer à réveiller des cancers qui étaient considérés comme dormants ou guéris. Au total, devant l'action néfaste de certains progestatifs, il est admis que l'une des stratégies concernant le développement de nouveaux traitements d'HT est d'éviter l'association de progestatifs aux SERMs. Par conséquent, ces SERMs doivent être dépourvus d'action sur l'endomètre. À ces fins, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'activation de ER est nécessaire pour sélectionner des molécules qui conserveraient les effets bénéfiques des œstrogènes détaillés ci-dessus, tout en étant dépourvues d'effets délétères sur le cancer du sein et l'endomètre [36].

### Cibles moléculaires : E

Les effets biologiques de l'E2 sont médiés par la liaison puis l'activation des récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  [43]. Ils appartiennent à la sous-famille des récepteurs nucléaires des facteurs de transcription ligand-dépendants, subdivisés en six régions distinctes nommées de A à F

(Fig. 3) [43-46]. Le domaine C est nécessaire et suffisant pour la liaison spécifique du récepteur à l'ADN. Le domaine E permet la liaison avec l'hormone, ce qui induit des changements conformationnels spécifiques, permettant à l'ER de moduler l'activité transcriptionnelle des gènes cibles par le biais de deux fonctions de transactivation (AFs), AF-1 et AF-2, situées respectivement dans les domaines B et E [45].

Comme indiqué Fig. 2, lors de la liaison de l'œstrogène, ER subit un changement conformationnel qui facilite le recrutement pour les régions promotrices des gènes cibles soit directement par l'interaction avec des séquences d'ADN de reconnaissance (ERE), soit par l'interaction de la protéine/protéine avec d'autres facteurs transcriptionnels tels que AP1 et SP1 [43, 46-47]. Le recrutement des coactivateurs transcriptionnels *via* l'une et/ou l'autre fonction AFs menant à l'activation de la transcription de gènes cibles. L'activation de la transcription par l'ER peut donc être initiée soit par l'intermédiaire de la coopération des deux fonctions AFs, ou par chaque fonction AFs de façon indépendante. La contribution relative exercée par AF-1 et AF-2 sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  varie de manière spécifique en fonction du promoteur et du type cellulaire [45, 48-49]. Notamment, il a été démontré que plus une cellule est différenciée, plus la voie de signalisation utilisée est celle d'AF1. En revanche, AF-2 est la seule fonction active dans les cellules qui ont atteint leur transition épithéliale-mésenchymateuse [50]. Cependant les mécanismes responsables de la sensibilité à chacun des deux fonctions AFs restent encore incomplètement élucidés. Enfin, plusieurs voies de signalisation cellulaire comme les MAPK [51], activables par des facteurs de croissance par exemple, peuvent directement (par phosphorylation) ou indirectement moduler l'activité transcriptionnelle du récepteur.

En plus de ces actions génomiques classiques, E2 déclenche également des nombreuses voies de signalisation intracellulaires (Fig. 2) : par exemple, E2 induit rapidement et de façon transitoire l'activation de plusieurs kinases (MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase ou PKC), de

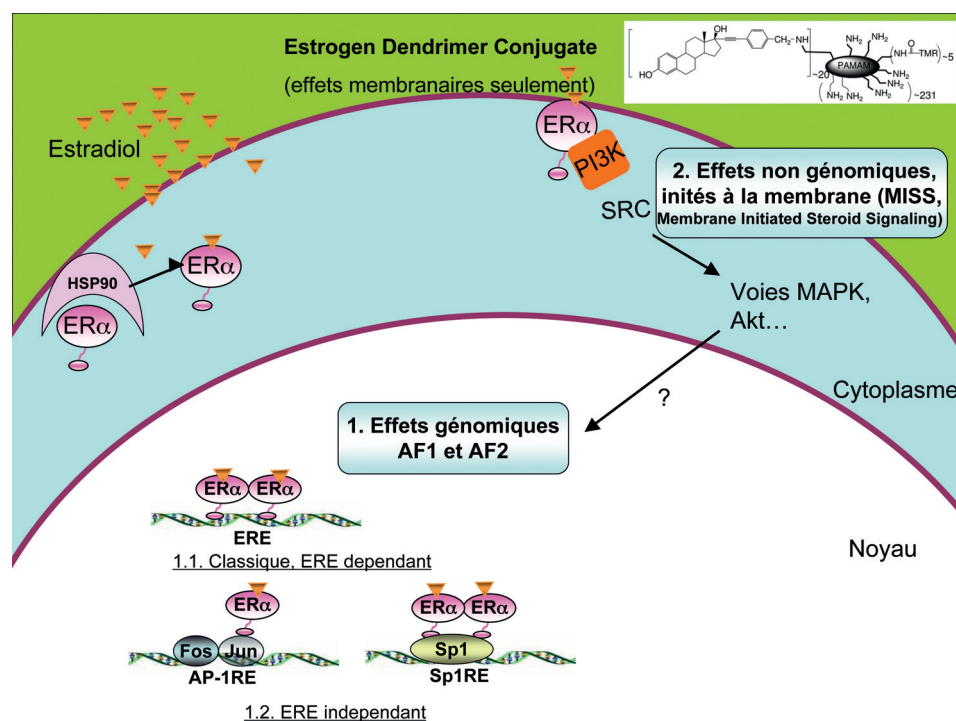


Fig. 2. Représentation schématique des effets intra-cellulaires de l'activation du récepteur des œstrogènes  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). ER $\alpha$  appartient à la sous-famille des récepteurs nucléaires des facteurs de transcription ligand-dépendants, subdivisés en six régions distinctes nommées de A à F. Le domaine C est nécessaire et suffisant pour la liaison spécifique du récepteur à l'ADN. La liaison avec l'hormone (E2) au site de liaison de l'hormone situé dans le domaine E d'ER $\alpha$  induit des changements conformationnels avec dimérisation et translocation nucléaire et se lie au niveau de régions promotrices des gènes cibles. Les deux fonctions de transactivation (AFs), AF-1 et AF-2, situées respectivement dans les domaines B et E vont être activées et moduler l'activité transcriptionnelle des gènes cibles soit directement par l'interaction avec des séquences de reconnaissance de l'ADN (ERE), soit indirectement par interaction protéine/protéine avec d'autres facteurs transcriptionnels tels que AP1 et SP1. Le recrutement des coactivateurs transcriptionnels via l'une et/ou l'autre fonction AFs mènent à l'activation de la transcription de gènes cibles. Par ailleurs, plusieurs voies de signalisation cellulaire comme les MAPK, activables par des facteurs de croissance, peuvent activer directement la fonction AF1 d'ER $\alpha$ , en l'absence d'E2, activation appelée pour cette raison ligand-indépendante.

En plus de ces actions génomiques classiques, E2 déclenche également des nombreuses voies de signalisation intracellulaires : par exemple, E2 induit rapidement et de façon transitoire l'activation de plusieurs kinases (MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase ou PKC), de phosphatases et d'adénylyl-cyclase, ainsi que des variations du calcium intra-cellulaire. Cette voie de signalisation, appelée aussi voie extra-nucléaire (MISS), est médiée par un pool de ER $\alpha$  localisés dans la membrane plasmique. Elle peut être activée électivement par un dendrimère conjugué à un œstrogène (EDC), macromolécule n'entrant pas dans la cellule.

phosphatases et d'adénylyl cyclase, ainsi que des variations du calcium intra-cellulaire [52]. Cette voie de signalisation, appelée aussi voie extra-nucléaire (MISS), est médiée par un pool de ER $\alpha$  localisés dans la membrane plasmique.

Comme détaillé plus loin (Fig. 3), des modèles de souris inactivées soit pour ER $\alpha$ , soit pour ER $\beta$ , ont permis de démontrer que la présence de ER $\alpha$  est absolument nécessaire à la plupart des actions bénéfiques de l'E2. Des approches pharmacologiques utilisant des agonistes spécifiques des récepteurs montrent également l'importance de ER $\alpha$  [53]. Cela n'exclut cependant pas des rôles bénéfiques

possibles d'ER $\beta$ . L'induction de l'expression de ER $\beta$  dans les cellules cancéreuses mammaires T47D [54] ou les MCF7 [55] ER $\alpha$  positives, provoque l'arrêt du cycle cellulaire par le biais de la modulation de l'expression de régulateurs importants du cycle cellulaire. L'inhibition de la croissance de la tumeur par ER $\beta$  pourrait être médiée par un effet anti-angiogénique [56]. Cependant, au niveau moléculaire, le mécanisme de cet effet antagoniste de ER $\beta$  sur les fonctions de ER $\alpha$  est toujours mal connu, étant donné que ER $\alpha$  domine ER $\beta$  dans la liaison de la chromatine et que les hétérodimères ER $\alpha$ /ER $\beta$  sont rares au niveau des sites de liaison [57].

## Agonistes sélectifs d'ER et modulateurs (Fig. 4)

Les SERMs sont un groupe de molécules ayant des caractéristiques structurales chimiques hétérogènes et une haute affinité (à des concentrations nanomolaires) pour les ERs. Ils diffèrent des œstrogènes car ils ont un effet soit agoniste soit antagoniste en fonction du tissu cible considéré. La modulation sélective d'ER peut être expliquée par les changements conformationnels d'ER induits par ces ligands synthétiques et différents de ceux induits par l'E2. Très schématiquement, l'interaction des agonistes avec ER entraîne le recrutement des co-activateurs, tandis que les antagonistes favorisent le recrutement de co-répresseurs.

Une sous-classe de SERMs montre des affinités distinctes entre ER $\alpha$  ou ER $\beta$  (Fig. 4). Par exemple, le propylpyrazole triol (PPT) est un puissant agoniste d'ER $\alpha$ , qui n'active pas ER $\beta$ , tandis que le diarylpropionitrile (DPN) est un puissant agoniste d'ER $\beta$ . En plus de l'activation du sous-type spécifique d'ERs, d'autres SERMs permettent l'activation sélective de tissu-spécifiques d'ER. Le tamoxifène (et son métabolite 4-hydroxytamoxifène) et le raloxifène sont les agonistes partiels de ER les deux plus largement étudiés (Fig. 4). Les deux présentent des propriétés anti-œstrogéniques dans les cancers du sein ER $\alpha$  positifs. Toutefois, dans l'utérus, le tamoxifène est associé à une augmentation du risque d'hyperplasie endométriale, ce qui limite son utilisation aux femmes atteintes de cancer. Comme le raloxifène n'augmente pas le risque de cancer de l'endomètre, son activité œstrogénique sur l'os associée aux effets sur la prévention du cancer du sein expliquent sa large utilisation dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. Cependant, les deux molécules augmentent le risque de maladie thromboembolique veineuse et les accidents cérébrovasculaires, et sont dépourvues de bénéfice sur les bouffées de chaleur. Plusieurs SERMs de « troisième génération » sont à l'étude dans des essais cliniques qui devraient préciser les améliorations qu'ils sont susceptibles d'apporter. L'analyse de l'effet de ces SERMs chez des souris

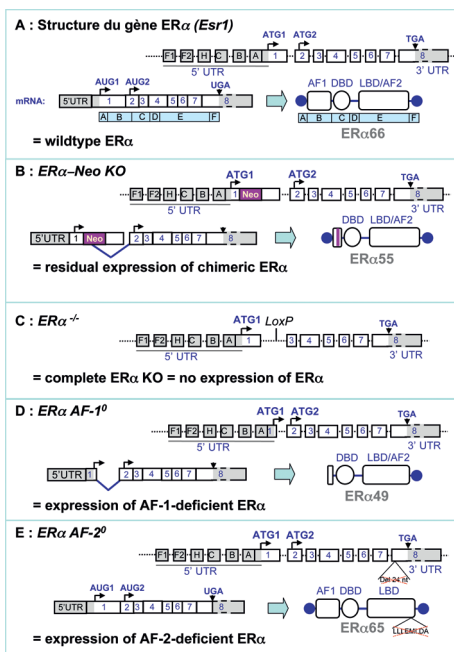


Fig. 3. Représentation schématique de la structure du récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ ) de la souris et stratégies de son inactivation.

A. Le gène codant ER $\alpha$ . comprend huit exons et au moins six non codante 5'exons. Le forme classique de pleine taille de 66kDa est composé de six domaines (A à F), comprenant un domaine liant l'ADN (DBD), un domaine de liaison du ligand (LBD), et deux fonctions de transactivation (AF-1 et AF-2). Il est possible de générer une deuxième isoforme physiologique de 46 kDa, déficiente dans les domaines A et B et donc en AF-1.

B. La première stratégie de ciblage du gène ER $\alpha$  a consisté en l'insertion d'une cassette néomycine dans le premier exon du gène ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -NeoKO) [60, 117]. Le modèle ER $\alpha$ -NeoKO exprime au moins deux protéines tronquées, dues à un épissage naturel ou non naturel, toutes 2 dépourvues de la fonction AF-1 mais conservant la fonction AF-2. L'épissage impliquant la cassette néomycine génère un ER $\alpha$  55kDa chimérique. Bien que la fuite et, partant, l'expression de l'isoforme 55 kDa chimérique soit très variable, le niveau d'expression des isoformes tronquées est suffisant pour médier plusieurs effets d'E2 dans la paroi du vaisseau [66].

C. Le seconde stratégie de knock-out d'ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -/-) a consisté à flanquer le deuxième exon avec un site LoxP puis d'exciser ce deuxième exon codant pour la DBD [62]. Seul ce modèle constitue une inactivation complète d'ER $\alpha$  avec abolition de la fertilité et de tous les effets vasculaires de l'E2 [66].

D. Les souris ER $\alpha$ AF-1° [69] ont consisté à cibler le premier exon du gène ER $\alpha$  codant pour les domaines A et B et, donc AF-1 (suppression correspondant aux acides aminés 2-148). Le phénotype des souris ER $\alpha$ AF-1° rappelle celui des souris  $\alpha$ ER-NeoKO.

E. Les souris ER $\alpha$ AF-2° ont consisté à supprimer 7 acides aminés dans l'hélice 12 et de ce fait AF-2 (déletion correspondant aux acides aminés 543-549) [70]. Le phénotype des souris ER $\alpha$ AF-1° rappelle celui des souris ER $\alpha$ -/-, mais conserve cependant les effets MISS, et ainsi l'E2 est toujours capable d'accélérer la réendothélialisation chez ces souris.

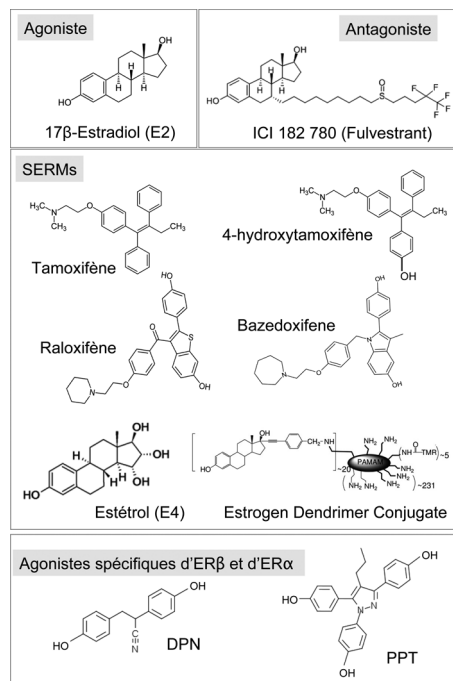


Fig. 4. Structure de l'estradiol, de l'antagoniste ICI 182780, de SERMs et d'agonistes spécifiques d'ER $\beta$  et d'ER $\alpha$ .

modifiées pour le ER et sur des modèles de culture cellulaire permettra d'améliorer notre compréhension de leurs mécanismes d'action. En particulier, on pense que l'action pro- ou anti-œstrogénique des ligands de ER sur les tissus cibles dépend de l'activation totale ou partielle ou encore de l'antagonisation d'AF-1 et AF-2, et de la liaison spécifique ultérieure avec les co-activateurs [58]. Ces mécanismes seront étudiés de manière plus précise *in vivo* grâce à des souris inactivées sélectivement pour ER ou pour l'une des deux fonctions AFs.

Une autre façon de moduler sélectivement l'action ER est de cibler l'effet MISS. Récemment, Chambliss *et al.* [59] a montré qu'un dendrimère conjugué à un œstrogène (EDC) (Fig. 2 et 4), qui active la membrane ERs sans induire d'effets génomiques classiques, stimule la migration des cellules endothéliales *in vitro* et accélère la réendothélialisation *in vivo*. En outre, ils montrent que cet effet bénéfique vasculaire de l'EDC *in vivo* se produit sans stimulation de l'endomètre ou la croissance de xénogreffes de cancer du sein. Ces résultats indiquent que l'activation MISS régit les événements vasculaires physiologiques et indiquent que cette approche pourrait être

utile en particulier pour accélérer la réendothélialisation après une angioplastie endoluminale.

Ainsi, la modulation sélective d'ERs pourrait offrir la possibilité d'un découplage des actions bénéfiques d'E2 des autres actions délétères. Cependant, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la spécificité des effets des SERMs dans les différents tissus sont loin d'être complètement élucidés.

### Les leçons du ciblage d'ERs chez des souris (Fig. 3)

Des modèles de souris ciblés pour ER $\alpha$  ou ER $\beta$  ont été publiés en 1993 et en 1998, respectivement, mais leurs rôles respectifs demeuraient controversés jusqu'en 2002 et même depuis. Pourquoi ces incertitudes ?

Le premier modèle de souris de suppression de gène ER $\alpha$  a été généré par K. Korach's groupe, consistant en l'insertion du gène de résistance à la néomycine dans le premier exon codant, ainsi nommé souris ER $\alpha$ -NeoKO [60] (Fig. 3). Comme attendu, ces souris sont infertiles lorsque homozygotes, et les actions de l'E2 sur les cibles de la reproduction sont abolies. Des études ont montré que le traitement œstrogénique sur des souris ovariectomisées et déficientes soit en ER $\alpha$ , soit en ER $\beta$ , inhibe l'hyperplasie de la média après agression vasculaire, et ont ainsi une action similaire à celle observée chez les souris sauvages. Les auteurs ont suggéré qu'ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont capables de se compenser l'un l'autre. Pour tester cette hypothèse, ils ont étudié l'effet de l'E2 après lésion vasculaire chez les souris ER $\alpha$ -NeoKO/ER $\beta$ KO. Cependant, l'E2 inhibe encore la prolifération des cellules musculaires lisses après la blesure, soulevant la possibilité d'un possible troisième ER [61].

Toutefois, dans le même temps, A. Krust et P. Chambon à Strasbourg ont généré un deuxième modèle d'inactivation du gène ER $\alpha$ , consistant à supprimer le deuxième exon et donc le domaine C [62] (Fig. 3). Ces souris ont été décrites sans ambiguïté comme totalement déficientes en ER $\alpha$ , et seules ces souris peuvent être considérées comme un véritable knock-out ER $\alpha$  ou ER $\alpha$ -/-. Comme prévu, ces souris sont infertiles quand homozygotes, mais

elles ont surtout permis de démontrer que ER $\alpha$  est aussi absolument nécessaire aux actions bénéfiques de E2 sur la cicatrisation endothéliale [63], sur la production endothéliale de NO [64] et sur l'hyperplasie de la média après lésion vasculaire [65].

Nous avons ensuite clarifié les mécanismes responsables des discordances entre les deux modèles de gènes cibles d'ER $\alpha$ . Nous avons constaté que les souris ER $\alpha$ -NeKO avaient une fuite transcriptionnelle en raison d'un épissage alternatif non naturel de l'ARNm de ER $\alpha$ , résultant de l'expression d'une isoforme chimérique de 55 kDa tronquée [66] (Fig. 3). Ce récepteur tronqué d'ER $\alpha$ , avec une grande partie du domaine B manquante et donc probablement un AF-1 non fonctionnel, était donc suffisante pour médier l'effet de l'E2 sur la production de NO endothéliale [66] ainsi que sur l'hyperplasie post traumatique de la média [67]. Ainsi, les différences dans les phénotypes entre les modèles de deux souris de modification de gène ER $\alpha$  a suggéré que la fonction d'activation AF-1 n'est pas nécessaire à la médiation de certaines actions vasculaires bénéfiques d'E2 [66], ce qui ouvre un nouveau champ de recherche pour le découplage des actions d'ER $\alpha$ .

Récemment, nous avons exploré directement le rôle d'AF-1 dans les effets vasculaires de l'E2 *in vivo* en utilisant une souris déficiente dans le domaine A/B de ER $\alpha$  et donc déficientes en ER $\alpha$  AF-1 (nommée ER $\alpha$ AF-1<sup>o</sup>). Nous avons constaté qu'AF-1 n'est pas nécessaire à deux effets vasculoprotecteurs majeurs de l'E2, son action athéroprotectrice [69] ou son effet accélérateur sur la réendothélialisation alors qu'il est nécessaire pour la reproduction [69]. Plus récemment, nous avons montré, grâce à la souris ER $\alpha$ AF-2<sup>o</sup> (Fig. 3) qu'AF2 est nécessaire à la fois pour les effets reproducteurs et pour les effets vasculaires [70].

Enfin, plusieurs modèles d'inactivation du gène ER $\beta$  ont également été générés et tous ont conclu à ont un rôle important dans la reproduction des mâles et des femelles. Cependant, ils ont également fourni des phénotypes divergents, le plus récent témoignant d'un phénotype extra-reproducteur quasi-normal [71].

## Conclusions et perspectives

Différentes classes d'œstrogènes et de SERMs ont été décrites selon leurs actions moléculaires à travers ER $\alpha$  et ER $\beta$ . En raison de la complexité des mécanismes d'action d'ER, l'effet *in vivo* des œstrogènes et des SERMs dans divers types cellulaires et tissus ne peuvent être prédites par des études *in vitro*. À ce jour, les seuls SERMs actuellement disponibles (tamoxifène, raloxifène, bazedoxifène) sont caractérisés par un effet agoniste des œstrogènes sur les os, ainsi que par un effet antagoniste des œstrogènes sur le sein, mais sont dépourvus de tout effet positif sur les symptômes de la ménopause et sur le risque cardiovasculaire, et même une augmentation du risque thrombo-embolique. Théoriquement, il est envisageable de concevoir un SERM (ou une combinaison de molécules) dépourvu des effets indésirables de l'E2 (essentiellement l'utérus et le sein) et qui conserverait les effets désirables de l'E2 (tels que la prévention de l'athérome ou du diabète de type 2) que n'ont pas les SERMs actuellement disponibles.

Ainsi, seuls les modèles murins intégrés permettant une « dissection *in vivo* » d'ER et, en particulier, d'ER $\alpha$ , pourrait représenter de nouveaux outils pour screener les futurs SERMs, en terme d'effets bénéfiques et nocifs.

Par exemple, comme précédemment mentionné, le phénotype de souris ER $\alpha$ AF-1<sup>o</sup> [69] suggère que les SERMs stimulant ER $\alpha$  avec une activation minimale de ER $\alpha$ AF-1 pouvait conserver les actions vasculaires bénéfiques tout en minimisant les effets délétères.

Le conjugué de dendrimère-œstrogènes, un activateur sélectif de la membrane ER $\alpha$ , pourrait également fournir une vasculoprotection, bien que seule l'accélération de la réendothélialisation ait été démontrée jusqu'ici [59].

La prévention du cancer du sein, du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires par les SERMs représentent donc le défi majeur du traitement futur de la ménopause.

## Remerciements

Nous sommes reconnaissants aux Prof. P. Chambon et F. Bayard et aux Drs JC Guery

et G Flouriot pour leurs importante contribution dans ces travaux, ainsi que tous les membres de notre équipe pour leurs contributions essentielles au fil des ans.

## Références

1. Table 27. Life expectancy at birth ayoa, and at 75 years, of age brasUS, selected years 1900-2004, pg 192. In: National Center for Health Statistics Health U, States WCoTitHoA, Hyattsville MAahwcgnd, hus07.pdf#027. Accessed: April 17. life expectancy
2. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (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: 321-33
3. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML (2007) Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *Jama* 297: 1465-77
4. Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH (1996) Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 335: 453-61
5. Clarkson TB, Appt SE (2005) Controversies about HRT--lessons from monkey models. *Maturitas* 51: 64-74
6. Holm P, Andersen HL, Andersen MR, Erhardtson E, 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: 1727-33
7. Arnal JF, Scarabin PY, Tremollières F, Laurell H, Gourdy P (2007) Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr Opin Lipidol* 18: 554-60
8. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 291: 1701-12
9. Miyagawa K, Rosch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K (1997) Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 3: 324-7
10. Stevenson JC, Hodis HN, Pickar JH, Lobo RA (2009) Coronary heart disease and menopause management: the swinging pendulum of HRT. *Atherosclerosis* 207: 336-40
11. Lenfant F, Tremollières F, Gourdy P, Arnal JF (2010) Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: Why protective early, and not when delayed? *Maturitas*
12. Hays J, Ockene JK, Brunner RL, Kotchen JM, Manson JE, Patterson RE, Aragaki AK, Shu-

- maker SA, Brzyski RG, LaCroix AZ, Graneck IA, Valanis BG (2003) Effects of estrogen plus progestin on health-related quality of life. *N Engl J Med* 348: 1839-54
13. Brunner RL, Gass M, Aragaki A, Hays J, Graneck I, Woods N, Mason E, Brzyski R, Ockene J, Assaf A, LaCroix A, Matthews K, Wallace R (2005) Effects of conjugated equine estrogen on health-related quality of life in postmenopausal women with hysterectomy: results from the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trial. *Arch Intern Med* 165: 1976-86
  14. Maki PM, Gast MJ, Vieweg AJ, Burriss SW, Yaffe K (2007) Hormone therapy in menopausal women with cognitive complaints: a randomized, double-blind trial. *Neurology* 69: 1322-30
  15. Welton AJ, Vickers MR, Kim J, Ford D, Lawton BA, MacLennan AH, Meredith SK, Martin J, Meade TW (2008) Health related quality of life after combined hormone replacement therapy: randomised controlled trial. *BMJ* 337: a1190
  16. Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, Recker RR (2007) Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone* 41: 111-6
  17. Wehrli FW, Ladinsky GA, Jones C, Benito M, Magland J, Vasilic B, Popescu AM, Zemel B, Cucchiara AJ, Wright AC, Song HK, Saha PK, Peachey H, Snyder PJ (2008) *In vivo* magnetic resonance detects rapid remodeling changes in the topology of the trabecular bone network after menopause and the protective effect of estradiol. *J Bone Miner Res* 23: 730-40
  18. Wells G, Tugwell P, Shea B, Guyatt G, Peterson J, Zytaruk N, Robinson V, Henry D, O'Connell D, Cranney A (2002) Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. V. Meta-analysis of the efficacy of hormone replacement therapy in treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev* 23: 529-39
  19. Komulainen MH, Kroger H, Tuppurainen MT, Heikkinen AM, Alhava E, Honkanen R, Saarikoski S (1998) HRT and Vit D in prevention of non-vertebral fractures in postmenopausal women; a 5 year randomized trial. *Maturitas* 31: 45-54
  20. Nuutila P, Knuuti MJ, Maki M, Laine H, Ruotsalainen U, Teras M, Haaparanta M, Solin O, Yki-Jarvinen H (1995) Gender and insulin sensitivity in the heart and in skeletal muscles. Studies using positron emission tomography. *Diabetes* 44: 31-6
  21. Donahue RP, Bean JA, Donahue RA, Goldberg RB, Prineas RJ (1997) Insulin response in a triethnic population: effects of sex, ethnic origin, and body fat. *Miami Community Health Study. Diabetes Care* 20: 1670-6
  22. Wedisinghe L, Perera M (2009) Diabetes and the menopause. *Maturitas* 63: 200-3
  23. de Lauzon-Guillain B, Fournier A, Fabre A, Simon N, Mesrine S, Boutron-Ruault MC, Balkau B, Clavel-Chapelon F (2009) Menopausal hormone therapy and new-onset diabetes in the French Etude Epidemiologique de Femmes de la Mutuelle Generale de l'Education Nationale (E3N) cohort. *Diabetologia* 52: 2092-100
  24. Margolis KL, Bonds DE, Rodabough RJ, Tinker L, Phillips LS, Allen C, Bassford T, Burke G, Torrens J, Howard BV (2004) Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial. *Diabetologia* 47: 1175-87
  25. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, Lin F, Grady D, Bittner V, Cauley JA, Barrett-Connor E (2003) Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 138: 1-9
  26. Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Quesada I, Ropero AB (2009) The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 304: 63-8
  27. Bonds DE, Lasser N, Qi L, Brzyski R, Caan B, Heiss G, Limacher MC, Liu JH, Mason E, Oberman A, O'Sullivan MJ, Phillips LS, Prineas RJ, Tinker L (2006) The effect of conjugated equine oestrogen on diabetes incidence: the Women's Health Initiative randomised trial. *Diabetologia* 49: 459-68
  28. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331: 1056-61
  29. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12729-34
  30. Cooke PS, Heine PA, Taylor JA, Lubahn DB (2001) The role of estrogen and estrogen receptor-alpha in male adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 178: 147-54
  31. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, Gourdy P (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150: 2109-17
  32. Herrington DM, Klein KP (2001) Invited review: Pharmacogenetics of estrogen replacement therapy. *J Appl Physiol* 91: 2776-84
  33. Koh KK, Yoon BK (2006) Controversies regarding hormone therapy: Insights from inflammation and hemostasis. *Cardiovasc Res* 70: 22-30
  34. Canonico M, Oger E, Plu-Bureau G, Conard J, Meyer G, Levesque H, Trillot N, Barrellier MT, Wahl D, Emmerich J, Scarabin PY (2007) Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation* 115: 840-5
  35. Renoux C, Dell'aniello S, Garbe E, Suissa S (2010) Transdermal and oral hormone replacement therapy and the risk of stroke: a nested case-control study. *BMJ* 340: c2519
  36. Jordan VC (2001) The past, present, and future of selective estrogen receptor modulation. *Ann N Y Acad Sci* 949: 72-9
  37. Beatson G (1896) On treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* 11: 104-7
  38. Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, Frye CA (2010) Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiol Behav* 99: 151-62
  39. Jordan VC (2003) Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2: 205-13
  40. (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: 1687-717
  41. Anderson GL, Chlebowski RT, Rossouw JE, Rodabough RJ, McTiernan A, Margolis KL, Aggerwal A, David Curb J, Hendrix SL, Allan Hubbell F, Khandekar J, Lane DS, Lasser N, Lopez AM, Potter J, Ritenbaugh C (2006) Prior hormone therapy and breast cancer risk in the Women's Health Initiative randomized trial of estrogen plus progestin. *Maturitas* 55: 103-15
  42. Horwitz KB (2008) The Year in Basic Science: update of estrogen plus progestin therapy for menopausal hormone replacement implicating stem cells in the increased breast cancer risk. *Mol Endocrinol* 22: 2743-50
  43. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 27: 299-402
  44. Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *Embo J* 5: 891-7
  45. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59: 477-87
  46. McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-74
  47. Edwards DP (2005) Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67: 335-76
  48. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP (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
  49. 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: 2811-8
  50. Merot Y, Metivier R, Penot G, Manu D, Salignat C, Gannon F, Pakdel F, Kah O, 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: 26184-91
51. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270: 1491-4
  52. Kim KH, Bender JR (2009) Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 308: 3-8
  53. Bolego C, Cignarella A, Sanvito P, Pelosi V, Pellegatta F, Puglisi L, Pinna C (2005) 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* 313: 1203-8
  54. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 1566-71
  55. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC (2004) Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64: 423-8
  56. Hartman J, Lindberg K, Morani A, Inzunza J, Strom A, Gustafsson JA (2006) Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. *Cancer Res* 66: 11207-13
  57. Charn TH, Liu ET, Chang EC, Lee YK, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2010) Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors alpha and beta: mutual restriction and competitive site selection. *Mol Endocrinol* 24: 47-59
  58. Shang Y, Brown M (2002) Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295: 2465-8
  59. 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 (2010) Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest* 120: 2319-30
  60. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, 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 USA* 90: 11162-6
  61. Karas RH, Schulten H, Pare G, Aronovitz MJ, Ohlsson C, Gustafsson JA, Mendelsohn ME (2001) Effects of estrogen on the vascular injury response in estrogen receptor alpha, beta (double) knockout mice. *Circ Res* 89: 534-9
  62. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127: 4277-91
  63. Brouchet L, Krust A, Dupont S, Chambon P, Bayard F, Arnal JF (2001) Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta. *Circulation* 103: 423-8
  64. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF (2002) Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 90: 413-9
  65. Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P, Mendelsohn ME (2002) Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 90: 1087-92
  66. Pendaries C, Darblade B, Rochemaix P, Krust A, Chambon P, Korach KS, Bayard F, Arnal JF (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 USA* 99: 2205-10
  67. Iafrafi MD, Karas RH, Aronovitz M, Kim S, Sullivan TR, Jr., Lubahn DB, O'Donnell TF, Jr., Korach KS, Mendelsohn ME (1997) Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med* 3: 545-8
  68. Arnal JF, Fontaine C, Billon-Gales A, Favre J, Laurell H, Lenfant F, Gourdy P (2010) Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1506-12
  69. 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 (2009) The transactivating function 1 of estrogen receptor {alpha} is dispensable for the vasculoprotective actions of 17{beta}-estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2053-8
  70. 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 (2011) 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* 108: 13311-6
  71. Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M (2008) Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2433-8