



HAL
open science

Découplage de l'activation nucléaire et membranaire du $ER\alpha$ dans la protection artérielle et métabolique

Melissa Buscato

► **To cite this version:**

Melissa Buscato. Découplage de l'activation nucléaire et membranaire du $ER\alpha$ dans la protection artérielle et métabolique: implication clinique pour un nouveau traitement substitutif de la ménopause. *Endocrinologie et métabolisme*. 2020. hal-03130483

HAL Id: hal-03130483

<https://ephe.hal.science/hal-03130483>

Submitted on 3 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par

Mélissa BUSCATO

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Découplage de l'activation nucléaire et membranaire du ER α dans la
protection artérielle et métabolique :
Implication clinique pour un nouveau traitement substitutif de la ménopause**

Soutenu le 23 Juin 2020 devant le jury suivant :

Dr THENET Sophie – Présidente
Dr FONTAINE Coralie – Tutrice scientifique
Dr GAD-LAPITEAU Sophie – Tutrice pédagogique
Dr GAUTHIER-VANACKER Karine – Rapporteuse
Dr DUEZ Hélène – Examinatrice

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr FONTAINE Coralie
Equipe 9 Optimisation de la modulation du récepteur aux œstrogènes en médecine
Dirigée par les Pr Jean François ARNAL et Pr Pierre GOURDY
I2MC - INSERM U1048 - Toulouse

et de

Dr GAD-LAPITEAU Sophie
Groupe "Cancer du Rein" dirigé par le Pr Stéphane RICHARD
UMR CNRS 9019 - Institut Gustave Roussy - Villejuif

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à remercier les membres de mon jury, Dr **Karine GAUTHIER-VANACKER**, rapporteure, Dr **Hélène DUEZ**, examinatrice, Dr **Sophie THENET**, présidente de jury, merci à vous qui me faites l'honneur de juger ce travail.

Coralie FONTAINE, cela fait maintenant près de 10 ans que je travaille à tes côtés et il m'est difficile de résumer tout ça en quelques lignes. Tout d'abord merci de m'avoir poussée dans cette reprise d'étude et de m'avoir soutenue pendant ces 3 années. Je suis consciente de la chance que j'ai eu d'avoir une encadrante en or comme tu l'as été. Merci pour ton investissement à mes côtés pour que ce diplôme se déroule de la meilleure manière. Tu as toujours eu les mots justes dans les moments difficiles et tu m'as toujours suivie dans mon euphorie après de beaux résultats. Merci pour ta confiance qui m'a permis de m'épanouir pleinement dans ce travail. Merci pour ton exigence et ta rigueur qui m'ont fait évoluer. Merci pour ton amitié, MERCI pour tout !

Jean François ARNAL, je vous remercie de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans la réalisation de ce projet et plus largement au cours de ces 10 années au sein de l'équipe. Merci de votre disponibilité et de votre aide.

Sophie GAD-LAPITEAU, je vous remercie d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique. Merci pour le temps que vous m'avez accordé tout au long de ces trois années mais également pour vos précieux conseils, vos corrections et votre soutien tout au long de ce diplôme.

Marine, merci pour ces longues heures à parler de projets scientifiques pendant nos pauses cafés/clopes qui sont, depuis ton départ aux Etats-Unis, devenues de nombreuses heures passées au téléphone. Tu as sans aucun doute grandement participé à ma passion pour ce métier, mais aussi à la reprise de mes études. Merci pour ton soutien sans faille à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit.

Anne, ma première formatrice. Tu m'as fait adorer mon métier en m'inculquant la rigueur et ta passion pour la recherche. Je n'oublierai jamais ces longues heures à extraire des ARN en se racontant nos vies. Merci pour ton soutien pendant les périodes difficiles, tu as toujours répondu présente.

Morgane et Rana, le trio de choc. Je vous remercie pour le super travail d'équipe qu'on a su mettre en place, sans vous ces 3 années n'auraient pas été les mêmes. Merci pour votre patience, votre écoute et votre aide. Mais c'est loin d'être terminé, je l'espère ;)

Toute **l'équipe 9** actuelle et passée, merci pour votre soutien et tous ces bons moments de rigolades.

C'est enfin à **ma famille et mes amis** que j'adresserai mes remerciements. Maman, Manon, Steph, Chanou, ... tout au long de ce projet, vous m'avez incroyablement soutenue, encouragée et supportée ! Je vous aime.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES.....	3
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES ANNEXES	8
ABBREVIATIONS	8
AVANT PROPOS	10
INTRODUCTION	12
I. Des œstrogènes à la ménopause	12
I.1 Généralités sur les œstrogènes.....	12
I.1.1 Structure et voies de biosynthèse	12
I.1.2 Rôles physiologiques du 17β-œstradiol (E2).....	14
I.2 La ménopause	15
I.2.1 La ménopause et ses conséquences.....	15
I.2.2 Des débuts du traitement hormonal de la ménopause à l'étude WHI.....	17
I.3 Effets des œstrogènes sur les maladies cardiovasculaires	19
I.3.1 L'athérosclérose	20
I.3.2 Facteurs de risques des maladies cardiovasculaires.....	24
II. Vers une modulation sélective du récepteur aux œstrogènes alpha	29
II.1 ERα un récepteur nucléaire avec une activité membranaire	29
II.1.1 Structure du récepteur	30
II.1.2 Mode d'action	31
II.1.3 Modèles de souris permettant l'étude du ERα nucléaire et membranaire	35
II.2 Les SERMS : modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes alpha	36
II.2.1 Activation sélective du ERα membranaire	37
II.2.2 Activation sélective du ERα nucléaire : L'Estetrol (E4)	39
OBJECTIFS DU PROJET.....	42
MATERIELS ET METHODES	44

I.	Modèles de souris transgéniques.....	44
II.	Chirurgies sur les souris	44
II.1	Ovariectomie bilatérale.....	44
II.2	Implantation des capsules ou mini-pompes délivrant les traitements hormonaux (composés oestrogéniques)	45
III.	Analyse des paramètres métaboliques chez la souris.....	46
III.1	Prise pondérale	46
III.2	Test de tolérance au glucose : IPGTT	46
IV.	Dosages sériques	47
IV.1	Dosage d'Estérol	47
IV.2	Dosage des lipides plasmatiques	47
V.	Analyses histo-pathologiques.....	47
V.1	Analyse des plaques d'athérome au sinus aortique	47
V.2	Histologie du tissu adipeux péigonadique.....	48
V.3	Analyse de la stéatose hépatique	49
V.3.1	Analyse des lipides neutres hépatiques.....	49
V.3.2	Analyse histologique du foie pour évaluation de la stéatose hépatique.....	49
VI.	Analyse de la quantité en ARNm par RT-qPCR.....	50
VI.1	Extraction d'ARNm.....	50
VI.2	Rétro-transcription des ARNm en ADN complémentaires (ADNc)	50
VI.3	Quantification de l'expression relative des ARNm par qPCR	50
VII.	Analyses statistiques	51
RESULTATS.....		52
I.	Découplage des effets membranaires et nucléaires du ER α dans la prévention de l'athérosclérose.....	52
I.1	Approche génétique.....	52
I.2	Approche pharmacologique.....	55
I.2.1	Activation sélective de la voie membranaire : EDC et PaPE-1	55
I.2.2	Activation sélective de la voie nucléaire : Estérol (E4).....	57
II.	Etude des effets de l'E4 dans un contexte de désordre métabolique.....	59
II.1	Obésité et intolérance au glucose	60

II.2	Athérosclérose et stéatose hépatique	62
II.3	Etude des cibles cellulaires impliquées dans ces effets protecteurs	63
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		68
I.	Le ciblage préférentiel de la voie membranaire du ER α est-elle une stratégie à poursuivre pour améliorer le traitement de la ménopause ?.....	70
II.	Quels sont les effets vasculaires et métaboliques de l'Estérol ?	72
III.	Estérol : œstrogène faible ou SERM ?	76
BIBLIOGRAPHIE.....		83
ANNEXES.....		94

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique des œstrogènes.....	13
Figure 2 : Voie de biosynthèse des œstrogènes.....	14
Figure 3 : Représentation schématique du cycle menstruel chez la femme.....	15
Figure 4 : Principaux symptômes et dysfonctions à la ménopause.....	16
Figure 5 : Risque relatif de maladies coronariennes dans l'étude WHI.....	18
Figure 6 : Représentation schématique de la formation et rupture de la plaque d'athérome.....	19
Figure 7 : Représentation schématique de la paroi artérielle.....	20
Figure 8 : Représentation schématique du processus d'athérosclérose, une pathologie métabolique et inflammatoire.....	22
Figure 9 : Résumé des études épidémiologiques et cliniques sur les risques d'événements coronariens chez la femme.....	23
Figure 10 : Répartition de la masse graisseuse de type « gynoïde » ou « androïde ».....	25
Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution de la NAFLD.....	27
Figure 12 : Schéma illustrant les mécanismes impliqués dans la stéatose.....	28
Figure 13 : Représentation schématique du mode d'action des récepteurs nucléaires.....	30
Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires.....	31
Figure 15 : Représentation schématique de la transcription génique par les voies nucléaires.....	32
Figure 16 : Représentation schématique des voies d'activation nucléaire et membranaire d'ER α	34
Figure 17 : Modèles de souris ciblant le ER α nucléaire et membranaire.....	35
Figure 18 : Structure chimique de l' <i>Estrogen Dendrimer Conjugate</i> (EDC).....	37
Figure 19 : Structure chimique du <i>Pathway-Preferential Estrogen 1</i> (PaPE-1).....	38
Figure 20 : Structure chimique de l'Estetrol (E4).....	40
Figure 21 : Physiologie de l'appareil reproducteur chez la souris femelle.....	45
Figure 22 : Méthode de compaction permettant de fabriquer des capsules d'E4.....	46
Figure 23 : Représentation schématique des valves du sinus aortique.....	48
Figure 24 : Le ER α membranaire n'est pas nécessaire pour la prévention des lésions athérosclérotiques au niveau du sinus aortique en réponse à l'E2.....	54

Figure 25 : Le ER α membranaire n'est pas suffisant pour la prévention des lésions d'athérome au niveau du sinus aortique.56

Figure 26 : Dosage sanguin de l'E4.....58

Figure 27 : L'E4 est capable d'induire une athéroprotection59

Figure 28 : L'estétrol prévient de la prise de poids et de l'intolérance au glucose61

Figure 29 : L'estétrol prévient de l'athérosclérose induite par un régime obésogène.....62

Figure 30 : L'estétrol prévient de la stéatose hépatique induite par un régime obésogène63

Figure 31 : Validation du modèle LERKO-LDLr^{-/-}64

Figure 32 : Le ER α hépatique n'est pas nécessaire pour l'effet protecteur de l'E4 contre l'obésité et l'intolérance au glucose induite par un régime obésogène.....65

Figure 33 : Le ER α hépatique n'est pas nécessaire pour l'effet athéroprotecteur de l'E466

Figure 34 : Le ER α hépatique est nécessaire pour l'effet protecteur de l'E4 contre la stéatose hépatique induite par un régime obésogène67

Figure 35 : Effets vasculoprotecteurs de l'E269

Figure 36 : Schéma représentant le rôle respectif du ER α nucléaire et membranaire dans les effets vasculoprotecteurs74

Figure 37 : Structure du 17 β -œstradiol (E2) et de l'Estétrol (E4) et de leur conformation respective avec le domaine LBD du ER α 77

Figure 38 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes régulés communément et différemment par l'E2 et l'E4 dans l'aorte.....78

Figure 39 : Méthode du Microarray Assay for Realtime Coregulator-Nuclear receptor Interaction (MARCoNI)80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Séquences des amorces.....	51
Tableau 2 : Résumé des rôles respectifs du ER α membranaire et nucléaire dans la vasculoprotection à l'aide de modèles de souris génétiquement modifiées (perte de fonction) et d'outils pharmacologiques (gain de fonction).....	71

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Predominant role of nuclear <i>versus</i> membrane estrogen receptor (ER) α in arterial protection: implications for ER α modulation in cardiovascular prevention/safety.....	94
Annexe 2 : The tissue-specific effects of different 17 β -estradiol doses reveal the key sensitizing role of AF1 domain in ER α activity.....	94
Annexe 3 : Estetrol prevents diet-induced metabolic disorders, such as obesity and atheroma, in an ER α liver-independent manner.....	94

ABBREVIATIONS

A

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AF1 : *Activation Function 1*
AF2 : *Activation Function 2*
ANOVA : *Analysis of variance*
AP1 : *Activating Protein-1*
AR : Récepteur aux Androgènes
ARNm : Acide RiboNucléique
messenger
AVC : Accident Vasculaire Cérébral

C

CEE : Œstrogènes Conjugués Equins
CML : Cellule Musculaire Lisse

D

DBD : *DNA binding domain*
dNTPs : désoxyribonucléotides

E

E1 : Œstrone
E2 : Œstradiol (17 β -œstradiol)
E3 : Œstriol
E4 : Estétrol
EDC : *Estrogen Dendrimer*
Conjugate
EGF : *Endothelial Growth Factor*
eNOS : *endothelial Nitric Oxyd*
Synthase
ER : Récepteur aux œstrogènes
ERE : *Estrogen Responsive Element*
ER α : Récepteur aux œstrogènes
alpha
ER β : Récepteur aux œstrogènes beta
ESR1 : *Estrogen Receptor 1*

F

FDA : *Food and Drug*
Administration
FSH : Hormone Folliculo-Stimulante

G

GPR30 : *G protein-coupled receptor*
30
GR : Récepteur aux glucocorticoïdes

H

H/E : Hématoxyline/Eosine
HDL : *High Density Lipoprotein*
HERS : *Heart and*
Oestrogen/Progestin Substitution
HSP : *Heat Shock Proteins*

I

ICAM-1 : *Intercellular Adhesion*
Molecule 1
IGF1 : *Insuline-like Growth Factor-1*
IL1 β : Interleukine 1 beta
IP : Intrapéritonéale
IPGTT : *Intraperitoneal glucose*
tolerance test

L

LDB : *Ligand Binding Domain*
LDL : *Low Density Lipoprotein*
LDLr : Récepteur aux LDL
LERKO : *Liver ER α Knock Out*
LH : Hormone Lutéinisante
LHS : Lipase Hormono-Sensible
LPL : Lipoprotéine lipase

M

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*

MCP1 : *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

MIP1 α : *Macrophage Inflammatory Protein 1-alpha*

MISS : *Membrane Initiated Steroid Signaling*

MR : Récepteur aux minéralocorticoïdes

N

NAFLD : *Non Alcoholic Fatty Liver Diseases*

NASH : *Non Alcoholic SteatoHepatitis*

NIH : *National Institutes of Health*

NO : Monoxyde d'azote

O

OCT : *Optimal Cutting Temperature compound*

P

PANAM : Poly(amido) amine

PaPE-1 : *Pathway-Preferential Estrogen 1*

PAT : Palmitoyl acyltransferase

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PPIA : *Peptidylprolyl Isomerase A*

PR : Récepteur à la progestérone

R

RT : *Reverse Transcriptase*

S

SEM : *Standard Error of the Mean*

SERM : *Selective Estrogen Receptor Modulator*

SHR : Récepteurs aux hormones stéroïdiennes

SP1 : *Specificity Protein-1*

T

TG : Triglycérides

THM : Traitement Hormonal de la Ménopause

TPT1 : *Tumor Protein, Translationally-Controlled 1*

V

VAMS : *Volumetric Absorptive Microsampling*

VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*

VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

W

WHI : *Women's Health Initiative*

AVANT PROPOS

J'ai réalisé mon diplôme des Sciences de la Vie et de la Terre de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes au sein de l'Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires dans l'équipe « Optimisation de la modulation du récepteur aux œstrogènes en médecine » dirigée par les Pr. Jean-François Arnal et Pierre Gourdy. Un des projets de l'équipe dirigé par le Dr. Coralie Fontaine s'intéresse plus particulièrement à l'impact des œstrogènes sur le plan cardiovasculaire.

Les œstrogènes sont des hormones féminines nécessaires aux fonctions de reproduction et à l'acquisition des caractères sexuels secondaires pendant la période d'activité génitale chez la femme. En plus de ce rôle bien connu, ces hormones assurent le maintien de l'homéostasie de nombreux tissus extra-reproducteurs tels que l'os et le cerveau. De plus, il est maintenant bien établi que les œstrogènes protègent les artères, et les tissus qui assurent l'homéostasie métabolique (foie, tissus adipeux, pancréas, muscle...).

Ainsi, **la ménopause**, qui se traduit par l'arrêt de la production des œstrogènes par les ovaires, s'accompagne de troubles fonctionnels qui affectent la qualité de vie des femmes. Les symptômes de la ménopause (bouffées de chaleur, troubles génito-urinaires) peuvent être soulagés par un traitement hormonal de la ménopause (THM) basé sur l'administration d'œstrogènes associés à un progestatif. A la fin des années 1990, les instituts américains de la santé (*National Institutes of Health*) ont lancé une grande étude randomisée, l'étude WHI (*Women's Health Initiative*), afin d'évaluer les risques et les avantages potentiels associés à un tel traitement. Cette étude a finalement été interrompue, notamment du fait d'une majoration des accidents thrombotiques et du risque de cancer du sein et, en raison du relai de ces informations par les médias, le nombre de femmes sous THM a drastiquement chuté.

Les femmes occidentales passent maintenant plus d'un tiers de leur vie dans les années post-ménopauses. La ménopause est associée à une augmentation du risque d'ostéoporose, de maladies métaboliques et cardiovasculaires. L'amélioration du THM représente donc un enjeu majeur pour la santé des femmes. Elle repose sur une optimisation de l'activation du récepteur des œstrogènes. **Le but de mon projet a été d'évaluer l'impact de ces nouvelles stratégies thérapeutiques dans le développement des maladies cardiovasculaires.**

Dans la première partie bibliographique de ce manuscrit, je décrirai les effets des œstrogènes en physiologie et les conséquences de leur déficit à la ménopause. Je m'intéresserai plus particulièrement aux effets des œstrogènes sur l'athérosclérose, pathologie à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. L'effet des œstrogènes est majoritairement relayé par le **récepteur des œstrogènes alpha (ER α)**. Ainsi, je décrirai ensuite le mode d'action du ER α , et le concept de « modulation sélective » proposé pour optimiser le THM.

La deuxième partie de ce manuscrit consistera en l'exposé de mes travaux expérimentaux visant à évaluer l'impact de ces nouvelles stratégies thérapeutiques vis à vis des pathologies vasculaires et métaboliques dont l'incidence est fortement augmentée à la ménopause.

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

INTRODUCTION

I. Des œstrogènes à la ménopause

I.1 Généralités sur les œstrogènes

I.1.1 Structure et voies de biosynthèse

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles féminines. Ces hormones stéroïdiennes assurent les fonctions de reproduction chez la femme et l'acquisition des caractères sexuels à la puberté. Il existe quatre œstrogènes endogènes chez la femme (**Figure**) :

- Le 17β -œstradiol (E2) est l'œstrogène majoritaire en **période d'activité génitale**. L'E2 est synthétisé par les ovaires à partir de la puberté, sa production est stimulée par deux hormones hypophysaires (l'hormone folliculo-stimulante : FSH, et l'hormone lutéinisante : LH). De plus, il est également produit mais en plus petites quantités dans d'autres tissus extra-gonadiques comme le cerveau, le tissu adipeux et les glandes surrénales.

- L'œstriol (E3) est l'œstrogène le moins puissant. Il est cependant produit en grande quantité **pendant la grossesse**.

- L'estetrol (E4) (sur lequel je reviendrai plus en détail dans la partie II.2.2) est l'autre œstrogène majoritaire de la grossesse. Il est produit par le **foie fœtal** mais uniquement chez les grands singes.

- L'œstrone (E1) est, comme l'E2, produit par l'ovaire chez la femme non ménopausée, mais aussi par le placenta durant la grossesse, et dans une moindre mesure, par les tissus adipeux chez l'homme et la femme ménopausée. **A la ménopause**, qui se traduit par l'arrêt de la fonction ovarienne, il devient l'œstrogène majoritaire.

Les œstrogènes sont des molécules liposolubles impliquées dans un large éventail de mécanismes physiologiques. L'E2 est l'œstrogène de référence et il fait l'objet de nombreuses études. Son rôle physiologique est bien décrit (cf I.1.2). *A contrario*, les rôles physiologiques de l'E3, l'E4 et l'E1 restent inconnus.

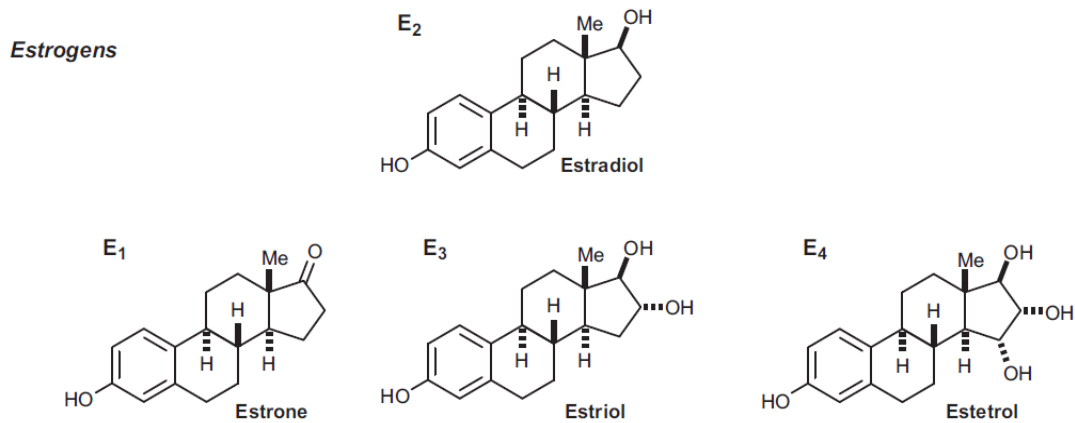


Figure 1 : Structure chimique des œstrogènes, issue de (Jean-Francois Arnal et al. 2017)

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles lipophiles. Leur structure chimique est basée sur un noyau stéroïdien constitué de quatre cycles hydrocarbonés pour un total de 18 atomes de carbone. Ces quatre œstrogènes se différencient par la substitution de groupements hydroxyles (-OH). Ainsi E₁ = 1 groupement -OH, E₂ = 2 groupements -OH, E₃ = 3 groupements -OH et E₄ = 4 groupements -OH.

La voie de biosynthèse des œstrogènes est initiée à partir du cholestérol et passe par la formation de la progestérone puis d'androgènes (**Figure 2**). Les précurseurs androgéniques subissent des conversions afin de produire les œstrogènes. Ces conversions se font *via* une enzyme : l'aromatase. Cette enzyme, produit du gène *cyp19*, est essentielle dans la stéroïdogénèse. Elle catalyse la dernière étape convertissant l'androstènedione en œstrone et la testostérone en œstradiol (Morselli et al., 2017).

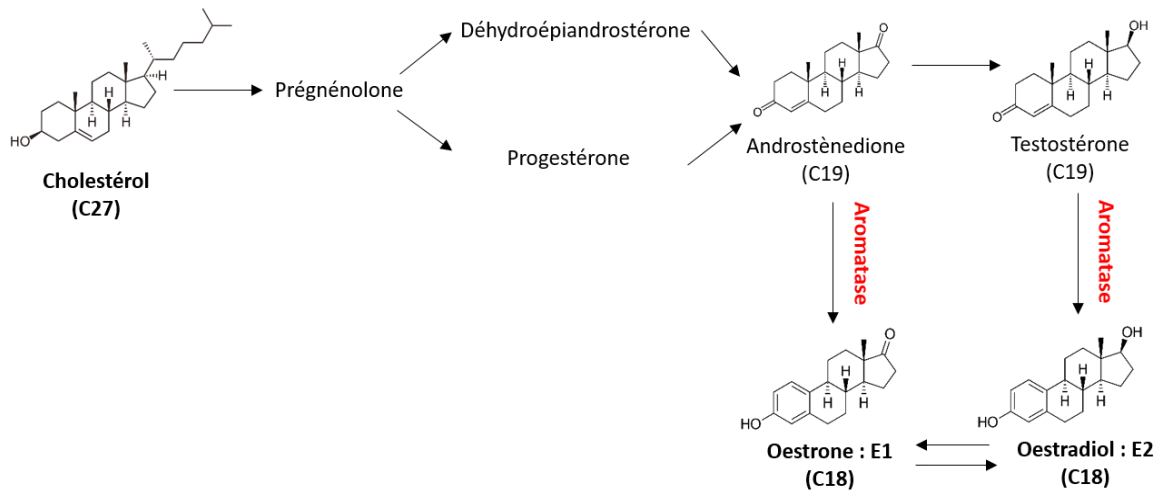


Figure 2 : Voie de biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont dérivés du cholestérol. La conversion de la prégnénolone en déhydroépiandrostérone et la conversion de la progestérone en androstènedione constituent d'autres étapes précoces de la biosynthèse des œstrogènes. L'enzyme aromatasase catalyse l'étape finale et clé (c'est-à-dire la conversion des stéroïdes C19 en œstrogènes). Les cellules de la granulosa ovarienne expriment les niveaux les plus élevés d'aromatasase chez les femmes non ménopausées, mais le tissu adipeux devient le principal site d'expression de l'aromatasase après la ménopause.

I.1.2 Rôles physiologiques du 17 β -œstradiol (E2)

L'E2 joue un rôle majeur dans la régulation des fonctions de reproduction chez la femme. A la **puberté**, il participe à la croissance du vagin, de l'utérus, des trompes de Fallope et de la glande mammaire. En **période d'activité génitale**, sa sécrétion cyclique permet l'ovulation. Il assure aussi les modifications de la paroi utérine essentielles pour l'implantation de l'embryon au cours de **la grossesse** (Figure 3).

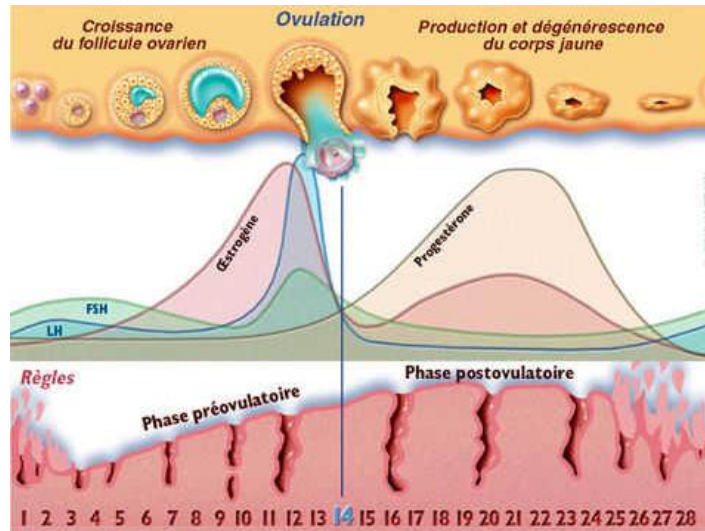


Figure 3 : Représentation schématique du cycle menstruel chez la femme

Chez une femme en période d'activité génitale, les taux d'E2 dans le sang varient : en phase folliculaire (en moyenne 50 pg/mL), en période d'ovulation (en moyenne 300 pg/mL), après l'ovulation (en moyenne 100 pg/mL), et pendant la grossesse (plus de 20 000 pg/mL pendant le second et troisième trimestre) (Stanczyk and Clarke, 2014).

Les œstrogènes agissent également sur de nombreux tissus extra-reproducteurs. Ils ont un rôle protecteur au niveau du système nerveux central, et améliorent la trophicité de la peau et des voies urinaires. Au niveau du système osseux, ils régulent le renouvellement et la croissance osseuse (Riggs et al., 2002). Il est également bien établi que les œstrogènes protègent la paroi vasculaire et les tissus métaboliques (je reviendrai plus en détails sur ces effets dans la partie I.3). La description des effets protecteurs des œstrogènes repose sur différentes études épidémiologiques qui montrent que les femmes en période d'activité génitale sont protégées par rapport aux hommes, notamment vis à vis des maladies cardiovasculaires et métaboliques, et que ces différences s'estompent dans les années qui suivent la ménopause chez la femme.

I.2 La ménopause

I.2.1 La ménopause et ses conséquences.

Dans les pays industrialisés, l'âge médian des femmes à la ménopause se situe entre 50 et 52 ans. La ménopause est définie par la fin permanente de la menstruation et la cessation de l'ovulation dues à l'arrêt de la fonction ovarienne. Elle se traduit donc par une diminution drastique des taux d'E2.

La ménopause est souvent à l'origine de nombreux troubles qui peuvent être très pénibles et affecter considérablement la qualité de vie personnelle, sociale et professionnelle des femmes. Les symptômes les plus fréquents sont ceux liés au système nerveux central : les symptômes vasomoteurs (bouffées de chaleur et sueurs nocturnes), les troubles du sommeil, l'anxiété et la dépression. Le déficit en œstrogène est également à l'origine de symptômes urogénitaux (tels que les sécheresses vaginales et les dysuries) et du vieillissement de la peau. La ménopause provoque un risque augmenté d'ostéoporose, associé à une augmentation du risque de fracture osseuse provenant de la diminution de la densité osseuse. Elle est également associée à une augmentation des événements cardiovasculaires (et plus particulièrement les maladies coronariennes, comme l'infarctus du myocarde) et de troubles du métabolisme (obésité, diabète...) sur lesquels je reviendrai dans la partie I.3 (**Figure 4**) (Monteleone et al., 2018).

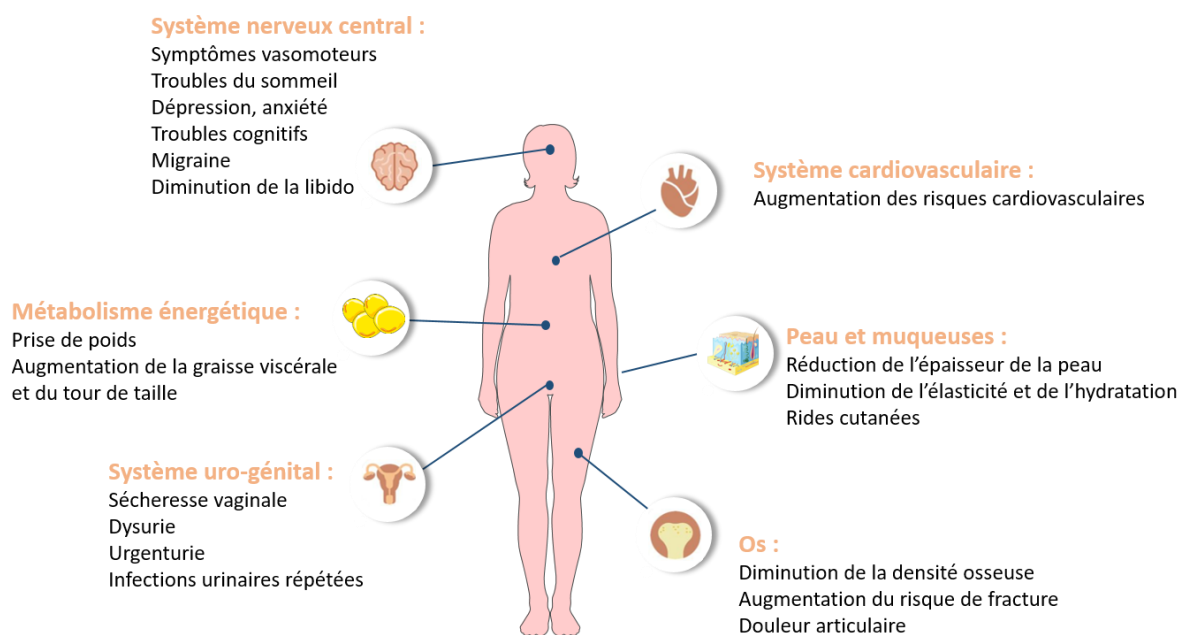


Figure 4 : Principaux symptômes et dysfonctions à la ménopause, adaptée de (Monteleone et al., 2018)

Pour limiter ces dysfonctions, les femmes peuvent avoir recours à un traitement hormonal de substitution ou traitement hormonal de la ménopause (THM) qui associe un œstrogène et un progestatif.

I.2.2 Des débuts du traitement hormonal de la ménopause à l'étude WHI

Dès les années 1940, la *Food and Drug Administration* (FDA) autorise la prescription d'œstrogènes issus d'urine de juments gravides, nommés œstrogènes conjugués équins (CEE) ou Prémarin®. Ce traitement est un succès puisqu'il montre une grande efficacité chez les femmes souffrant de bouffées de chaleur et de sueurs nocturnes. Alors qu'il est d'abord prescrit pour réduire ces symptômes, des études démontrent qu'il est également capable de ralentir le vieillissement de certains tissus et qu'il est associé à une prévention de maladies coronaires, de l'ostéoporose et de la maladie d'Alzheimer (Stampfer et Colditz 1991; Yaffe et al. 1998). La vente du Prémarin s'envole jusqu'aux années 1970. En 1975, un article est publié dans la prestigieuse revue *The New England Journal of Medicine*, montrant que les œstrogènes augmentent le risque de cancer de l'endomètre (Ziel and Finkle, 1975) et s'en suivent d'autres articles qui iront dans le même sens.

Parallèlement, d'autres études démontrent que le risque de cancer de l'endomètre peut être prévenu par l'adjonction d'un traitement par progestatif (Woodruff and Pickar, 1994). Très vite, pour contrecarrer cet effet délétère, le traitement œstrogénique est donc associé à un progestatif. Cette association est totalement neutre sur le plan utérin et le THM redevient un traitement de choix chez les femmes ménopausées pour pallier aux bouffées de chaleur. Cependant, la première étude contrôlée randomisée *Heart and Oestrogen/Progestin Substitution* (HERS) remet en cause le bénéfice du THM sur le plan cardiovasculaire qui émanait des études épidémiologiques (Hulley, 1998).

Au vu de l'utilisation répandue du traitement et de la controverse autour du THM, les *National Institutes of Health* (NIH) lancent dans les années 1990 une grande étude randomisée : la *Women's Health Initiative* (WHI). Cette étude a pour but d'évaluer clairement les risques et les avantages de ce traitement. Elle est divisée en deux groupes : le premier évaluant l'impact du CEE couplé à un progestatif chez plus de 16000 femmes âgées de 50 à 79 ans, et le second évaluant l'impact de l'œstrogène seul (CEE) chez des femmes hystérectomisées (ayant subi une ablation de l'utérus) ménopausées.

Le premier volet de l'étude est stoppé en 2002, soit 3 ans avant la fin prévue, puisqu'il montre une incidence accrue de maladies thromboemboliques, de cancer du sein et, de manière plus inattendue, une augmentation des maladies coronariennes (Rossouw et al., 2002). Dans le

deuxième volet de l'étude, après un suivi de 7 ans, il n'a été montré aucune augmentation de maladies coronariennes chez les femmes hystérectomisées prenant le CEE seul, mettant en lumière le rôle important du progestatif dans le risque cardiovasculaire (Anderson et al., 2004).

Les analyses ultérieures ont révélé des limites majeures à cette étude. La principale est l'âge des patientes, qui pour la plupart, ont reçu le traitement à distance de la survenue de la ménopause. En effet, près d'un quart des femmes étaient âgées de plus de 70 ans. Après ré-analyse de l'étude, il s'est avéré que c'était dans cette tranche d'âge que les femmes présentaient une augmentation des risques coronariens, alors qu'il n'y avait aucune différence (comparé au placebo) chez les femmes de moins de 60 ans (Rossouw et al., 2007) (**Figure 5**).

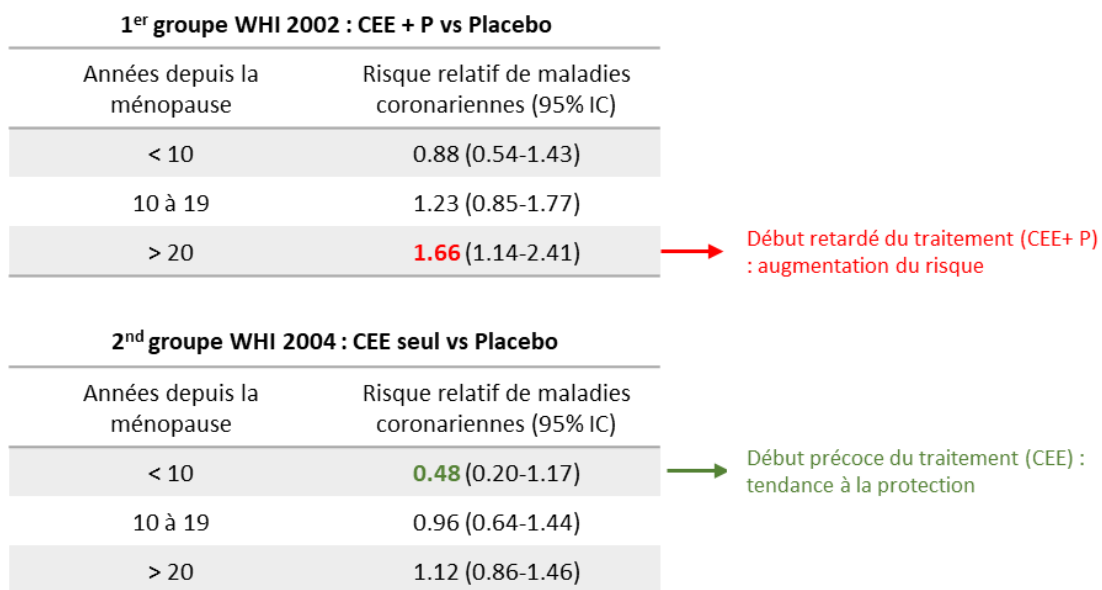


Figure 5 : Risque relatif de maladies coronariennes dans l'étude WHI, adaptée de (Valera et al., 2015) WHI : *Women's Health Initiative* ; CEE : Œstrogènes Conjugués Equins ; P : Progestatif

Concernant le risque de maladies thromboemboliques veineuses, il semblerait que la voie d'administration du traitement et le type de progestatif associé soient des déterminants importants. En effet, il a été montré que la voie d'administration orale augmente le risque thromboembolique comparé à la voie transdermique. Cet effet peut être dû au premier passage hépatique qui augmenterait les facteurs de la coagulation responsables des maladies thromboemboliques seulement lorsque les œstrogènes sont administrés par voie orale (Canonica et al., 2007; Scarabin et al., 2003).

L'étude WHI ainsi que les études qui ont suivi, ont révolutionné le monde de la gynécologie et cela a abouti à de nouvelles recommandations d'utilisation des THM. Les recommandations actuelles préconisent de prendre le THM dès l'apparition de la ménopause pour une période de 5 à 10 ans (Hodis et al., 2016; Schierbeck et al., 2012). Toutefois, sa prescription a fortement chuté et a laissé les femmes dans une impasse thérapeutique face aux symptômes de la ménopause. En 2002, un peu plus de 2 millions de françaises suivaient un THM, elles représentaient environ 20% de l'ensemble des femmes ménopausées et près de 2 femmes sur 5 âgées de 50 à 65 ans. A l'issue de l'étude WHI, 1 femme ménopausée sur 3 a arrêté son traitement. Ainsi en 2002, 23,2 millions de boîtes de THM ont été vendues contre 5,9 millions en 2012, soit une diminution de plus de 74% en 10 ans (AFEM).

Avec l'augmentation de l'espérance de vie, on estime d'ici 2025 qu'il y aura 1,1 milliards de femmes ménopausées dans le monde. Ainsi, mieux comprendre et identifier de nouveaux traitements plus sûrs pour les femmes ménopausées représentent un enjeu de santé majeur.

I.3 Effets des œstrogènes sur les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, qui comprend : les maladies coronariennes, touchant les vaisseaux qui alimentent le cœur (tel que l'infarctus du myocarde), les maladies cérébro-vasculaires, touchant les vaisseaux qui alimentent le cerveau (tel que l'accident vasculaire cérébral : AVC), mais également d'autres maladies comme celles touchant les vaisseaux sanguins alimentant les bras et les jambes, les malformations cardiaques et les thromboses veineuses.

En 2017, les maladies cardiovasculaires, et principalement l'infarctus du myocarde et l'AVC, représentent la première cause de mort dans le monde, soit presque 18 millions de décès (Ritchie and Roser, 2018). Leur cause la plus courante est la rupture de la **plaque d'athérome**, résultant d'un dépôt de graisse (cholestérol) dans la paroi artérielle (**Figure 6**).

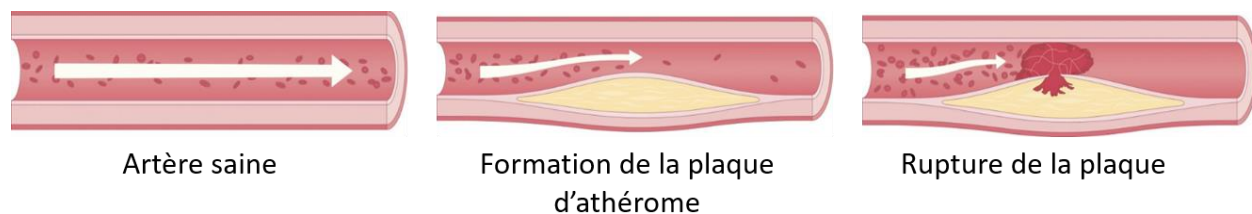


Figure 6 : Représentation schématique de la formation et rupture de la plaque d'athérome, inspirée de (Libby, 2001)

I.3.1 L'athérosclérose

- **Physiopathologie**

C'est une pathologie touchant les artères de grand et moyen calibre, caractérisée par l'accumulation de lipides à la faveur d'un processus inflammatoire. Les mécanismes mis en jeu sont complexes, il est donc important de bien comprendre la structure de la paroi artérielle pour pouvoir les décrire :

La paroi artérielle est composée de trois couches cellulaires. La première, *l'intima*, tunique la plus interne à la paroi artérielle, est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et se situe à l'interface entre le flux sanguin et la deuxième couche cellulaire, *la média*. Cette structure assure les échanges entre ces deux compartiments ce qui lui confère un rôle clé dans la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire et l'adhésion leucocytaire. La deuxième couche, *la média*, constituant principal de l'artère, est composée principalement de cellules musculaires lisses contenues dans une matrice extracellulaire riche en collagène et en fibres élastiques. Cette structure permet d'assurer des fonctions vasomotrices, de compliance et de tonus vasculaire. Enfin la troisième couche, *l'adventice*, la tunique la plus externe, est constituée de fibroblastes et de tissu conjonctif lâche et peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques. Elle est traversée par des micros vaisseaux, *vasa vasorum*, qui apportent les nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau (**Figure 7**).

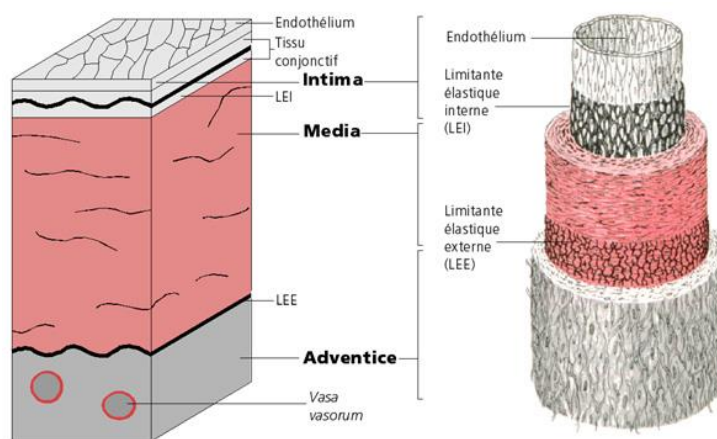


Figure 7 : Représentation schématique de la paroi artérielle, adaptée de (Abot, 2013)

Plusieurs étapes vont conduire à la formation de la plaque d'athérome. L'évènement initial est l'entrée du cholestérol contenu dans les lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein*,

LDL) dans la paroi artérielle en traversant la monocouche de cellules endothéliales. La quantité de LDL cholestérol sanguin est un élément déterminant de la formation des plaques d'athérosclérose. Cette phase d'infiltration est suivie de modifications oxydatives des LDL dans l'espace sous endothélial, qui vont activer l'endothélium et en particulier induire l'expression de molécules d'adhérence pour les leucocytes. Ces molécules telles que *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) ou *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1), vont permettre l'adhérence des monocytes circulants à la surface de l'endothélium, puis leur migration dans l'espace sous endothélial où ils se différencieront en macrophage. Dans un premier temps, un certain nombre d'entre eux se transforment en cellules spumeuses en captant les LDL-oxydées ; cette captation se fait par l'intermédiaire de récepteurs « *scavengers* ». Les macrophages gorgés de lipides évoluent en cellules spumeuses, ce qui aboutit à la formation des lésions athéromateuses précoces, ou stries lipidiques. La nécrose des cellules spumeuses provoque la libération de leur contenu lipidique, qui va former le cœur de la plaque. En plus des macrophages, d'autres cellules du système immunitaire sont recrutées au niveau de la plaque d'athérome (lymphocytes, cellules dendritiques, mastocytes...), conduisant à une auto-amplification du processus.

Suite à l'infiltration des cellules immunitaires, les cellules musculaires lisses, sous l'action des cytokines, migrent vers l'intima et se multiplient autour de la plaque athéromateuse ainsi formée. Celle-ci augmente en épaisseur, conduisant à la réduction progressive de la lumière de l'artère et créant une sténose qui diminue le débit sanguin et compromet l'oxygénation des tissus irrigués par l'artère malade, on l'appelle alors chape fibreuse. La chape fibreuse peut se rompre et entraîner la formation d'un thrombus qui va obstruer la lumière artérielle (et, par exemple, provoquer un infarctus du myocarde s'il s'agit d'une artère coronaire) (**Figure 8**).

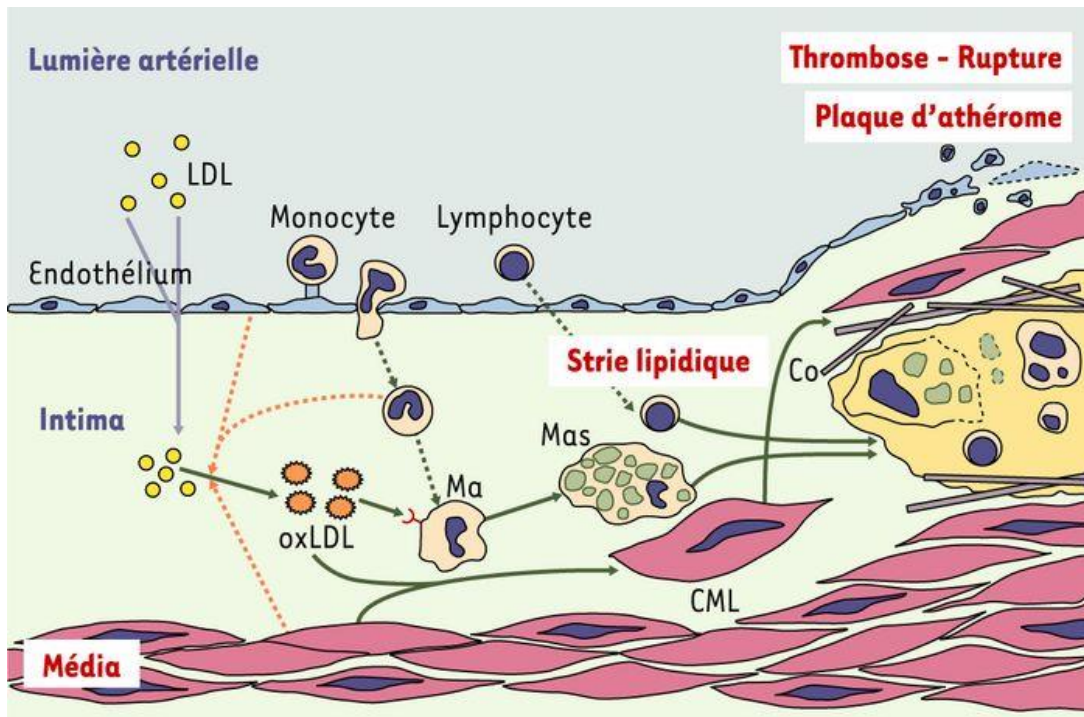


Figure 8 : Représentation schématique du processus d'athérosclérose, une pathologie métabolique et inflammatoire, issue de (Arnal et al., 2003)

Après pénétration dans l'intima, les LDL subissent une oxydation (oxLDL). Ces modifications vont activer des molécules d'adhérence des cellules endothéliales qui vont ralentir les monocytes circulants et permettre leur infiltration dans l'intima. Les monocytes vont être activés en macrophages (Ma). Les LDL oxydés vont être reconnus par des récepteurs à la surface des macrophages (*scavengers*) qui deviennent progressivement spumeux (Mas), formant la strie lipidique. Les cellules musculaires lisses (CML) vont alors migrer dans l'intima et sécréter du collagène (Co) formant une plaque d'athérome qui bouche la lumière du vaisseau. Cette plaque peut rompre et former un thrombus obstruant alors la lumière artérielle.

- **Données épidémiologiques et cliniques**

Les études épidémiologiques prospectives, dont l'étude Framingham en 1986, mettent en évidence que les femmes présentent deux à quatre fois moins d'accidents cardiovasculaires que les hommes et que cette différence s'estompe après la ménopause (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, l'étude de la cohorte de la *Nurses' Health Study*, montre une augmentation du risque de coronopathies chez les femmes ayant subi une hystérectomie (Colditz et al., 1987). Enfin, comme décrit précédemment, les ré-analyses des données cliniques de WHI ont montré le rôle protecteur des œstrogènes sur les maladies cardiovasculaires lorsque le THM est prescrit dans les premières années de la ménopause (**Figure 9**).

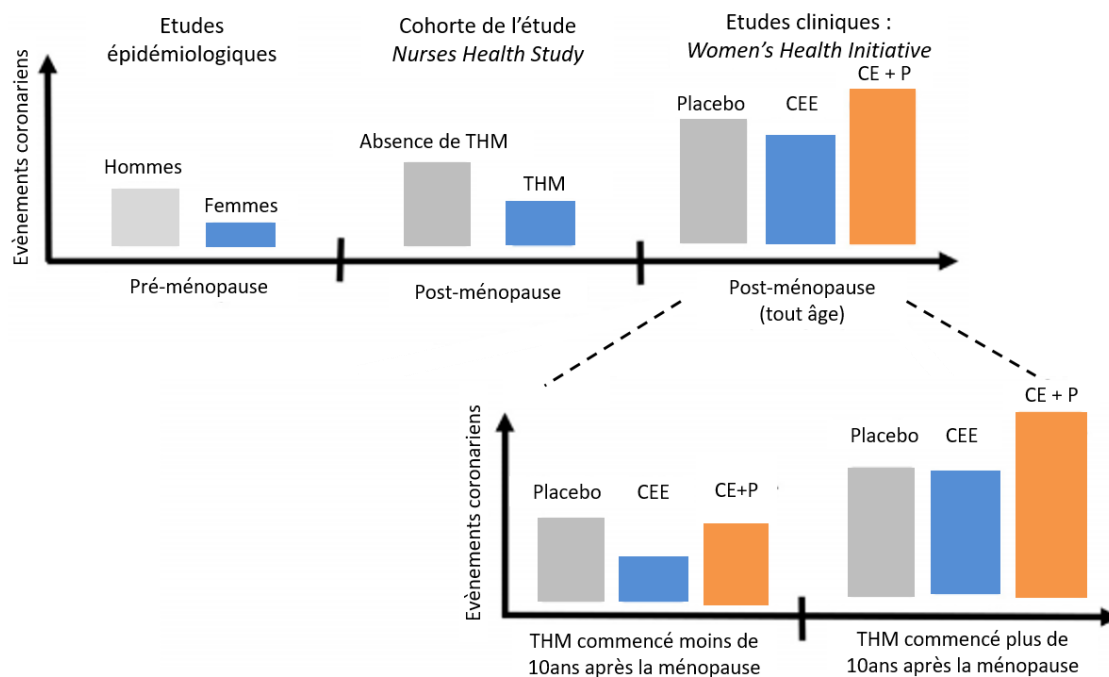


Figure 9 : Résumé des études épidémiologiques et cliniques sur les risques d'événements coronariens chez la femme, adaptée de (Valera et al., 2015)

THM : Traitement hormonal de la ménopause, CEE : œstrogènes conjugués équiens, P : progestatif

Ces conclusions sont renforcées par l'ensemble des modèles expérimentaux démontrant clairement un effet protecteur de l'E2 sur le plan artériel et notamment sur l'athérosclérose à l'origine de nombreuses maladies cardiovasculaires.

- **Données expérimentales**

L'effet athéroprotecteur des œstrogènes a été mis en évidence dans de nombreux modèles expérimentaux allant de la souris au singe (Bourassa et al., 1996; Clarkson and Appt, 2005; Elhage et al., 1997a). C'est grâce à l'avènement de la recombinaison homologue dans les années 1990, que les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cette protection ont pu être élucidés.

Le processus d'athérosclérose fait appel à de nombreux acteurs cellulaires ne pouvant pas être modélisés *in vitro*. La souris ne développant pas d'athérosclérose spontanée, l'étude de l'athérosclérose se fait donc *via* une inactivation génique accompagnée d'un régime enrichi en cholestérol. La souris déficiente pour le récepteur au LDL (LDLr^{-/-}) est un modèle classiquement

utilisé pour modéliser cette pathologie. L'absence du récepteur au LDL influence principalement l'absorption et la clairance des lipoprotéines résultant en une plus grande quantité de cholestérol contenu dans les LDL dans la circulation sanguine (Daugherty et al., 2017).

La souris ne faisant pas de ménopause, un des modèles classiques de carence œstrogénique chez l'animal est l'ovariectomie, qui correspond à l'ablation bilatérale des ovaires. Mon équipe d'accueil a contribué à progresser dans la compréhension de la protection vis-à-vis de l'athérosclérose en réponse aux œstrogènes, notamment en montrant que l'ovariectomie chez les souris est suivie d'une augmentation de la taille des lésions d'athérome au niveau du sinus aortique. L'administration d'E2 exogène chez ces souris prévient ce dépôt lipidique (Elhage et al., 1997a) démontrant clairement un **effet protecteur de l'E2 sur l'athérosclérose**.

Les effets de l'E2 sont relayés par des récepteurs aux œstrogènes et principalement du récepteur aux œstrogènes alpha (ER α) (sur lequel je reviendrai plus en détail dans la partie II.1). L'utilisation de souris déficientes pour ER α a permis de démontrer son rôle crucial dans cette action protectrice puisque cet effet protecteur sur les dépôts lipidiques au sinus aortique est perdu dans les souris invalidées pour ER α (Hodgin et al., 2001). Les travaux de mon équipe ont permis de confirmer ces résultats mais également de mettre en évidence le rôle crucial de **ER α dans l'endothélium** pour cet effet protecteur de l'E2 (Billon-Galés et al., 2009).

I.3.2 Facteurs de risques des maladies cardiovasculaires

De nombreux facteurs de risques vont influencer la survenue des maladies cardiovasculaires, comme le tabac, l'hypertension artérielle, l'hérédité, le diabète, l'hyperlipidémie et l'obésité. Durant mon Diplôme, je me suis plus particulièrement intéressée aux maladies cardiovasculaires associées aux désordres métaboliques, tels que le diabète de type 2 et la stéatose hépatique. En effet, ces deux pathologies métaboliques sont hautement corrélées à la survenue de maladies cardiovasculaires (Adams et al., 2017; O'Donnell and Elosua, 2008; Stols-Gonçalves et al., 2019). De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'existence d'un dimorphisme sexuel vis-à-vis des maladies métaboliques et cardiovasculaires avec un risque augmenté chez les hommes par rapport aux femmes en période d'activité génitale.

- **L'obésité et le diabète de type 2**

Etudes épidémiologiques et cliniques

La prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 est moindre chez les femmes que chez les hommes dans les tranches d'âge moyen (35-64 ans) (Balkau et al., 2007). Les femmes en période d'activité génitale présentent également une meilleure sensibilité à l'insuline que les hommes à un âge comparable (Mittendorfer, 2005).

Cette protection est principalement attribuée à une différence de répartition de la masse graisseuse, qui se localise au niveau sous cutané chez les femmes, et au niveau abdominal et péri-viscéral chez les hommes. La ménopause provoque une redistribution des graisses dans le compartiment abdominal et viscéral, conduisant au passage d'une silhouette de type « gynoïde » à une silhouette de type « androïde » (**Figure 10**). Cette redistribution chez les femmes au moment de la ménopause favorise l'installation d'une insulino-résistance, et entraîne une incidence accrue des troubles métaboliques prédisposant à une obésité, un diabète de type 2 et un sur-risque de maladies cardiovasculaires (Mauvais-Jarvis et al., 2013; Shi and Clegg, 2009).

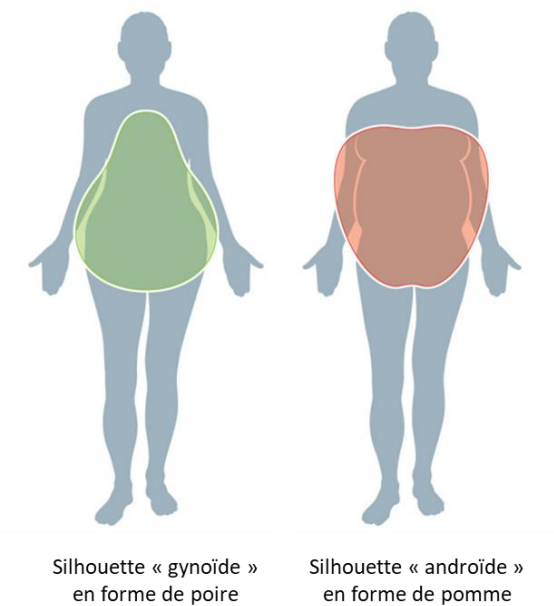


Figure 10 : Répartition de la masse graisseuse de type « gynoïde » ou « androïde »

Les études WHI et HERS ont conclu à un rôle du système hormonal puisque que la prise d'un THM permet de réduire entre 20 et 35% l'incidence du diabète de type 2 par rapport à un placebo (Bonds et al., 2006; Kanaya et al., 2003; Margolis et al., 2004). Une méta-analyse de 107

études cliniques randomisées en double aveugle démontre également que le THM prévient du diabète de type 2, de l'accumulation de graisse intra-abdominale et de l'insulino-résistance (Salpeter et al., 2006).

Données expérimentales

Les données expérimentales chez la souris ont permis de confirmer ces conclusions. En effet, l'ovariectomie augmente la prise pondérale chez la souris nourrie avec un régime alimentaire classique (Kamada et al., 2011). L'utilisation d'un régime riche en lipides induit une prise pondérale, une augmentation de l'adiposité, une dyslipidémie (concentration trop importante de lipides dans le sang), le développement d'une insulino-résistance ainsi que d'une intolérance au glucose chez des souris ovariectomisées comparées aux souris intactes (opération « fantôme ») (Riant et al., 2009; Zhu et al., 2013). Ces désordres métaboliques sont prévenus par l'administration d'E2 exogène (Riant et al., 2009; Zhu et al., 2013).

En parallèle, l'utilisation de souris transgéniques déficientes pour le récepteur aux œstrogènes alpha (ER α) a permis de mettre en évidence son rôle dans la protection de l'E2 sur l'obésité et le diabète de type 2 (Riant et al., 2009). Les cibles cellulaires impliquées dans ces effets sont complexes, faisant intervenir différents organes, comme le cerveau, le pancréas, le tissu adipeux et le muscle (Hevener et al., 2015; Mauvais-Jarvis et al., 2013; Tramunt et al., 2020).

- **La stéatose hépatique**

La stéatose hépatique non alcoolique fait partie d'un large spectre de maladies hépatiques appelées *Non Alcoholic Fatty Liver Diseases* (NAFLD). Les NAFLD sont définies comme des manifestations hépatiques du syndrome métabolique (Marchesini et al., 2003). Ces pathologies représentent aujourd'hui la plus grande cause de pathologies hépatiques chroniques dans les pays industrialisés. En 2016, une étude épidémiologique révèle que la prévalence mondiale des NAFLD est de 25,24 %, soit un adulte sur 4 (Younossi et al., 2016).

La stéatose est le premier stade des NAFLD. Sa prévalence est de 30% et atteint jusqu'à 70 à 90% chez les patients obèses. Même si elle est réversible par une augmentation de l'activité physique et une perte de poids, elle est pour de nombreux patients, le point de départ de nombreuses atteintes plus sévères et non réversibles dans le foie comme la stéato-hépatite ou *Non*

Alcoholic SteatoHepatitis (NASH). En plus de la stéatose, la NASH est caractérisée par une inflammation hépatique et peut être associée ou non à des lésions de fibrose. Elle peut elle-même évoluer vers la cirrhose et le cancer du foie (**Figure 11**).

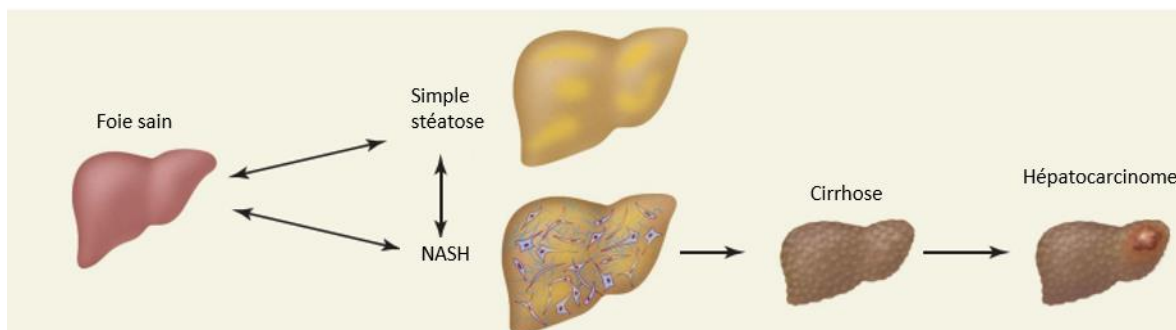


Figure 11 : Représentation schématique de l'évolution de la NAFLD, issue de (Cohen et al., 2011)

La NAFLD débute par une accumulation de graisse dans le foie, appelée stéatose. Cette étape est réversible mais peut évoluer vers la NASH lorsqu'elle est accompagnée d'inflammation et/ou présence de fibrose. Enfin, le stade plus avancé de la maladie peut aboutir à une cirrhose du foie, voire un cancer (hépatocarcinome).

La stéatose hépatique est définie par une accumulation de triglycérides dans plus de 5% des hépatocytes. Cette accumulation provient de l'estérification d'acides gras provoquant un déséquilibre métabolique dans les hépatocytes. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans ce déséquilibre (Postic and Girard, 2008) (**Figure 12**) :

- Une arrivée en excès d'acides gras exogènes venant des intestins *via* les chylomicrons à la suite d'une prise alimentaire excessive. Les triglycérides sont transportés dans les chylomicrons ou les LDL, puis la lipoprotéine lipase (LPL) les hydrolyse en acides gras pour leur prise en charge par le foie et d'autres organes (muscle, tissu adipeux).

- Une augmentation de la lipolyse adipocytaire générant un afflux important d'acides gras libres (surtout en cas d'insulino-résistance). Chez une personne saine, l'insuline bloque l'activité de la lipase hormono-sensible (LHS), enzyme du tissu adipeux qui hydrolyse les triglycérides et libère des acides gras libres. En situation d'insulino-résistance, l'insuline va supprimer de façon incomplète l'activité de la LHS, ce qui va provoquer une libération accrue d'acides gras libre dans la circulation sanguine.

- Une augmentation de la lipogénèse *de novo* (processus permettant la synthèse des lipides et de triglycérides en particulier) et une diminution de la β -oxydation (processus intervenant dans

la lipolyse et permettant la dégradation des acides gras) en condition **de glycémie élevée** (hyperglycémie) et **de concentrations d'insuline élevée** (hyperinsulinémie).

- Une diminution de l'export des triglycérides intra-hépatiques par les *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) vers la circulation sanguine qui va donc favoriser l'accumulation des triglycérides dans le foie.

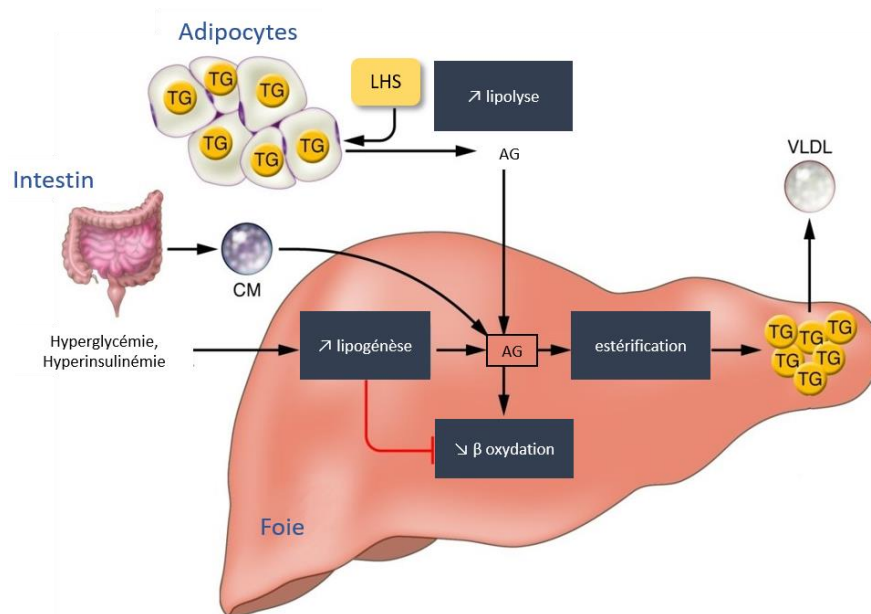


Figure 12 : Schéma illustrant les mécanismes impliqués dans la stéatose, issu de (Postic and Girard, 2008)

Différentes sources d'acides gras (AG) peuvent amener au développement de la stéatose. Dans des conditions d'insulino-résistance, l'insuline n'inhibe plus la lipase hormono-sensible (LHS) ce qui conduit à une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux. Les acides gras proviennent également de l'alimentation où ils sont absorbés dans le foie *via* les chylomicrons (CM) depuis l'intestin. L'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie favorisent la lipogénèse et altèrent la β-oxydation, qui contribuent également à la stéatose. Enfin, le stockage de triglycérides (TG) provenant de l'estérification des acides gras les retient dans le foie. Ils peuvent alors être distribués dans la circulation sanguine sous forme de *Very Low Density Lipoprotéin* (VLDL).

Etudes épidémiologiques et cliniques

De nombreuses études épidémiologiques montrent une prévalence de la NAFLD plus importante chez l'homme que chez la femme en période d'activité génitale (Suzuki and Abdelmalek, 2009; Weston et al., 2005). De manière intéressante, les femmes atteintes de NAFLD présentent des taux d'œstradiol circulant moins importants que les femmes indemnes (Gutierrez-Grobe et al., 2010). A la ménopause, la prévalence de NAFLD augmente comparée à celle des femmes en période d'activité génitale (Lonardo et al., 2019; Wang et al., 2015).

Le traitement hormonal de la ménopause a montré un effet protecteur sur la NAFLD par rapport aux femmes ne recevant pas de traitement. En effet, l'incidence de la NAFLD chez les femmes ménopausées traitées par un THM est plus faible que chez les femmes ménopausées non traitées, suggérant également un rôle des œstrogènes dans la protection des femmes vis-à-vis de la NAFLD (Florentino et al., 2013; McKenzie et al., 2006).

Etudes expérimentales

Les études expérimentales chez la souris nourrie par un régime alimentaire normal, ont permis de montrer que l'ovariectomie ne suffit pas à induire une stéatose hépatique, celle-ci n'est observée que lorsque l'ovariectomie est associée à un régime gras (Kamada et al., 2011). Dans ces conditions, l'administration chronique d'E2 exogène prévient la stéatose hépatique en diminuant le niveau de triglycérides intrahépatiques (Zhu et al., 2013). L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur ER α , et plus particulièrement dans le compartiment hépatique, a permis de mettre en évidence son rôle crucial dans la protection de l'E2 sur la stéatose hépatique (Guillaume et al., 2019; Zhu et al., 2013).

II. Vers une modulation sélective du récepteur aux œstrogènes alpha

La plupart des effets des œstrogènes (qu'ils soient bénéfiques ou délétères) sont relayés par le récepteur nucléaire des œstrogènes alpha (*Estrogen Receptor alpha*, ER α). D'autres récepteurs comme l'*Estrogen Receptor beta* (ER β) ou la *G protein-coupled receptor 30* (GPR30) interviennent dans la transmission du signal œstrogénique mais leur rôle est beaucoup moins décrit. Les effets vasculaires et métaboliques des œstrogènes, sujets de ce mémoire, dépendent exclusivement de ER α , comme a pu le démontrer mon équipe d'accueil à travers de nombreux travaux (Billon-Galés et al., 2009; Brouchet et al., 2001; Darblade et al., 2002; Favre et al., 2010; Handgraaf et al., 2013; Riant et al., 2009). Dans cette deuxième partie, je m'intéresserai donc uniquement à ce récepteur.

II.1 ER α un récepteur nucléaire avec une activité membranaire

ER α appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Cette superfamille est divisée en deux sous familles : les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (SHR) et les récepteurs aux hormones non stéroïdiennes (hormones thyroïdiennes, rétinoides, vitamine D...). 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). Au sein de la famille des récepteurs aux œstrogènes, il existe deux sous-types de récepteurs : ER α et ER β . Ils proviennent de gènes distincts (*ESR1* pour ER α et *ESR2* pour ER β). *ESR1*, pour *Estrogen Receptor 1*, est localisé au niveau du chromosome 6 chez l'Homme.

Comme les autres SHR, en condition non-activé, le récepteur se trouve dans le cytoplasme. Lors de la liaison avec son ligand, le récepteur va s'activer, changer de conformation, et il est alors transloqué dans le noyau. Il se fixe sur le promoteur de ses gènes cibles en reconnaissant des éléments spécifiques d'ADN et recrute alors des cofacteurs et des éléments nécessaires à la machinerie transcriptionnelle (**Figure 13**).

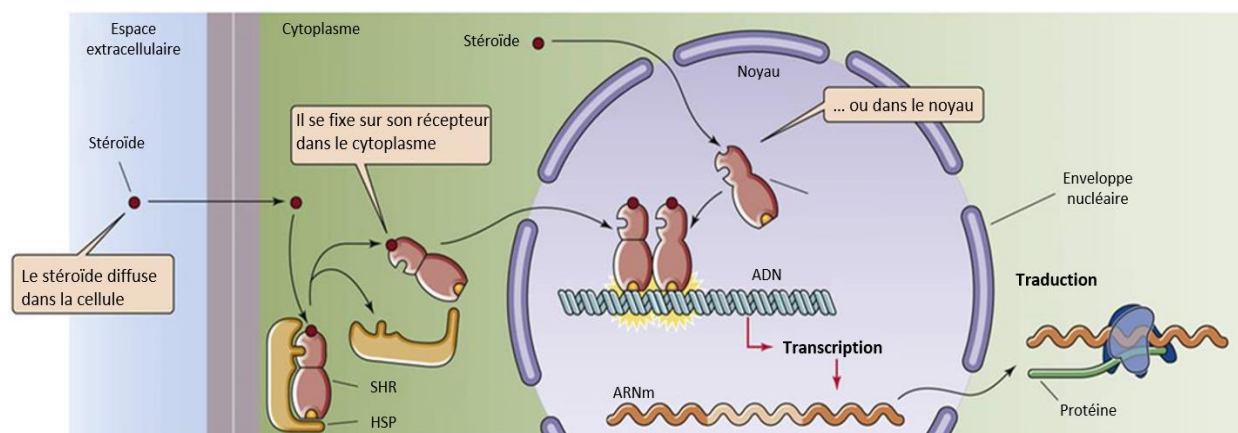


Figure 13 : Représentation schématique du mode d'action des récepteurs nucléaires, inspirée de (Adlanmerini et al., 2015)

En absence de ligand, les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (SHR) se localisent, selon le type cellulaire, dans le noyau ou le cytoplasme, sous forme de monomères associés à des protéines chaperonnes (*Heat Shock Proteins*, HSP) qui les maintiennent à l'état inactif. Les hormones stéroïdiennes diffusent à travers la membrane plasmique et se fixent sur leurs récepteurs dans le cytoplasme ou dans le noyau. Les SHR se dimérisent et se fixent sur le promoteur de gènes cibles induisant la transcription dans le noyau puis la synthèse de protéines (traduction) dans le cytoplasme.

II.1.1 Structure du récepteur

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription présentant une organisation structurelle commune de 6 domaines fonctionnels, désignés de A à F depuis l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale. Ces récepteurs possèdent deux fonctions de transactivation (AF-1 et AF-2) situées respectivement dans les domaines N- et C-terminaux (Kumar et al., 1987) (**Figure 14**).



Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires, issue de (Abot, 2013).

Les récepteurs nucléaires possèdent 6 domaines de A à F. AF-1 : *Activation Function 1*, AF-2 : *Activation Function 2*, DBD : *DNA Binding Domain*, LBD : *Ligand Binding Domain*.

- Le domaine A/B, situé à l'extrémité N-terminale, contient la fonction de transactivation AF-1 permettant l'activité transcriptionnelle du récepteur en agissant de manière indépendante de la présence de ligand. Elle peut interagir avec des cofacteurs et d'autres facteurs de transcription. Ce domaine est également le lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles impliquées dans l'activation ligand indépendante du récepteur.

- Le domaine C, (aussi appelé DBD pour *DNA binding domain* : domaine de liaison à l'ADN), permet la reconnaissance de séquences d'ADN appelées éléments de réponses aux œstrogènes (ERE : *Estrogen Responsive Element*) présents dans le promoteur des gènes cibles.

- Le domaine D, région « charnière » entre le domaine C et E, apporte une flexibilité structurelle permettant la rotation du DBD et l'adoption de différentes conformations.

- Le domaine E, permet la fixation du ligand *via* le domaine de liaison au ligand (LBD : *Ligand binding domain*), et la transcription ligand-dépendante *via* la fonction de transactivation AF-2. Elle est composée de plusieurs hélices, dont l'hélice H12. La fixation des œstrogènes sur son récepteur entraîne un basculement de l'hélice 12 qui referme la poche de liaison du ligand. Cela va permettre le recrutement de cofacteurs nécessaires à la machinerie transcriptionnelle. Suivant la nature du ligand reconnu par le récepteur, sa conformation sera différente et le positionnement de l'hélice 12 sera à l'origine des effets agonistes et antagonistes des œstrogènes (je reviendrai sur ces notions dans la partie II.2).

- Le domaine F, situé à l'extrémité C-terminale, n'est pas clairement caractérisé. Il a été proposé que cette région pourrait influencer la position de l'hélice 12 et moduler le recrutement de certains partenaires d'ER α (Arnal et al., 2017).

II.1.2 Mode d'action

En plus de son action nucléaire comme facteur de transcription, de récentes recherches ont mis en évidence la présence et l'action d'ER α *via* une voie membranaire. Ceci a permis de définir

deux mécanismes d'action d'ER α : la voie « classique » dite génomique ou nucléaire, et la voie « non classique » dite non génomique, extranucléaire ou membranaire (Arnal et al., 2017; Saczko et al., 2017).

- **Voie d'activation « classique » dite génomique ou nucléaire**

Le récepteur ER α va agir comme un facteur de transcription au niveau de séquences cibles des œstrogènes. Il va alors induire l'expression de gènes cibles de manière directe, en s'associant à des séquences ERE au sein de la chromatine, ou de manière indirecte, via des interactions avec d'autres facteurs de transcription (*Activating Protein-1* : AP1, *Specificity Protein-1* : SP1). La fixation de l'E2 conduit au repliement de l'hélice 12, permettant le recrutement de co-activateurs nécessaires à l'activation de la machinerie transcriptionnelle. Ainsi différentes voies d'activation du ER α nucléaire sont possibles (**Figure 15**) :

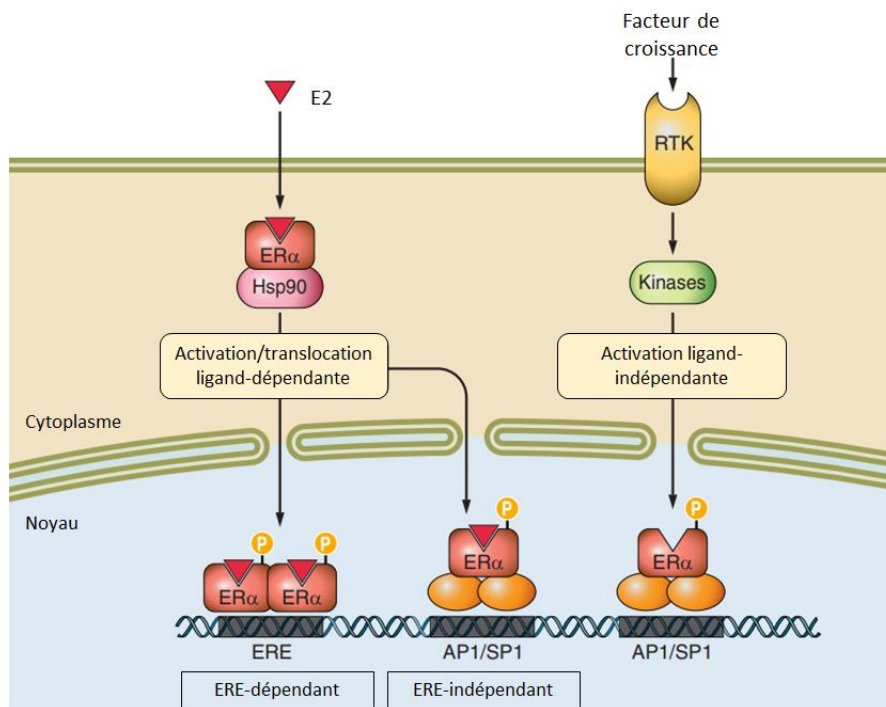


Figure 15 : Représentation schématique de la transcription génique par les voies nucléaires, adaptée de (Arnal et al., 2017)

- La voie ERE-dépendante : La fixation de l'E2 sur ER α entraîne un changement conformationnel du récepteur qui se dimérise, permettant sa translocation dans le noyau. Celui-ci se fixe sur des ERE situés en amont des gènes cibles. Une fois fixé sur un ERE, ER α va activer la transcription de ses gènes cibles *via* ces fonctions de transactivation AF-1 et AF-2, avec le

recrutement de co-activateurs à l'origine d'un remodelage de la chromatine permettant l'activation de la transcription (Kumar and Chambon, 1988; McKenna and O'Malley, 2002).

- La voie ERE-indépendante : outre sa fixation sur les ERE, ER α peut se lier à d'autres facteurs de transcription liant eux-mêmes directement les éléments de reconnaissance sur l'ADN. Dans cette voie de signalisation, ER α module l'activité de facteurs de transcription tels que AP1 ou SP1 (Safe et al., 2008).

- La voie ligand-indépendante : en plus de son activation par son ligand œstrogénique, l'activité de ER α peut être modulée par des signaux extracellulaires, en l'absence d'œstrogènes. Des facteurs de croissance comme *Endothelial Growth Factor* (EGF) ou *Insuline-like Growth Factor-1* (IGF1) sont ainsi capables d'activer le récepteur par phosphorylation et d'induire la transcription de gènes cibles. Cela est possible par la présence sur ER α d'un domaine d'activation hormono-indépendant, AF-1, qui est sujet à de nombreuses phosphorylations (Lannigan, 2003).

- **Voie d'activation non génomique ou membranaire**

Parallèlement aux effets génomiques précédemment décrits, il existe des effets dits « rapides ». Il s'agit d'une voie « non-classique » dite non-génomique, extranucléaire ou membranaire. Celle-ci est caractérisée par des effets rapides des œstrogènes de l'ordre de la seconde à la minute, ils sont trop rapides pour être associés à une action transcriptionnelle.

De nombreuses études montrent qu'une fraction du ER α est également localisée à la membrane de la cellule et participe ainsi à une signalisation membranaire (appelée effets MISS pour *Membrane Initiated Steroid Signaling*) (Chambliss and Shaul, 2002; Clarke et al., 2000; Pappas et al., 1995).

L'ancrage du récepteur à la membrane est permis par différentes modifications post-traductionnelles du récepteur dont une palmitoylation. Cette modification a lieu sur la cystéine 447 chez l'humain (Cys451 chez la souris) par une palmitoyl acyltransferase (PAT) (Acconcia et al., 2004). La mutation de cette cystéine empêche la localisation membranaire et limite l'activation rapide induite par les œstrogènes de la voie *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK). L'inhibition de l'activité de la PAT empêche l'activation des voies de signalisation MAPK/Akt. Ces résultats suggèrent que la palmitoylation de ER α joue un rôle important dans la signalisation cytoplasmique des œstrogènes (Acconcia et al., 2005).

La palmitoylation d'ER α permet sa localisation membranaire en s'associant à la cavéoline-1 au niveau des cavéoles (invagination de la membrane plasmique formées par les cavéolines) (Pedram et al., 2007). La fixation de l'E2 sur le récepteur conduit à la mise en place rapide d'une signalisation extra-nucléaire qui se traduit par la stimulation de cascades de kinases (**Figure 16**).

Les différents travaux réalisés *in vitro* ont montré l'implication de cette voie extra-nucléaire d'ER α dans de nombreuses voies de signalisation. En effet, l'activation par l'E2 de la partie du ER α à la membrane permet son interaction avec des protéines kinases (comme Src et PI3K) ou des protéines G (comme G α i) conduisant à des cascades de signalisation telles que PKA, ERK1/2 et/ou Akt mais également à l'activation de l'oxyde nitrique synthase (NO) (Chambliss et al., 2010; Gourdy et al., 2018; Kim and Bender, 2009). Cependant, l'importance du ER α à la membrane reste sujet à controverse et son véritable rôle est encore peu connu.

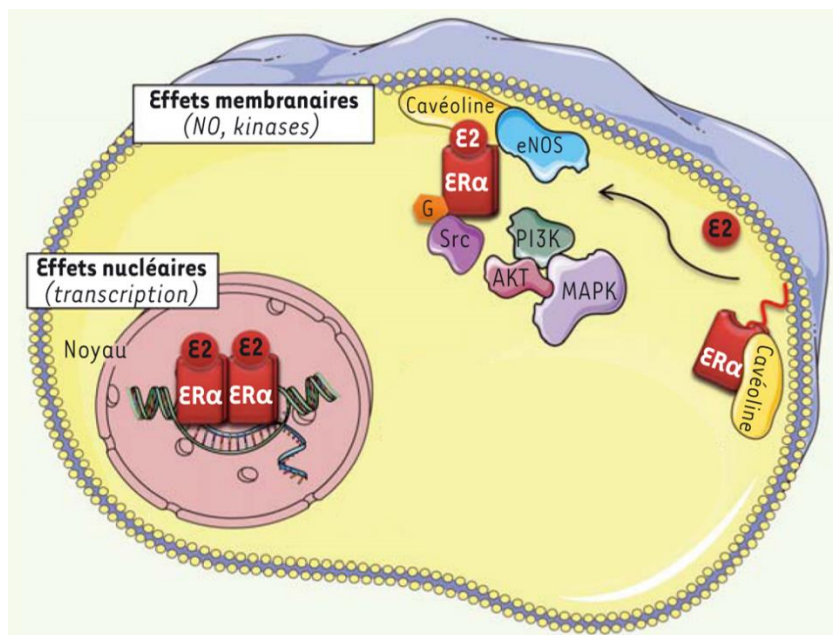


Figure 16 : Représentation schématique des voies d'activation nucléaire et membranaire d'ER α , adaptée de (Adlanmerini et al., 2015)

En parallèle de son activité nucléaire, ER α peut être palmitoylé et, ainsi, transporté à la membrane plasmique, où il peut interagir avec la cavéoline. En présence d'E2, ER α va former une véritable plateforme de signalisation membranaire conduisant notamment à l'activation de la *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) et à l'activation de nombreuses kinases. E2 : 17 β -oestradiol, G : *G protein*, Src : *Sarc*, PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*, MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*, Akt : *Protein Kinase B*.

II.1.3 Modèles de souris permettant l'étude du ER α nucléaire et membranaire

Afin d'étudier les rôles respectifs des effets nucléaires et membranaires de ER α , mon équipe d'accueil a généré, en collaboration avec la clinique de la souris à Strasbourg, deux modèles murins génétiquement modifiés : la première conduisant à une absence d'effet nucléaire de ER α : la souris ER α -AF2⁰ et la seconde conduisant à l'abolition des effets MISS de ER α : la souris C451A-ER α (**Figure 17**).

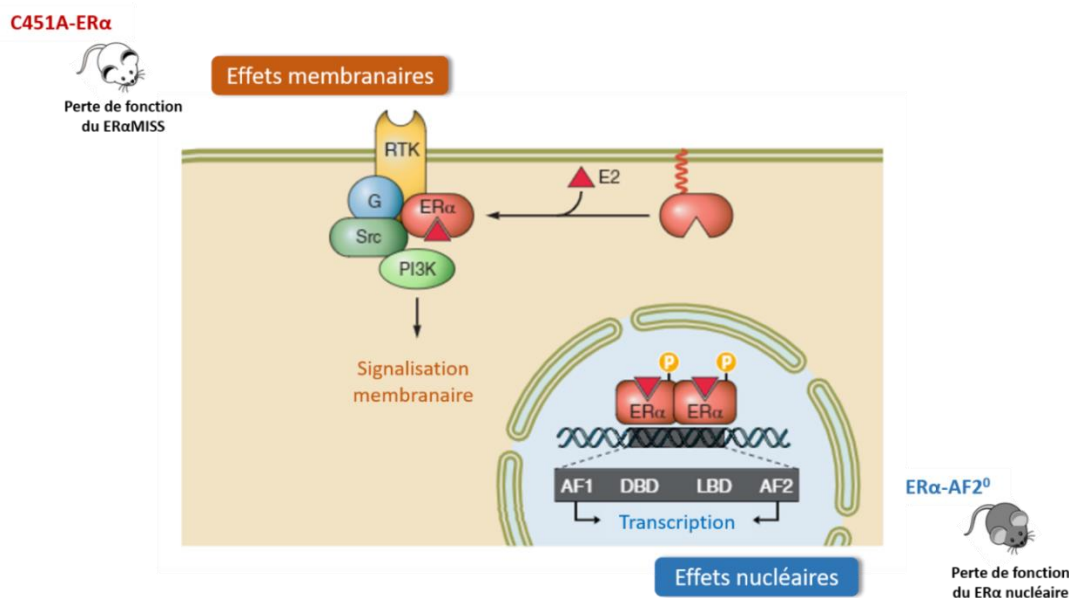


Figure 17 : Modèles de souris ciblant le ER α nucléaire et membranaire

- **Mutant d'inactivation du ER α nucléaire : ER α -AF2⁰**

Ces souris ont été générées par recombinaison homologue avec une construction présentant une délétion des acides aminés 543 à 549 présents dans l'hélice 12 du domaine AF-2, essentiels pour l'activité transcriptionnelle induite par l'E2 (Billon-Galés et al., 2011).

Sur le plan vasculaire, mon équipe a montré que l'effet protecteur des œstrogènes sur l'accumulation de dépôts lipidiques au niveau du sinus aortique est complètement perdu dans les souris ER α -AF2⁰ LDLr^{-/-} démontrant son rôle clé dans les effets protecteurs des œstrogènes sur l'athérosclérose (Billon-Galés et al., 2011).

Au niveau métabolique, les souris ER α -AF2⁰ nourries par un régime classique développent une obésité et des troubles métaboliques. Ceux-ci sont exacerbés lorsque les souris sont nourries par un régime gras, provoquant également une insulino-résistance. Les effets protecteurs des

œstrogènes sur la prise de poids, l'accumulation de tissus adipeux, l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance sont complètement perdus dans les souris ovariectomisées déficientes pour le récepteur nucléaire, démontrant son rôle crucial dans la protection métabolique (Handgraaf et al., 2013).

- **Mutant d'inactivation du ER α membranaire : C451A-ER α**

Plus récemment, nous avons développé un modèle de souris ayant une mutation du site de palmitoylation du récepteur au niveau de la cystéine 451, remplacée par une alanine, obtenant ainsi le premier modèle murin d'abolition des effets MISS de ER α .

Au niveau vasculaire, les effets protecteurs de l'E2 sur la dilatation artérielle, l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) et la cicatrisation endothéliale après lésion électrique de la carotide sont complètement perdus chez les souris C451A-ER α (Adlanmerini et al., 2014) démontrant un rôle du ER α membranaire dans ces effets vasculaires protecteurs.

Sur le plan métabolique, les souris C451A-ER α développent rapidement une obésité et une insulino-résistance lorsqu'elles sont nourries par un régime gras mais de manière moins forte que les souris ER α -AF2⁰ (Résultats non publiés).

II.2 Les SERMS : modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes alpha

Le récepteur aux œstrogènes alpha est la cible des œstrogènes endogènes mais il existe d'autres composés synthétiques qui miment une partie des effets des œstrogènes et permettent ainsi de moduler sélectivement l'activité des récepteurs aux œstrogènes, d'où leur dénomination de SERM pour *Selective Estrogen-Receptor Modulator* ou modulateurs sélectifs du récepteur aux œstrogènes. Ces molécules représentent une classe pharmacologique utilisée pour traiter les maladies en lien avec les œstrogènes. Actuellement, en clinique, les SERM sont utilisés dans le traitement et la prévention du cancer du sein (avec le tamoxifène) et de l'ostéoporose (avec le raloxifène). Dans le contexte du traitement hormonal de la ménopause, l'enjeu capital est donc de développer un « SERM idéal » capable de mimer les effets bénéfiques des œstrogènes en inhibant les effets délétères. En effet, les SERM sont capables d'avoir des actions spécifiques sur certains tissus en mimant l'action des œstrogènes (action agoniste) ou à l'inverse en bloquant leurs effets dans d'autres tissus (action antagoniste).

Les propriétés pharmacologiques des SERM s'expliquent par leur forte affinité pour les récepteurs aux œstrogènes et par la conformation différentielle adoptée par ceux-ci en fonction de la structure du ligand. En effet, selon la structure de ces molécules lorsqu'elles se lient au domaine de liaison au ligand (LDB), la fermeture par l'hélice 12 de ce domaine est modifiée et peut adopter une conformation différente de celle adoptée par l'E2. Les co-activateurs, qui normalement permettent l'activité transcriptionnelle du récepteur, ne peuvent plus être reconnus au profit de co-répresseurs qui vont bloquer la transcription.

Plus récemment de nouvelles stratégies visant à découpler les effets membranaires des effets nucléaires du ER α ont été proposées.

II.2.1 Activation sélective du ER α membranaire

- L'EDC

En 2006, l'équipe du Pr. John Katzenellenbogen produit l'*Estrogen Dendrimer Conjugate* (EDC), qui est l'une des premières stratégies pharmacologiques pour étudier les effets membranaires d'ER α . Il est produit par l'attachement d'un œstrogène (éthynyl-œstradiol) à une macromolécule synthétique : un dendrimère de poly(amido) amine (PAMAM) par une liaison hydrolytiquement stable. Vingt molécules de 17 α éthynyl-œstradiol sont couplées à une molécule de PANAM contenant 236 fonctions amines (**Figure 18**). La nature du lien chimique entre le PAMAM et l'œstrogène est telle qu'elle permet un accès optimal à l'œstrogène sur son récepteur et lui confère alors la même affinité que celle de l'œstrogène seul. En raison de ses charges et de sa taille, ce composé reste en dehors du noyau et ne peut initier qu'une signalisation extracellulaire (Harrington et al., 2006; Kim and Katzenellenbogen, 2006).

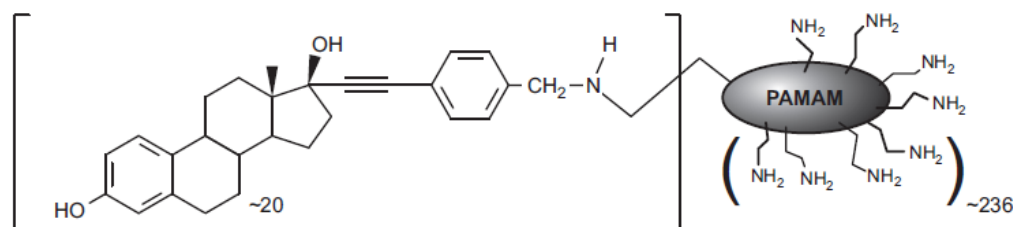


Figure 18 : Structure chimique de l'*Estrogen Dendrimer Conjugate* (EDC), issue de (Arnal et al., 2017)

Cette première étude *in vitro* a permis de montrer par fluorescence, dans des cellules cancéreuses mammaires, que l'EDC est localisé dans le compartiment extranucléaire. L'EDC est

capable d'activer des voies de signalisation comme la phosphorylation de ERK, l'activation des MAPK et la phosphorylation de la tyrosine kinase c-Src, mais n'est pas capable d'induire la transcription de gènes cibles des œstrogènes. De manière intéressante, contrairement à l'E2, il n'induit pas la prolifération de cellules mammaires cancéreuses (Harrington et al., 2006).

En 2010, la première étude utilisant l'EDC *in vivo* montre que, comme l'E2, il est capable de protection artérielle en activant la production de NO et en accélérant la cicatrisation endothéliale après une agression à la carotide. Dans un modèle de souris ApoE^{-/-}, l'EDC, comme l'E2 est capable de diminuer l'hyperplasie néo-intimale (prolifération accrue des CML) après dénudation de l'endothélium à la carotide. Enfin contrairement à l'E2, l'EDC n'induit pas d'hypertrophie utérine et ne favorise pas la croissance de tumeurs mammaires. Dans ce travail, les auteurs définissent l'EDC comme le premier SERM non nucléaire. Ils proposent donc qu'activer la voie du ER α membranaire pourrait être **une bonne stratégie pour les nouveaux THM** puisque l'EDC favorise la **protection cardiovasculaire sans induire la croissance tumorale utérine et mammaire** (Chambliss et al., 2010).

- **Le PaPE-1**

Plus récemment, l'équipe du Pr. John Katzenellenbogen a développé un nouveau composé capable d'activer seulement le ER α membranaire. Il s'agit du *Pathway-Preferential Estrogen 1* (PaPE-1). Celui-ci a été synthétisé en modifiant la structure de l'E2, de manière à conserver ses propriétés physico-chimiques mais en diminuant le temps d'interaction avec ER α (**Figure 19**).

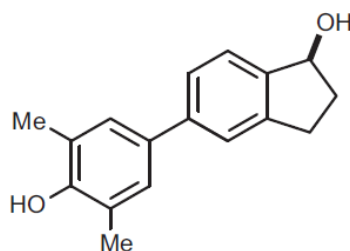


Figure 19 : Structure chimique du *Pathway-Preferential Estrogen 1* (PaPE-1), issue de (Arnal et al., 2017)

Dans leur premier travail, cette équipe montre que le PaPE-1 a une affinité 50000 fois moins forte pour les récepteurs aux œstrogènes que l'E2. La labilité d'interaction ligand-récepteur permet d'activer le ER α membranaire mais pas les fonctions nucléaires du récepteur.

En effet, ER α n'est pas capable d'interagir avec son co-activateur SRC3 après induction avec le PaPE-1 contrairement à l'E2 dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires, démontrant qu'il n'est pas capable d'activer le ER α nucléaire. *A contrario*, le PaPE-1 est capable d'activer des voies de signalisation rapides comme mTOR et MAPK. Ces activations permettent l'expression de gènes *via* des mécanismes indépendants de la fixation d'ER α sur l'ADN (Madak-Erdogan et al., 2016). Comme décrit pour l'EDC, sur le plan vasculaire, le PaPE-1 est capable d'augmenter la production de NO et d'accélérer la cicatrisation des cellules endothéliales après agression à la carotide sans induire de prolifération utérine et mammaire.

Ces données renforcent l'idée selon laquelle des composés qui activent sélectivement la signalisation ER à la membrane plasmique **pourraient être développés en tant qu'agents thérapeutiques** puisqu'ils n'ont pas d'impact sur l'utérus et la glande mammaire, et donc **n'augmentent potentiellement pas le risque de cancer du sein et de l'endomètre** comparés aux œstrogènes classiques. L'évaluation de cette stratégie dans la protection artérielle a fait l'objet de la première partie de mon travail.

II.2.2 Activation sélective du ER α nucléaire : L'Estetrol (E4)

En miroir de l'activation sélective membranaire, l'estetrol (E4) a été décrit comme le premier et probablement le seul **modulateur sélectif de ER (SERM) naturel et endogène**, capable d'activer les effets nucléaires d'ER α mais qui est dépourvu des effets membranaires du récepteur (Abot et al., 2014).

- **L'Estetrol : un œstrogène endogène spécifique des grands singes**

L'E4 est un œstrogène naturel produit par le foie fœtal chez l'Homme et les grands singes. La découverte de ce nouvel œstrogène a été faite en 1965 par Diczfaluzy *et al.* Le but de leur étude était d'étudier le métabolisme de l'E2 au début de l'enfance. Pour cela, les auteurs ont administré de l'E2 radiomarqué (C¹⁴-E2) à trois nourrissons présentant de multiples malformations et ont récupéré des échantillons d'urine afin de doser les composés œstrogéniques. Ils retrouvent dans ces échantillons la présence d'E1, d'E2 et d'E3 mais de manière surprenante, découvrent un nouveau composé présent majoritairement. Ils décrivent ce composé comme un stéroïde phénolique possédant 4 groupes hydroxyles (-OH) sans groupe oxo (=O) (Hagen et al., 1965).

Peu de temps après, Gurpide *et al.*, étudient le métabolisme de l'E2 chez la femme enceinte et le fœtus. Les auteurs retrouvent un métabolite urinaire plus polarisé que l'E3 et, en comparant les spectres infrarouges de cette molécule, concluent que ce composé est identique à celui découvert par Diczfaluzi *et al.* Ils nomment alors cet œstrogène : Estetrol (Gurpide *et al.*, 1966). L'isolement et l'identification de ce nouvel œstrogène se fera par Diczfaluzi *et al.*, en extrayant 200 litres d'urine en fin de grossesse. Ils concluent que l'E4 est synthétisé exclusivement par le foie fœtal durant la grossesse, se basant sur de précédentes études montrant que le foie fœtal est le site exclusif d'hydroxylations (15 α et 16 α hydroxylases) nécessaires à la formation de l'E4 (Zucconi *et al.*, 1967). Les travaux permettant l'étude de la voie de biosynthèse de l'E4 ont permis de conclure que l'E2 était le précurseur majeur de l'E4. L'E4 est formé par une première 15 α hydroxylation puis une 16 α hydroxylation (Cantineau *et al.*, 1985). Il n'est pas reconverti en E3 ou en E2 (Holinka *et al.*, 2008a) (**Figure 20**).

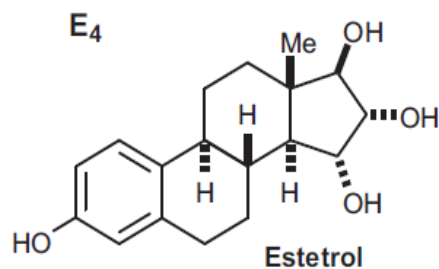


Figure 20 : Structure chimique de l'Estetrol (E4), issue de (Arnal *et al.*, 2017)

Les études sur l'affinité de cet œstrogène pour ses récepteurs ont révélé que l'E4 avait une affinité et une puissance très faible : 100 fois plus faible que celle de l'E2 (Holinka and Gurpide, 1979). Après de nombreuses études *in vivo* révélant que comme l'E2, l'E4 active la prolifération utérine, la recherche sur cet œstrogène est abandonnée, considérant que l'E4 est un œstrogène faible, et que de plus il ne peut pas servir comme marqueur de bien-être fœtal en raison des fortes variations inter- et intra-individuelles des taux plasmatiques.

Cependant, il paraissait étrange qu'un œstrogène produit en si grande quantité par le foie, peu importe le sexe de l'embryon pendant la grossesse, n'ait pas un rôle physiologique significatif. En 2001, un projet pour l'étude des propriétés de l'E4 est lancé par la société pharmaceutique Pantharei Bioscience. Ils synthétisent l'E4, ce qui leur permet ensuite de réaliser de nombreuses études pharmacologiques. Ces études révèlent que la biodisponibilité de l'E4 est

élevée et que contrairement aux autres œstrogènes, il dispose d'une longue demi-vie (environ 28 heures) (Coelingh Bennink et al., 2008a; Visser and Coelingh Bennink, 2009).

- **Vers une utilisation en clinique de l'estérol**

Des études *in vivo* chez le rat ont montré que l'E4 possédait de nombreuses actions agonistes des œstrogènes puisqu'il était capable de prévenir de la déminéralisation osseuse, d'inhiber l'ovulation et de prévenir des bouffées de chaleurs (Coelingh Bennink et al., 2008a, 2008b; Holinka et al., 2008b). Il a également été montré chez le rat que l'E4 prévient du développement de tumeurs mammaires et permet la régression de tumeurs existantes de manière dose dépendante (Visser et al., 2012). Enfin des études *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines de cancers du sein ont montré que l'E4 agit comme un œstrogène faible et se comporte comme un antagoniste de l'E2 sur la prolifération des cellules (Gérard et al., 2015b, 2015a; Giretti et al., 2014).

Ainsi, toutes ces caractéristiques ont conduit à l'utilisation de cette molécule pour une application clinique comme THM. Il est actuellement en phase III d'essai clinique sous le nom de Donesta® par la société belge Mithra Pharmaceuticals. Il pourrait présenter l'avantage de limiter les effets secondaires des traitements hormonaux actuels à base de CEE ou d'E2 (cancer du sein, évènements thromboemboliques...).

Une étude à doses multiples réalisée chez des femmes ménopausées a en effet permis de montrer que l'E4, contrairement aux œstrogènes classiques, n'augmente pas les facteurs de la coagulation au niveau hépatique, suggérant un **risque thromboembolique moindre** (Mawet et al., 2015). Dans le même temps, cette étude a rapporté que l'E4 avait des effets œstrogéniques sur les tissus reproducteurs, sur les bouffées de chaleur et sur le renouvellement osseux (Coelingh Bennink et al., 2016, 2017).

Dans la seconde partie de mon stage, je me suis attachée à évaluer l'impact de cette molécule sur le plan vasculaire et métabolique.

OBJECTIFS DU PROJET

Ainsi, les résultats de la littérature proposent deux stratégies totalement différentes (voire opposées) pour améliorer le traitement hormonal de la ménopause :

1/ développer **des activateurs sélectifs du ER α membranaire** (EDC et PaPE) pour limiter l'action des œstrogènes sur l'utérus,

2/ développer **des activateurs sélectifs du ER α nucléaire** (E4) pour limiter le risque thromboembolique.

Dans ce contexte, et afin de progresser dans la compréhension des mécanismes d'action de ces molécules, le premier objectif de mon projet a été de **préciser les rôles respectifs des effets nucléaires et membranaires de ER α dans les effets athéroprotecteurs.**

Pour cela deux approches ont été utilisées :

1. La première en utilisant le modèle de souris **génétiquement modifiées** pour l'adressage membranaire de ER α (ER α -C451A) croisé au modèle de souris athérosclérotiques LDLr^{-/-}.
2. Cette approche génétique a été couplée à **une approche pharmacologique** en utilisant des agonistes sélectifs de chacune des deux voies d'activation du ER α : l'EDC et le PaPE-1 pour l'activation sélective membranaire, et l'E4 pour l'activation sélective nucléaire.

Dans chacun de ces modèles, les lésions d'athérome ont été évaluées au sinus aortique après 12 semaines de régime enrichi en cholestérol. Différents paramètres et notamment les taux de cholestérol plasmatique ont été mesurés dans ces expériences. Ce premier travail nous a permis de conclure que les effets membranaires n'étaient ni nécessaires ni suffisants pour induire une athéroprotection en réponse à l'E2.

Dans la suite de mon projet, je me suis recentrée sur les effets nucléaires et plus particulièrement sur l'E4 puisque 1) cet agoniste agit uniquement sur les voies nucléaires du ER α et 2) il présente un intérêt clinique comme nouveau traitement de la ménopause.

Comme décrit dans l'introduction, la ménopause s'accompagne de troubles métaboliques. Le second objectif de cette étude a donc été **d'évaluer les effets de l'E4 dans un contexte**

d'obésité (prise de poids, composition corporelle) et des pathologies qui lui sont associées (intolérance au glucose, stéatose hépatique, athérosclérose).

Pour cela, les souris femelles LDLr^{-/-} ovariectomisées ont reçu un régime obésogène de type Western Diet (42% de gras et 0,2% de cholestérol) et différents paramètres métaboliques et vasculaires ont été mesurés. Le rôle du ER α hépatique dans les effets de l'E4 a été évalué à l'aide de souris sélectivement déficientes pour le ER α dans les hépatocytes (système Cre/lox).

MATERIELS ET METHODES

I. Modèles de souris transgéniques

Tous les animaux utilisés sont maintenus sur portoir ventilé dans une animalerie conventionnelle. Les souris femelles sont hébergées dans des cages de 5 animaux, dans un environnement à température contrôlée et avec un cycle jour-nuit de 12h. Les expériences ont été menées conformément aux directives européennes concernant l'expérimentation animale et validées par les comités d'éthique au niveau local et national.

Les souris femelles invalidées pour le ER α membranaire (ER α -C451A) (Adlanmerini et al., 2014) générées par la clinique de la souris (Strasbourg, France), ont été croisées avec le modèle de souris athéromateuses LDLr^{-/-} obtenues de Charles Rivers (L'Arbresle, France).

Les souris femelles déficientes pour le ER α hépatocytaire (*Liver ER α Knock Out*, LERKO) (Guillaume et al., 2019) ont également été croisées avec le modèle de souris athéromateuses LDLr^{-/-}.

Toutes les souris sont sous fond génétique C57BL/6J et les souris génétiquement modifiées sont systématiquement comparées à leur contrôle sauvage (littermate).

II. Chirurgies sur les souris

II.1 Ovariectomie bilatérale

A l'âge de 4 semaines (avant la maturité sexuelle), les femelles préalablement anesthésiées par une injection intrapéritonéale (IP) d'un mélange de Zoletil (25 mg/kg) / Xylazine (5 mg/kg), subissent une ovariectomie bilatérale afin de s'affranchir de la production d'œstrogènes endogènes par les ovaires (**Figure 21**). Pour cela, deux incisions sur les flancs droit et gauche de la souris sont réalisées, après ouverture du péritoine, l'ovaire est enlevé grâce à un stylo à cautériser. Le péritoine et la peau sont recousus grâce à du fil chirurgical (Optime 4/0, Peters Surgical).

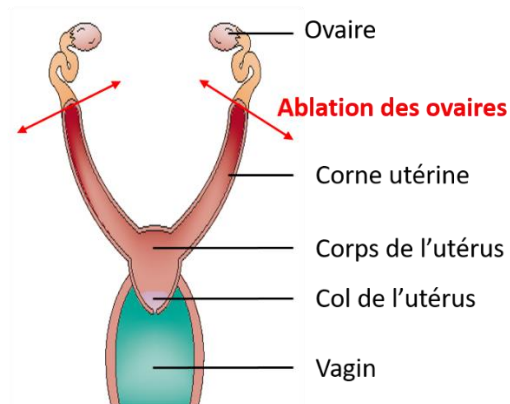


Figure 21 : Physiologie de l'appareil reproducteur chez la souris femelle, adaptée de (Kobayashi and Behringer, 2003)

II.2 Implantation des capsules ou mini-pompes délivrant les traitements hormonaux (composés oestrogéniques)

Après deux semaines de rémission (soit à 6 semaines de vie), les animaux sont nourris avec un régime athérogène (1,25% cholestérol, U8959 Version 0022, Safe) ou obésogène et athérogène (42% gras, 0,2% cholestérol, PF4347, Envigo). De manière concomitante, les souris sont traitées avec des composés oestrogéniques pendant 9 ou 12 semaines.

Afin de délivrer les composés oestrogéniques de manière continue, les souris sont préalablement anesthésiées par un mélange d'O₂/isoflurane et implantées d'une capsule ou d'une mini pompe osmotique en sous-cutané, au niveau dorsal. L'opération est renouvelée toutes les 3 ou 4 semaines pour garantir le maintien de la délivrance des différents composés.

L'E2 (80 µg/kg/j) ou son contrôle véhicule (*Innovativ Research of America*, Sarasota, FL) sont délivrés par capsule délivrant de manière chronique pendant 4 semaines.

Le PaPE-1 (8,5 mg dans 20 mg de cholestérol) et son contrôle véhicule (20 mg de cholestérol) sont également délivrés par capsules délivrant de manière chronique pendant 4 semaines (fournies par l'équipe du Pr. John Katzenellenbogen, USA).

L'EDC (240 µg/kg/j) et son contrôle (dendrimère) (fournis par l'équipe du Pr. John Katzenellenbogen, USA) sont délivrés par mini pompes osmotiques (Alzet, modèle 2004) délivrant de manière chronique pendant 4 semaines. Préalablement à l'implantation chez la souris, les mini pompes sont incubées 12h dans du PBS à 37°C.

Concernant le traitement à l'E4, fourni par la société Mithra, nous avons mis au point des capsules délivrant de manière chronique. En effet, celles-ci ne sont pas commercialisées. Pour cela, l'E4 (Mithra) et du cholestérol (C3045 Sigma-Aldrich) ont été soigneusement mélangés sous forme de poudre et compactés dans un moule pour obtenir des capsules (20 mg total avec un ratio 1/20 E4/Cholestérol) délivrant de manière chronique pendant 3 semaines (**Figure 22**).

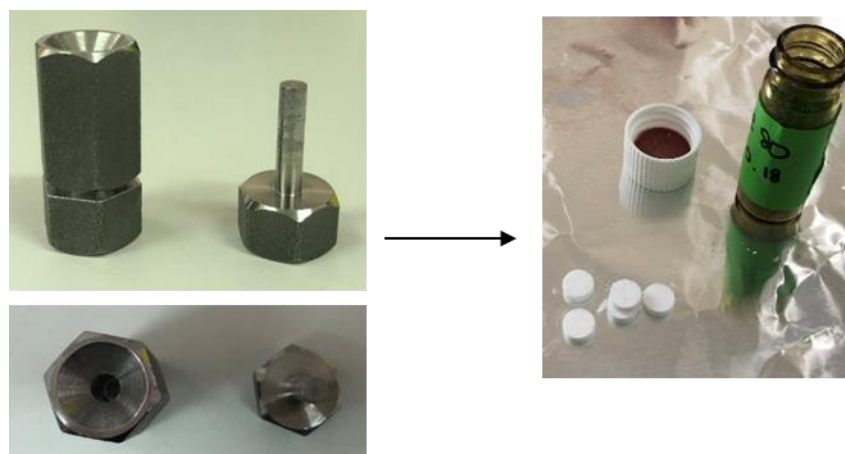


Figure 22 : Méthode de compaction permettant de fabriquer des capsules d'E4

III. Analyse des paramètres métaboliques chez la souris

III.1 Prise pondérale

Les souris ont été pesées de manière hebdomadaire afin d'évaluer leur prise de poids. Cette opération est réalisée toujours à la même heure et le même jour de la semaine.

III.2 Test de tolérance au glucose : IPGTT

Le test de tolérance au glucose (*Intraperitoneal glucose tolerance test*, IPGTT) est réalisé après 12h de jeûne. La glycémie (concentration en glucose dans le sang) est mesurée à l'aide d'un glucomètre (AccuCheck Performa, Roche) sur une goutte de sang prélevée après amputation de l'extrémité de la queue (0,1 mm). Une injection de 1 g/kg de glucose en IP est réalisée et la glycémie est mesurée à différents temps : avant l'injection à -30 et 0 min, puis 30, 60 et 90 min après l'injection.

IV. Dosages sériques

IV.1 Dosage d'Estérol

Dix microlitres de sang de souris préalablement anesthésiées par un mélange de Zoletil (25mg/kg) / Xylasine (5mg/kg) ont été récupérés sur des *Volumetric Absorptive Microsampling* VAMS (Neoteryx). Les VAMS imbibés sont séchés 2h à température ambiante puis stockés dans une boîte étanche d'humidité à -80°C. Les dosages sont réalisés par le laboratoire d'analyse des médicaments à l'université de Liège. L'extraction est effectuée en utilisant 200 µL de méthanol contenant 2,5 ng/mL d'un standard interne. Les VAMS sont incubés 5 minutes dans le solvant sans agitation puis 5 minutes avec agitation. L'extrait est ensuite placé sur une plaque d'élimination des phospholipides (Ostro TM) puis séché sous vide à 50°C pendant 1 heure. Il est alors reconstitué dans 50 µL de H₂O/méthanol (95/5, v/v) puis séparé par chromatographie UHPLC (chromatographie en phase liquide à ultra haute performance) grâce avec un système 1290 Infinity (Agilent Technologies). La détection se fait par spectrophotométrie de masse en tandem (MS/MS) avec une technologie iFunnel (Agilent Technologies).

IV.2 Dosage des lipides plasmatiques

Le sang de souris est prélevé au niveau du plexus retro-orbital (sur souris anesthésiées) et le sérum des souris est récupéré après centrifugation (13000 rpm à 4°C pendant 15 min). Tous les dosages sont réalisés par la plateforme d'Exploration Fonctionnelle (I2MC, Toulouse). Le cholestérol total plasmatique est calculé à partir de 3 µL de sérum de façon colorimétrique à l'aide du kit cholestérol oxydase (kit CHOD-PAP, Horiba ABX). Les fractions HDL et LDL sont isolées à partir de 2,4 µL de sérum et analysées en utilisant respectivement les méthodes ABX Pentra HDL Direct CP et ABX Pentra LDL Direct CP (ABX Pentra, Horiba, Montpellier, France). Les triglycérides plasmatiques sont analysés à partir de 3 µL de sérum en utilisant le kit ABX Pentra Triglycerides CP (ABX Pentra, Horiba, Montpellier, France).

V. Analyses histo-pathologiques

V.1 Analyse des plaques d'athérome au sinus aortique

A la fin du protocole, les animaux reçoivent une dose d'anesthésique Zoletil (25 mg/kg) / Xylasine (5 mg/kg). Le cœur des animaux est prélevé puis inclus en OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*, Cell-Path). Cent coupes sériées de 10 µm d'épaisseur sont réalisées, à

l'aide d'un cryostat, à partir du sommet du ventricule gauche, lors de l'apparition de la première valve aortique, jusqu'à l'aorte descendante où les valves aortiques disparaissent (**Figure 23**).

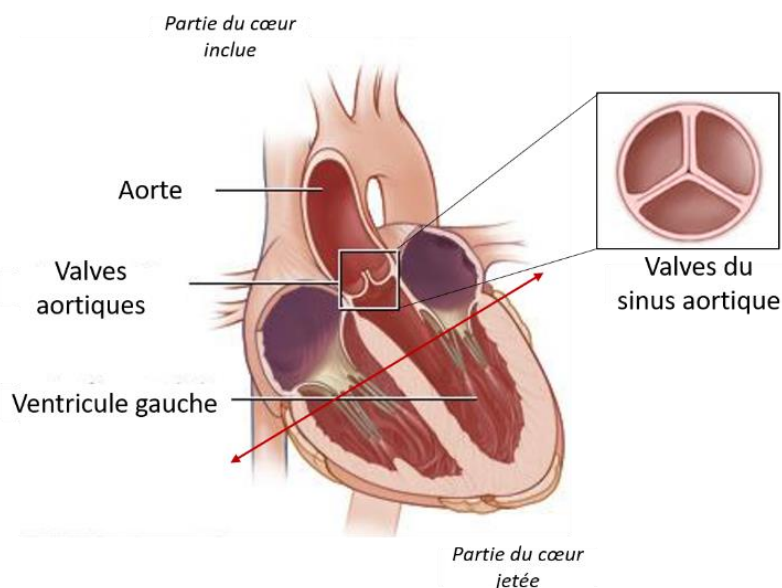


Figure 23 : Représentation schématique des valves du sinus aortique, adaptée de www.umcvc.org

Les coupes sont ensuite colorées à l'huile rouge avec une contre-coloration à l'hématoxyline de Mayer. Pour cela, elles sont placées 10 min dans une solution d'huile rouge préalablement filtrée (Oil Red O, Sigma, 1g dans 200 mL d'isopropanol et 133 mL d'H₂O) et 1 minute dans un bain d'hématoxyline de Mayer (Sigma). Après rinçage, les lames sont recouvertes d'un milieu de montage glycérol/gélatine (Kaiser's glycerol gelatine, Millipore) et d'une lamelle.

Cinq coupes sont retenues pour l'évaluation morphométrique des lésions à l'aide du logiciel Leica Application Suite. La taille moyenne des lésions dans ces cinq coupes permet d'estimer l'étendue des lésions d'athérome chez chaque animal (Elhage et al., 1997a).

V.2 Histologie du tissu adipeux périgonadique

Après prélèvement du tissu adipeux lors de l'euthanasie, un fragment d'environ 100 mg de celui-ci est placé dans une cassette histologique puis fixé dans du paraformaldéhyde 4% (Electron Microscopy Sciences) pendant 24h. Il est ensuite inclus en paraffine et des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome, puis colorées à l'hématoxyline/éosine (H/E). Les lames déparaffinées et hydratées sont immergées dans un bain d'Hématoxyline de Mayer (Sigma) pendant 30 min puis, après rinçage, trempées 30 sec dans une solution d'éosine (Sigma).

Après trois bains de 5 min dans de l'éthanol 100% (Sigma), les lames sont immergées 5 min dans l'Histoclear (Euromedex) et montées sous lamelle. Les images sont capturées avec une caméra vidéo Nikon Coolpix 4500 et la taille moyenne des adipocytes est calculée à l'aide du logiciel ImageJ.

V.3 Analyse de la stéatose hépatique

V.3.1 Analyse des lipides neutres hépatiques

Les dosages des lipides neutres (triglycérides et cholestérol ester) intra-hépatiques ont été réalisés sur le plateau technique de lipidomique (Plateau MetaToul, I2MC, Toulouse) à partir de 50 mg de foie broyé au FastPrep dans des tubes Lysing Matrix D (MP) avec 1 mL de solution méthanol / 5mM EGTA (2 :1, v/v). Les lipides ont ensuite été extraits selon la méthode Bligh & Dyer à partir d'un volume correspondant à 2 mg de tissu dans un mélange de chloroforme/méthanol/eau (2,5 : 2,5 : 2, v/v/v) en présence des standards internes de lipides de synthèse suivants : 4 µg de cholesteryl heptadecanoate (Cholestérol ester C19, standard interne des esters de cholestérol, Sigma) et 12 µg de glyceryltrionadecanoate (TG 19, standard interne des triglycérides, Sigma) permettant une quantification relative. Après ajout de 2,5 mL de méthanol, 2,5 mL de chloroforme et 2,5 mL d'H₂O, la solution est centrifugée (6 min à 2500 rpm) puis la phase inférieure, correspondant à la phase organique est prélevée et évaporée sous flux d'azote. Les lipides neutres sont ensuite repris dans 50 µL d'acétate d'éthyl, puis séparés et analysés par chromatographie en phase gazeuse dans un système Focus Thermo Electron équipé d'une colonne capillaire Zebron-1 Phenomenex.

V.3.2 Analyse histologique du foie pour évaluation de la stéatose hépatique

Coloration Hématoxyline/Eosine (H/E)

Après prélèvement du foie lors de l'euthanasie, un quart du grand lobe du foie est prélevé et placé dans une cassette histologique puis fixé dans du paraformaldéhyde 4% (Electron Microscopy Sciences) pendant 24h. Il est ensuite inclus en paraffine et des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome puis colorées à l'hématoxyline/éosine (H/E). Le protocole de coloration est le même que celui décrit pour le tissu périgonadique dans la partie V.2.

Coloration à l'Huile rouge

Un quart de lobe est inclus dans un moule (Tissue-Tek Cryomold 4565, Sakura) rempli d'OCT et immergé dans de l'isopentane (Cell-Path) refroidi dans de l'azote liquide. Des coupes de 4 μm sont réalisées à l'aide d'un cryostat puis colorées à l'huile rouge (Sigma) et contre colorées à l'hématoxyline de Mayer. Le protocole de coloration est le même que celui décrit dans la partie V.1 pour les sinus aortiques.

Les lames sont ensuite scannées (Hamamatsu, NanoZoomer) et visualisées à l'aide du logiciel NDPView 1.2.

VI. Analyse de la quantité en ARNm par RT-qPCR

VI.1 Extraction d'ARNm

Les ARN totaux sont extraits à partir d'aorte entière ou de 50 mg de foie (lobe inférieur gauche). Les échantillons tissulaires (aorte et foie) sont broyés à l'aide du Precellys 24 Lysis and Homogeniser (Bertin Technologies ®) dans des tubes Lysing Matrix D (MP) contenant 500 μL de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Après ajout de 100 μL de chloroforme, les échantillons sont agités 2 fois 15 secondes puis centrifugés 15 min à 4°C à 13000 rpm. La phase supérieure (contenant les ARN) est récupérée dans le même volume d'éthanol 70%. Les ARN totaux sont extraits grâce au kit GenElute Total Mammalian RNA (Sigma). Ils sont ensuite dosés au NanoDrop afin d'estimer leur concentration (absorbance à 260 nm) et leur pureté déterminée par la valeur des ratios des absorbances mesurées à 230 et 280 nm (les ratios 260/230 nm et 260/280 nm permettent d'évaluer respectivement la présence résiduelle de solvants et la contamination éventuelle par des protéines).

VI.2 Rétro-transcription des ARNm en ADN complémentaires (ADNc)

La transcription reverse s'effectue à partir de 500 ng d'ARN pour l'aorte et 1000 ng par le foie. Cette réaction enzymatique est réalisée à l'aide d'un kit (High Capacity DNA reverse transcriptase, Applied Biosystems) contenant un tampon, des amorces aléatoires, des désoxyribonucléotides (dNTPs) et l'enzyme reverse transcriptase (MultiScribe ®). La réaction s'effectue pendant 10min à 25°C et 2h à 37°C dans 20 μL final.

VI.3 Quantification de l'expression relative des ARNm par qPCR

Les ADNc dilués au $1/5^{\text{ème}}$ pour l'aorte et au $1/10^{\text{ème}}$ pour le foie sont analysés par PCR quantitative à l'aide du SsoFast EvaGreen ® Supermix (Biorad) (contenant la polymérase (SSo7d fusion), les dNTPs, et l'intercalant de base fluorescent (EvaGreen Dye)) et d'amorces ciblant les

transcrits d'intérêt (**Tableau 1**). Les réactions de qPCR ont été réalisées sur un appareil StepOne + (Applied Biosystems).

Gènes	Amorce Sens	Amorce AntiSens
<i>ERα</i>	CTGTCGGCTGCGCAAGTGTT	AACATTCTCCCTCCTCGGCGGT
<i>TPT1</i>	TTGGATCTATCACCTGTCAACCA	TTTGTCTAAAGTCTGGTGTGTG
<i>VCAM-1</i>	AAGAGAACCCAGGTGGAGGTCT	GTGACAGGTCTCCCATGCACA
<i>MCP1</i>	TCTCTTCCCTCCACCACCATGC	GGGCGTTAACTGCATCTGGCT
<i>Adiponectin</i>	CGTGATGGCAGAGATGGCACT	GGCCCTTCAGTCTCTGTCTATT
<i>ICAM-1</i>	CTTCCGCTACCATCACCGTGT	AGGTCCTTGCTACTTGTCTGC
<i>MIP1α</i>	ATGGAGCTGACACCCCGACT	AGTCAGGAAAATGACACCT
<i>IL1β</i>	TGAAGAAGAGCCATCCTCTGT	GCAGGTTATCATCATCATCCCA
<i>CD68</i>	GCTGTTACCTTGACCTGCTCT	CGGTTGCAAGAGAAACATGGCC
<i>PPIA</i>	GAATGGCTGGATGGCAAG	CCACAGTCGGAAATGGTGAT

Tableau 1 : Séquences des amorces

Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel Primer Blast et synthétisées par Sigma. Leur efficacité (comprise entre 95 et 105%) a été vérifiée grâce au logiciel LinReg. Les résultats sont normalisés par rapport aux gènes de ménage (*Tumor Protein, Translationally-Controlled 1 : TPT1* pour l'aorte et *Peptidylprolyl Isomerase A : PPIA* pour le foie) puis par rapport au groupe contrôle. Ils sont représentés comme ratio d'expression relative ($2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct \text{ Gène d'intérêt} - Ct \text{ Gène de ménage}$).

VII. Analyses statistiques

Toutes les statistiques et les graphiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6TM. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (*Standard Error of the Mean*).

Pour tester l'effet des traitements une ANOVA (*Analysis of variance*) à 1 facteur a été réalisée. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Afin de tester le rôle respectif d'un traitement et du génotype, un test ANOVA à 2 facteurs a été réalisé. Quand une interaction est observée entre deux facteurs (p < 0.05), l'effet du traitement a été étudié pour chaque génotype à l'aide d'un test post test Fischer LSD (*Least Significant Difference*).

RESULTATS

Il est maintenant bien établi que les œstrogènes, et notamment l'E2, possèdent des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire : accélération de la cicatrisation endothéliale, prévention de l'hyperplasie néo-intimale, augmentation de la production de NO et prévention de l'athérosclérose (Billon-Galés et al., 2009; Brouchet et al., 2001; Smirnova et al., 2015). Tous ces effets sont relayés par le récepteur ER α qui peut agir soit dans le noyau (action nucléaire), soit à la membrane (action membranaire). L'activation sélective du ER α membranaire a été proposée comme une stratégie d'amélioration du traitement hormonal de la ménopause (THM).

Dans ce contexte, la première partie de mon projet a été d'étudier le découplage des deux voies d'activation du ER α (nucléaire et membranaire) dans la prévention de l'athérosclérose grâce à une approche de souris génétiquement modifiées et une approche pharmacologique avec des activateurs sélectifs pour le ER α membranaire ou nucléaire.

I. Découplage des effets membranaires et nucléaires du ER α dans la prévention de l'athérosclérose

I.1 Approche génétique

Pour définir le rôle du ER α membranaire sur la prévention de l'athérome, nous avons utilisé le modèle de souris génétiquement modifiées pour la perte de fonction du ER α membranaire (ER α -C451A) croisées au modèle de souris athérosclérotiques LDLr^{-/-}. La perte de localisation du ER α membranaire et des voies d'activation qui lui sont spécifiques dans les souris ER α -C451A ont été validés dans des études préalables au laboratoire (Adlanmerini et al., 2014).

Les souris femelles ER α -C451A LDLr^{-/-} et leurs contrôles ER α -WT LDLr^{-/-} issues de ces croisements ont été ovariectomisées à l'âge de 4 semaines pour s'affranchir de la production d'œstrogènes endogènes. Après deux semaines de rémission, une administration d'E2 exogène (ou d'un contrôle véhicule) a été réalisée à l'aide de capsules à libération prolongée, implantées en sous-cutané pendant 12 semaines. De manière concomitante, les souris ont été nourries avec un régime athérogène (1,25% de cholestérol). A 18 semaines d'âge, les animaux ont été mis à mort après un jeûne sur la nuit et différents tissus ont été collectés (**Figure 24A**). L'imprégnation œstrogénique des souris a été validée en pesant les *uteri*. Comme attendu, l'ovariectomie des souris s'est traduite par une atrophie de l'utérus (avec un poids de tissu inférieur à 10 mg) alors

que l'ajout d'E2 s'est accompagné d'une augmentation significative du poids de l'utérus. Cette hypertrophie utérine est observée de manière équivalente dans les 2 génotypes de souris (ER α -WT LDLr^{-/-} et ER α -C451A LDLr^{-/-}) comme en atteste l'absence d'interaction, révélée par le test ANOVA à 2 facteurs (**Figures 24B et 24C**). Ce résultat témoigne de l'absence d'impact de la mutation ER α -C451A sur l'imprégnation utérine en réponse à l'E2 comme déjà établi dans les études précédentes (Adlanmerini et al., 2014).

Pour analyser le développement des plaques d'athérome chez ces souris, des coupes de cœur ont été réalisées au sinus aortique, et l'accumulation des lipides a été quantifiée après marquage à l'huile rouge. Comme attendu, nous avons observé une diminution significative des plaques d'athérome chez les souris contrôles ER α -WT LDLr^{-/-} ayant reçu un traitement à l'E2 comparées aux souris contrôles. Un effet protecteur de l'E2 a été observé de façon similaire chez les souris ER α -C451A LDLr^{-/-} (**Figure 24D et 24E**). De façon cohérente, nous avons observé une diminution de l'expression de gènes marqueurs d'adhésion endothéliale et de l'inflammation (*VCAM-1* et *MCPI*) chez les souris sous E2 et indépendamment du génotype des souris (ER α -WT LDLr^{-/-} et ER α -C451A LDLr^{-/-}) (**Figure 24F**). L'analyse du cholestérol total plasmatique montre un effet hypolipémiant de l'E2 dans les deux génotypes de souris également (**Figure 24G**).

L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que le **ER α membranaire n'est pas nécessaire pour la prévention de l'athérosclérose au niveau du sinus aortique en réponse à l'E2.**

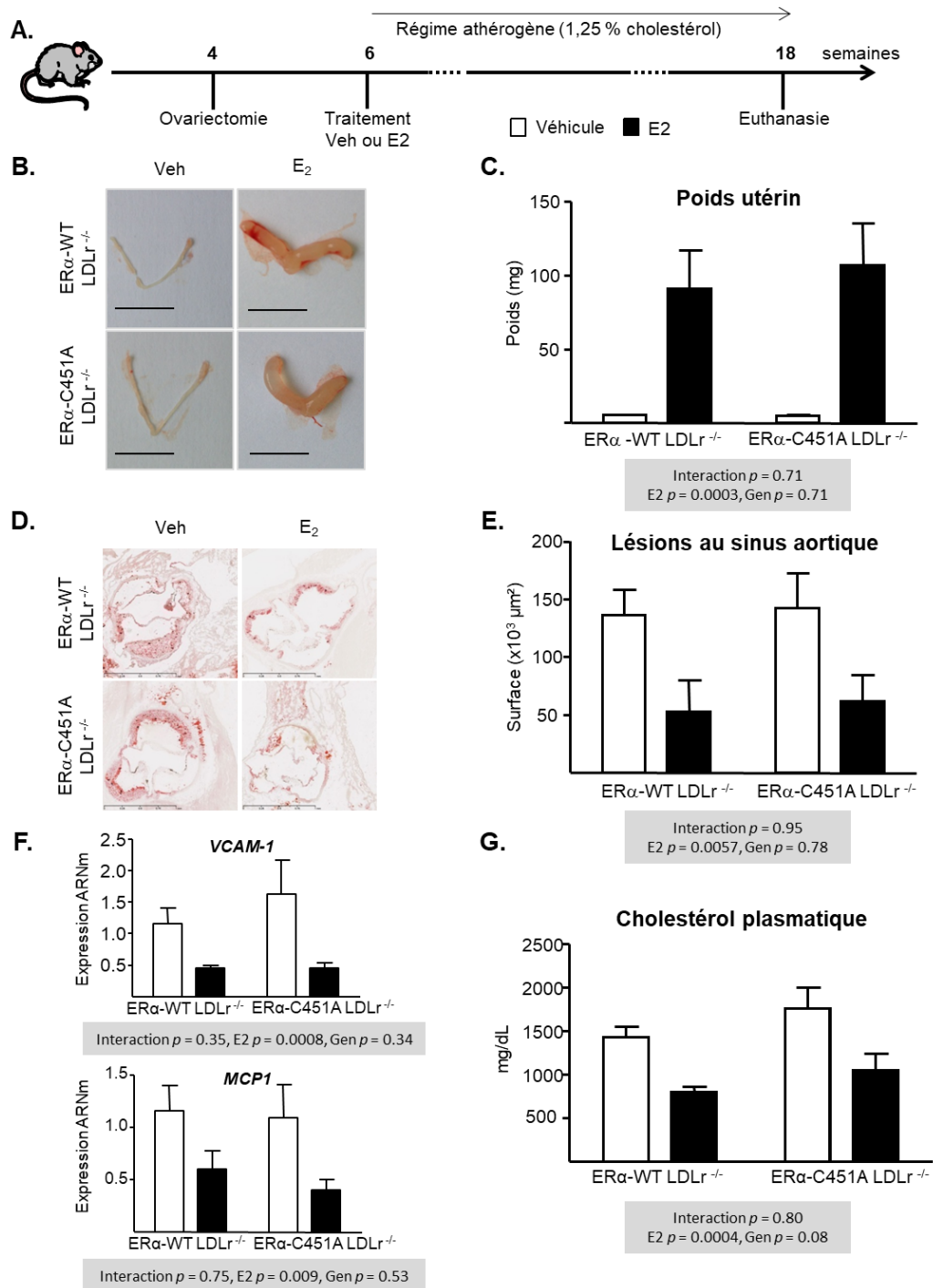


Figure 24 : Le ER α membranaire n'est pas nécessaire pour la prévention des lésions athérosclérotiques au niveau du sinus aortique en réponse à l'E2.

Les souris ER α -WT LDLr^{-/-} et ER α -C451A LDLr^{-/-}, ovariectomisées à l'âge de 4 semaines, ont reçu des capsules délivrant soit un véhicule (Veh) soit de l'E2, et ont été placées sous régime athérogène de 6 à 18 semaines (A). Photos représentatives (B) et poids des utéri (C). Photos représentatives (D) et quantification des lésions au sinus aortique (E). Niveau d'expression des ARNm de *VCAM-1* et *MCP1* dans l'aorte normalisé par le niveau d'expression de l'ARNm de *TPT1* (F). Taux de cholestérol plasmatique (G). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester l'effet du génotype et de l'E2, une ANOVA à 2 facteurs a été réalisée.

I.2 Approche pharmacologique

I.2.1 Activation sélective de la voie membranaire : EDC et PaPE-1

Pour compléter cette approche par invalidation de fonction, le développement des plaques d'athérome a été mesuré chez les souris femelles LDLr^{-/-} ovariectomisées, recevant un traitement pharmacologique avec des activateurs sélectifs de la voie membranaire (l'EDC et le PaPE-1). Des souris traitées à l'E2 ont été utilisées comme contrôle positif.

Comme publié par d'autres équipes (Chambliss et al., 2010; Madak-Erdogan et al., 2016), ces deux molécules n'induisent pas d'hypertrophie utérine contrairement à l'E2 (**Figure 25A et 25B**). La bonne délivrance du traitement a été vérifiée par l'induction de l'expression d'ARNm de l'adiponectine dans le foie (Madak-Erdogan et al., 2016) (**Figure 25C**). Le niveau de lésions au sinus aortique a été mesuré, et nos résultats montrent que ni l'EDC, ni le PaPE-1 ne diminuent le niveau de plaque d'athérome (**Figure 25E et 25F**). **Ces molécules ne sont pas capables d'induire une athéroprotection** au niveau du sinus aortique, contrairement à l'E2 qui, à une dose équivalente, diminue les lésions athérosclérotiques de 70%. De plus, alors qu'on retrouve comme attendu l'effet hypocholestérolémiant de l'E2, l'EDC et le PaPE-1 n'ont pas d'effet sur le taux de cholestérol plasmatique (**Figure 25D**). L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que l'activation du **ER α membranaire n'est pas suffisante pour induire une prévention de l'athérosclérose au niveau du sinus aortique en réponse à l'E2.**

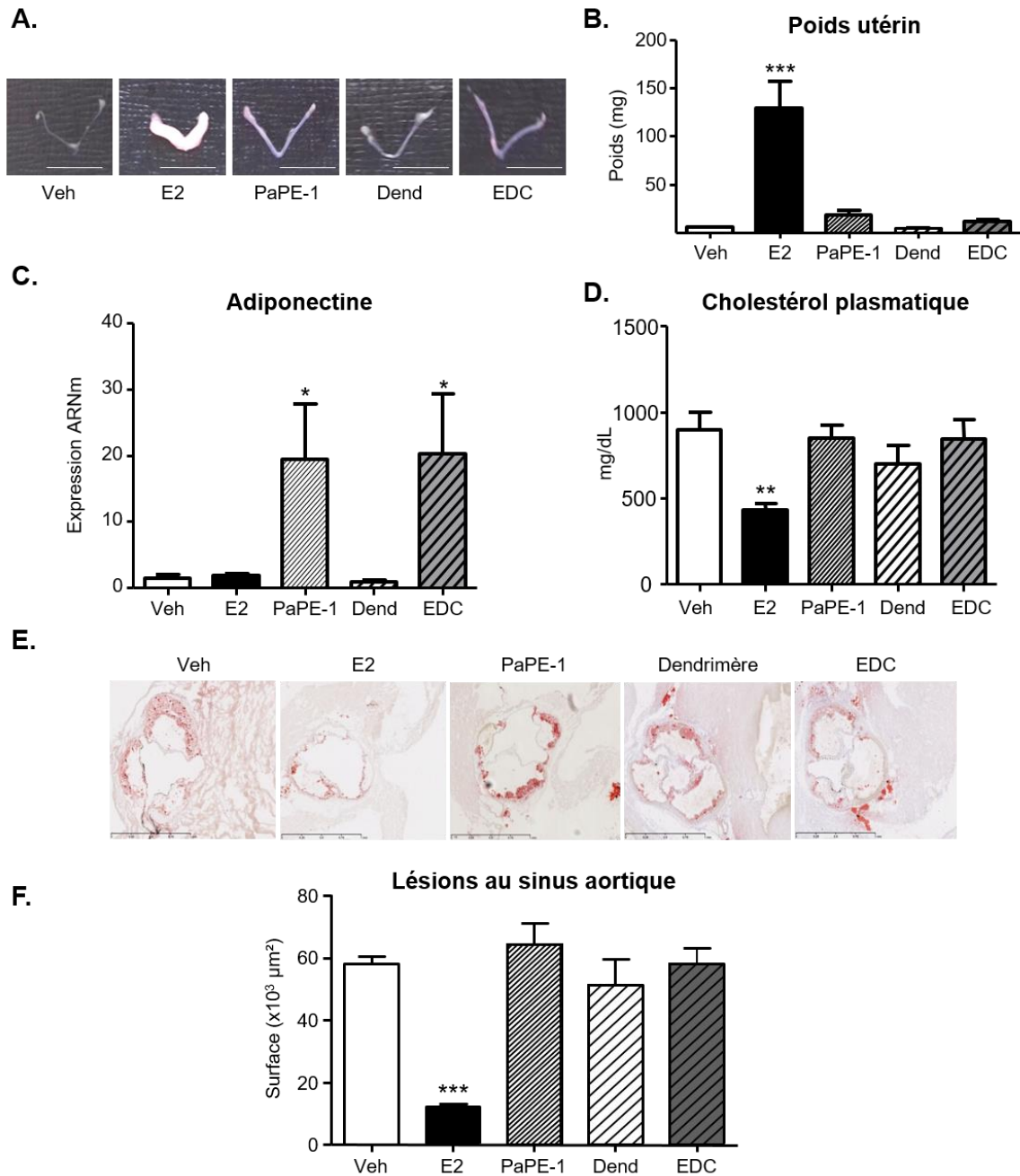


Figure 25 : Le ER α membranaire n'est pas suffisant pour la prévention des lésions d'athérome au niveau du sinus aortique.

Les souris LDLr^{-/-} ovariectomisées à l'âge de 4 semaines, ont reçu des capsules délivrant soit un véhicule (Veh), de l'E2 ou du PaPE-1, soit des mini pompes délivrant l'EDC ou son contrôle Dendrimère (Dend). Les souris ont été placées sous régime athérogène pendant 9 semaines. Photos représentatives des uteri (A) et poids des uteri (B). Niveau d'expression des ARNm de l'adiponectine dans le foie normalisé par le niveau d'expression des ARNm de *PPIA* (C). Taux de cholestérol plasmatique total (D). Photos représentatives des dépôts lipidiques au niveau du sinus aortique après coloration à l'huile rouge (E) et quantification des lésions au niveau du sinus aortique (F). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester l'effet des différents traitements, une ANOVA à un facteur a été réalisée (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le « *Journal of the American Heart Association* » en 2018, présenté en **Annexe 1** de ce manuscrit.

I.2.2 Activation sélective de la voie nucléaire : Estérol (E4)

L'activation du ER α membranaire ne semble pas impliqué dans l'athéroprotection des œstrogènes, notre intérêt s'est alors porté sur l'effet de l'estérol dans la prévention de l'athérome. En effet, ce dernier est un œstrogène naturel et endogène, capable d'activer sélectivement la voie nucléaire du récepteur aux œstrogènes.

Pour évaluer son impact dans la prévention de l'athérome, nous avons tout d'abord mis en place un processus permettant de délivrer l'E4, dans des capsules, de manière chronique. Le traitement chronique par l'E2 se fait grâce à des capsules commercialisées (Innovative Research), cependant il n'en existe pas pour l'E4. Nous avons précédemment validé ce processus et cette délivrance avec l'E2 (Fontaine et al., 2020) (**Annexe 2**).

- **Mise en place de capsules délivrant l'E4 de manière prolongée**

Afin de mettre en place les capsules, de la poudre de cholestérol et d'E4 ont été mélangées et compactées. Pour tester l'efficacité de ces capsules, des souris C57BL/6J ont été ovariectomisées à l'âge de 4 semaines et implantées 2 semaines plus tard d'une capsule d'E4 ou d'un véhicule en sous-cutané pendant 3 semaines. Une goutte de sang prélevé à la queue a été récupérée après 1, 2 et 3 semaines de traitement afin de doser l'E4 circulant. Grâce à une collaboration avec le laboratoire d'analyse du médicament à Liège, les résultats des dosages ont permis de montrer que les capsules d'E4 délivraient 5 ng/mL après 3 semaines de traitement (**Figure 26A**). A la fin du protocole, l'utérus a été pesé afin de vérifier la bonne imprégnation œstrogénique (**Figure 26B**).

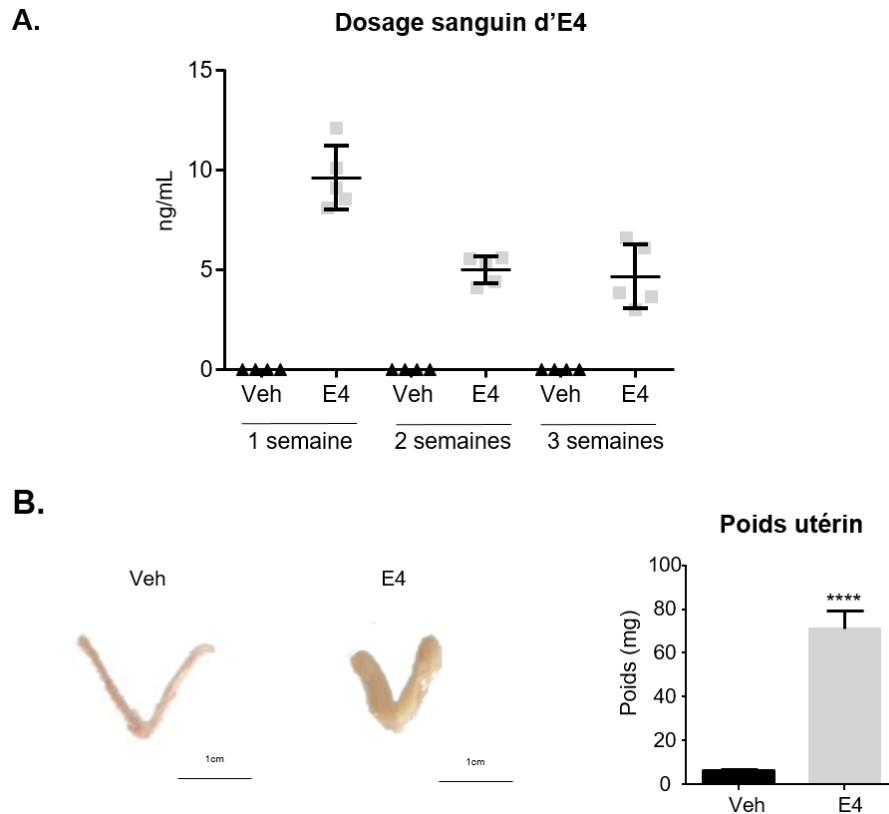


Figure 26 : Dosage sanguin de l'E4

La concentration d'estérol dans le sang a été calculée après 1, 2 et 3 semaines de traitement (**A**). Le poids utérin a été mesuré à la fin des 3 semaines de protocole (**B**). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester l'effet de l'E4, un t-test a été réalisé (***) $p < 0.001$.

- **Effet de l'E4 sur la protection contre l'athérosclérose**

L'effet de l'E4 dans la prévention athéromateuse a été étudié grâce à ces nouvelles capsules dans le modèle de souris femelles LDLr^{-/-} ovariectomisées et recevant un régime athérogène (1,25 % cholestérol) pendant 12 semaines, comme précédemment décrit pour l'E2.

L'analyse des lésions d'athérome au sinus aortique à la fin du protocole a permis de montrer une nette diminution des lésions (**Figure 27A**) chez les souris traitées par l'E4 comparées à leur contrôle. La mesure de la quantité de cholestérol plasmatique a permis de montrer que, comme l'E2 et à l'inverse de l'EDC et du PaPE-1, l'E4 avait un effet hypocholestérolémiant dans ces conditions (**Figure 27B**). L'expression génique dans l'aorte de VCAM-1, marqueur d'adhésion des cellules immunitaires, a montré une diminution dans les souris traitées à l'E4 (**Figure 27C**).

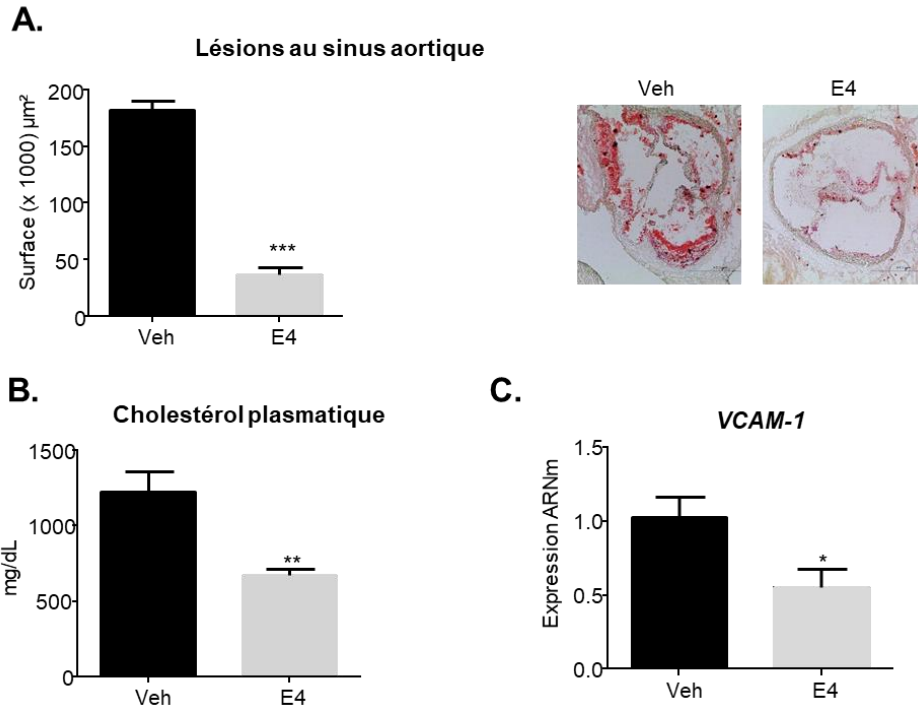


Figure 27 : L'E4 est capable d'induire une athéroprotection

Les souris LDLr^{-/-} ovariectomisées à l'âge de 4 semaines, ont reçu des capsules délivrant soit un véhicule (Veh) soit de l'E4, et ont été placées sous régime athérogène pendant 9 semaines. Photos représentatives et quantification des lésions d'athérome au sinus aortique (A). Taux de cholestérol plasmatique total (B). Niveau d'expression des ARNm de *VCAM-1* dans l'aorte normalisé par le niveau d'expression des ARNm de *TPT1* (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester l'effet de l'E4, un t-test a été réalisé (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Ces résultats ont donc permis de montrer que contrairement à l'EDC et au PaPE-1, l'E4 était capable de prévenir des dépôts d'athérome au sinus aortique.

II. Etude des effets de l'E4 dans un contexte de désordre métabolique

Outres les effets délétères sur le système cardiovasculaire, la ménopause s'accompagne également d'une augmentation des troubles métaboliques. Comme l'ont montré de nombreuses études épidémiologiques et cliniques dont l'étude WHI, les œstrogènes et notamment l'E2 préviennent de ces effets délétères (Salpeter et al., 2006).

La suite de mon projet s'est donc portée sur l'effet de l'E4 sur les complications métaboliques dans un contexte d'obésité. Pour répondre à cette question, les souris LDLr^{-/-} ovariectomisées ont été traitées avec des capsules d'E4 ou d'un véhicule (Veh) et nourries avec un régime obésogène de type « Western Diet » (0,2% de cholestérol et 42 % de gras) pendant 9 semaines (Figure 28A).

II.1 Obésité et intolérance au glucose

Afin d'évaluer l'impact de l'E4 sur la prise de poids dans un contexte d'obésité, les souris ont été pesées de manière hebdomadaire pendant les neuf semaines de protocole. Ce suivi de poids a révélé que l'E4 protège de l'obésité induite par le régime obésogène dès les premières semaines de régime (**Figure 28B**). A la fin de l'expérience, les souris traitées par l'E4 avaient pris beaucoup moins de poids que les souris contrôles. Cette diminution du poids total de la souris est accompagnée d'une diminution de la quantité des tissus adipeux avec moins de tissus adipeux sous cutanés (SC), périgonadiques (PG) et mésentériques (Mes) (**Figure 28C**). De façon cohérente, les marquages hématoxyline/éosine du tissu adipeux périgonadique ont montré une diminution significative de l'aire moyenne des adipocytes chez les souris traitées par l'E4 (**Figure 28D**). Afin d'évaluer l'impact de l'E4 sur la régulation de la glycémie, un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale a été réalisé. Nous avons observé que l'E4 prévient également de l'intolérance au glucose induite par le régime obésogène (**Figure 28E**).

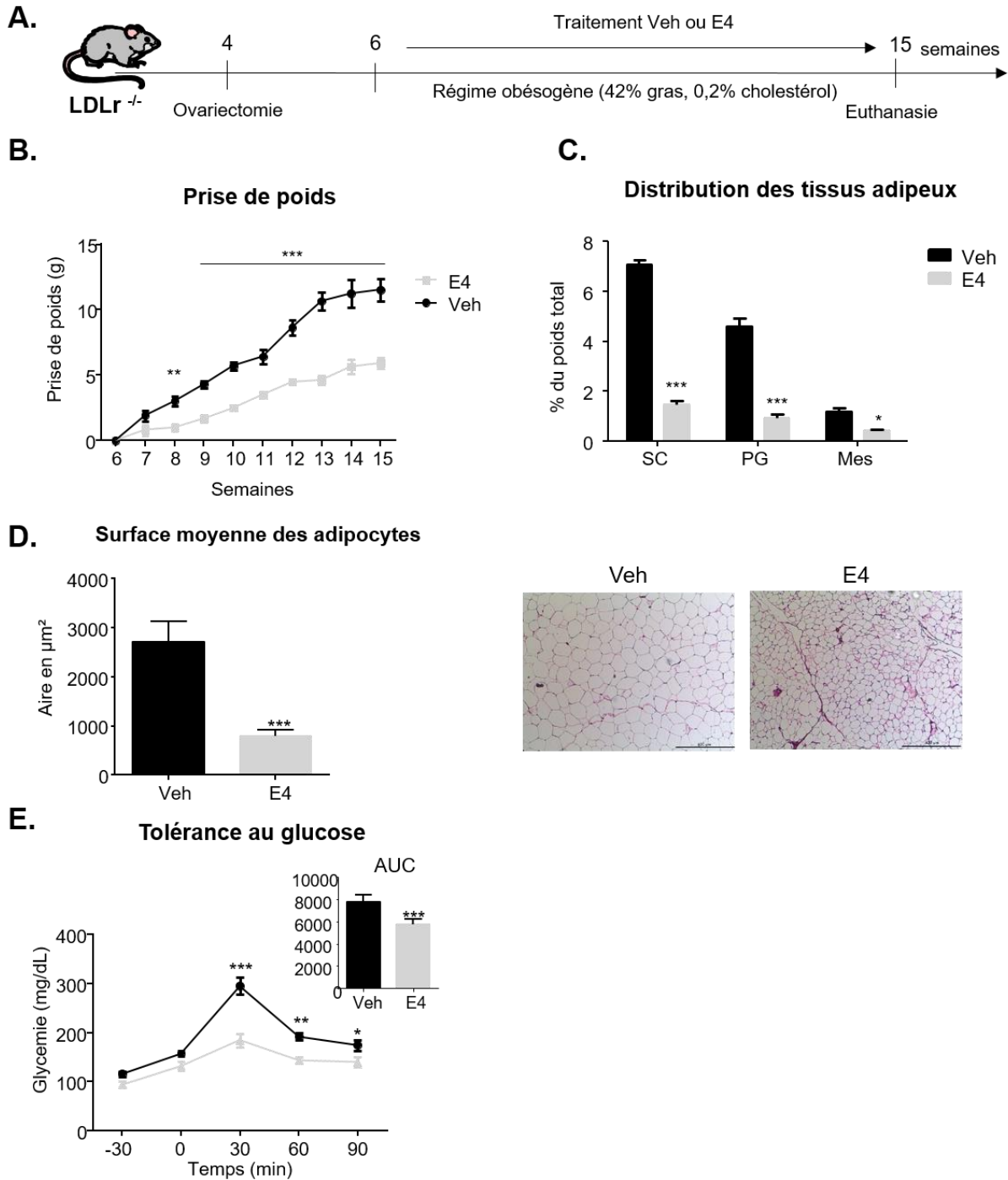


Figure 28 : L'estroène prévient de la prise de poids et de l'intolérance au glucose

Les souris LDLr^{-/-}, ovariectomisées à l'âge de 4 semaines ont été traitées avec de l'E4 ou un véhicule (Veh) et nourries avec un régime obésogène pendant 9 semaines (A). Prise de poids hebdomadaire (B). Distribution des tissus adipeux, SC : sous cutané, PG : périgonadique, Mes : mésentérique à la fin de l'expérience (C). Surface moyenne des adipocytes du tissu adipeux périgonadique et images représentatives d'une coupe de tissus adipeux colorée à l'hématoxyline/éosine (D). Test de tolérance au glucose en intrapéritonéal (E). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Pour tester l'effet de l'E4, un t-test a été réalisé (*p<0.05, **p<0.01, ***p< 0.001).

II.2 Athérosclérose et stéatose hépatique

Nous avons également évalué l'effet de l'E4 sur l'athérosclérose dans ce contexte d'obésité sur ces souris LDLr^{-/-}. Les lésions au sinus aortique ont été évaluées et, comme observé en condition non obésogène (**Figure 27**), le traitement des souris par l'E4 conduit à une diminution des plaques d'athérome (**Figure 29A**). L'analyse de l'expression génique montre une diminution des marqueurs de l'activation endothéliale comme *ICAM-1* et *VCAM-1* dans l'aorte des souris traitées à l'E4 (**Figure 29B**). De plus, ce traitement diminue le niveau d'ARNm des cytokines inflammatoires comme l'interleukine 1 beta (*IL1β*), la protéine inflammatoire des macrophages 1 alpha (*Macrophage Inflammatory Protein 1-alpha, MIP1α*), et l'expression de marqueur des macrophages (*Cluster of Differentiation, CD68*).

L'estérol est donc capable d'**induire une athéroprotection dans un contexte d'obésité**.

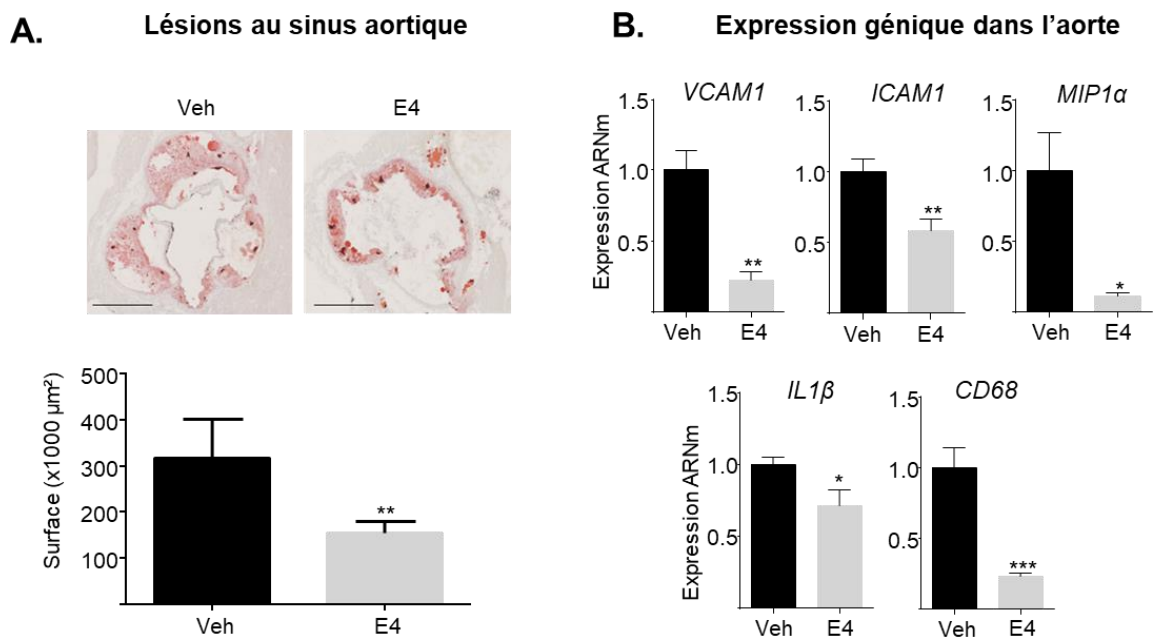


Figure 29 : L'estérol prévient de l'athérosclérose induite par un régime obésogène

Photos représentatives et quantification des dépôts lipidiques au niveau du sinus aortique après coloration à l'huile rouge (**A**). Niveau d'expression des ARNm de *VCAM-1*, *ICAM1*, *MIP1α*, *IL1β* et *CD68* dans l'aorte, normalisé par le niveau d'expression de l'ARNm de *TPT1* (**B**). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Pour tester l'effet de l'E4, un t-test a été réalisé (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Ces effets protecteurs sont également associés à une prévention de la stéatose hépatique. En effet, comme le montre les images histologiques de coupes de foie colorées à l'hématoxyline/éosine, on observe une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le foie des souris contrôles (Veh), alors que celles-ci sont absentes dans le foie des souris traitées à l'E4 (**Figure 30A**). En accord avec ces résultats histologiques, l'analyse des lipides intra-hépatiques montre une diminution des triglycérides et du cholestérol ester chez les souris traitées à l'E4 (**Figure 30B**).

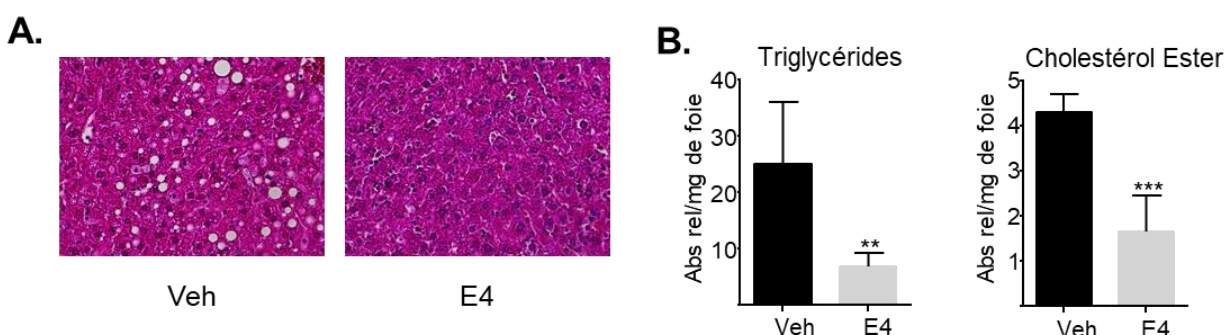


Figure 30 : L'estérol prévient de la stéatose hépatique induite par un régime obésogène

L'analyse de l'accumulation des lipides dans le foie a été réalisée sur les souris LDLr^{-/-}, ovariectomisées à l'âge de 4 semaines, traitées avec de l'E4 ou un véhicule (Veh), et nourries avec un régime obésogène et athérogène pendant 9 semaines. Photos représentatives des gouttelettes lipidiques dans le foie après coloration à l'hématoxyline/éosine (A). Mesure du contenu intra-hépatique en triglycérides et cholestérol ester (B). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Pour tester l'effet de l'E4, un t-test a été réalisé (**p<0.01, ***p< 0.001).

Ces résultats montrent donc que **l'E4 est capable de prévenir des désordres métaboliques, comme la prise de poids, l'intolérance au glucose, l'athérosclérose et la stéatose hépatique, induits par un régime obésogène.**

II.3 Etude des cibles cellulaires impliquées dans ces effets protecteurs

Dans la suite du projet, nous avons cherché à déterminer l'implication du ER α hépatique dans ces effets protecteurs de l'E4. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à ce tissu car des études précédentes ont montré un rôle du ER α hépatique dans la prévention de la stéatose en réponse à l'E2 (Guillaume et al., 2019; Zhu et al., 2013). Il a également été proposé que le ER α hépatique pouvait contribuer au rôle athéroprotecteur de l'E2 en accélérant le transport « reverse » du cholestérol (Zhu et al., 2018).

Pour cela, nous avons croisé les souris LERKO (délétion spécifique du ER α dans les hépatocytes) avec les souris LDLr^{-/-}. La validation du modèle a été réalisée en vérifiant la diminution du niveau d'ARNm de *ER α* dans le foie des souris (**Figure 31**).

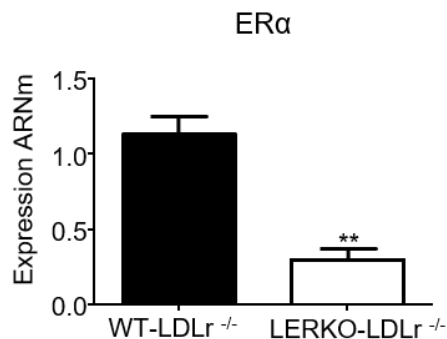


Figure 31 : Validation du modèle LERKO-LDLr^{-/-}

Niveau d'expression des ARNm de *ER α* dans le foie, normalisé par le niveau d'expression de l'ARNm de *PPIA*. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester l'effet de l'E4, un t-test a été réalisé (**p<0.01).

Pour évaluer l'impact de cette délétion, ces souris, comme pour les expériences précédentes, ont été ovariectomisées à l'âge de 4 semaines puis, à l'âge de 6 semaines, traitées avec de l'E4 ou un véhicule (Veh) et nourries avec un régime obésogène pendant 9 semaines. Dans ces conditions, la protection vis-à-vis de la prise de poids conférée par l'E4 dans les souris déficientes pour le ER α hépatocytaire (LERKO-LDLr^{-/-}) est similaire à celle observée chez les souris contrôles WT-LDLr^{-/-} (**Figure 32A**). En conséquence, la diminution de l'accumulation de masse grasse chez les souris traitées à l'E4 est la même chez les souris WT-LDLr^{-/-} et LERKO-LDLr^{-/-} (**Figure 32C**). De plus, l'exposition à l'E4 a protégé de manière similaire les souris femelles LERKO-LDLr^{-/-} et leur contrôle WT-LDLr^{-/-} de l'intolérance au glucose induite par le régime obésogène et athérogène (**Figure 32B**). Ces résultats montrent que le ER α hépatique n'est pas nécessaire pour relayer les effets protecteurs de l'E4 sur l'obésité et l'intolérance au glucose.

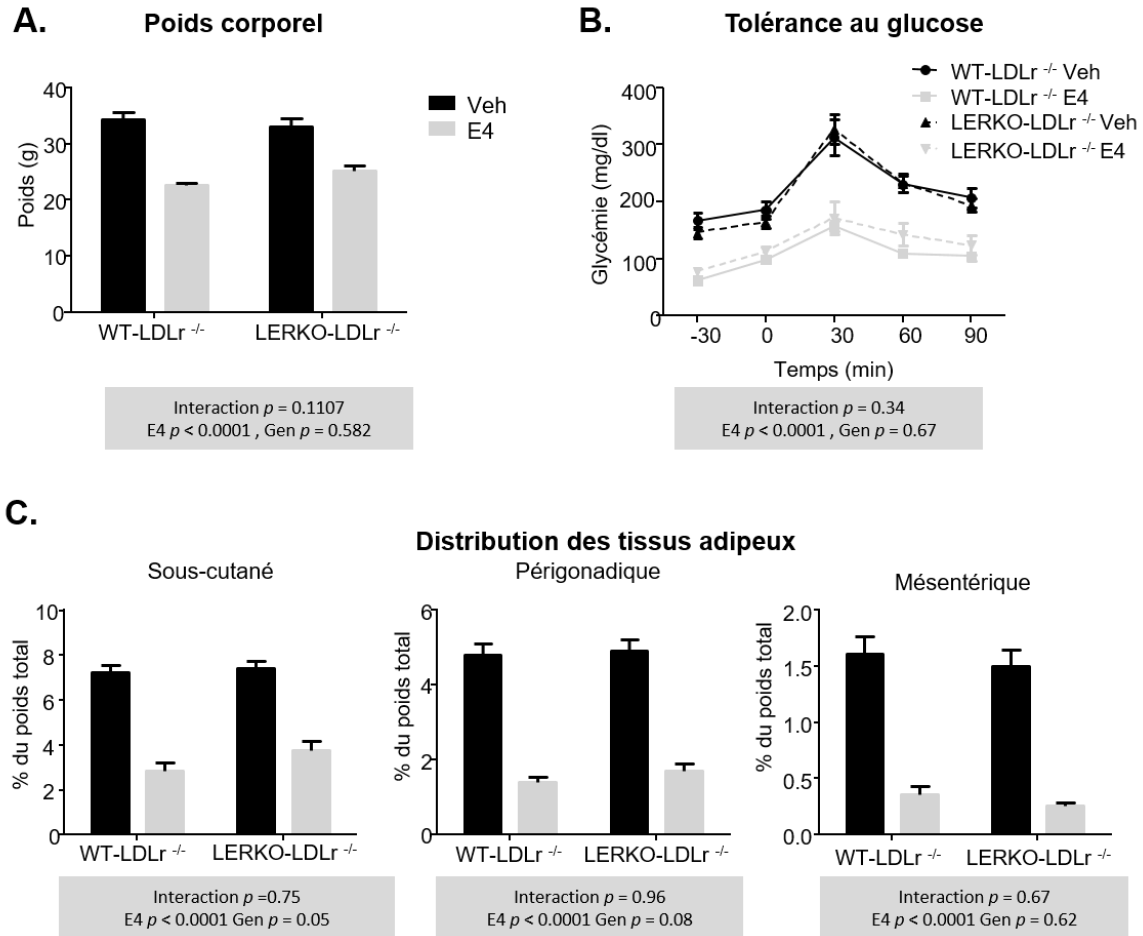


Figure 32 : Le ER α hépatique n'est pas nécessaire pour l'effet protecteur de l'E4 contre l'obésité et l'intolérance au glucose induite par un régime obésogène

Les souris LERKO-LDLr^{-/-} et leur contrôle WT-LDLr^{-/-} ont été ovariectomisées à l'âge de 4 semaines, après deux semaines de rémission, elles sont traitées avec de l'E4 ou son contrôle (Veh) et nourries avec un régime obésogène et athérogène pendant 9 semaines. Poids corporel à la fin de l'expérience (A). Test de tolérance au glucose réalisé à l'âge de 9 semaines (B) et distribution des tissus adipeux à la fin du protocole (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester les rôles respectifs du traitement à l'E4 et du génotype, une ANOVA à 2 facteurs a été réalisée.

De plus, nous n'avons observé aucune différence dans la protection contre les dépôts de lipides conférée par l'E4 chez les souris LERKO-LDLr^{-/-} comparées aux souris WT-LDLr^{-/-} (Figure 33A). Les analyses des quantités de HDL-cholestérol plasmatique (Figure 33B) et de LDL-cholestérol (Figure 33C) ont révélé un profil similaire entre les souris déficientes pour le ER α hépatique et leur contrôle. En revanche, alors que l'E4 diminue la quantité de triglycérides plasmatiques chez les souris WT-LDLr^{-/-}, cet effet est totalement perdu chez les souris LERKO-LDLr^{-/-} (Figure 33D).

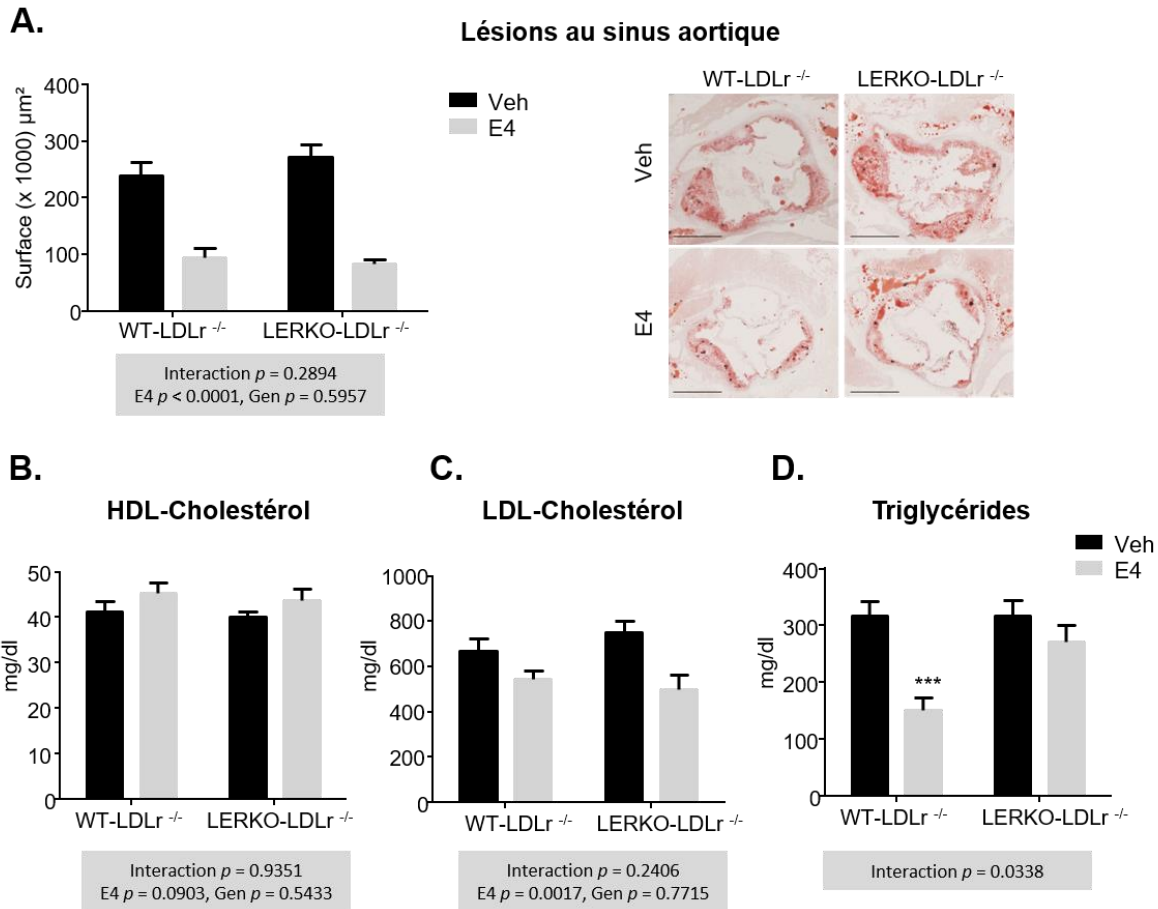


Figure 33 : Le ER α hépatique n'est pas nécessaire pour l'effet athéroprotecteur de l'E4

Les souris LERKO-LDLr^{-/-} et leur contrôle WT-LDLr^{-/-} ont été ovariectomisée à l'âge de 4 semaines, après deux semaines de rémission, elles sont traitées avec de l'E4 ou son contrôle (Veh) et nourries avec un régime obésogène et athérogène pendant 9 semaines. Photos représentatives des dépôts lipidiques au niveau du sinus aortique après coloration à l'huile rouge et quantification des lésions (A). Mesure de la quantité plasmatique d'HDL-Cholestérol (B), de LDL-Cholestérol (C) et de triglycérides (D). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester les rôles respectifs du traitement à l'E4 et du génotype, une ANOVA à 2 facteurs a été réalisée. Lorsqu'il y avait interaction, un *post test* Fisher a été appliqué (E4 versus Veh *** $p < 0.001$).

L'impact de la déficience en ER α hépatique sur l'effet protecteur de l'E4 contre la stéatose hépatique a ensuite été étudié. L'analyse des gouttelettes lipidiques dans le foie par marquage à l'hématoxyline/éosine (Figure 34A) et à l'huile rouge (Figure 34B), et la mesure de la quantité intrahépatique en triglycérides et en esters de cholestérol (Figure 34C) ont révélé que la protection hépatique conférée par l'E4 était complètement abolie chez les souris LERKO-LDLr^{-/-}.

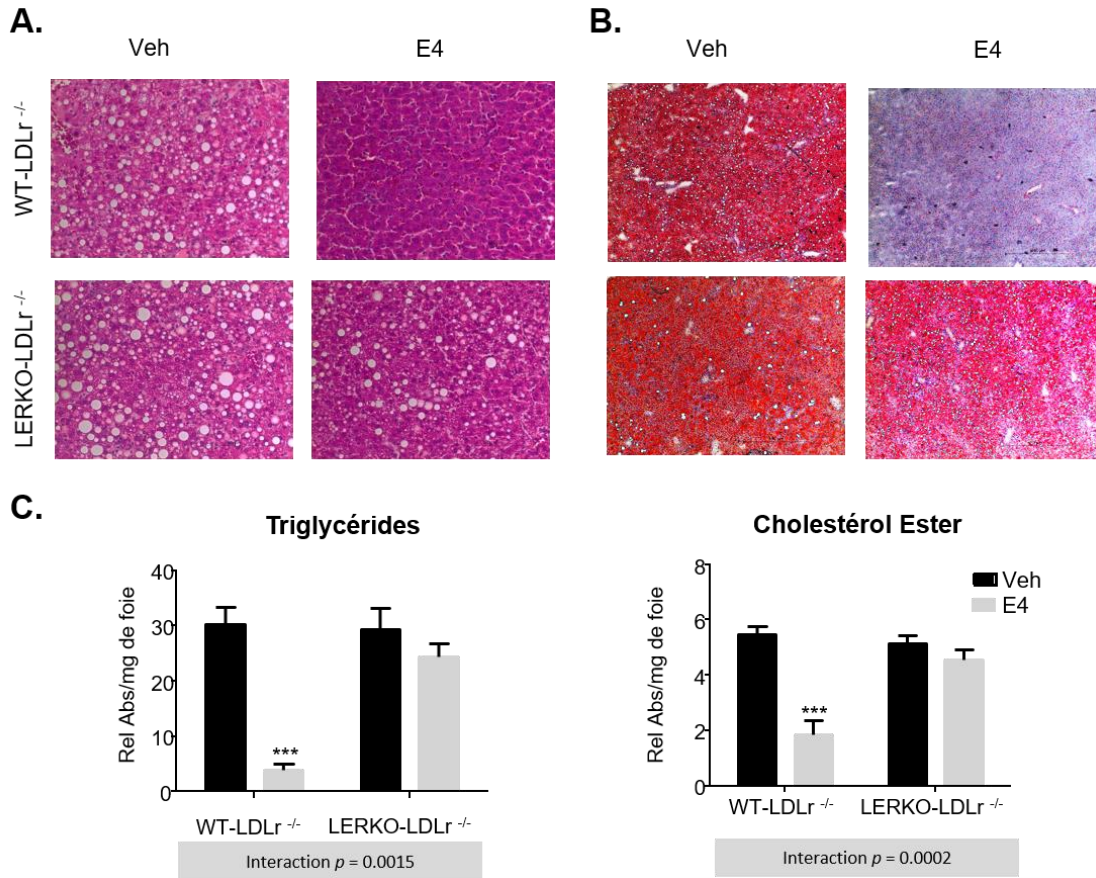


Figure 34 : Le ER α hépatique est nécessaire pour l'effet protecteur de l'E4 contre la stéatose hépatique induite par un régime obésogène

Les souris LERKO-LDLr^{-/-} et leur contrôle WT-LDLr^{-/-} ont été ovariectomisée à l'âge de 4 semaines, après deux semaines de rémission, elles sont traitées avec de l'E4 ou son contrôle (Veh) et nourries avec un régime obésogène et athérogène pendant 9 semaines. Photos représentatives de coupes de foie marquées à l'hématoxyline/éosine (A) et à l'huile rouge (B). Quantité de triglycérides et cholestérol ester intra-hépatique (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Pour tester les rôles respectifs du traitement à l'E4 et du génotype, une ANOVA à 2 facteurs a été réalisée. Lorsqu'il y avait interaction, un *post test* Fisher a été appliqué (E4 versus Veh ***P < 0.001).

Dans l'ensemble, ces données montrent que **la plupart des actions protectrices (contre l'athérosclérose, l'obésité et l'intolérance au glucose) de l'E4 dans un contexte de stress métabolique sont indépendantes du ER α hépatocytaire.** Cependant nos résultats révèlent l'importance du ER α hépatique dans la prévention de la stéatose hépatique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En France, les femmes passent pratiquement un tiers de leur vie en ménopause. Cette période peut être associée à de nombreux troubles (symptômes vasomoteurs, troubles du sommeil, ...) impactant fortement la qualité de vie. Pour limiter ces effets indésirables, les femmes peuvent être traitées avec un traitement hormonal de la ménopause (THM). Dans les années 90, près de 2 femmes occidentales sur 3 prenaient ce traitement. Mais en 2002, la publication du grand essai d'intervention WHI a complètement modifié l'utilisation du THM puisque ce sont désormais moins de 10% des françaises qui bénéficient d'un traitement hormonal ; et ceci bien que les ré-analyses de l'étude WHI aient montré que l'augmentation des risques coronariens était due au délai de prise du traitement entre le début de la ménopause et le début du traitement, et/ou à un âge avancé (Manson et al., 2017). L'amélioration du THM reste donc un enjeu majeur pour la santé des femmes.

Les données expérimentales démontrent que le 17β -œstradiol (E2), œstrogène majoritaire, est crucial pour assurer une bonne fonction artérielle notamment par la production de NO (*Nitric Oxide*) et le remodelage artériel en réponse au flux (Darblade et al., 2002; Tarhouni et al., 2013, 2014). L'E2 joue également un rôle préventif dans les pathologies artérielles comme l'athérosclérose et l'hypertension artérielle et il permet d'accélérer la cicatrisation endothéliale et de limiter l'hyperplasie néointimale après une agression du vaisseau (**Figure 35**) (Billon-Galés et al., 2009; Brouchet et al., 2001; Chappell et al., 2003; Elhage et al., 1997a; Pollow et al., 2015; Smirnova et al., 2015).

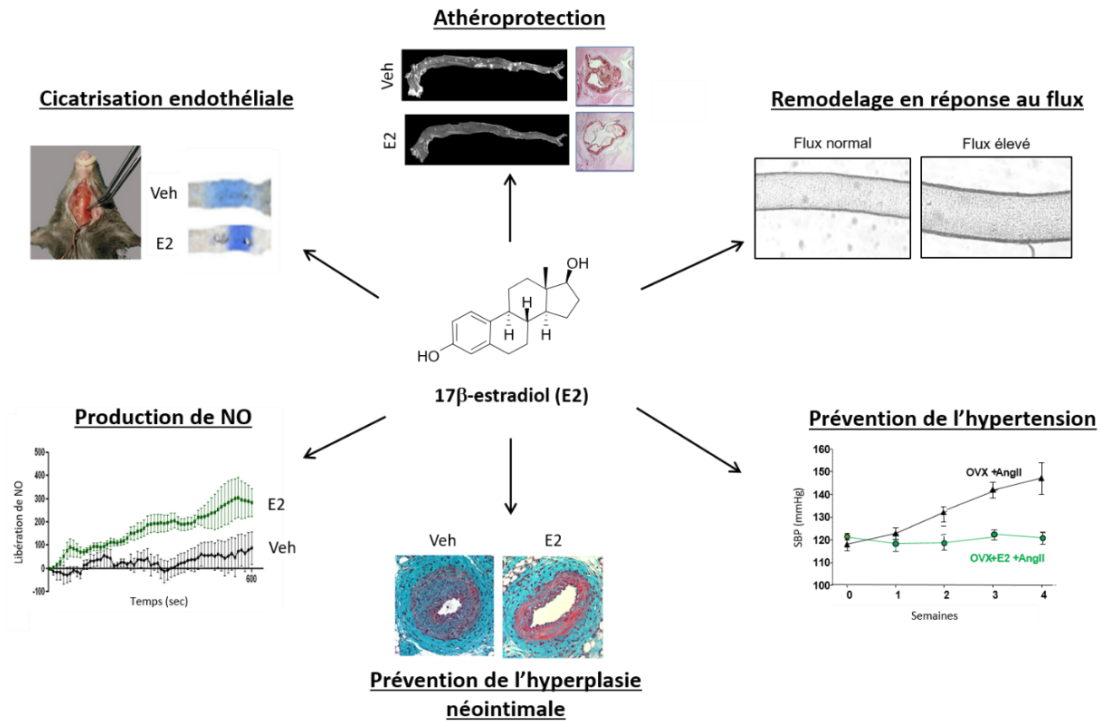


Figure 35 : Effets vasculoprotecteurs de l'E2

Cette action est relayée par le récepteur aux œstrogènes alpha ($ER\alpha$) et plus précisément par le $ER\alpha$ de la cellule endothéliale (Billon-Galés et al., 2009; Tarhouni et al., 2013; Toutain et al., 2009) à l'exception de la prévention de l'hyperplasie néointimale dont la cible cellulaire est la cellule musculaire lisse (Smirnova et al., 2015). La modulation sélective du $ER\alpha$ est une stratégie développée pour optimiser la balance bénéfice/risque de l'action œstrogénique. Cette modulation sélective peut reposer sur différentes approches :

- Le ciblage cellulaire préférentiel comme cela a été proposé en conjuguant le GLP-1 (*Glucagon-Like Peptide 1*) à l'E2, permettant une délivrance spécifique des œstrogènes aux tissus exprimant le récepteur au GLP-1 (GLP-1R) dans l'intestin et le cerveau. Ce ciblage sélectif pourrait permettre le traitement de l'obésité sans induire de réponse proliférative sur les tissus reproducteurs ou de défaut de l'axe reproducteur (Finan et al., 2012; Vogel et al., 2016). Cependant ce ciblage reste compliqué dans le cadre de la protection vasculaire car il existe peu de récepteurs spécifiques des cellules endothéliales.

- La dégradation du récepteur dans certains tissus comme le fait le Bazedoxifène. Cette molécule en association avec les conjugués équinés est actuellement utilisée comme THM aux Etats-Unis. Cette conjugaison va provoquer la dégradation du ER α *via* le système ubiquitine protéasome dans les tissus mammaire et utérin, et limite donc le sur risque de cancer du sein et de l'utérus. Chez la femme, ce traitement prévient des bouffées de chaleur, de la déminéralisation osseuse, et des symptômes génito-urinaires. Des études cliniques ont montré que le bazedoxifène, associé aux conjugués équinés, n'avait aucun impact sur le sur risque de thrombose veineuse (Pinkerton et al., 2013). Des études plus longues et avec un plus grand groupe de femmes seront nécessaires pour évaluer pleinement ce sur risque.
- L'activation de certaines sous fonctions du ER α (exemple du tamoxifène qui cible spécifiquement la fonction AF-1 et antagonise la fonction AF-2). Cette molécule est utilisée dans le cadre du cancer du sein ER+ (ER α positif).

Dans le cadre de mon projet, nous avons cherché à déterminer si **le découplage de l'activation membranaire/nucléaire du ER α** pouvait représenter une bonne stratégie pour l'optimisation du traitement hormonal de la ménopause.

I. Le ciblage préférentiel de la voie membranaire du ER α est-elle une stratégie à poursuivre pour améliorer le traitement de la ménopause ?

En 2010, il a été proposé que l'activation sélective du ER α membranaire pourrait conférer une protection artérielle avec un risque minimal de cancer du sein et de l'utérus comparé à celui des œstrogènes (Chambliss et al., 2010). En effet, des résultats *in vivo* ont montré que l'utilisation d'une nouvelle classe de modulateur sélectif ciblant sélectivement le ER α membranaire (l'EDC et le PaPE-1) pouvait induire la production de NO et accélérer la cicatrisation endothéliale après agression à la carotide sans impact sur les tissus sexuels comme l'utérus et la glande mammaire (Chambliss et al., 2010; Madak-Erdogan et al., 2016). Il a également été montré un rôle protecteur de l'EDC vis-à-vis de la stéatose hépatique induite par un régime obésogène (Chambliss et al., 2016a) et de la déminéralisation osseuse (Vinel et al., 2018).

Les effets membranaires des œstrogènes (effets MISS pour *Membrane Initiated Steroid Signaling*) ont été bien décrits dans la cellule endothéliale et les actions protectrices vasculaires dépendent de ces cellules. Nous nous sommes donc intéressés au rôle du ER α membranaire dans

l'athéroprotection (processus relayé par le ER α de la cellule endothéliale). Les résultats obtenus dans ce projet ont permis de montrer que le ER α membranaire n'est pas nécessaire à l'effet athéroprotecteur de l'E2. L'approche pharmacologique utilisant le PaPE-1 et l'EDC a montré que contrairement à l'E2, ces deux molécules ne sont pas capables d'induire une athéroprotection.

Grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Henrion à Angers, nous avons pu étudier le rôle respectif du ER α membranaire et nucléaire dans d'autres effets protecteurs de l'E2 et nous avons pu mettre en évidence que le ER α membranaire (ER α MISS) n'était pas non plus nécessaire pour prévenir de l'hypertension induite par l'angiotensine II et pour le remodelage de l'artère mésentérique en réponse au flux (Guivarc'h et al., 2018) (**Annexe 1**) (**Tableau 2**). Mon équipe d'accueil avait également précédemment démontré que l'effet protecteur de l'E2 sur la prévention de l'hyperplasie néointimale dépendait des effets nucléaires du ER α (Smirnova et al., 2015). Les effets vasculoprotecteurs des œstrogènes relayés par le ER α membranaire se restreindraient donc à l'accélération de la cicatrisation endothéliale après agression à la carotide et à la production de NO (Adlanmerini et al., 2014) (**Tableau 2**).

	Souris génétiquement modifiées		Outils pharmacologiques
	= Perte de fonction		= Gain de fonction
	MISS	Nucléaire	MISS
Génotype	ER α -C451A	ER α -AF2 ^o	Sauvage
Traitement	Œstradiol (E2)		EDC ou PaPE-1
Accélération de la cicatrisation endothéliale	NON	OUI	OUI
Augmentation de la production de NO	NON	OUI	OUI
Prévention de l'hyperplasie néointimale	<i>nd</i>	<i>nd</i>	NON
Prévention de l'athérome	OUI	NON	NON
Remodelage artériel en réponse au flux	OUI	NON	<i>nd</i>
Prévention de l'hypertension	OUI	NON	<i>nd</i>

Tableau 2 : Résumé des rôles respectifs du ER α membranaire et nucléaire dans la vasculoprotection à l'aide de modèles de souris génétiquement modifiées (perte de fonction) et d'outils pharmacologiques (gain de fonction)

MISS : Membrane Initiated Steroid Signaling, nd : non déterminé, NO : monoxyde d'azote

Aussi, contrairement à l'E2, l'EDC et le PaPE-1 n'ont pas d'impact sur la prévention de l'obésité et l'intolérance au glucose induites par un régime obésogène (Chambliss et al., 2016b; Madak-Erdogan et al., 2016). Enfin aucune donnée n'est disponible sur leur efficacité pour lutter contre les bouffées de chaleur. Ces données sont importantes à prendre en compte dans l'optique d'une stratégie thérapeutique qui consisterait à cibler de façon sélective la voie ER α MISS dans le cadre du traitement de la ménopause comme cela a pu être proposé dans la littérature (Chambliss et al., 2010).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux associant des approches pharmacologiques (gain de fonction) et l'utilisation de modèles animaux ciblant sélectivement les différentes voies d'activation de ER α (perte de fonction) démontrent que **le ciblage sélectif de la voie membranaire du ER α n'est pas une bonne stratégie pour l'optimisation du traitement de la ménopause (Tableau 2).**

II. Quels sont les effets vasculaires et métaboliques de l'Estérol ?

Nous nous sommes également intéressés à l'estérol (E4) qui, au contraire de l'EDC et du PaPE-1, agit comme un activateur sélectif du ER α nucléaire (Abot et al., 2014). Cet œstrogène naturel présente un intérêt médical majeur car il est développé comme THM (en phase 3 d'essai clinique) par la société belge Mithra. Une étude à doses multiples réalisée chez des femmes ménopausées a permis de montrer que l'E4 avait des effets protecteurs sur les bouffées de chaleur et sur le renouvellement osseux. Dans le même temps, cette étude a montré que contrairement aux œstrogènes classiques, il n'augmente pas les facteurs de la coagulation au niveau hépatique, suggérant un risque thromboembolique moindre (Mawet et al., 2015).

Chez la souris, les résultats de mon projet ont permis de mettre en évidence un rôle protecteur de l'E4 sur le développement des lésions au sinus aortique dans le modèle de souris LDLr^{-/-} en réponse à un régime athérogène. *A contrario*, l'E4 (activateur sélectif du ER α nucléaire) n'est pas capable d'induire la production de NO, une action dépendant du ER α membranaire (Abot et al., 2014). Alors qu'il est largement admis que l'augmentation de la production de NO dans l'endothélium joue un rôle important dans les actions vasculoprotectrices des œstrogènes, il est intéressant de noter que mon équipe d'accueil avait précédemment montré que l'effet athéroprotecteur de l'E2 n'était pas altéré par l'inhibition du NO (Elhage et al.,

1997b). De plus, l'effet athéroprotecteur de l'E2 est totalement maintenu dans le modèle de souris invalidée pour la eNOS, renforçant l'indépendance de ces 2 actions (Hodgin et al., 2002).

En collaboration avec l'équipe du Pr. Henrion, nous avons également pu montrer que l'E4 était capable de prévenir de l'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II et du remodelage artériel en réponse au flux (Guivarc'h et al., 2018) (**Annexe 1**). Mon équipe d'accueil avait également montré l'effet bénéfique de l'E4 dans la prévention de l'hyperplasie néointimale. Ainsi, l'ensemble de ces travaux, combinant des approches d'inactivation génique et pharmacologique, démontrent que **la majorité des effets bénéfiques relayés par ER α sur le plan artériel repose sur son activation nucléaire (Figure 36)**.

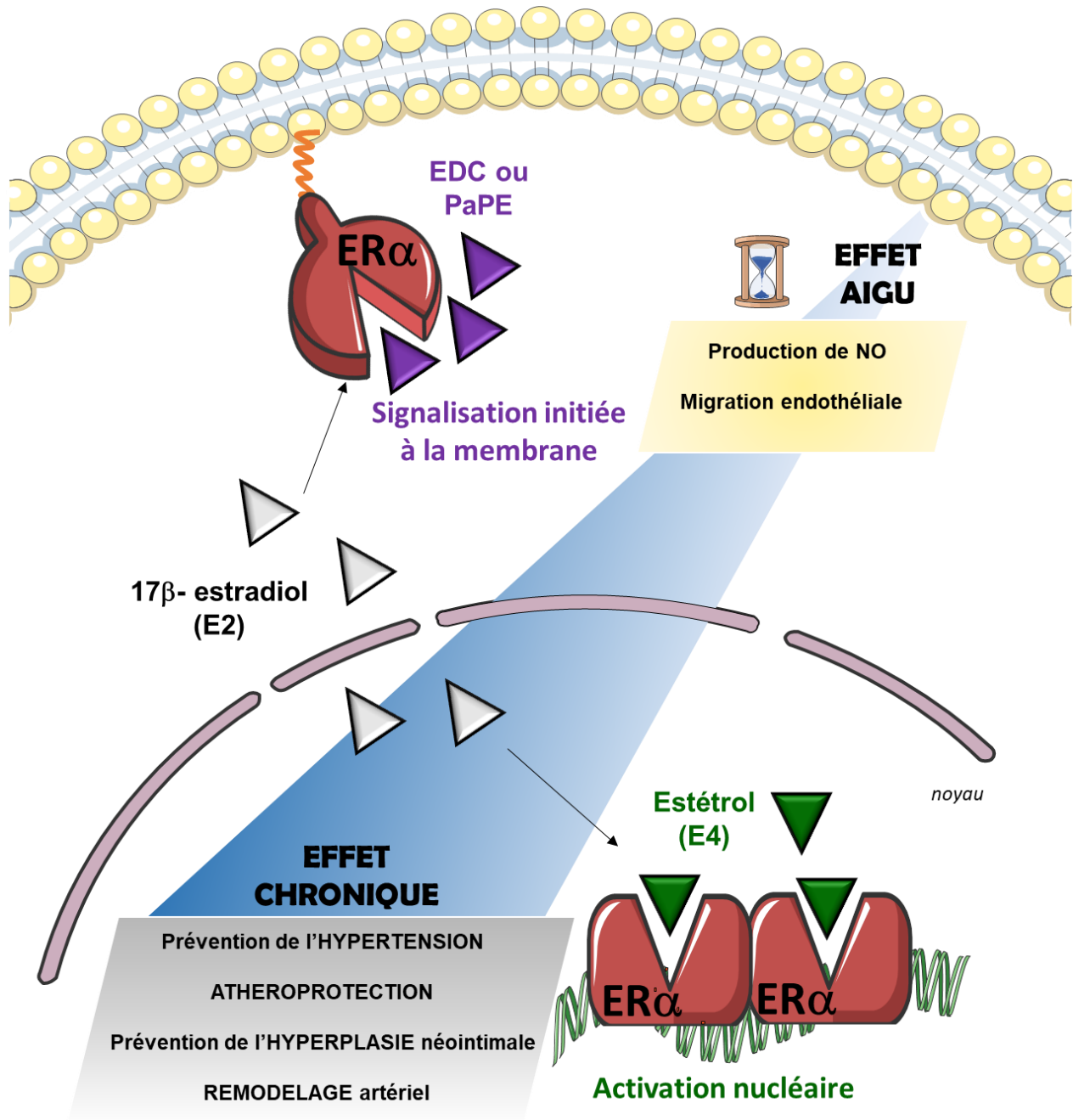


Figure 36 : Schéma représentant le rôle respectif du ERα nucléaire et membranaire dans les effets vasculoprotecteurs, adapté de (Guivarc'h et al., 2018)

Nous nous sommes également intéressés aux effets de l'estérol dans un contexte d'obésité puisque 1) les études cliniques ont montré que le THM diminue de 20 à 30% l'incidence du diabète de type 2, et 2) les désordres métaboliques (obésité et diabète de type 2) sont associés à

un sur risque de maladies artérielles. Les résultats de mon projet ont permis de montrer que l'E4 était capable de prévenir de la prise de poids et de l'intolérance au glucose induite par un régime obésogène dans un modèle de souris LDLr^{-/-}. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de souris sauvages C57BL/6 (**Annexe 3**). L'E4 est également capable de prévenir de complications induites par ce régime comme la stéatose hépatique et l'athérome dans un contexte de régime obésogène. Comme pour l'E2, mes résultats montrent que la protection métabolique est relayée par ER α et plus particulièrement par sa fonction nucléaire AF-2 (**Annexe 3**). D'un point de vue cellulaire, mes travaux ont permis de montrer que, comme pour l'E2, le ER α hépatocytaire n'était pas impliqué dans les effets protecteurs de l'E4 contre l'obésité et l'intolérance au glucose. Les cibles cellulaires impliquées dans ces effets pourraient être les mêmes que celles de l'E2. En effet, j'ai étudié le métabolisme énergétique de souris C57BL/6 traitées par l'E4 à l'aide de cages métaboliques (**Annexe 3**). Ces expériences ont permis de montrer que l'E4 augmente l'activité physique mais également la dépense énergétique chez des souris ovariectomisées et nourries avec un régime obésogène comparé aux souris contrôles non traitées. Ces résultats pourraient en partie expliquer l'effet protecteur de l'E4 sur la diminution de la prise de poids et ceci est en faveur d'un effet central.

Cependant les cibles cellulaires impliquées dans ces effets peuvent être nombreux et complexes puisqu'il a été montré pour l'E2 une participation du ER α non seulement au niveau central (augmentation de la dépense énergétique et de l'activité physique), mais également du pancréas (augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'insuline), des adipocytes (augmentation de la sensibilité à l'insuline et de la lipolyse, et diminution de la lipogénèse) et du muscle (augmentation de la sensibilité à l'insuline, de l'oxydation des acides gras libres et diminution de la lipogénèse) (Mauvais-Jarvis et al., 2013).

Pour vérifier l'hypothèse d'un rôle du ER α central dans les effets protecteurs de l'E4 sur le syndrome métabolique, une approche par souris génétiquement modifiées invalidant ER α dans le système nerveux central, dans les neurones hypothalamiques SF1 (*Steroidogenic Factor-1*) et les neurones POMC (*Pro-opiomelanocortin*) pourrait être réalisée comme cela a été fait avec l'E2 (Xu et al., 2011).

III. Estérol : œstrogène faible ou SERM ?

L'ensemble de mes résultats a montré que, comme l'E2, l'E4 avait des effets bénéfiques sur le plan de la prévention artérielle et métabolique. Les études cliniques montrent également de nombreux effets identiques entre E2 et E4 (prévention de l'ostéoporose, diminution des bouffées de chaleur). Cependant l'impact hépatique de l'E4 est moindre que celui de l'E2 notamment vis-à-vis de l'induction des facteurs de la coagulation. Alors, l'E4 est-il un œstrogène « faible » ou un véritable modulateur sélectif du ER α ?

Les SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) sont capables d'avoir des actions spécifiques sur certains tissus en mimant l'action des œstrogènes (action agoniste) ou à l'inverse en bloquant leurs effets dans d'autres tissus (action antagoniste). Leurs différences reposent sur leur structure chimique, leur affinité pour le récepteur aux œstrogènes mais également sur la conformation que celui-ci adopte après leur fixation.

L'E4 est un œstrogène possédant une structure chimique très proche de celle de l'E2 avec deux groupements hydroxyles supplémentaires (**Figure 37A**). La spécificité de cet œstrogène endogène est son lieu de production, qui se fait exclusivement dans le foie fœtal chez l'Homme et les grands singes. A ce jour, aucune explication n'a été donnée sur son apparition chez ce groupe restreint de mammifères, ni sur son rôle physiologique. Les études de l'affinité de l'E4 ont révélé une affinité 100 fois plus faible que l'E2 pour le récepteur aux œstrogènes (Abot et al., 2014)

Des études antérieures effectuées au laboratoire ont permis de démontrer que, dans le modèle figé de cristallisation et analyse par diffraction des rayons X, les changements conformationnels induits en réponse à l'E2 et à l'E4 sur le ER α étaient également très similaires : dans les 2 cas, le repliement de l'hélice H12 permet de créer une surface d'interaction favorable au recrutement des co-activateurs (**Figure 37B et 37C**) (Abot et al., 2014).

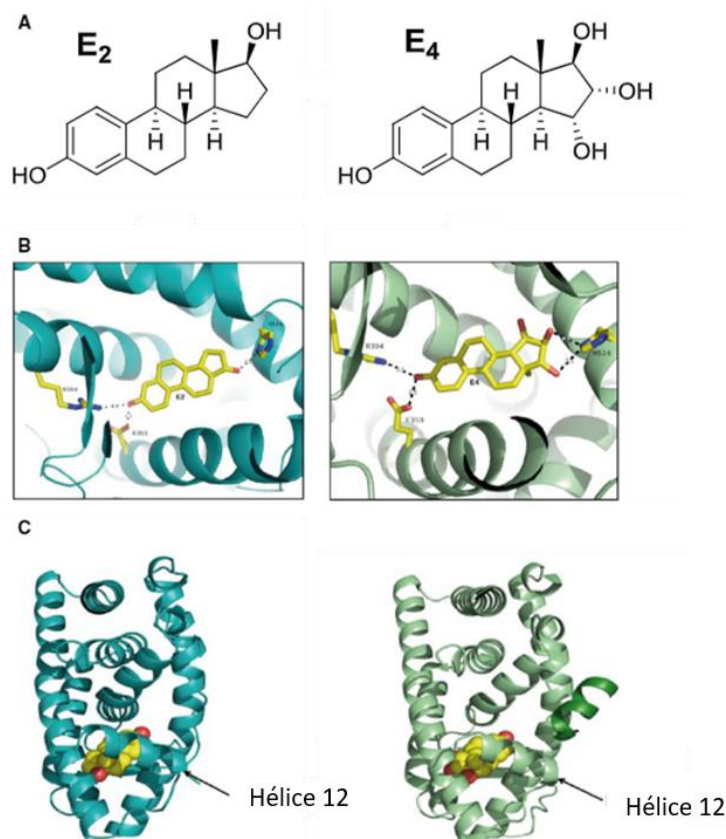


Figure 37 : Structure du 17β-œstradiol (E2) et de l'Estœtroll (E4) et de leur conformation respective avec le domaine LBD du ERα, issue de (Abot et al., 2014)

En accord avec ces résultats, le cofacteur SRC-3 (*Steroid Receptor Coactivator 3*) présente un profil d'affinité pour ERα similaire en réponse à l'E2 et à l'E4 (Abot et al., 2014).

Cependant, les résultats obtenus au cours de ce projet ont mis en évidence des réponses transcriptionnelles spécifiques et sélectives en réponse à l'E2 et à l'E4 à la fois dans l'aorte et dans le foie. En effet :

- **Dans le foie**, l'analyse d'hépatokines chez des souris C57BL/6 a révélé de fortes différences d'induction de certains gènes entre d'une part l'E4 et le tamoxifène (SERM le plus couramment utilisé), et d'autre part l'E2 (**Annexe 3**).
- **Dans l'aorte**, l'analyse du transcriptome (RNA Seq) a révélé que l'E2 régulaît 486 gènes, contre 1091 pour l'E4. De manière intéressante, l'E4 est la molécule qui induit le plus de gènes dans l'aorte et plus de 70% de ces gènes (787) ne sont régulés que par

cette molécule (**Figure 38**). L'analyse des voies biologiques dans lesquelles ces gènes sont impliqués montre qu'il s'agit de voies complètement différentes entre ces deux molécules.



Figure 38 : Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes régulés communément et différemment par l'E2 et l'E4 dans l'aorte.

PERSPECTIVES :

L'E4 semble donc avoir un mécanisme d'action différent de l'E2. Pour mieux comprendre ces différences, il serait intéressant de répondre aux questions suivantes :

- 1. Quelle est l'importance de la dose dans ces régulations ?** Nous réaliserons donc des expériences de doses réponses (E2 et E4) pour évaluer l'importance de ce paramètre.
- 2. Ces effets sont-ils entièrement dépendants du ER α ?** L'analyse d'un panel de gènes régulés spécifiquement par l'E2, l'E4 et commun aux deux molécules sera réalisée dans des aortes issues de souris ER α KO.
- 3. Quels sont les sites de liaison sur l'ADN de la protéine ER α en réponse à l'E2 et à l'E4 ?** Par séquençage *Chip-Seq* (*Chromatin Immunoprecipitation sequencing*), nous chercherons à évaluer la fixation de ER α sur le génome en étudiant la différence du cistrome dans les aortes de souris traitées par l'E2 et l'E4. Pour cela, nous sommes actuellement en cours de mise au point d'une technique de *Chip* sur l'aorte.

Cette spécificité d'action de l'E4 pourrait s'expliquer par :

- 1. Le recrutement différentiel de cofacteurs.** Bien que le changement conformationnel de ER α en réponse à la fixation d'E2 et d'E4 soient identiques conduisant à un recrutement similaire du cofacteur SRC-3, il serait important d'analyser le recrutement des cofacteurs au niveau de la fonction AF-2 à plus large échelle à l'aide de l'approche MARCoNI (*Microarray Assay for Real-time Coregulator-Nuclear receptor*) (**Figure 39**).

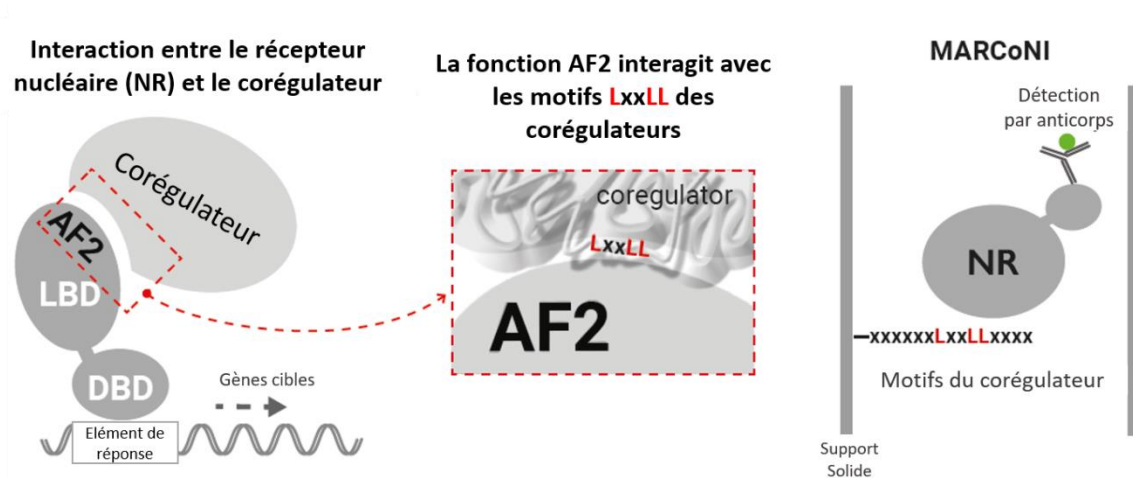


Figure 39 : Méthode du Microarray Assay for Realtime Coregulator-Nuclear receptor Interaction (MARCoNI)

LBD : Domaine de liaison au ligand, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, AF2 : Fonction de transactivation 2, LxxLL : séquence de liaison au peptide, NR : récepteur nucléaire

Cette approche permet en effet de déterminer à large échelle la fixation des co-activateurs (motifs LxxLL) au niveau de la fonction AF-2 du récepteur en réponse à un ligand donné. Il serait par ailleurs pertinent de réaliser une démarche expérimentale encore plus globale afin d'approcher les cofacteurs régulés également au niveau de la fonction AF-1. La technique du RIME (*Rapid Immunoprecipitation Mass spectrometry of Endogenous proteins*) pourrait être un nouvel atout dans la détection de ces co-régulateurs. Cette technique permet d'identifier les protéines associées à une protéine d'intérêt préalablement fixée sur une séquence d'ADN par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette approche a été utilisée par l'équipe du Pr. Jason Carroll pour identifier les co-régulateurs recrutés par ER α en réponse à l'E2 et au tamoxifène dans le modèle MCF-7 (Mohammed et al., 2013; Papachristou et al., 2018).

- 2. Le ciblage différentiel de la voie membranaire :** Mon équipe d'accueil a montré que l'E4 n'était pas capable d'activer le ER α membranaire et qu'en plus il était capable d'antagoniser les effets MISS de l'E2 sur l'accélération de la cicatrisation endothéliale et la production de NO (Abot et al., 2014). L'activation du ER α membranaire a été décrite comme pouvant jouer un rôle clé dans l'action du ER α nucléaire (*crosstalk*) via des mécanismes de phosphorylation du récepteur ER α ou de ses co-activateurs (Kato et al.,

1995; La Rosa et al., 2012). Pour évaluer le rôle du ER α membranaire en réponse à l'E2 et à l'E4, il serait donc intéressant d'analyser la réponse transcriptionnelle à ces 2 molécules dans le modèle d'inactivation de la localisation membranaire (ER α -C451A).

3. Les modifications épigénétiques : Nous avons préalablement observé que dans le foie, une injection (traitement aigu) d'E2 et de tamoxifène provoquait l'induction du gène *GDF15* (impliqué dans les effets métaboliques et hépatiques protecteurs du tamoxifène *via* ER α) et que cette induction était perdue lorsque l'E2 était administré de manière chronique contrairement au tamoxifène. Nous avons également observé qu'après un traitement chronique (3 semaines), ER α n'était plus capable de se fixer sur la région régulatrice de *GDF15* en réponse à l'E2 et que ceci était associé à la triméthylation de l'histone H3K27, une modification épigénétique (Guillaume et al., 2019). L'E4, comme le tamoxifène, permet d'induire *GDF15* aussi bien après un traitement aigu que par un traitement chronique (**Annexe 3**). Pour évaluer les modifications épigénétiques à large échelle en réponse à l'E2 et à l'E4 dans le foie et/ou dans l'aorte, des expériences d'ATAC seq (*Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing*) pourraient être envisagées. Cela nous permettrait de caractériser les régions accessibles de la chromatine en réponse à ces deux molécules et de voir si elles sont différentes ou similaires. Puis, elle permettrait, de révéler l'existence ou non de différences d'interaction du ER α sur les sites de la chromatine ouverte, le positionnement des nucléosomes et les facteurs de transcription.

CONCLUSION GENERALE :

Pour conclure, l'ensemble de mon travail a permis de montrer que :

- **L'activation sélective du récepteur aux œstrogènes alpha membranaire** dans le cadre d'une optimisation du traitement hormonal de la ménopause **n'était pas une stratégie d'intérêt médical**, contrairement à ce qui avait été proposé il y a quelques années.
- **En revanche, l'estétrol**, activateur sélectif du ER α nucléaire, est capable d'une large **protection artérielle et métabolique** dans des modèles précliniques et pourrait donc être une molécule d'intérêt dans le cadre du THM. En effet, chez la femme, il n'induit pas les facteurs de la coagulation contrairement aux œstrogènes actuellement utilisés par voie orale et pourrait donc avoir un effet moindre de sur risque de thrombose veineuse qui est actuellement un effet délétère important du THM. Ce profil métabolique, artériel et veineux paraît à ce stade nettement favorable.
- L'E4 se présente donc plutôt comme **un nouveau modulateur sélectif du récepteur aux œstrogènes (SERM), naturel et endogène** dont le rôle physiologique reste à découvrir, que comme un œstrogène faible. Nous allons continuer à en étudier les effets et les mécanismes en vue d'une utilisation en médecine d'abord en contraception puis dans le traitement de la ménopause.

BIBLIOGRAPHIE

Abot, A. (2013). Dissection moléculaire de la fonction activatrice AF-1 du récepteur aux oestrogènes alpha dans la physiopathologie vasculaire et la prolifération utérine. phd. Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Abot, A., Fontaine, C., Buscato, M., Solinhac, R., Flouriot, G., Fabre, A., Drougard, A., Rajan, S., Laine, M., Milon, A., et al. (2014). The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor α modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol Med* 6, 1328–1346.

Acconcia, 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.

Acconcia, 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.

Adams, L.A., Anstee, Q.M., Tilg, H., and Targher, G. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease and its relationship with cardiovascular disease and other extrahepatic diseases. *Gut* 66, 1138–1153.

Adlanmerini, M., Solinhac, R., Abot, A., Fabre, A., Raymond-Letron, I., Guihot, A.-L., Boudou, F., Sautier, L., Vessières, E., Kim, S.H., et al. (2014). Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor α in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E283-290.

Adlanmerini, M., Fabre, A., Boudou, F., Riant, É., Fontaine, C., Laurell, H., Gourdy, P., Lenfant, F., and Arnal, J.-F. (2015). [Tissue-specific membrane effects of estrogen receptor alpha]. *Med Sci (Paris)* 31, 1083–1091.

Anderson, G.L., Limacher, M., Assaf, A.R., Bassford, T., Beresford, S.A.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.

Arnal, J.-F., Gourdy, P., Garmy-Susini, B., Delmas, É., and Bayard, F. (2003). Effets vasculaires des œstrogènes. *Med Sci (Paris)* 19, 1226–1232.

Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., et al. (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* 97, 1045–1087.

Balkau, B., Valensi, P., Eschwège, E., and Slama, G. (2007). A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* 33, 405–413.

Billon-Galés, A., Fontaine, C., Douin-Echinard, V., Delpy, L., Berges, H., Calippe, B., Lenfant, F., Laurell, H., Guéry, J.-C., Gourdy, P., 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.

Billon-Galés, A., Krust, A., Fontaine, C., Abot, A., Flouriot, G., Toutain, C., Berges, H., Gadeau, A.-P., Lenfant, F., Gourdy, P., et al. (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. U.S.A.* *108*, 13311–13316.

Bonds, D.E., Lasser, N., Qi, L., Brzyski, R., Caan, B., Heiss, G., Limacher, M.C., Liu, J.H., Mason, E., Oberman, A., et al. (2006). The effect of conjugated equine oestrogen on diabetes incidence: the Women's Health Initiative randomised trial. *Diabetologia* *49*, 459–468.

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.

Brouchet, L., Krust, A., Dupont, S., Chambon, 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.

Canonica, M., Oger, E., Plu-Bureau, G., Conard, J., Meyer, G., Lévesque, H., Trillot, N., Barrellier, M.-T., Wahl, D., Emmerich, J., et al. (2007). Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study. *Circulation* *115*, 840–845.

Cantineau, R., Kremers, P., De Graeve, J., Gielen, J.E., and Lambotte, R. (1985). 15- and 16-hydroxylations of androgens and estrogens in the human fetal liver: a critical step in estetrol biosynthesis. *J. Steroid Biochem.* *22*, 195–201.

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.

Chambliss, K.L., Barrera, J., Umetani, M., Umetani, J., Kim, S.H., Madak-Erdogan, Z., Huang, L., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Mineo, C., et al. (2016a). Nonnuclear Estrogen Receptor Activation Improves Hepatic Steatosis in Female Mice. *Endocrinology* *157*, 3731–3741.

Chambliss, K.L., Barrera, J., Umetani, M., Umetani, J., Kim, S.H., Madak-Erdogan, Z., Huang, L., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Mineo, C., et al. (2016b). Nonnuclear Estrogen Receptor Activation Improves Hepatic Steatosis in Female Mice. *Endocrinology* *157*, 3731–3741.

- Chappell, M.C., Gallagher, P.E., Averill, D.B., Ferrario, C.M., and Brosnihan, K.B. (2003). Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2. Lewis rat. *Hypertension* 42, 781–786.
- Clarke, C.H., Norfleet, A.M., Clarke, M.S., Watson, C.S., Cunningham, K.A., and Thomas, M.L. (2000). Perimembrane localization of the estrogen receptor alpha protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 71, 34–42.
- Clarkson, T.B., and Appt, S.E. (2005). Controversies about HRT--lessons from monkey models. *Maturitas* 51, 64–74.
- Coelingh Bennink, H.J.T., 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.T., Skouby, S., Bouchard, P., and Holinka, C.F. (2008b). Ovulation inhibition by estetrol in an in vivo model. *Contraception* 77, 186–190.
- Coelingh Bennink, H.J.T., Verhoeven, C., Zimmerman, Y., Visser, M., Foidart, J.-M., and Gemzell-Danielsson, K. (2016). Clinical effects of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Maturitas* 91, 93–100.
- Coelingh Bennink, H.J.T., Verhoeven, C., Zimmerman, Y., Visser, M., Foidart, J.-M., and Gemzell-Danielsson, K. (2017). Pharmacodynamic effects of the fetal estrogen estetrol in postmenopausal women: results from a multiple-rising-dose study. *Menopause* 24, 677–685.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519–1523.
- 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.
- 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.
- Daugherty, A., Tall, A.R., Daemen, M.J.A.P., Falk, E., Fisher, E.A., García-Cardena, G., Lüscher, A.J., Owens, A.P., Rosenfeld, M.E., Virmani, R., et al. (2017). Recommendation on Design, Execution, and Reporting of Animal Atherosclerosis Studies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, e131–e157.
- Elhage, R., Arnal, J.F., Pieraggi, M.T., Duverger, N., Fiévet, C., Faye, J.C., and Bayard, F. (1997a). 17 beta-estradiol prevents fatty streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2679–2684.

Elhage, R., Bayard, F., Richard, V., Holvoet, P., Duverger, N., Fiévet, C., and Arnal, J.F. (1997b). Prevention of fatty streak formation of 17 β -estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 96, 3048–3052.

Favre, J., Gao, J., Henry, J.-P., Remy-Jouet, I., Fourquaux, I., Billon-Gales, A., Thuillez, C., Arnal, J.-F., Lenfant, F., and Richard, V. (2010). Endothelial estrogen receptor α plays an essential role in the coronary and myocardial protective effects of estradiol in ischemia/reperfusion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2562–2567.

Finan, B., Yang, B., Ottaway, N., Stemmer, K., Müller, T.D., Yi, C.-X., Habegger, K., Schriever, S.C., García-Cáceres, C., Kabra, D.G., et al. (2012). Targeted estrogen delivery reverses the metabolic syndrome. *Nat. Med.* 18, 1847–1856.

Florentino, G.S. de A., Cotrim, H.P., Vilar, C.P., Florentino, A.V. de A., Guimarães, G.M.A., and Barreto, V.S.T. (2013). Nonalcoholic fatty liver disease in menopausal women. *Arq Gastroenterol* 50, 180–185.

Fontaine, C., Buscato, M., Vinel, A., Giton, F., Raymond-Letron, I., Kim, S.H., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., Gourdy, P., Milon, A., et al. (2020). The tissue-specific effects of different 17 β -estradiol doses reveal the key sensitizing role of AF1 domain in ER α activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 505, 110741.

Gérard, C., Blacher, S., Communal, L., Courtin, A., Tskitishvili, E., Mestdagt, M., Munaut, C., Noel, A., Gompel, A., Péqueux, C., et al. (2015a). Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. *J. Endocrinol.* 224, 85–95.

Gérard, C., Mestdagt, M., Tskitishvili, E., Communal, L., Gompel, A., Silva, E., Arnal, J.-F., Lenfant, F., Noel, A., Foidart, J.-M., et al. (2015b). Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. *Oncotarget* 6, 17621–17636.

Giretti, M.S., Montt Guevara, M.M., Cecchi, E., Mannella, P., Palla, G., Spina, S., Bernacchi, G., Di Bello, S., Genazzani, A.R., Genazzani, A.D., et al. (2014). Effects of Estetrol on Migration and Invasion in T47-D Breast Cancer Cells through the Actin Cytoskeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 80.

Gourdy, P., Guillaume, M., Fontaine, C., Adlanmerini, M., Montagner, A., Laurell, H., Lenfant, F., and Arnal, J.-F. (2018). Estrogen receptor subcellular localization and cardiometabolism. *Mol Metab* 15, 56–69.

Guillaume, M., Riant, E., Fabre, A., Raymond-Letron, I., Buscato, M., Davezac, M., Tramunt, B., Montagner, A., Smati, S., Zahreddine, R., et al. (2019). Selective Liver Estrogen Receptor α Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice. *Hepatology* 3, 908–924.

Guivarc’h, E., Buscato, M., Guihot, A.-L., Favre, J., Vessières, E., Grimaud, L., Wakim, J., Melhem, N.-J., Zahreddine, R., Adlanmerini, M., et al. (2018). Predominant Role of Nuclear

Versus Membrane Estrogen Receptor α in Arterial Protection: Implications for Estrogen Receptor α Modulation in Cardiovascular Prevention/Safety. *J Am Heart Assoc* 7.

Gurpide, E., Schwers, J., Welch, M.T., Vande Wiele, R.L., and Lieberman, S. (1966). Fetal and maternal metabolism of estradiol during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26, 1355–1365.

Gutierrez-Grobe, Y., Ponciano-Rodríguez, G., Ramos, M.H., Uribe, M., and Méndez-Sánchez, N. (2010). Prevalence of non alcoholic fatty liver disease in premenopausal, postmenopausal and polycystic ovary syndrome women. The role of estrogens. *Ann Hepatol* 9, 402–409.

Hagen, A.A., Barr, M., and Diczfalusy, E. (1965). METABOLISM OF 17-BETA-OESTRADIOL-4-14-C IN EARLY INFANCY. *Acta Endocrinol.* 49, 207–220.

Handgraaf, S., Riant, E., Fabre, A., Waget, A., Burcelin, R., Lière, P., Krust, A., Chambon, P., Arnal, J.-F., and Gourdy, P. (2013). Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ER α activation function-2 (ER α AF-2), whereas ER α AF-1 is dispensable. *Diabetes* 62, 4098–4108.

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.

Hevener, A.L., Clegg, D.J., and Mauvais-Jarvis, F. (2015). Impaired estrogen receptor action in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418 Pt 3, 306–321.

Hodgin, J.B., Krege, J.H., Reddick, R.L., Korach, K.S., Smithies, O., and Maeda, N. (2001). Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in Apoe^{-/-} mice. *J. Clin. Invest.* 107, 333–340.

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.

Hodis, H.N., Mack, W.J., Henderson, V.W., Shoupe, D., Budoff, M.J., Hwang-Levine, J., Li, Y., Feng, M., Dustin, L., Kono, N., et al. (2016). Vascular Effects of Early versus Late Postmenopausal Treatment with Estradiol. *N. Engl. J. Med.* 374, 1221–1231.

Holinka, C.F., and Gurpide, E. (1979). In vivo effects of estetrol on the immature rat uterus. *Biol. Reprod.* 20, 242–246.

Holinka, C.F., Diczfalusy, E., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2008a). Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 110, 138–143.

Holinka, C.F., Brincat, M., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2008b). Preventive effect of oral estetrol in a menopausal hot flush model. *Climacteric* 11 Suppl 1, 15–21.

Hulley (1998). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Heart and Estrogen/progesti...* - PubMed - NCBI.

Kalin, M.F., and Zumoff, B. (1990). Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55, 330–352.

Kamada, Y., Kiso, S., Yoshida, Y., Chatani, N., Kizu, T., Hamano, M., Tsubakio, M., Takemura, T., Ezaki, H., Hayashi, N., et al. (2011). Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G1031-1043.

Kanaya, A.M., Herrington, D., Vittinghoff, E., Lin, F., Grady, D., Bittner, V., Cauley, J.A., Barrett-Connor, E., and Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (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.

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.

Kim, K.H., and Bender, J.R. (2009). Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 308, 3–8.

Kim, S.H., and Katzenellenbogen, J.A. (2006). Hormone–PAMAM Dendrimer Conjugates: Polymer Dynamics and Tether Structure Affect Ligand Access to Receptors. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 7243–7248.

Kobayashi, A., and Behringer, R.R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 4, 969–980.

Kumar, V., and Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55, 145–156.

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.

La Rosa, P., Pesiri, V., Leclercq, G., Marino, M., and Acconcia, F. (2012). Palmitoylation regulates 17 β -estradiol-induced estrogen receptor- α degradation and transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 26, 762–774.

Lannigan, D.A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1–9.

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.

Libby, P. (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104, 365–372.

Lonardo, A., Nascimbeni, F., Ballestri, S., Fairweather, D., Win, S., Than, T.A., Abdelmalek, M.F., and Suzuki, A. (2019). Sex Differences in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: State of the Art and Identification of Research Gaps. *Hepatology* 70, 1457–1469.

Madak-Erdogan, Z., Kim, S.H., Gong, P., Zhao, Y.C., Zhang, H., Chambliss, K.L., Carlson, K.E., Mayne, C.G., Shaul, P.W., Korach, K.S., et al. (2016). Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci Signal* 9, ra53.

Manson, J.E., Aragaki, A.K., Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Chlebowski, R.T., Howard, B.V., Thomson, C.A., Margolis, K.L., et al. (2017). Menopausal Hormone Therapy and Long-term All-Cause and Cause-Specific Mortality: The Women’s Health Initiative Randomized Trials. *JAMA* 318, 927–938.

Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N., et al. (2003). Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37, 917–923.

Margolis, K.L., Bonds, D.E., Rodabough, R.J., Tinker, L., Phillips, L.S., Allen, C., Bassford, T., Burke, G., Torrens, J., Howard, B.V., et al. (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, 1175–1187.

Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., and Hevener, A.L. (2013). The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocr. Rev.* 34, 309–338.

Mawet, M., Maillard, C., Klipping, C., Zimmerman, Y., Foidart, J.-M., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2015). Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 20, 463–475.

McKenna, N.J., and O’Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465–474.

McKenzie, J., Fisher, B.M., Jaap, A.J., Stanley, A., Paterson, K., and Sattar, N. (2006). Effects of HRT on liver enzyme levels in women with type 2 diabetes: a randomized placebo-controlled trial. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 65, 40–44.

Mittendorfer, B. (2005). Insulin resistance: sex matters. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8, 367–372.

Mohammed, H., D’Santos, C., Serandour, A.A., Ali, H.R., Brown, G.D., Atkins, A., Rueda, O.M., Holmes, K.A., Theodorou, V., Robinson, J.L.L., et al. (2013). Endogenous purification reveals GREB1 as a key estrogen receptor regulatory factor. *Cell Rep* 3, 342–349.

Monteleone, P., Mascagni, G., Giannini, A., Genazzani, A.R., and Simoncini, T. (2018). Symptoms of menopause - global prevalence, physiology and implications. *Nat Rev Endocrinol* 14, 199–215.

- Morselli, E., Santos, R.S., Criollo, A., Nelson, M.D., Palmer, B.F., and Clegg, D.J. (2017). The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 13, 352–364.
- O'Donnell, C.J., and Elosua, R. (2008). [Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study]. *Rev Esp Cardiol* 61, 299–310.
- Papachristou, E.K., Kishore, K., Holding, A.N., Harvey, K., Roumeliotis, T.I., Chilamakuri, C.S.R., Omarjee, S., Chia, K.M., Swarbrick, A., Lim, E., et al. (2018). A quantitative mass spectrometry-based approach to monitor the dynamics of endogenous chromatin-associated protein complexes. *Nat Commun* 9, 2311.
- 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.
- Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R.C.A., Kim, J.K., Hughes, C.C., and Levin, E.R. (2007). A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 282, 22278–22288.
- Pinkerton, J.V., Komm, B.S., and Mirkin, S. (2013). Tissue selective estrogen complex combinations with bazedoxifene/conjugated estrogens as a model. *Climacteric* 16, 618–628.
- Pollow, D.P., Romero-Aleshire, M.J., Sanchez, J.N., Konhilas, J.P., and Brooks, H.L. (2015). ANG II-induced hypertension in the VCD mouse model of menopause is prevented by estrogen replacement during perimenopause. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R1546–1552.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118, 829–838.
- 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.
- Riggs, B.L., Khosla, S., and Melton, L.J. (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr. Rev.* 23, 279–302.
- Ritchie, H., and Roser, M. (2018). Causes of Death. *Our World in Data*.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A.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.

Saczko, J., Michel, O., Chwiłkowska, A., Sawicka, E., Mączyńska, J., and Kulbacka, J. (2017). Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 227, 93–105.

Safe, S., Kim, K., 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.

Salpeter, S.R., Walsh, J.M.E., Ormiston, T.M., Greyber, E., Buckley, N.S., and Salpeter, E.E. (2006). Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab* 8, 538–554.

Scarabin, P.-Y., Oger, E., Plu-Bureau, G., and EStrogen and THromboEmbolism Risk Study Group (2003). Differential association of oral and transdermal oestrogen-replacement therapy with venous thromboembolism risk. *Lancet* 362, 428–432.

Schierbeck, L.L., Rejnmark, L., Tofteng, C.L., Stilgren, L., Eiken, P., Mosekilde, L., Køber, L., and Jensen, J.-E.B. (2012). Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial. *BMJ* 345, e6409.

Shi, H., and Clegg, D.J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol. Behav.* 97, 199–204.

Smirnova, N.F., Fontaine, C., Buscato, M., Lupieri, A., Vinel, A., Valera, M.-C., Guillaume, M., Malet, N., Foidart, J.-M., Raymond-Letron, I., et al. (2015). The Activation Function-1 of Estrogen Receptor Alpha Prevents Arterial Neointima Development Through a Direct Effect on Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 117, 770–778.

Stampfer, M.J., and Colditz, G.A. (1991). Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 20, 47–63.

Stanczyk, F.Z., and Clarke, N.J. (2014). Measurement of estradiol--challenges ahead. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 56–58.

Stols-Gonçalves, D., Hovingh, G.K., Nieuwdorp, M., and Holleboom, A.G. (2019). NAFLD and Atherosclerosis: Two Sides of the Same Dysmetabolic Coin? *Trends Endocrinol. Metab.* 30, 891–902.

Suzuki, A., and Abdelmalek, M.F. (2009). Nonalcoholic fatty liver disease in women. *Womens Health (Lond)* 5, 191–203.

Tarhouni, K., Guihot, A.L., Freidja, M.L., Toutain, B., Henrion, B., Baufreton, C., Pinaud, F., Procaccio, V., Grimaud, L., Ayer, A., et al. (2013). Key role of estrogens and endothelial estrogen receptor α in blood flow-mediated remodeling of resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 605–611.

Tarhouni, K., Guihot, A.-L., Vessières, E., Toutain, B., Procaccio, V., Grimaud, L., Loufrani, L., Lenfant, F., Arnal, J.-F., and Henrion, D. (2014). Determinants of flow-mediated outward

remodeling in female rodents: respective roles of age, estrogens, and timing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 1281–1289.

Toutain, C.E., Filipe, C., Billon, A., Fontaine, C., Bouchet, L., Guéry, J.-C., Gourdy, P., Arnal, J.-F., and Lenfant, F. (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.

Tramunt, B., Smati, S., Grandgeorge, N., Lenfant, F., Arnal, J.-F., Montagner, A., and Gourdy, P. (2020). Sex differences in metabolic regulation and diabetes susceptibility. *Diabetologia* *63*, 453–461.

Valera, M.-C., Gourdy, P., Trémollières, F., and Arnal, J.-F. (2015). From the Women's Health Initiative to the combination of estrogen and selective estrogen receptor modulators to avoid progestin addition. *Maturitas* *82*, 274–277.

Vinel, A., Coudert, A.E., Buscato, M., Valera, M.-C., Ostertag, A., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Berdal, A., Babajko, S., Arnal, J.-F., et al. (2018). Respective role of membrane and nuclear estrogen receptor (ER) α in the mandible of growing mice: Implications for ER α modulation. *J. Bone Miner. Res.* *33*, 1520–1531.

Visser, M., and Coelingh Bennink, H.J.T. (2009). Clinical applications for estetrol. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *114*, 85–89.

Visser, M., Kloosterboer, H.J., and Bennink, H.J.T.C. (2012). Estetrol prevents and suppresses mammary tumors induced by DMBA in a rat model. *Horm Mol Biol Clin Investig* *9*, 95–103.

Vogel, H., Wolf, S., Rabasa, C., Rodriguez-Pacheco, F., Babaei, C.S., Stöber, F., Goldschmidt, J., DiMarchi, R.D., Finan, B., Tschöp, M.H., et al. (2016). GLP-1 and estrogen conjugate acts in the supramammillary nucleus to reduce food-reward and body weight. *Neuropharmacology* *110*, 396–406.

Wang, Z., Xu, M., Hu, Z., and Shrestha, U.K. (2015). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its metabolic risk factors in women of different ages and body mass index. *Menopause* *22*, 667–673.

Weston, S.R., Leyden, W., Murphy, R., Bass, N.M., Bell, B.P., Manos, M.M., and Terrault, N.A. (2005). Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology* *41*, 372–379.

Woodruff, J.D., and Pickar, J.H. (1994). Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. The Menopause Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *170*, 1213–1223.

Xu, Y., Nedungadi, T.P., Zhu, L., Sobhani, N., Irani, B.G., Davis, K.E., Zhang, X., Zou, F., Gent, L.M., Hahner, L.D., et al. (2011). Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab.* *14*, 453–465.

Yaffe, K., Sawaya, G., Lieberburg, I., and Grady, D. (1998). Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 279, 688–695.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.

Zhu, L., Brown, W.C., Cai, Q., Krust, A., Chambon, P., McGuinness, O.P., and Stafford, J.M. (2013). Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes* 62, 424–434.

Zhu, L., Shi, J., Luu, T.N., Neuman, J.C., Trefts, E., Yu, S., Palmisano, B.T., Wasserman, D.H., Linton, M.F., and Stafford, J.M. (2018). Hepatocyte estrogen receptor alpha mediates estrogen action to promote reverse cholesterol transport during Western-type diet feeding. *Mol Metab* 8, 106–116.

Ziel, H.K., and Finkle, W.D. (1975). Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N. Engl. J. Med.* 293, 1167–1170.

Zuconni, G., Lisboa, B.P., Simonitsch, E., Roth, L., Hagen, A.A., and Diczfalusy, E. (1967). Isolation of 15-alpha-hydroxy-oestriol from pregnancy urine and from the urine of newborn infants. *Acta Endocrinol.* 56, 413–423.

The National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Program: Osteoporosis.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Predominant role of nuclear *versus* membrane estrogen receptor (ER) α in arterial protection: implications for ER α modulation in cardiovascular prevention/safety

Emmanuel Guivarc'h*, **Mélissa Buscato***, Anne-Laure Guihot, Julie Favre, Emilie Vessières, Linda Grimaud, Jamal Wakim, Nada-Joe Melhem, Rana Zahreddine, Marine Adlanmerini, Laurent Loufrani, Claude Knauf, John A. Katzenellenbogen, Benita S. Katzenellenbogen, Jean-Michel Foidart, Pierre Gourdy, Françoise Lenfant, Jean-François Arnal, *Daniel Henrion, *Coralie Fontaine

J Am Heart Assoc. 2018 Jun 29;7(13). pii: e008950. doi: 10.1161/JAHA.118.008950.

ANNEXE 2 :

The tissue-specific effects of different 17 β -estradiol doses reveal the key sensitizing role of AF1 domain in ER α activity

Coralie Fontaine*, **Mélissa Buscato***, Alexia Vinel, Frank Giton, Isabelle Raymond-Letron, Sung Hoon Kim, Benita S. Katzenellenbogen, John A. Katzenellenbogen, Pierre Gourdy, Alain Milon, Gilles Flouriot, Claes Ohlsson, Françoise Lenfant and Jean-François Arnal.

Mol Cell Endocrinol. 2020 Apr 5;505:110741. doi: 10.1016/j.mce.2020.110741. Epub 2020 Jan 28

ANNEXE 3 :

Estetrol prevents diet-induced metabolic disorders, such as obesity and atheroma, in an ER α liver-independent manner

Mélissa Buscato*, Morgane Davezac*, Rana Zahreddine, Marianne Fillet, Gael Cobraiville, Marine Adlanmerini, Cedric Moro, Raphaël Métivier, Françoise Lenfant, Pierre Gourdy, Jean-François Arnal*, Coralie Fontaine*

(Article en préparation)

ANNEXE 1 :

Predominant role of nuclear *versus* membrane estrogen receptor (ER) α in arterial protection: implications for ER α modulation in cardiovascular prevention/safety

Emmanuel Guivarc'h*, **Mélissa Buscato***, Anne-Laure Guihot, Julie Favre, Emilie Vessières, Linda Grimaud, Jamal Wakim, Nada-Joe Melhem, Rana Zahreddine, Marine Adlanmerini, Laurent Loufrani, Claude Knauf, John A. Katzenellenbogen, Benita S. Katzenellenbogen, Jean-Michel Foidart, Pierre Gourdy, Françoise Lenfant, Jean-François Arnal, *Daniel Henrion, *Coralie Fontaine

J Am Heart Assoc. 2018 Jun 29;7(13). pii: e008950. doi: 10.1161/JAHA.118.008950.

Predominant Role of Nuclear Versus Membrane Estrogen Receptor α in Arterial Protection: Implications for Estrogen Receptor α Modulation in Cardiovascular Prevention/Safety

Emmanuel Guivarc'h, PhD;* MéliSSa Buscato, BS;* Anne-Laure Guihot, BS; Julie Favre, PhD; Emilie Vessières, BS; Linda Grimaud, BS; Jamal Wakim, PhD; Nada-Joe Melhem, BS; Rana Zahreddine, BS; Marine Adlanmerini, PhD; Laurent Loufrani, PhD; Claude KnauF, PhD; John A. Katzenellenbogen, PhD; Benita S. Katzenellenbogen, PhD; Jean-Michel Foidart, MD, PhD; Pierre Gourdy, MD, PhD; Françoise Lenfant, PhD; Jean-François Arnal, MD, PhD; Daniel Henrion, PharmD, PhD;* Coralie Fontaine, PhD*

Background—Although estrogen receptor α (ER α) acts primarily as a transcription factor, it can also elicit membrane-initiated steroid signaling. Pharmacological tools and transgenic mouse models previously highlighted the key role of ER α membrane-initiated steroid signaling in 2 actions of estrogens in the endothelium: increase in NO production and acceleration of reendothelialization.

Methods and Results—Using mice with ER α mutated at cysteine 451 (ER α C451A), recognized as the key palmitoylation site required for ER α plasma membrane location, and mice with disruption of nuclear actions because of inactivation of activation function 2 (ER α AF20 = ER α AF2 $^\circ$), we sought to fully characterize the respective roles of nuclear *versus* membrane-initiated steroid signaling in the arterial protection conferred by ER α . ER α C451A mice were fully responsive to estrogens to prevent atheroma and angiotensin II-induced hypertension as well as to allow flow-mediated arteriolar remodeling. By contrast, ER α AF20 mice were unresponsive to estrogens for these beneficial vascular effects. Accordingly, selective activation of nuclear ER α with estetrol was able to prevent hypertension and to restore flow-mediated arteriolar remodeling.

Conclusions—Altogether, these results reveal an unexpected prominent role of nuclear ER α in the vasculoprotective action of estrogens with major implications in medicine, particularly for selective nuclear ER α agonist, such as estetrol, which is currently under development as a new oral contraceptive and for hormone replacement therapy in menopausal women. (*J Am Heart Assoc.* 2018;7:e008950. DOI: 10.1161/JAHA.118.008950.)

Key Words: arteriolar remodeling • atherosclerosis • estrogen • hypertension • nuclear receptor

From the institut des maladies des mitochondries, du cœur et des vaisseaux (MITOVASC) Institute, Cardiovascular Functions investigation (CARFI) Facility, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1083, Unité mixte de Recherche du Centre national de la recherche scientifique (UMR CNRS) 6015, University of Angers, France (E.G., A.-L.G., J.F., E.V., L.G., J.W., N.-J.M., L.L., D.H.); Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U 1048, University of Toulouse 3, France (M.B., R.Z., M.A., C.K., P.G., F.L., J.-F.A., C.F.); Departments of Chemistry and Molecular and Integrative Physiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL (J.A.K., B.S.K.); and Groupe Interdisciplinaire de Génomique Appliquée, Université de Liège, Belgium (J.-M.F.).

Accompanying Figures S1 through S3 are available at <http://jaha.ahajournals.org/content/7/13/e008950/DC1/embed/inline-supplementary-material-1.pdf>

*Dr Guivarc'h, Dr Buscato, Dr Henrion, and Dr Fontaine contributed equally to this work.

Correspondence to: Jean-François Arnal, MD, PhD, INSERM/UPS UMR 1048—I2MC, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, 1 Ave Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. E-mail: jeanfrancois.arnal@inserm.fr

Received March 26, 2018; accepted April 20, 2018.

© 2018 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Hypertension affects 1 of 4 women worldwide, and its prevalence is particularly high among women >60 years of age. Indeed, the first decade after menopause is accompanied by an increase in blood pressure and has been associated with a higher risk of cardiovascular diseases, such as myocardial infarction and stroke.¹ In line with these epidemiological data, clinical and preclinical studies show considerable evidence that estrogen modulates cardiovascular physiological features and function.² Even if the publication of the Women's Health Initiative in 2002^{3,4} did not initially confirm the expected protective action of estrogens against coronary heart disease and questioned their overall benefit, subgroup analysis suggested that women who initiated hormone therapy soon after the onset of menopause had reduced coronary artery events, in contrast to the increased risk in more aged women.⁵ All experimental data demonstrate major atheroprotective actions of estrogens. In particular, 17 β -estradiol strongly prevents lipid deposition in mouse models of atherosclerosis: apolipoprotein E-deficient^{6,7} and low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLR $^{-/-}$)⁸ mice. In

Clinical Perspective

What Is New?

- Although most vasculoprotective effects studied until now in mouse models were shown to be mediated by membrane estrogen receptor α actions, the present results reveal that experimental prevention against atheroma and hypertension required only 17 β -estradiol-mediated nuclear actions.

What Are the Clinical Implications?

- Estetrol, as a selective nuclear estrogen receptor α agonist that does not alter circulating coagulation factors, could now be considered as an alternative estrogen for women's health treatment in contraception or menopause.

addition, in several experimental models of hypertension, ovariectomy exacerbates, whereas estrogen replacement attenuates, the course of hypertension^{9,10} and reduces arterial stiffening associated with hypertension or aging.¹¹ 17 β -estradiol also increases basal nitric oxide (NO) production,¹² accelerates reendothelialization,^{8,13} and prevents postinjury medial as well as neointimal hyperplasia after vessel injury.¹⁴ Finally, 17 β -estradiol plays a crucial role in the ability of resistance arteries to remodel in response to a long-term increase in blood flow, which is necessary to optimize tissue perfusion.^{11,15}

Two nuclear receptors, estrogen receptors (ERs) α and β , have been reported to mediate cardiovascular protection conferred by estrogens.¹⁶ ER β plays a key role in cardiac protection,¹⁷ and ER α , especially in the endothelium, is involved in the beneficial vascular actions of 17 β -estradiol.¹⁸ Indeed, most of the vascular actions of 17 β -estradiol are abrogated in mice lacking ER α in both endothelial and hematopoietic cells by breeding Tie2-Cre transgenic mice (expressing the Cre recombinase under the control of the endothelial tyrosine-protein kinase receptor (Tie2) promoter) with ER α -floxed mice at exon 2 (ER $\alpha^{\text{lox/lox}}$).^{8,15,19} Thus, the endothelium, a guardian of arterial integrity, represents a promising cellular target for 17 β -estradiol via the activation of ER α .¹⁸ Beside the well-recognized role of nuclear ER α , which regulates target gene transcription (genomic action) through activation functions (AFs) 1 and 2,^{16,20} a subpopulation of ER α is present at or near the plasma membrane, where it can elicit rapid, nongenomic, membrane-initiated steroid signaling (MISS) effects.^{21–25}

Recently, we generated a mouse model in which membrane ER α localization was abrogated by a point mutation of the palmitoylation site of ER α (mice with ER α mutated at cysteine 451 [ER α -C451A]), leading to an abrogation of endothelial NO synthase (eNOS) phosphorylation and acceleration of reendothelialization in response to 17 β -estradiol.²² The estrogen-dendrimer conjugate (EDC) and “pathway

preferential estrogens” (PaPEs) are highly effective in stimulating nonnuclear signaling, but they are inefficient in stimulating nuclear ER target gene expression.^{23,26} More important, in vivo administration of EDC or PaPE-1 accelerates repair of endothelial damage.^{23,26} In addition, EDC and PaPE-1 both favor the production of endothelial NO,²² a vasculoprotective agent of the arteries, initially viewed as an important mechanism of the protective action of 17 β -estradiol against the development of atheroma and hypertension.²⁷ Our arsenal of pharmacological tools has recently been enriched with estetrol, a fetal estrogen produced exclusively by the liver of humans (and to a smaller extent in large apes). We demonstrated that although estetrol nicely induced ER α target gene transcription, it failed to promote eNOS activation and to accelerate endothelial healing, but also antagonized both of these 17 β -estradiol MISS-dependent effects.²⁸ Altogether, these powerful pharmacological tools allow us to uncouple nuclear and membrane actions of ER α with a selective activation of MISS using PaPE-1 or EDC and of nuclear ER α using estetrol. The novel understanding of action of this new class of selective ER modulator-like molecules led to the idea that they would decrease the proliferative action of estrogens^{23,29} and, thereby, lower the risk of breast and/or uterine cancer induced by sex hormones.^{30,31}

In the present work, using these pharmacological tools of gain of function (EDC, PaPE-1, and estetrol) and genetically modified mouse models of ER α loss of function (Using mice with ER α mutated at cysteine 451, recognized as the key palmitoylation site required for ER α plasma membrane location (ER α C451A), and mice with disruption of nuclear actions because of inactivation of activation function 2 (ER α AF2^o)), we sought to further explore the role of ER α MISS in the prevention of atherosclerotic lesions and hypertension and in the promotion of arteriolar remodeling, 3 crucial pathophysiological aspects of the vasculoprotective actions of estrogens.

Methods

The data, analytical methods, and study materials will not be made available to other researchers for purposes of reproducing the results or replicating the procedure.

Mice

All procedures involving experimental animals were performed in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research and were approved by the local Animal Care and Use Committee. The investigation conforms to the directive 2010/63/EU of the European parliament. To generate the double-deficient mice,

LDLr^{-/-} female mice, purchased from Charles River (L'Arbresle, France), were crossed with ER α -C451A^{+/-} mice.²² ER α -AF20 mice were generated, as previously described,³² and were kindly provided by Professor P. Chambon (Strasbourg, France). Mice are on a C57Bl/6 background, and genetically manipulated mice are systematically compared with their wild-type (WT) littermates controls (n=7–12 per group). For short-term 17 β -estradiol treatment, bilateral ovariectomy was performed when the mice were 4 weeks old and then, 2 weeks after surgery, mice were injected SC with either vehicle or 17 β -estradiol (8 μ g/kg). Mice were euthanized 6 hours after the injection to study the short-term effect of 17 β -estradiol on gene expression. Before surgical and euthanasia procedures, mice were anesthetized with a combination of ketamine hydrochloride (100 mg/kg; Panpharma) and xylazine (5 mg/kg; Sigma-Aldrich) by IP injection.

Real-Time NO Production

Aortas from intact mice (10–12 weeks/n=6 per group) were quickly harvested and maintained in 200 μ L Krebs-Ringer oxygenated solution containing 2.5 mmol/L glucose at 37°C. A NO-specific amperometric probe (ISO-NOPF100; World Precision Instruments, Sarasota, FL) was implanted directly in the tissue, and NO release was monitored. The aortas were exposed to 17 β -estradiol (10⁻⁸ mol/L) or vehicle (dimethyl sulfoxide). The concentration of NO gas in the tissue was measured in real time with the data acquisition system LabTrax (World Precision Instruments) connected to the free radical analyzer Apollo1000 (World Precision Instruments). Data acquisition and analysis were performed with DataTrax2 software (World Precision Instruments). The NO-specific amperometric probe was calibrated, as previously described.²⁸

Analyses of Atherosclerosis Lesions

Bilateral ovariectomy was performed, as previously described. Two weeks after surgery, mice were switched to a hypercholesterolemic-atherogenic diet (1.25% cholesterol, 6% fat, no cholate; TD96335; Harlan Teklad, Madison, WI) and concomitantly received long-term estrogenic treatments. Mice were implanted with subcutaneous pellets releasing either placebo or 17 β -estradiol (60-day release, 0.1 mg [ie, 80 μ g/kg per day]) at weeks 6 and 12. To evaluate the atheroprotective role of selective activation of ER α MISS, mice received subcutaneous miniosmotic pumps (Alzet, model 2004; 0.25 μ L/h, 28 days), releasing either empty dendrimer or EDC (240 μ g/kg per day); or pellet, releasing either a placebo or equivalent dose of 17 β -estradiol (pellet, 0.25 mg [ie, 240 μ g/kg per day]; Innovative Research of America, Sarasota, FL) or PaPE-1 (8.5-mg compound mixed with cholesterol to a total weight of 20 mg) at weeks 6 and 10. At the end of the protocol,

overnight fasted mice were anesthetized with a combination of ketamine hydrochloride (100 mg/kg; Panpharma) and xylazine (5 mg/kg; Sigma-Aldrich) via intraperitoneal injection, and blood was collected from retro-orbital venous plexus. After euthanasia, the heart, the thoracic aorta, the liver, and the uterus were carefully dissected.

Lipid deposition size was estimated at the aortic sinus, as previously described.^{8,32} Briefly, each heart was frozen on a cryostat mount with optimal cutting temperature compound. One hundred 10- μ m-thick sections 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. Ten sections of the 100, each separated by 90 μ m, were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions using a computerized Biocom morphometry system. The first and most proximal section to the heart was taken 90 μ m distal to the point where the aorta first becomes rounded. The mean lesion size (expressed in μ m²) in these 10 sections was used to evaluate the lesion size of each animal.

En face aorta analyses were analyzed at 8 months of age. The heart was perfusion fixed in situ with 10% phosphate-buffered formalin for 10 minutes. After the perfusion, the abdominal cavity was opened and the internal organs were removed. The aorta from the arch to bifurcation was carefully cleaned from periadventitial connective tissue. Then, the aorta was opened longitudinally by an incision along its ventral aspect. The thoracic and abdominal parts of the aorta were pinned out flat (using 10-mm tips of dental root-canal needles).

Determination of Plasma Lipids

Overnight fasted mice were anesthetized, and blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus. Total plasma cholesterol was assayed using the CHOD-PAD kit (Horiba ABX, Montpellier, France). The high-density lipoprotein fraction was isolated from 10 μ L of serum and assayed using the "C-HDL+Third generation" kit (Roche, Lyon, France).

Analysis of mRNA Levels by Real-Time Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction

Tissues were dissected and frozen. They 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 500 ng (aorta) or 1 μ g (liver) was reverse transcribed for 10 minutes at 25°C and 2 hours at 37°C in a 20- μ L final

volume using the High Capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative polymerase chain reactions were performed on the StepOne instrument (Applied Biosystems). Primers were validated by testing polymerase chain reaction efficiency using standard curves ($95\% \leq \text{efficiency} \leq 105\%$). Gene expression was quantified using the comparative threshold cycle method; tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1) (aorta) or Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIA) (liver) was used as reference.

Blood Pressure Measurement

As previously shown,³³ systolic blood pressure (SBP) was measured every day using photoplethysmography (BP-2000 Blood Pressure Analysis System; Visitech Systems). Female mice (aged 12–16 weeks) were divided into the following groups: ER $\alpha^{-/-}$, ER α -C451A, and ER α AF20 mice associated with their corresponding littermates. In all groups, mice were acclimated to the technique for 2 weeks (week “–2” to “–1”) before measuring basal SBP for 1 week (week “0”). Mice were then subjected to sham operation or were implanted SC with osmotic minipumps (Alzet, model 2004; 0.25 $\mu\text{L}/\text{h}$, 28 days) releasing angiotensin II (AngII; 0.5 mg/kg per day; Bachem, no. 4006473; solubilized in NaCl 0.9%) for 4 weeks to induce hypertension.³⁴ After surgery, mice were allowed to recover for 3 to 5 days, and SBP was measured daily during 4 weeks. The weekly average of SBP evolution pre- and post-AngII treatment was represented as mean of 5 days of SBP measurements (from week 0 to week 4). To assess the effect of estetrol in AngII-treated mice, ovariectomy was performed 2 weeks before implantation of osmotic minipump containing AngII and estetrol (AngII, 0.5 mg/kg per day, and estetrol, 6 mg/kg per day; solubilized in 50% PBS+50% dimethyl sulfoxide). Surgery was performed under isoflurane (2%) anesthesia. Analgesia was obtained with buprenorphine (Temgesic; 0.1 mg/kg, SC) before and after surgery.

Histomorphometry

AngII arterial remodeling was evaluated on thoracic aorta. Transverse aortic segments were dissected, embedded in Tissue-tek (Sakura Finetek), and cut in 7- μm sections (Cryostat CM3050 S; Leica). Orceine was used to stain elastic fibers in the thoracic aorta media to measure media thickness/surface and lumen surface. Image acquisition was performed using Histolab, and measurements were performed using ImageJ 1.47v.

Blood Flow–Mediated Arterial Remodeling

Increase in blood flow, applied to the mesenteric artery, was performed, as previously described, on 4- to 5-month-old

female mice.¹⁵ Briefly, 3 consecutive first-order mesenteric arteries were used, and surgery consisted of ligatures of second-order branches. The artery located between the 2 ligated arteries was designated as the high-flow artery. Arteries located at a distance of the ligated arteries were used as controls (normal flow). After 14 days, mice were euthanized and mesenteric arteries were collected. In each protocol, animals were anesthetized with isoflurane (2.5%). They were treated with buprenorphine (Temgesic; 0.1 mg/kg, SC) before and after surgery. The protocol was approved by the ethical committee (Protocol CEEA PdL 2012-105).

Flow-Mediated Dilation

First- or second-order mesenteric arterial segments were isolated and mounted onto an arteriograph system (Living System; LSI, Burlington, VT) in physiological saline solution (37°C, pH 7.4; partial pressure of O₂, 160 mm Hg; and partial pressure of CO₂, 37 mm Hg). This video-monitored perfusion system allowed us to follow changes in arterial internal diameter of pressurized arteries (Pression: 75 mm Hg; diameter, 270 μm) after they were cannulated on glass microcannulas connected to 2 peristaltic pumps, 1 controlling flow rate and 1 under the control of a pressure-servo control system.³⁵ Pressure at both ends of the artery segment was monitored using pressure transducers. After the arteries were pressurized at 75 mm Hg, a 20-minute equilibration period was provided and endothelial function was assessed through vasodilatory response to acetylcholine (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$) after pre-contraction with phenylephrine (10^{-6} mol/L). Arteries were then washed and allowed to recover for 20 minutes. After an equilibration period at low flow (3 $\mu\text{L}/\text{min}$) for 10 minutes, arteries were precontracted (phenylephrine, 10^{-6} mol/L) and step increases in intraluminal flow (2-minute step from 3–50 $\mu\text{L}/\text{min}$) were generated through the distal pipette with a peristaltic pump. The effect of estetrol on flow-mediated dilation was evaluated *ex vivo* on arteries incubated with estetrol (10^{-6} mol/L) for 30 minutes before assessing arterial responses to flow. At the end of the experiment, arteries were bathed in a Ca²⁺-free PSS containing ethylene-bis-(oxyethylene-nitrolo) tetra-acetic acid (2 mol/L) and sodium nitropruside (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) to measure maximal passive diameter.³⁶

Statistical Analyses

To test the respective roles of 17 β -estradiol treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed for atherosclerosis experiment. When an interaction was observed between the 2 factors, the effect of 17 β -estradiol treatment was studied in each genotype using a Bonferroni post test. A 2-way ANOVA for repeated measures was used for hypertension, flow-mediated remodeling (FMR), and flow-mediated dilation

experiments. To test the respective roles of 17 β -estradiol and EDC treatment, a 1-way ANOVA was performed, followed by a Bonferroni post test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Short-Term 17 β -Estradiol Treatment Induces Transcriptional Response But Not NO Production in Aorta From ER α -C451A Mice

To evaluate the potential cross talk between MISS and nuclear ER α in blood vessels, we first compared gene expression profiles in the aorta from ER $\alpha^{-/-}$, ER α -C451A, and ER α AF20 mice, including their littermate controls, after short-term 17 β -estradiol administration (6 hours). Two genes among the most induced by 17 β -estradiol in the aorta^{32,37} (ie, Gremlin 2 and UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase-like 2) were analyzed. Their transcriptional regulation is entirely ER α dependent because no gene regulation was observed in aortas from ER $\alpha^{-/-}$ mice (Figure 1A). Similarly, induction of these ER α target genes was totally abrogated in ER α AF20 mice, whereas targeting membrane ER α , in ER α -C451A mice, has a minor impact, affecting only modestly the most regulated gene by 17 β -estradiol, Gremlin 2 (Figure 1A). By contrast, although 17 β -estradiol (10^{-8} mol/L) rapidly induced NO production by aorta in WT mice, it failed to induce NO production in aorta from ER α -C451A mice (Figure 1B). These results further demonstrate that, in ER α -C451A mice, eNOS activation in response to 17 β -estradiol is abrogated, indicating the abolition of ER α MISS, whereas nuclear ER α activity in the arterial wall is preserved.

By Contrast With Nuclear ER α -AF2, ER α MISS Is Neither Necessary Nor Sufficient for Estrogen-Mediated Atheroprotection

We then investigated the role of ER α MISS actions on arteries submitted to an atherogenic stress using ER α -C451A mice bred with LDLr $^{-/-}$ mice (Figure 2A). As expected, ovariectomy led to uterine atrophy, whereas exogenous 17 β -estradiol replacement induced uterine hypertrophy in both ER α -WT/LDLr $^{-/-}$ and ER α -C451A/LDLr $^{-/-}$ mice (Figure 2B and 2C). In addition, 17 β -estradiol treatment similarly decreased fatty streak deposits at the aortic sinus of both ER α -WT/LDLr $^{-/-}$ and ER α -C451A/LDLr $^{-/-}$ mice (Figure 2D and 2E). Accordingly, gene expression of atherosclerosis markers, such as vascular cell adhesion molecule 1 or Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), was decreased in 17 β -estradiol-treated mice aorta, irrespective of the genotype (Figure 2F).

As expected, 17 β -estradiol significantly decreased cholesterolemia in ovariectomized ER α -WT/LDLr $^{-/-}$ mice and in ER α -C451A/LDLr $^{-/-}$ mice (Figure 2G).

In addition, endogenous estrogens decreased the lesion size on later stages of atheroma, as demonstrated by analysis of “en face” preparations of the aortic tree from 8-month-old ovariectomized *versus* sham-operated female WT mice (Figure 3A). This protective effect was abolished in ER α AF20/LDLr $^{-/-}$ mice (Figure 3B), confirming that atheroprotection required nuclear ER α , as previously shown in aortic sinus at earlier stages.³² However, compared with ER α -WT/LDLr $^{-/-}$ mice, endogenous 17 β -estradiol similarly prevented atheroma in intact ER α -C451A/LDLr $^{-/-}$ mice, demonstrating that ER α MISS is fully dispensable for the atheroprotective effect of endogenous estrogens (Figure 3C).

We then assessed whether selective activation of ER α MISS was sufficient to prevent early atheroma in LDLr $^{-/-}$ mice under an atherogenic diet using 2 unique pharmacological tools: PaPE-1 and EDC. As previously described, these 2 molecules did not induce uterine hypertrophy (Figure 4A and 4B) but were able to induce transcriptional responses, such as increase in adiponectin mRNA level in the liver (Figure 4C), as previously reported.²⁶ However, although 17 β -estradiol decreases plasma cholesterol, PaPE-1 or EDC do not (Figure 4D). In addition, doses of EDC or PaPE-1, previously shown to accelerate reendothelialization,^{23,26} did not prevent lipid deposition at the aortic sinus from LDLr $^{-/-}$ mice fed a hypercholesterolemic diet (Figure 4E and 4F). By contrast, equivalent dose of 17 β -estradiol prevented atheroma deposition by up to 70%. Altogether, the use of both genetically deficient mice and pharmacological tools consistently demonstrated that ER α MISS is neither necessary nor sufficient for the atheroprotective effect mediated by ER α activation, by contrast with nuclear ER α AF2.

Endogenous Estrogens Prevent Hypertension in ER α -C451A Mice But Not in ER α -AF20 Mice

We then explored the role of ER α MISS actions in animals submitted to hypertensive stress. Endogenous estrogens protected WT female mice from AngII-induced hypertension, as demonstrated by a greater increase in SBP in ovariectomized mice than in intact mice (Figure S1A). We then evaluated the respective protective role of ER α , ER α MISS, and nuclear ER α in AngII-induced hypertension using ER $\alpha^{-/-}$, ER α -C451A, and ER α -AF20 intact mice and their respective littermate controls (Figure 5A). In the different WT littermate control mice, 4 weeks of AngII infusion increased SBP. The hypertensive effect of AngII was significantly exacerbated in ER $\alpha^{-/-}$ mice (Figure 5B) but not in ER $\beta^{-/-}$ mice (Figure S2), showing that the beneficial effect of endogenous estrogens is ER α dependent. Moreover, the blood pressure increase

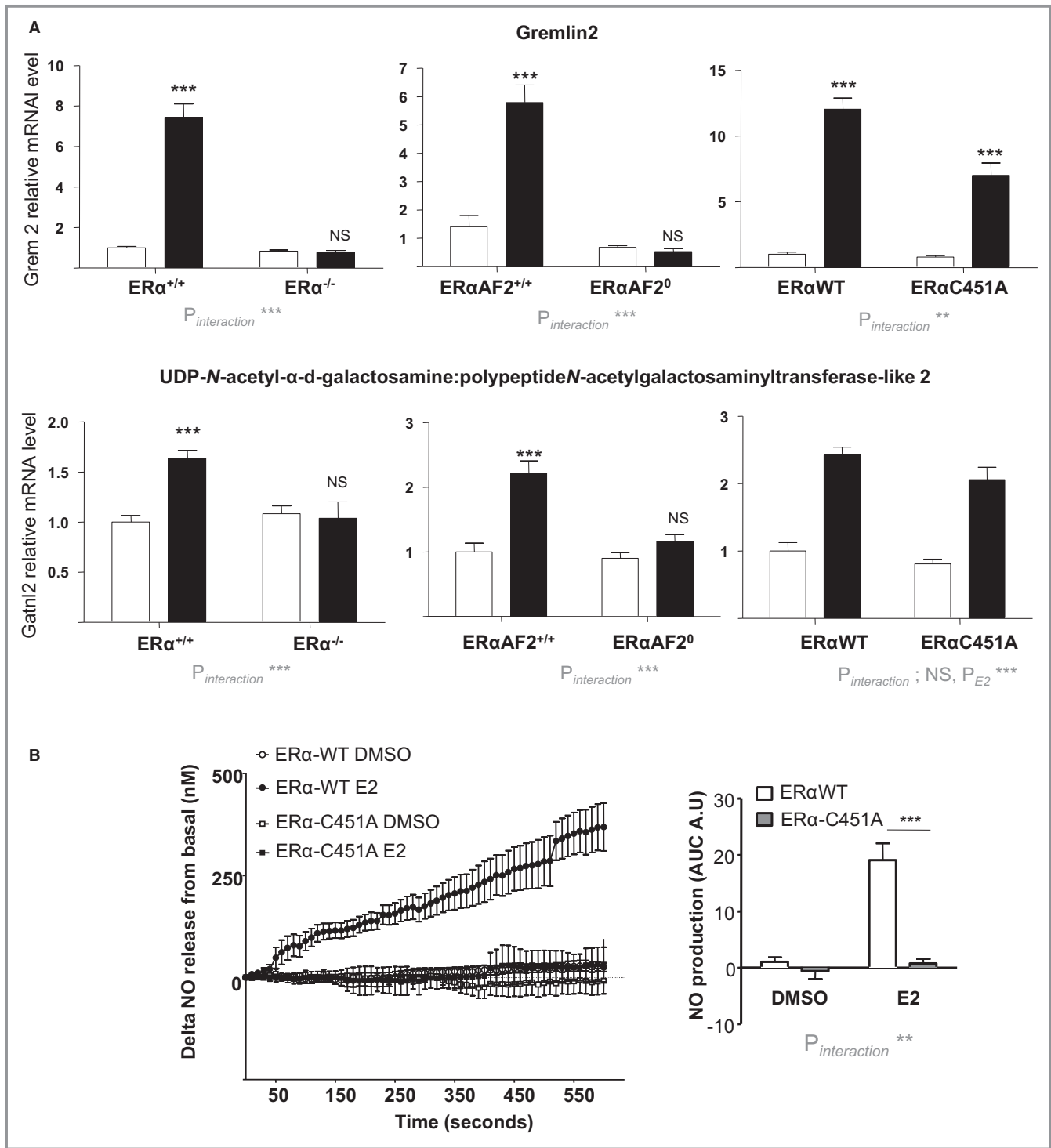


Figure 1. 17 β -Estradiol (E2) induces transcriptional response but not NO production in aorta from estrogen receptor α mutated at cysteine 451 (ER α -C451A) mice. A, Four-week-old ovariectomized ER α ^{-/-}, deficient for activation function-2 ER α -AF20, and ER α -C451A mice or their respective littermate control mice (n=7–9 per group) received short-term E2 subcutaneous injection. Six hours after, mRNA levels of the indicated gene from aorta were quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction and normalized to TPT1 mRNA levels. Results are expressed according to the level in aorta from vehicle-treated ER α -wild type (WT) set as 1. B, Representative trace of ex vivo amperometric measurements of NO release of aorta from 10- to 12-week-old ER α -C451A or their littermate control mice exposed to E2 (10⁻⁸ mol/L) and area under the curve (AUC) quantification. Results are expressed as means \pm SEM. To test the respective roles of E2 treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When an interaction was observed between the 2 factors, effect of E2 treatment was studied in each genotype using a Bonferroni post test. AU indicates arbitrary unit; DMSO, dimethyl sulfoxide; Gatn12, UDP-N-acetyl- α -d-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2; Grem2, Gremlin 2; NS, not significant. ***P<0.001.

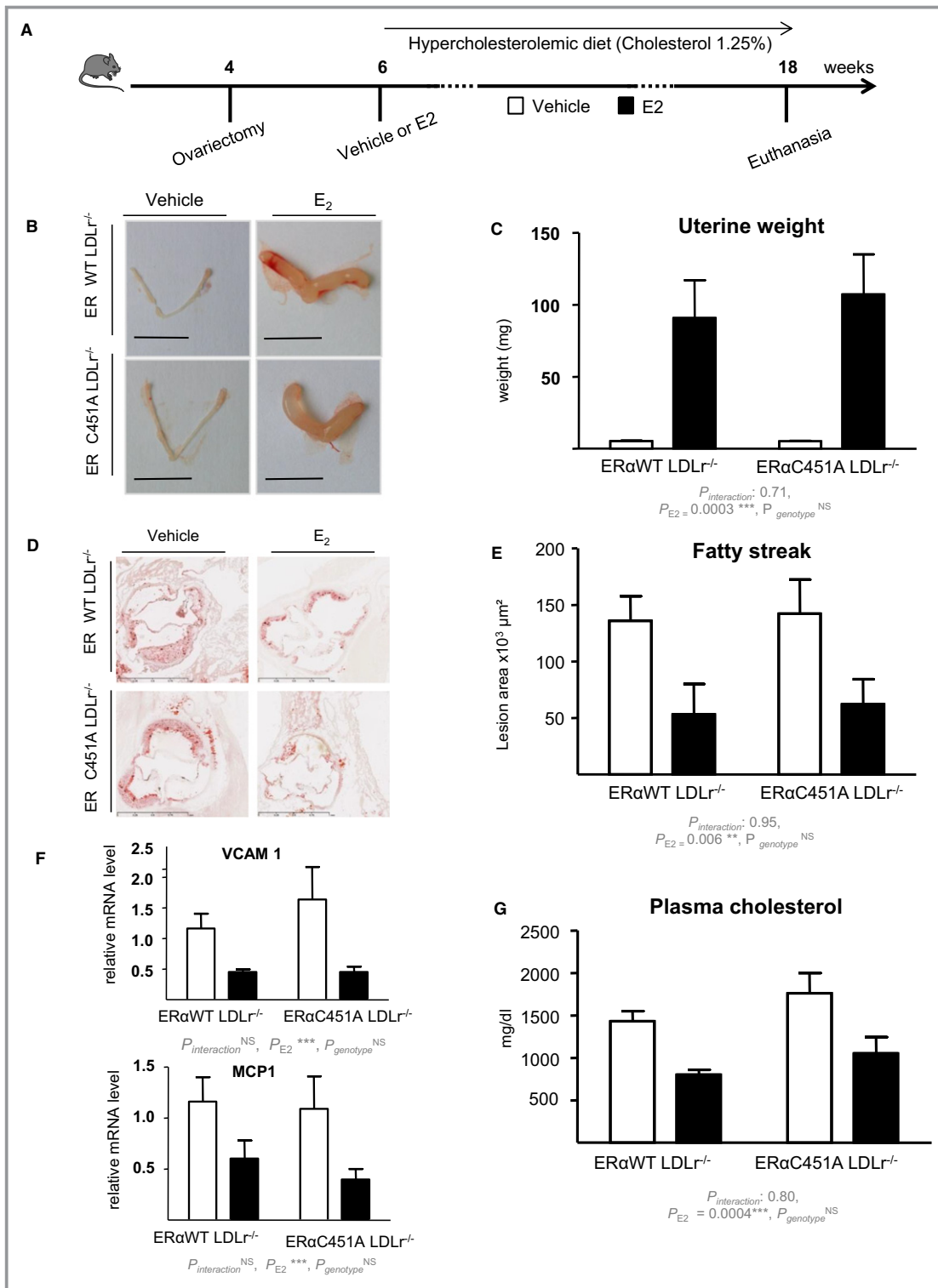


Figure 2. 17 β -Estradiol (E2) decreases fatty streak deposits at the aortic sinus in estrogen receptor α mutated at cysteine 451 (ER α -C451A)/low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLr^{-/-}) mice. A, Four-week-old ovariectomized ER α -wild-type (WT)/LDLr^{-/-} and ER α -C451A/LDLr^{-/-} mice were given either placebo or E2 during 12 weeks and switched to an atherogenic diet from the age of 6 to 18 weeks (n=7–10). Representative uteri (B), uterine weights (C), representative micrographs of oil red O lipid-stained cryosections of the aortic sinus (D), and quantification of lipid deposition (E) and vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and MCP1 mRNA levels from aorta, quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction and normalized to TPT1 mRNA levels (F) and cholesterol content (G) from these mice.

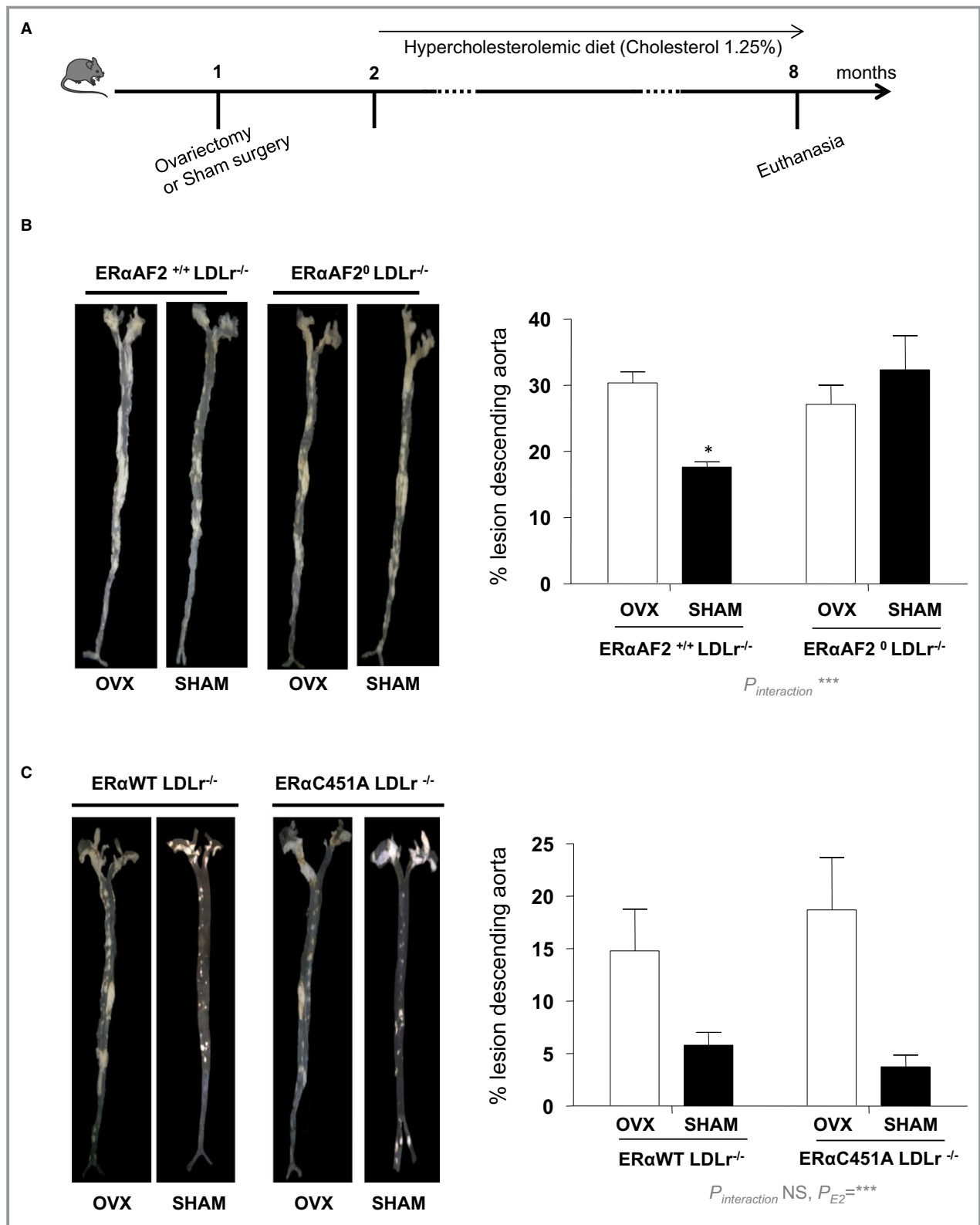


Figure 3. The atheroprotective effect of endogenous estrogens persists in 8-month-old estrogen receptor α mutated at cysteine 451 (ER α -C451A)/low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLr^{-/-}) mice, whereas it is abolished in ER α -AF20/LDLr^{-/-} mice. A, Four-week-old mice (n=5–7) were ovariectomized (OVX) or not (SHAM) and switched to atherogenic diet from the age of 6 weeks until euthanasia. Representative en face aorta preparations are shown with respective quantification of lesions from descending aorta of ER α -AF20/LDLr^{-/-} (B) or ER α -C451A/LDLr^{-/-} (C) mice and their respective littermates. Data are mean \pm SEM. WT indicates wild type.

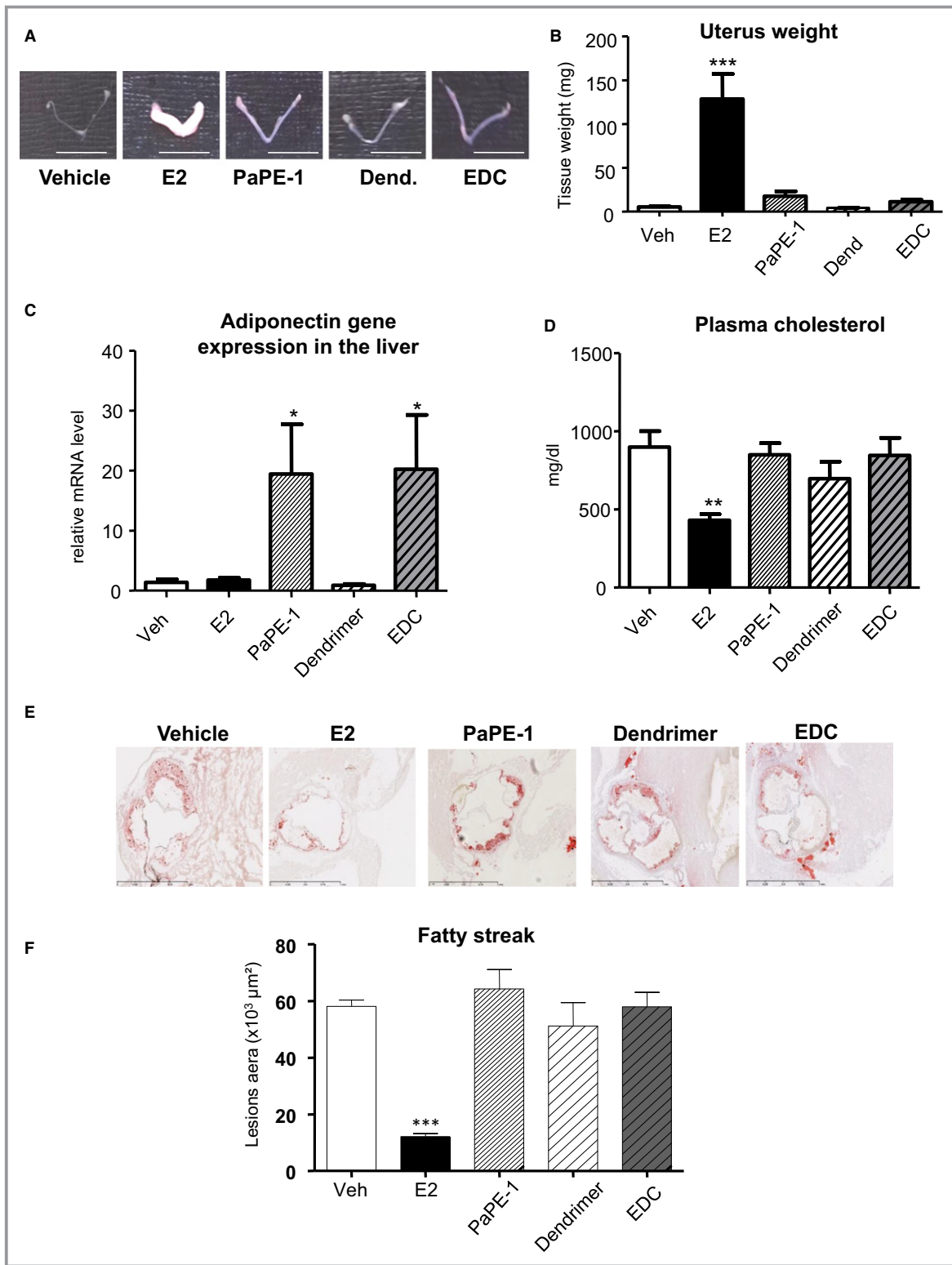


Figure 4. Selective activation of estrogen receptor α membrane-initiated steroid signaling does not prevent early plaque formation. Four-week-old ovariectomized low-density lipoprotein receptor-deficient mice were given 17 β -estradiol (E2), pathway preferential estrogen (PaPE)-1 pellet or vehicle (Veh), or empty dendrimer (Dend) or estrogen-Dend conjugate (EDC) (n=6–9) and switched to an atherogenic diet from the age of 6 to 14 weeks. Representative uteri (A), uterine weight (B), adiponectin mRNA levels from liver quantified by real-time quantitative polymerase chain reaction and normalized to PPIA mRNA levels (C), plasma cholesterol content (D), representative micrographs of oil red O lipid-stained cryosections of the aortic sinus (E), and quantification of lipid deposition from these mice (F). Data are mean \pm SEM. To test the impact of the different treatments, a 1-way ANOVA was performed. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

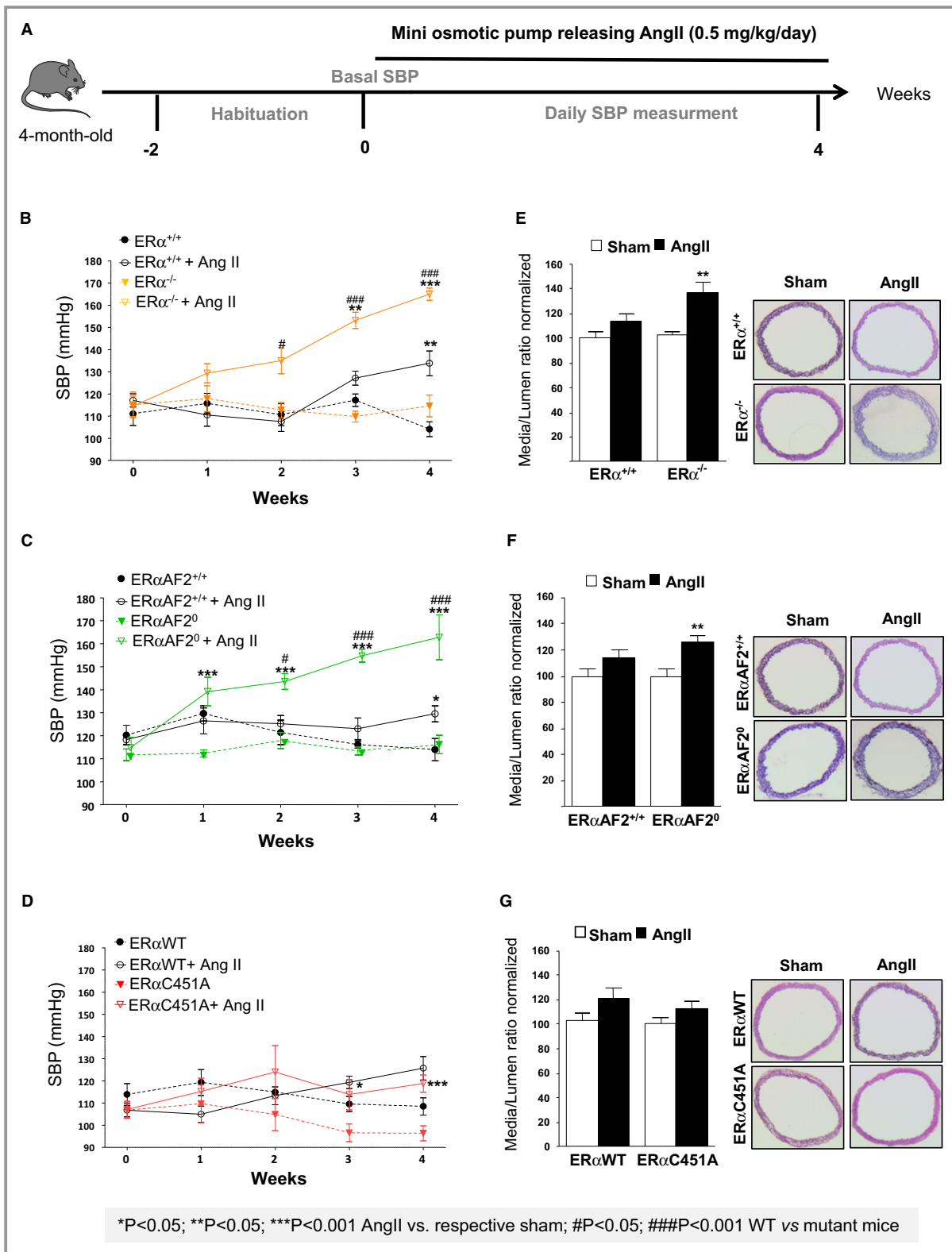


Figure 5. Endogenous estrogens prevent hypertension and medial remodeling in estrogen receptor α mutated at cysteine 451 (ER α -C451A) mice but not in ER α -AF20 mice. A, Intact female mice were implanted with osmotic minipumps delivering angiotensin II (AngII; 0.5 mg/kg per day, 1 month). Mean of systolic blood pressure (SBP) measurements for 5 days was represented as weekly evolution of blood pressure pre-AngII treatment (week 0) and post-AngII treatment (weeks 1–4). SBP measurements (B through D) and medial remodeling (E through G) from thoracic aorta were evaluated in ER $\alpha^{-/-}$ (n=8; B and E), ER α -AF20 (n=7; C and F), ER α -C451A (n=7; D and G) intact mice and their respective littermate controls (n=7). WT indicates wild type.

induced by AngII infusion was significantly greater in ER α -AF20 mice than in WT mice (Figure 5C), demonstrating that the nuclear ER α AF2 is necessary for the protective effect of ER α in hypertension. By contrast, the increase in blood pressure was similar in ER α -C451A and WT mice, demonstrating the dispensable role of membrane ER α in this process (Figure 5D). Histomorphometric analysis showed the absence of aortic smooth muscle hypertrophy in intact WT mice treated with AngII, contrasting with the media remodeling in ovariectomized WT mice given AngII (Figure S1B). Interestingly, AngII treatment led to arterial remodeling in ER α ^{-/-} and ER α -AF20, but not in ER α -C451A, intact mice (Figure 5E through 5G), confirming that aortic structural changes paralleled the level of hypertension. Because hypertension was induced by AngII, we measured the gene expression level of the angiotensin-converting enzyme (Ace) and angiotensin-converting enzyme 2 (Ace2) and of the AngII type 1 receptors (AT1Ra and AT1Rb) in arteries isolated, and we found no difference in expression level in ER α ^{-/-}, ER α -C451A, and ER α -AF20 compared with WT mice (Figure S3).

Endogenous Estrogens Allow Flow-Mediated Arteriolar Remodeling in ER α -C451A Mice But Not in ER α -AF20 Mice

Besides pressure-associated medial hypertrophic remodeling that characterizes hypertension, at the level of arterioles, outward remodeling occurs in response to increased blood flow and shear stress at the surface of endothelial cells. This remodeling is essential in postischemic revascularization or collateral artery growth.³⁸ To better characterize the respective role of nuclear *versus* ER α MISS in this remodeling, we investigated in vivo FMR of resistance arteries from ER α -AF20 and ER α -C451A mice. Two weeks after arterial ligation, arterial diameter was determined in vitro in response to stepwise increases in intraluminal pressure (Figure 6A). As expected, passive arterial diameter was significantly higher in high-flow than in normal-flow arteries in WT (Figure 6B), but not in ER α ^{-/-} mice (Figure 6C). Interestingly, the effect of endogenous estrogens on FMR was normal in ER α -C451A (Figure 6D), whereas it was completely abrogated in ER α -AF20 (Figure 6E), highlighting the crucial role of nuclear ER α in FMR.

Selective Activation of Nuclear ER α Using Estetrol Prevents AngII-Induced Hypertension and Favors Flow-Mediating Remodeling

Because nuclear ER α appears to be crucial to the prevention of atheroprotection and hypertension as well as to allow FMR, we decided to evaluate the impact of estetrol (Figure 7A). This natural selective ER modulator-like

molecule was recently recognized to activate selectively nuclear ER α and to be devoid of vascular MISS action.²⁸ We also previously demonstrated that estetrol conferred atheroprotection.²⁸ In addition, although short incubation with estetrol was not able to modulate the acute vasodilating response to flow (Figure 7B), a long-term treatment with estetrol allowed flow arteriolar remodeling to occur in ovariectomized mice (Figure 7C). Estetrol also prevented the increase in SBP induced by AngII treatment in ovariectomized mice (Figure 7D). These data clearly show that nuclear ER α activation is sufficient to attenuate AngII-induced hypertension and to promote FMR.

Discussion

Estrogen effects are mainly mediated by ER α , which acts primarily as a nuclear receptor/transcriptional factor, but which can also elicit rapid MISS. Because ER α MISS is necessary and sufficient to increase NO production and to accelerate postinjury reendothelialization without impact on sex targets, it was initially proposed that selective activation of membrane ER α could confer arterial protection with minimal risk of uterine or breast cancer.^{23,26} In the present study, we investigated the role of ER α eliciting membrane actions in the prevention of atheroma and hypertension as well as in the promotion of arteriolar outward remodeling.

First, we addressed the question of the necessary role of ER α MISS on 3 major vasculoprotective effects of estrogens. To this aim, on the basis of in vitro work demonstrating that the palmitoylation site at Cys447 of human ER α (the mouse counterpart of ER α Cys451) is crucial for the membrane localization of ER α ,³⁹ we generated a mouse model with a point mutation of this amino acid (ER α -C451A).²² The decrease of membrane localization of ER α was confirmed in primary hepatocytes and resulted in female infertility, an increase in luteinizing hormone levels, and hemorrhagic ovaries lacking corpora lutea.²² By contrast, the transcriptional action of 17 β -estradiol on the uterus was preserved: gene expression was similar in ER α -C451A and WT mice.²² Herein, we show that the impact of MISS on short-term 17 β -estradiol-dependent gene regulation in the aorta is also minimal, extending the previous observation to an arterial tissue. We also demonstrate that palmitoylation of ER α -C451, and thereby the activation of ER α MISS, is dispensable for the prevention by 17 β -estradiol of early stages of atheroma development at the aortic sinus, but also of more advanced lesions on the thoracic and abdominal aorta.

In addition, long-term treatment with AngII induced a significantly higher increase in SBP and media aortic hypertrophy in the absence of endogenous estrogens (ovariectomized mice) or of ER α (ER α ^{-/-} mice). Our finding is in agreement with previous works showing that hypertension

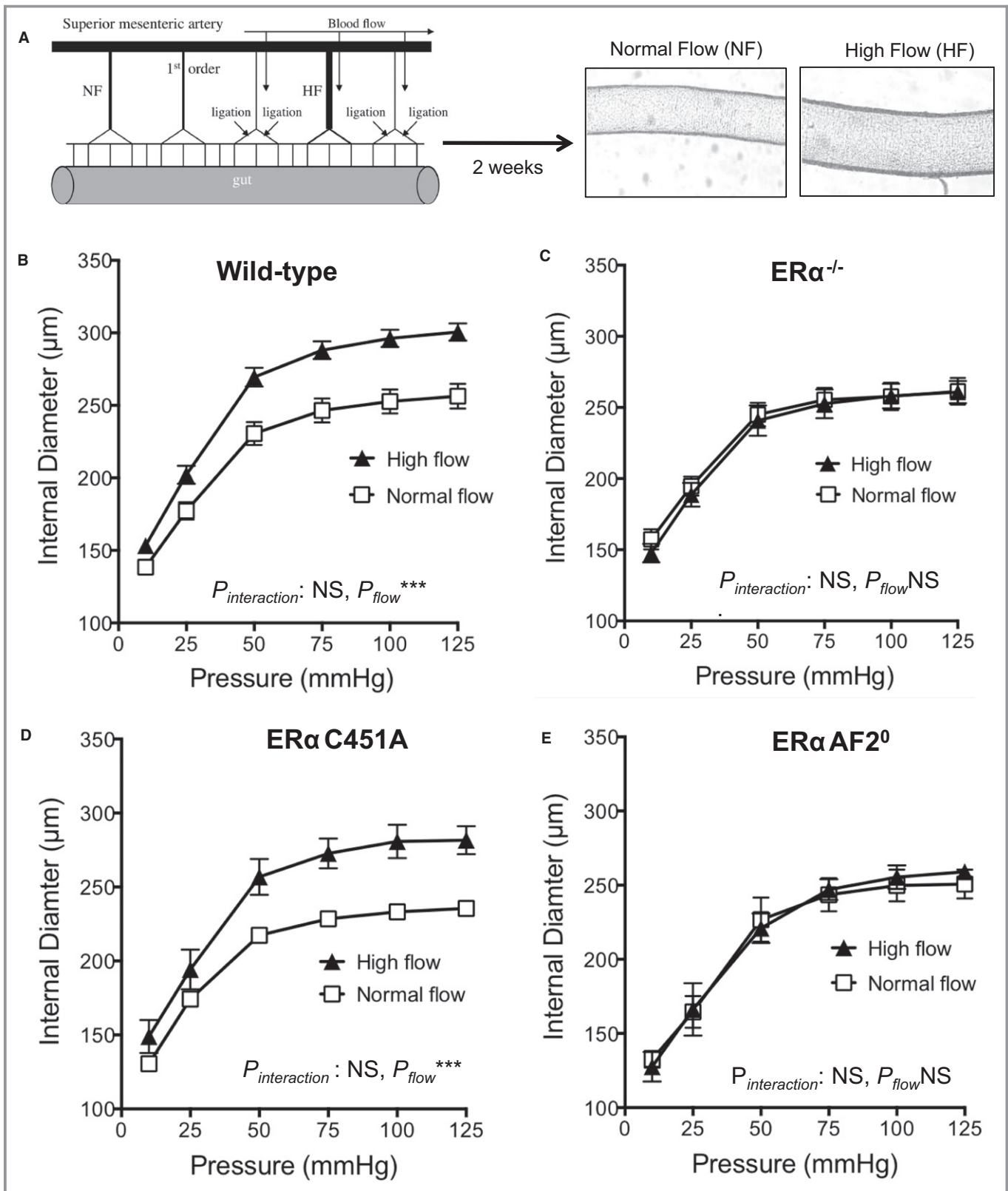


Figure 6. Endogenous estrogens allow flow-mediated outward remodeling of resistance arteries in estrogen receptor α mutated at cysteine 451 (ER α -C451A) mice but not in ER α -AF2⁰ mice. A, Arterial diameter was measured in response to stepwise increases in pressure in mesenteric arteries submitted chronically to high flow (HF) or to normal flow (NF). Arteries were isolated from wild-type (n=12; B), ER $\alpha^{-/-}$ (n=8; C), ER α -C451A (n=5; D), or ER α -AF20 (n=7; E) mice. NS indicates not significant.

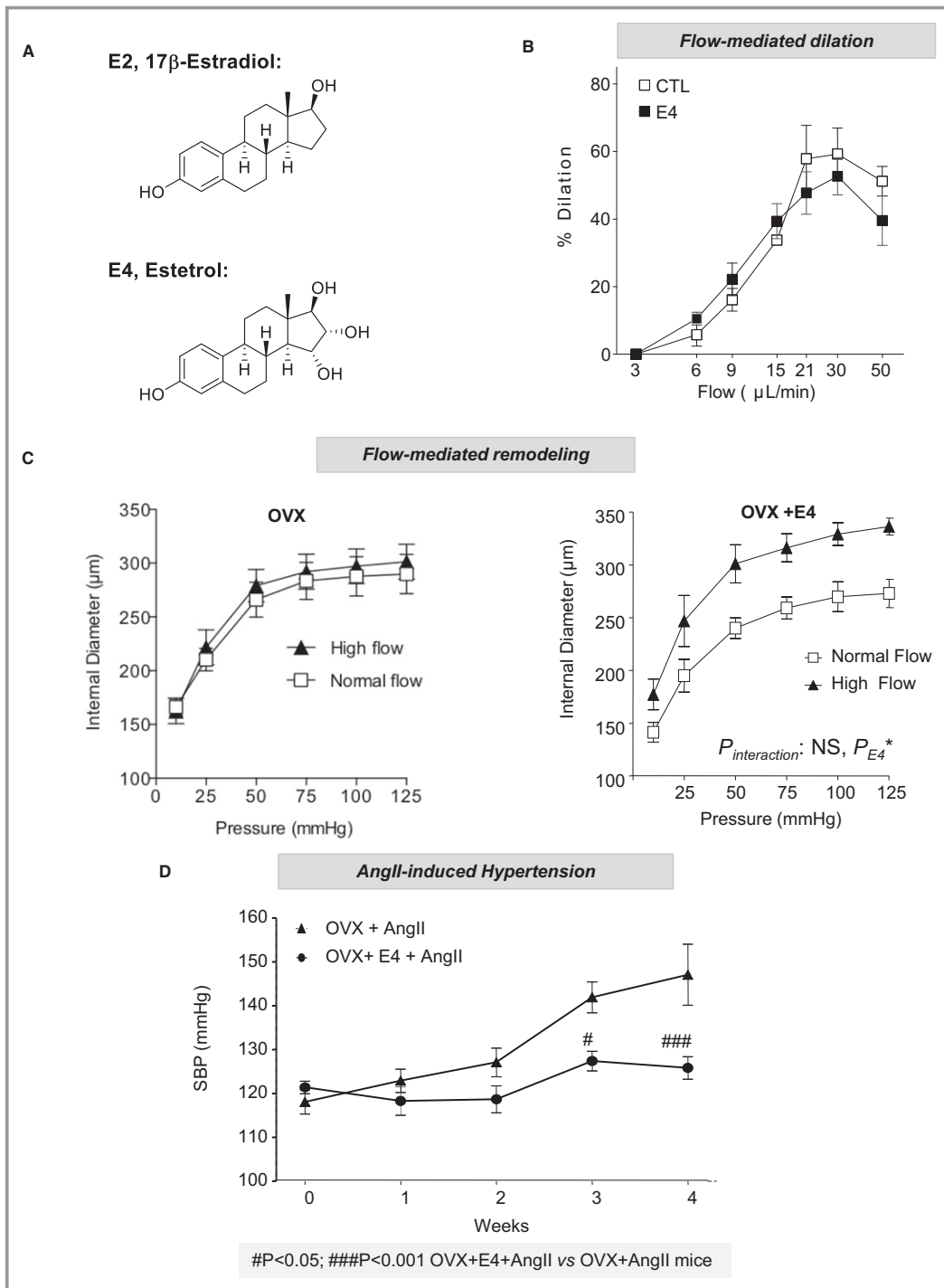


Figure 7. Selective activation of nuclear estrogen receptor α using estetrol (E4) prevents angiotensin II (AngII)-induced hypertension and favors flow-mediated remodeling. A, Chemical structures of 17 β -estradiol (E2) and E4. B, Short-term flow-mediated dilation was assessed in pressurized precontracted mesenteric arteries. Vasodilating response to stepwise increase in intraluminal flow was evaluated in the presence of E4 (30 minutes) or vehicle (n=8). C, Flow-mediated remodeling was evaluated in mesenteric arteries isolated from ovariectomized (OVX) mice treated chronically with vehicle or E4 over 2 weeks (n=6). Arterial diameter was measured in response to stepwise increases in pressure in mesenteric arteries submitted chronically to high flow or to normal flow. D, Effect of E4 on AngII treatment was evaluated in wild-type female mice OVX 2 weeks before sham surgery or simultaneous implantation with osmotic minipumps delivering AngII (1 month) and E4 (n=7). Mean of systolic blood pressure (SBP) measurements for 5 days were represented as weekly evolution of blood pressure pre-AngII (week 0) and post-AngII treatment. CTL indicates control.

induced by AngII is lower in female than in male mice.^{40,41} The protective effect of 17 β -estradiol is, at least in part, mediated by the AngII type 2 receptor.⁴² This receptor is counteracting the effect of the type 1 receptor with vasodilator effect not subjected to desensitization,⁴³ although in hypertension, this balance is not necessarily in favor of a vasodilator tone.^{44,45} The measurement of blood pressure in mice using plethysmography (tail cuff) can be considered as a limitation, because this technique is less accurate than telemetry. However, this limitation has to be taken with caution as regard to baseline or central blood pressure with the tail cuff method and some concern about the impact of the surgery for telemetry.⁴⁶ Nevertheless, the increase in pressure induced by AngII is the same whether it is measured using plethysmography or telemetry.⁴⁶ Our work is in agreement with previous works showing that ER α was involved in the protective effect of 17 β -estradiol against AngII-induced hypertension.⁴⁷ Interestingly, a protective role for ER α has been also suggested in pulmonary hypertension.⁴⁸ The present study definitively demonstrates the role of ER α in this beneficial effect of endogenous estrogens independently on ER α MISS.

Nevertheless, a role for ER β has been also shown in basal arterial blood pressure. Indeed, basal arterial blood pressure increases more in ER β ^{-/-} mice during aging than in age-matched control mice.⁴⁹ In addition, the pharmacological activation of ER β leads to blood pressure lowering in spontaneously hypertensive rats with reduced myocardial hypertrophy.⁵⁰ Arias-Loza et al also show that both ER α and ER β activation attenuates cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats.⁵¹ In the present study, we observed no protective role of ER β against AngII-mediated hypertension in adult female mice (Figure S2). Thus, both ER α and ER β could contribute to the control of arterial blood pressure, according to the context (aging versus AngII-induced hypertension), and their precise role and how they interact remain to be further investigated. In addition, beside ERs, G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER), has emerged as a third ER. Despite conflicting results obtained with the different mice models of GPER inactivation,⁵² GPER activation has been reported to exert several beneficial effects in the cardiovascular system, including protection against atherosclerosis and hypertension.^{53,54} Treatment with the selective agonist G-1 reduces atherosclerosis in ovariectomized mice, and the beneficial effects of GPER in this model are associated with a reduction in macrophage and T-cell recruitment, indicating an anti-inflammatory mechanism.⁵⁵ In addition, activation of GPER has been reported to protect female mice from salt- and pressure-induced vascular damage.^{56,57} Altogether, although activation of nuclear, but not membrane, ER α is necessary to induce a protection against atherosclerosis and hypertension, we cannot exclude the participation of other

membrane-initiated steroid signal elicited through GPER-mediated pathway.

Because hypertension is a major risk factor for cardiovascular diseases and especially for ischemic disorders, we also investigated FMR, which has a major role in the homeostasis of tissue perfusion. Indeed, FMR consists of vascular enlargement or outward remodeling induced by flow (shear stress) in small collateral arteries surrounding ischemic areas.³⁸ It contributes to the prevention of further tissue injury (eg, in limb or myocardial ischemia). FMR has been shown to be reduced by hypertension,^{58,59} diabetes mellitus,^{60,61} and aging.^{11,62} More important and rather unexpectedly, we previously reported that FMR depends on the presence of ER α ^{15,63} and could contribute to the better resistance to ischemia/necrosis of female compared with male mice. Herein, we report that ER α MISS is also dispensable to mediate this beneficial action of estrogens.

We previously demonstrated²² and confirmed herein, using another experimental approach, that ER α MISS is critical for the production of NO. Because NO is a well-recognized vasculoprotective mediator and guardian of arterial integrity,²⁷ and because 17 β -estradiol stimulates endothelial NO production through ER α MISS activation,²² one of the main surprises and unexpected findings in the present study is the absence of a role of ER α MISS on vascular protection. Indeed, it is largely believed that the increase in endothelium-derived NO plays an important role in the vasculoprotective actions of estrogens, in particular in their atheroprotective action.^{18,64} Interestingly, present finding is strikingly consistent with our previous work published 20 years ago, reporting that the atheroprotective effect of exogenous 17 β -estradiol was not altered by NOS inhibition.⁶⁵ Maeda's group subsequently refined this conclusion using hypercholesterolemic eNOS^{-/-} mice, showing that eNOS gene inactivation favored atheroma through hypertension, whereas the lack of local endothelial NO after blood pressure normalization did not contribute to the atheroprotective effect of 17 β -estradiol.⁶⁶ In addition, the absence of caveolin-1, which is involved in ER α -associated eNOS activation at the level of the plasma membrane, had no impact on FMR.⁶⁷

Then, in addition to genetic model of loss of function, pharmacological tools, such as PaPE and EDC, represent a complementary approach to evaluate ER α MISS action. Contrary to their stimulatory action on reendothelialization and on NO production,^{22,23} none of these molecules was able to prevent atheroma LDLr^{-/-} mice. Interestingly, a similar finding was previously reported in EDC-treated apolipoprotein E-deficient mice.⁶⁸ Accordingly, we previously showed that 17 β -estradiol failed to induce any atheroprotective action using mouse model in which nuclear effects are abrogated (ER α -AF20/LDLr^{-/-} mice), highlighting the requirement of nuclear/transcriptional actions of ER α for early

atheroprotection at the level of the aortic sinus.³² Herein, we further extend the crucial role of ER α AF2 in atheroma prevention by endogenous estrogens through en face analysis of the thoracic and abdominal aorta (ie, in arterial sites where the shear stress is less dramatically altered compared with that at the aortic sinus). Moreover, the present study allows us to identify the crucial role of ER α AF2 in the protective effect of estrogens against high blood pressure and to promote FMR. In line with the genetic approach showing the necessary role of nuclear ER α , the response of estetrol, which has an unusual profile of ER α activation, and uncoupling nuclear and membrane activation²⁸ demonstrate the vasculoprotective potential of nuclear ER α activation alone. Indeed, we previously reported the potent atheroprotective effect of estetrol²⁸ as well as its capacity to prevent neointimal hyperplasia after endovascular femoral artery injury.¹⁴ Herein, we show that estetrol prevents hypertension and vascular hypertrophy induced by AngII and allows FMR. These experimental data complement previous clinical studies reporting that estetrol has less effect than ethinyl-estradiol on hepatic-derived hemostatic biomarkers⁶⁹ and, therefore, could be the only oral estrogen that does not increase the risk of

thromboembolic events. Because estetrol, in combination with a progestin, is able to block ovulation, this fetal estrogen is being evaluated as both a new contraceptive and a new hormonal treatment for menopause.⁶⁹

To conclude, the combination of genetically modified mouse models (membrane and nuclear loss of function) and pharmacological approaches (membrane and nuclear gain of function) is unique in the area of nuclear receptors. This combination has led to the following conclusions, summarized in Figure 8: (1) ER α MISS is necessary and sufficient to promote 2 short-term actions of 17 β -estradiol on the endothelium: the acceleration of endothelial wound healing, which involves mainly endothelial cell migration,⁷⁰ and the increase in endothelial NO production. (2) By contrast, ER α MISS is neither necessary nor sufficient for eliciting the long-term effect of estrogens on arteries (ie, protection against neointimal hyperplasia,¹⁴ atheroma,²⁸ hypertension, and induction of FMR). (3) Accordingly, the nuclear ER α activation elicited by estetrol (that does not activate ER α MISS) is sufficient to confer these 4 major vasculoprotective actions. These results shed a new light on the mechanisms of the vasculoprotective effects of estrogens and will help to understand the tissue-specific actions of selective ER modulators, one of the major mysteries of ER biological features.

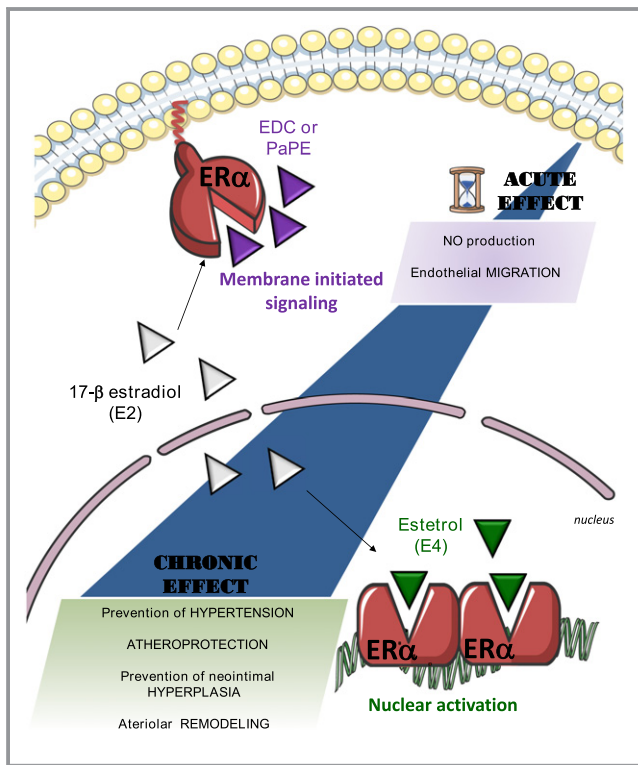


Figure 8. The beneficial actions of estrogen receptor α (ER α) activation on atheroma, hypertension, neointimal hyperplasia, and arterial remodeling all rely on nuclear ER α , whereas ER α membrane-initiated signaling is restricted to the rapid endothelial actions. E2 indicates 17 β -estradiol; E4, estetrol; EDC, estrogen-dendrimer conjugate; and PaPE, pathway preferential estrogen.

Acknowledgments

The animal facilities and the “Plateforme d’Experimentation Fonctionnelle” staff are acknowledged for skillful technical assistance. Estrogen receptor α -deficient and estrogen receptor α activation function-2 deficient mice (ER α AF2^{-/-}) mice were kindly provided by Professor P. Chambon and Dr A. Krust.

Sources of Funding

The work at INSERM U1048 was supported by INSERM, centre hospitalo universitaire (CHU) de Toulouse, Université de Toulouse III, Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil, Institut Universitaire de France, Fondation de France, Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20160334924), Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE12-0021-01), Conseil Régional Midi-Pyrénées, and the Eurostar project Septime. Support was also provided by the National Institutes of Health (PHS 5R01 DK015556 to J.A. Katzenellenbogen and P50 AT006268 to B.S. Katzenellenbogen). The work at Mitovasc was supported by INSERM, Centre national de la recherche scientifique (CNRS) and the centre hospitalo universitaire (CHU) d’Angers, Université of Angers, Fondation de France, and the Region des Pays de Loire (Mitovasc grant). Favre was financially supported by the Société d’Hypertension Artérielle and the Fondation de Recherche sur l’Hypertension Artérielle.

Disclosures

Foidart is a consultant at Mithra, the company that develops estetrol-based women's healthcare products and has received a research grant. This relationship is significant. The remaining authors have no disclosures to report.

References

- Barton M, Meyer MR. Postmenopausal hypertension: mechanisms and therapy. *Hypertension*. 2009;54:11–18.
- Regitz-Zagrosek V, Kararigas G. Mechanistic pathways of sex differences in cardiovascular disease. *Physiol Rev*. 2017;97:1–37.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. 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, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291:1701–1712.
- Vitale C, Mercurio G, Cerquetani E, Marazzi G, Patrizi R, Pelliccia F, Volterrani M, Fini M, Collins P, Rosano GM. Time since menopause influences the acute and chronic effect of estrogens on endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:348–352.
- Elhage R, Arnal JF, Pierragi M-T, Duverger N, Fiévet C, Faye JC, Bayard F. Estradiol-17 β prevents fatty streak formation in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2679–2684.
- Hodgin JB, Kregel JH, Reddick RL, Korach KS, Smithies O, Maeda N. Estrogen receptor alpha is a major mediator of 17beta-estradiol's atheroprotective effects on lesion size in apoE $^{-/-}$ mice. *J Clin Invest*. 2001;107:333–340.
- 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 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2009;120:2567–2576.
- Pollow DP Jr, Romero-Aleshire MJ, Sanchez JN, Konhilas JP, Brooks HL. Ang II-induced hypertension in the VCD mouse model of menopause is prevented by estrogen replacement during perimenopause. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015;309:R1546–R1552.
- Chappell MC, Gallagher PE, Averill DB, Ferrario CM, Brosnihan KB. Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2: Lewis rat. *Hypertension*. 2003;42:781–786.
- Tarhouni K, Guihot AL, Vessieres E, Toutain B, Procaccio V, Grimaud L, Loufrani L, Lenfant F, Arnal JF, Henrion D. Determinants of flow-mediated outward remodeling in female rodents: respective roles of age, estrogens, and timing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1281–1289.
- Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fougère MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F, Arnal JF. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res*. 2002;90:413–419.
- 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;103:423–428.
- Smirnova NF, Fontaine C, Buscato M, Lupieri A, Valera MC, Guillaume M, Malet N, Foidart JM, Raymond-Letron I, Lenfant F, Gourdy P, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen J, Laffargue M, Arnal JF. The activation function-1 of estrogen receptor alpha prevents arterial neointima development through a direct effect on smooth muscle cells. *Circ Res*. 2015;117:770–778.
- Tarhouni K, Guihot AL, Freidja ML, Toutain B, Henrion B, Baufréon C, Pinaud F, Procaccio V, Grimaud L, Ayer A, Loufrani L, Lenfant F, Arnal JF, Henrion D. Key role of estrogens and endothelial estrogen receptor alpha in blood flow-mediated remodeling of resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:605–611.
- Arnal JF, Lenfant F, Metivier R, Flouriot G, Henrion D, Adlanmerini M, Fontaine C, Gourdy P, Chambon P, Katzenellenbogen B, Katzenellenbogen J. Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: from tissue specificity to medical implications. *Physiol Rev*. 2017;97:1045–1087.
- Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol*. 2010;24:2152–2165.
- Arnal JF, Fontaine C, Billon-Gales A, Favre J, Laurell H, Lenfant F, Gourdy P. Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1506–1512.
- Toutain CE, Filipe C, Billon A, Fontaine C, Bouchet L, Guery JC, Gourdy P, Arnal JF, Lenfant F. Estrogen receptor alpha expression in both endothelium and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of estradiol on reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1543–1550.
- Arnal JF, Fontaine C, Abot A, Valera MC, Laurell H, Gourdy P, Lenfant F. Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor alpha in vivo. *Steroids*. 2013;78:576–582.
- Fu XD, Simoncini T. Extra-nuclear signaling of estrogen receptors. *IUBMB Life*. 2008;60:502–510.
- Adlanmerini M, Solinhac R, Abot A, Fabre A, Raymond-Letron I, Guihot AL, Boudou F, Sautier L, Vessieres E, Kim SH, Liere P, Fontaine C, Krust A, Chambon P, Katzenellenbogen JA, Gourdy P, Shaul PW, Henrion D, Arnal JF, Lenfant F. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor alpha in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:E283–E290.
- Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, Konanah 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.
- Harrington WR, Kim SH, Funk CC, Madak-Erdogan Z, Schiff R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol*. 2006;20:491–502.
- Keung W, Chan ML, Ho EY, Vanhoutte PM, Man RY. Non-genomic activation of adenylyl cyclase and protein kinase G by 17beta-estradiol in vascular smooth muscle of the rat superior mesenteric artery. *Pharmacol Res*. 2011;64:509–516.
- Madak-Erdogan Z, Kim SH, Gong P, Zhao YC, Zhang H, Chambliss KL, Carlson KE, Mayne CG, Shaul PW, Korach KS, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci Signal*. 2016;9:ra53.
- Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120:713–735.
- Abot A, Fontaine C, Buscato M, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, Drougard A, Rajan S, Laine M, Milon A, Muller I, Henrion D, Adlanmerini M, Valera MC, Gompel A, Gerard C, Pequeux C, Mestdagt M, Raymond-Letron I, Knauf C, Ferriere F, Valet P, Gourdy P, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Lenfant F, Greene GL, Foidart JM, Arnal JF. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor alpha modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol Med*. 2014;6:1328–1346.
- Gerard C, Blacher S, Communal L, Courtin A, Tskitishvili E, Mestdagt M, Munaut C, Noel A, Gompel A, Pequeux C, Foidart JM. Estetrol is a weak estrogen antagonizing estradiol-dependent mammary gland proliferation. *J Endocrinol*. 2015;224:85–95.
- Acconcia F, Marino M. The effects of 17beta-estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. *Front Physiol*. 2011;2:30.
- Levin ER, Pietras RJ. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;108:351–361.
- 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- α is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:13311–13316.
- Roy C, Tabiasco J, Caillon A, Delneste Y, Merot J, Favre J, Guihot AL, Martin L, Nascimento DC, Ryffel B, Robson SC, Sevigny J, Henrion D, Kauffenstein G. Loss of vascular expression of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/CD39 in hypertension. *Purinergic Signal*. 2018;14:73–82.
- Dowell FJ, Henrion D, Benessiano J, Poitevin P, Levy B. Chronic infusion of low-dose angiotensin ii potentiates the adrenergic response in vivo. *J Hypertens*. 1996;14:177–182.
- Henrion D, Terzi F, Matrougui K, Duriez M, Boulanger CM, Colucci-Guyon E, Babinet C, Briand P, Friedlander G, Poitevin P, Levy BI. Impaired flow-induced

- dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J Clin Invest*. 1997;100:2909–2914.
36. Dubroca C, Loyer X, Retailliau K, Loirand G, Pacaud P, Feron O, Balligand JL, Levy BI, Heymes C, Henrion D. RhoA activation and interaction with caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. *Cardiovasc Res*. 2007;73:190–197.
 37. Lu Q, Schnitzler GR, Vallaster CS, Ueda K, Erdkamp S, Briggs CE, Iyer LK, Jaffe IZ, Karas RH. Unliganded estrogen receptor α regulates vascular cell function and gene expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;442:12–23.
 38. Silvestre JS, Smadja DM, Levy BI. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev*. 2013;93:1743–1802.
 39. Accocchia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M. Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Mol Biol Cell*. 2005;16:231–237.
 40. Sampson AK, Moritz KM, Jones ES, Flower RL, Widdop RE, Denton KM. Enhanced angiotensin II type 2 receptor mechanisms mediate decreases in arterial pressure attributable to chronic low-dose angiotensin II in female rats. *Hypertension*. 2008;52:666–671.
 41. Barsha G, Denton KM, Mirabito Colafella KM. Sex- and age-related differences in arterial pressure and albuminuria in mice. *Biol Sex Differ*. 2016;7:57.
 42. Mirabito KM, Hilliard LM, Head GA, Widdop RE, Denton KM. Pressor responsiveness to angiotensin II in female mice is enhanced with age: role of the angiotensin type 2 receptor. *Biol Sex Differ*. 2014;5:13.
 43. Widdop RE, Matrougui K, Levy BI, Henrion D. AT₂ receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT₁ receptor blockade. *Hypertension*. 2002;40:516–520.
 44. Matrougui K, Levy BI, Henrion D. Tissue angiotensin II and endothelin-1 modulate differently the response to flow in mesenteric resistance arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2000;130:521–526.
 45. You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2005;111:1006–1011.
 46. Wilde E, Aubdool AA, Thakore P, Baldissera L Jr, Alawi KM, Keeble J, Nandi M, Brain SD. Tail-cuff technique and its influence on central blood pressure in the mouse. *J Am Heart Assoc*. 2017;6:e005204. DOI: 10.1161/jaha.116.005204.
 47. Xue B, Pamidimukkala J, Lubahn DB, Hay M. Estrogen receptor- α mediates estrogen protection from angiotensin II-induced hypertension in conscious female mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1770–H1776.
 48. Wright AF, Ewart MA, Mair K, Nilsen M, Dempsie Y, Loughlin L, Maclean MR. Oestrogen receptor α in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 2015;106:206–216.
 49. Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . *Science*. 2002;295:505–508.
 50. Jazbutyte V, Arias-Loza PA, Hu K, Widder J, Govindaraj V, von Poser-Klein C, Bauersachs J, Fritzsche KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Ertl G, Pelzer T. Ligand-dependent activation of ER β lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2008;77:774–781.
 51. Arias-Loza PA, Hu K, Dienesch C, Mehlich AM, König S, Jazbutyte V, Neyses L, Hegele-Hartung C, Heinrich Fritzsche K, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, α and β , attenuate cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension*. 2007;50:432–438.
 52. Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, Otto C. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research. *Steroids*. 2010;75:603–610.
 53. Meyer MR, Barton M. Estrogens and coronary artery disease: new clinical perspectives. *Adv Pharmacol*. 2016;77:307–360.
 54. Zimmerman MA, Budish RA, Kashyap S, Lindsey SH. Gper-novel membrane estrogen receptor. *Clin Sci*. 2016;130:1005–1016.
 55. Meyer MR, Fredette NC, Howard TA, Hu C, Ramesh C, Daniel C, Amann K, Arterburn JB, Barton M, Prossnitz ER. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. *Sci Rep*. 2014;4:7564.
 56. Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Endocrinology*. 2009;150:3753–3758.
 57. Liu L, Kashyap S, Murphy B, Hutson DD, Budish RA, Trimmer EH, Zimmerman MA, Trask AJ, Miller KS, Chappell MC, Lindsey SH. GPER activation ameliorates aortic remodeling induced by salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310:H953–H961.
 58. Tuttle JL, Sanders BM, Burkhardt HM, Fath SW, Kerr KA, Watson WC, Herring BP, Dalsing MC, Unthank JL. Impaired collateral artery development in spontaneously hypertensive rats. *Microcirculation*. 2002;9:343–351.
 59. Dumont O, Kauffenstein G, Guihot AL, Guerinéau NC, Abraham P, Loufrani L, Henrion D. Time-related alteration in flow- (shear stress-) mediated remodeling in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Int J Hypertens*. 2014;2014:859793.
 60. deBelin CHANTEMELE EJ, Vessieres E, Guihot AL, Toutain B, Mauguinau M, Loufrani L, Henrion D. Type 2 diabetes severely impairs structural and functional adaptation of rat resistance arteries to chronic changes in blood flow. *Cardiovasc Res*. 2009;81:788–796.
 61. Freidja ML, Tarhouni K, Toutain B, Fassot C, Loufrani L, Henrion D. The AGE-breaker ALT-711 restores high blood flow-dependent remodeling in mesenteric resistance arteries in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61:1562–1572.
 62. Dumont O, Pinaud F, Guihot AL, Baufreton C, Loufrani L, Henrion D. Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine. *Cardiovasc Res*. 2008;77:600–608.
 63. Tarhouni K, Freidja ML, Guihot AL, Vessieres E, Grimaud L, Toutain B, Lenfant F, Arnal JF, Loufrani L, Henrion D. Role of estrogens and age in flow-mediated outward remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;307:H504–H514.
 64. Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev*. 2002;23:665–686.
 65. Elhage R, Bayard F, Richard V, Holvoet P, Duverger N, Fievet C, Arnal JF. Prevention of fatty streak formation of 17 β -estradiol is not mediated by the production of nitric oxide in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1997;96:3048–3052.
 66. Hodgins JB, Knowles JW, Kim HS, Smithies O, Maeda N. Interactions between endothelial nitric oxide synthase and sex hormones in vascular protection in mice. *J Clin Invest*. 2002;109:541–548.
 67. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER. ERS associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol*. 2002;16:100–115.
 68. Chambliss KL, Barrera J, Umetani M, Umetani J, Kim SH, Madak-Erdogan Z, Huang L, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Mineo C, Shaul PW. Nonnuclear estrogen receptor activation improves hepatic steatosis in female mice. *Endocrinology*. 2016;157:3731–3741.
 69. Kluff C, Zimmerman Y, Mawet M, Klipping C, Duijkers IJ, Neuteboom J, Foidart JM, Bennink HC. Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception*. 2017;95:140–147.
 70. 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*. 2008;294:H2822–H2830.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

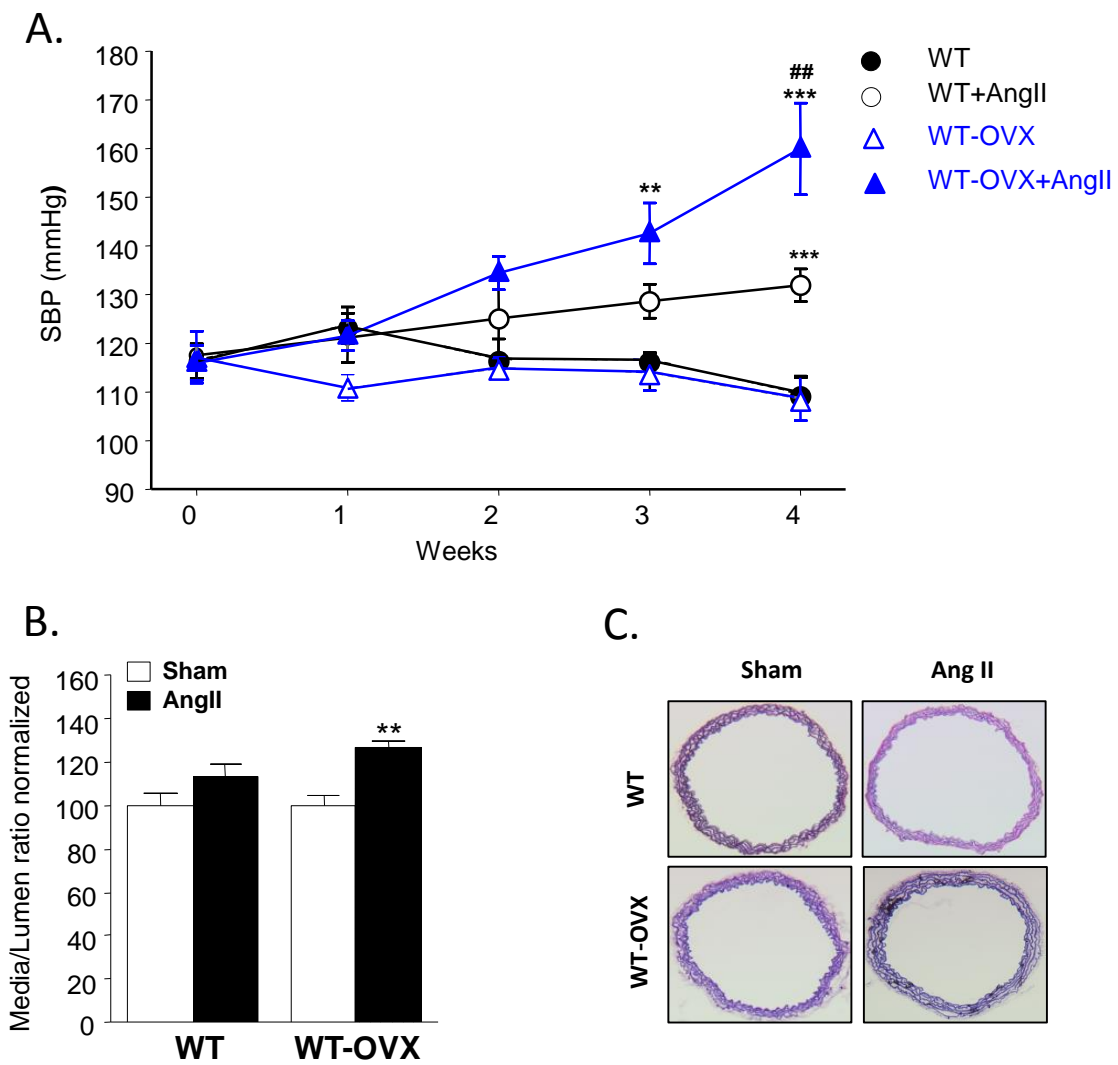


Figure S1. Effect of estrogen depletion on systolic blood pressure and aortic remodeling.

(A) Systolic blood pressure measurements in intact wild type (WT) and in ovariectomized (OVX) mice implanted with osmotic minipumps delivering angiotensin II (AngII, 500 ng/kg per day, 1 month) to induce hypertension or sham operated (Sham). (B) Media/Lumen Ratio and (C) Representative images of aortic remodeling in WT and WT-OVX mice.

Values are presented as mean \pm SEM ($n=6$), and statistically compared to respective control group. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$ ***: $p<0.001$ Ang II vs respective sham ; ## $p<0.01$ WT vs WT-OVX.

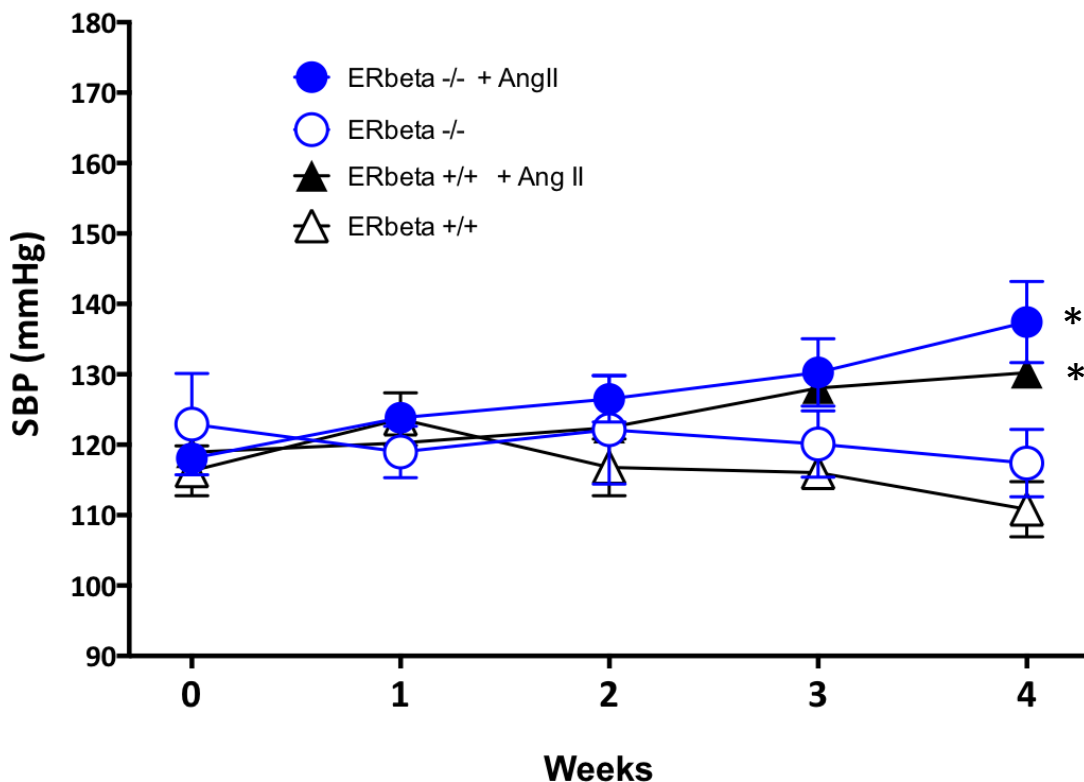


Figure S2. Effect of the absence of estrogen receptor beta (ERbeta) on systolic blood pressure in mice
 Systolic blood pressure measurements in intact wild type (ERbeta +/+) and in mice lacking ERbeta (ERbeta -/-) mice implanted with osmotic minipumps delivering angiotensin II (AngII, 500 ng/kg per day, 1 month) to induce hypertension or sham operated.
 Values are presented as mean \pm SEM (n=6 per group), and statistically compared to respective control group. *: p<0.05; Ang II vs respective control

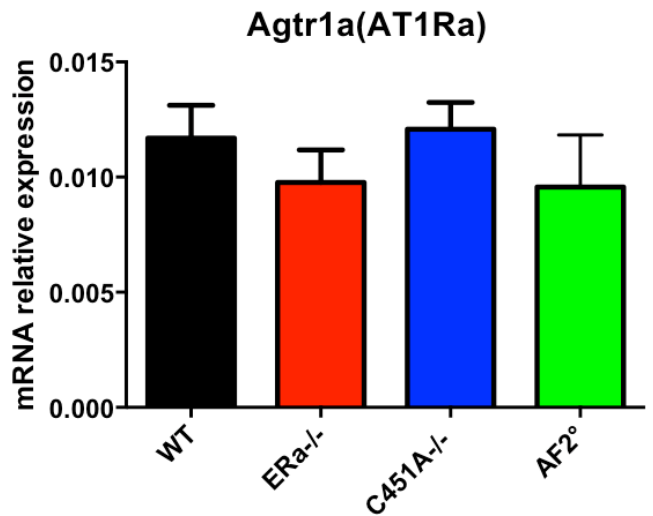
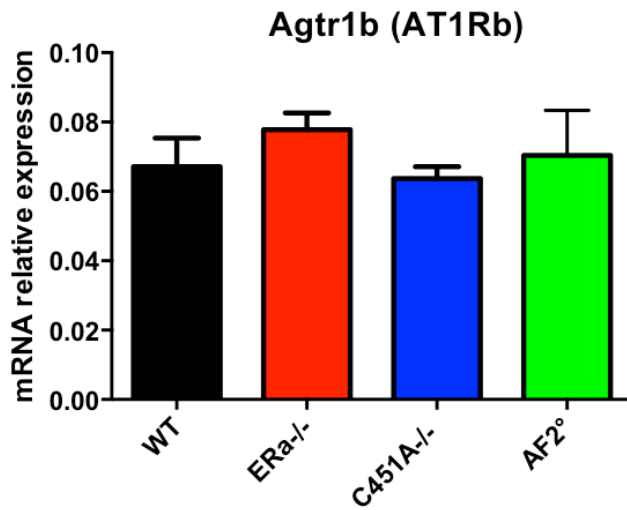
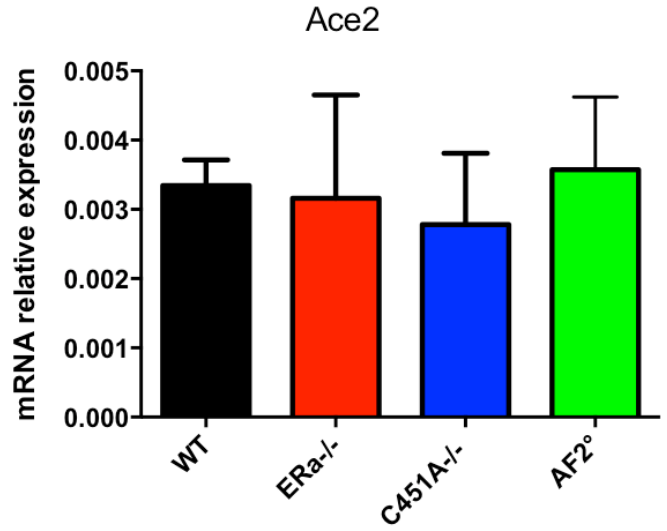
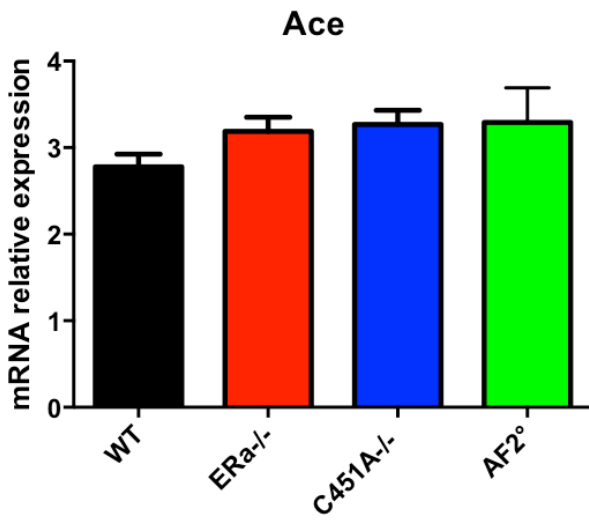


Figure S3. Gene expression level of the angiotensin converting enzymes *Ace* and *Ace2* and of the angiotensin II type 1 receptor (*AT1Ra* and *AT1Rb*) measured in intact wild type (WT) and in *ERα^{-/-}*, *ERα^{C451A}* and *ERα^{AF2°}* mice. Values are presented as mean ± SEM (*n*=5 per group), and statistically compared to the WT group. No significant difference was observed between groups.

ANNEXE 2 :

The tissue-specific effects of different 17 β -estradiol doses reveal the key sensitizing role of AF1 domain in ER α activity

Coralie Fontaine*, **Mélissa Buscato***, Alexia Vinel, Frank Giton, Isabelle Raymond-Letron, Sung Hoon Kim, Benita S. Katzenellenbogen, John A. Katzenellenbogen, Pierre Gourdy, Alain Milon, Gilles Flouriot, Claes Ohlsson, Françoise Lenfant and Jean-François Arnal.

Mol Cell Endocrinol. 2020 Apr 5;505:110741. doi: 10.1016/j.mce.2020.110741. Epub 2020 Jan 28



The tissue-specific effects of different 17 β -estradiol doses reveal the key sensitizing role of AF1 domain in ER α activity



Coralie Fontaine^{a,1}, Melissa Buscato^{a,1}, Alexia Vinel^a, Frank Giton^{b,c}, Isabelle Raymond-Letron^d, Sung Hoon Kim^e, Benita S. Katzenellenbogen^e, John A. Katzenellenbogen^e, Pierre Gourdy^a, Alain Milon^f, Gilles Flouriot^g, Claes Ohlsson^h, Françoise Lenfant^{a,*}, Jean-François Arnal^a

^a INSERM U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Université de Toulouse - UPS, Toulouse, France

^b INSERM IMRB U955 Eq07, Créteil, France

^c AP-HP, Pôle Biologie-Pathologie Henri Mondor, Créteil, France

^d Ecole Vétérinaire de Toulouse (ENVT), Toulouse, France

^e Departments of Molecular and Integrative Biology, and of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA

^f Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, IPBS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

^g Univ Rennes, Inserm, EHESP, Irset (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail), UMR 1085, Rennes, France

^h Center for Bone and Arthritis Research, Institute of Medicine, The Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden

ARTICLE INFO

Keywords:

Estrogen receptor alpha (ER α)

Activation function (AF)

Dose response

Tissue-specificity

ABSTRACT

17 β -Estradiol (E2) action can be mediated by the full-length estrogen receptor alpha (ER α 66), and also by the AF1 domain-deficient ER α (ER α 46) isoform, but their respective sensitivity to E2 is essentially unknown. We first performed a dose response study using subcutaneous home-made pellets mimicking either metestrus, proestrus or a pharmacological doses of E2, which resulted in plasma concentrations around 3, 30 and 600 pM, respectively. Analysis of the uterus, vagina and bone after chronic exposure to E2 demonstrated dose-dependent effects, with a maximal response reached at the proestrus-dose in wild type mice expressing mainly ER α 66. In contrast, in transgenic mice harbouring only an ER α deleted in AF1, these effects of E2 were either strongly shifted rightward (10–100-fold) and/or attenuated, depending on the tissue studied. Finally, experiments in different cell lines transfected with ER α 66 or ER α 46 also delineated varying profiles of ER α AF1 sensitivity to E2. Altogether, this work emphasizes the importance of dose in the tissue-specific actions of E2 and demonstrates the key sensitizing role of AF1 in ER α activity.

1. Introduction

During her lifetime, a woman is exposed to varying levels of estrogens. At puberty, the onset of the menstrual cycle leads to a cyclical production of estrogens with large fluctuations in estrogen levels. Pregnancy is marked by an extensive increase in estrogens levels whereas menopause, the consequence of the cessation of estrogen production by ovaries in women, results in a sharp decrease in the main estrogen 17- β estradiol (E2) levels. These hormonal variations translate into changes not only in sex target organs involved in sex secondary characters and reproduction, but also in many other non-reproductive tissues. In particular, estrogens play an important role in the growth and maturation of bone as well as in the regulation of bone turnover in adult. The importance of estrogens for skeletal health is well known and

represents an important research area. Indeed, estrogen deficiency is a major risk for development of osteoporosis and leads to increased fracture risk, while estrogen treatment reduces this risk (Almeida et al., 2017). Unfortunately, long-term estrogen therapy is also associated with serious side-effects, mainly increased risk of breast cancer and of deep venous thrombosis (Valera et al., 2018).

Mouse models have already contributed to elucidation of the mechanisms of actions of estrogens *in vivo* (Guillaume et al., 2017; Hewitt and Korach, 2018; Rooney and van der Meulen, 2017). In general, mice are ovariectomized to eliminate the main source of endogenous estrogens, and to allow studying the effects of doses of exogenous E2 delivered by various devices, such as subcutaneous pellets. A large range of pellets that deliver estrogen from 0.01 mg/pellet (*i.e.*, 0.8 μ g/kg/day) to 5 mg/pellet (*i.e.*, 2000 μ g/kg/day) are available, and very different

* Corresponding author. 1 avenue du Pr. Jean Poulhes, CHU Rangueil, 31432, Toulouse, France.

E-mail address: françoise.lenfant@inserm.fr (F. Lenfant).

¹ The authors have equally contributed to this work.

doses are used in the literature, often without justification of the dose employed. Furthermore, estrogens have frequently been reported to exert a hormetic or biphasic dose-response relationship, characterized by low-dose stimulation and high-dose inhibition (Strom et al., 2011; Duarte-Guterman et al., 2015). One example of such a dichotomous effect was reported in ischemic stroke; whereas some studies have shown a neuroprotective effect of estrogen, others have reported neurotoxicity, the differences being attributed to the dose (Strom et al., 2009).

The different responses to E2 are initiated by their binding to the estrogen receptors (ERs), ER α and ER β , which belong to the nuclear receptor superfamily and are structurally organized into 6 functional domains (A to F). The E domain supports hormone binding, which induces conformational changes that are required for ER transcriptional activity through the modulation of two activation functions (AFs), AF1 and AF2, located in the A/B and E domains, respectively. In addition to the full-length 66-kDa (ER α 66) isoform, a 46-kDa ER α -isoform (ER α 46), lacking the N-terminal portion (domains A/B), and thereby AF-1, has been reported to be expressed in various cell types such as human osteoblasts (Denger et al., 2001), macrophages (Murphy et al., 2009), and vascular endothelial cells (Murphy et al., 2009), but also in cancer cells (Chantalat et al., 2016). Mechanisms regulating both the expression of ER α 46 and its functions remain essentially unknown. ER α can be generated by either alternative splicing, proteolysis, or an alternative initiation of translation via an internal ribosome entry site (IRES) (Chantalat et al., 2016).

ER-mediated transcriptional regulation involves either a direct interaction of ER with specific estrogen-responsive elements (EREs) located in enhancers or near the promoter region of target genes, or an indirect mechanism (tethered) via protein/protein interactions with other transcriptional factors (Hamilton et al., 2017). ER α AF1 and ER α AF2 have been shown to play crucial roles in the transcriptional effects of ER α through the recruitment of coactivators. In cultured cells, the respective roles of ER α AF1 and ER α AF2 appear to depend on the state of cell differentiation (Merot et al., 2004). Using mice selectively deficient in ER α AF1 or ER α AF2, we previously demonstrated that ER α AF2 is absolutely required for all nuclear effects of ER α in response to E2 whereas the role of ER α AF1 is highly tissue dependent (Abot et al., 2013; Arnal et al., 2013; Billon-Gales et al., 2009; Borjesson et al., 2011).

However, the potential role of the E2 dose on the different biological effects mediated by the wild-type full length ER α -66 or the AF1/AB domain-deficient ER α has not been evaluated nor taken into account in most *in vivo* studies.

In this work, we describe the effect of a 3-week exposure of ovariectomized mice to 3 doses of E2 mimicking metestrus (low dose), proestrus (medium dose) or a supra-pharmacological dose on three major tissues: uterus, vagina and bone. This experimental paradigm allowed us to precisely compare tissue responses to these 3 doses. An additional very high dose of E2 was used in transgenic mice harbouring an ER α deleted for AF1 (ER α AF1⁰) and in its littermate wild type mice.

2. Material and methods

2.1. Mice

All procedures involving experimental animals were performed in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research and were approved by the local Animal Care and Use Committee. The investigation conforms to the directive 2010/63/EU of the European parliament. Mice were housed in cages in groups of four to six and kept in a specific pathogen-free and temperature-controlled facility on a 12-h light to dark cycle. Each experimental group included at least six animals. Female C57BL/6 J mice were purchased from Charles River Laboratories. ER α AF-1⁰ mice were generated as previously described (Billon-Gales et al., 2009). Mice were

anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (25 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and ovariectomized or sham operated at 4 weeks of age, before puberty, to avoid any endogenous estrogen exposure. After 2 weeks of recovery, mice were implanted subcutaneously with pellets releasing either vehicle (cholesterol) or various amounts of E2 for 21 days. To deliver increasing doses of estradiol over prolonged periods of time, various amounts of E2 (E2758 Sigma-Aldrich) and cholesterol (C3045 Sigma-Aldrich) were thoroughly mixed in powder form and compacted to obtain pellets (20 mg total) that were then implanted subcutaneously into ovariectomized mice as previously described (Hsieh et al., 1998). Low (LD-E2), medium (MD-E2), high (HD-E2) and very high (VHD-E2) doses correspond respectively to weight/weight ratio of E2/cholesterol: 1/20000, 1/2500, 1/250 and 1/25.

2.2. Hormone assays

Plasma E2 levels were assayed by GC/MS, as described previously (Giton et al., 2015) with minor modifications. Saline water/twice charcoal dextran stripped aged female rabbit serum (1/1, v/v) was used as the matrix for calibrators and quality control (QC) standards. Briefly, each sample (serums, calibration standards, quality controls, and blank matrix) was collected in an 8 ml borosilicate tube. A spiking solution of deuterated steroid internal standard (IS) (50 μ l containing 10 pg of E2-d4, except for blank matrix) (CDN Isotopes, Inc., Point-Claire, Canada), and 3 ml of 1-chlorobutane were added to each sample. After fast centrifugation, the upper organic phase was collected on conditioned Hypersep SI 500 mg SPE minicolumn (Thermo Scientific, Rockwood, USA). The column and adsorbed material were then washed with ethyl acetate/hexane (6 ml; 1/9, v/v). The second fraction containing E2 was eluted using ethyl acetate/hexane (4 ml; 1/1, v/v), then evaporated at 60 °C to dryness. E2 was derivatized with pentafluorobenzoyl chloride (PFBC) (103772-1G, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Final extracts were reconstituted in isooctane, then transferred into conical vials for injection into the GC system (GC-2010 Plus, Shimadzu, Japan) using a 50% phenylmethylpolysiloxane VF-17MS capillary column (20m x 0.15 mm, internal diameter, 0.15 μ m film thickness) (Agilent Technologies, Les Ulis, France). A TQ8050 (Shimadzu, Japan) triple quadrupole mass spectrometer equipped with a chemical ionization source and operating in Q3 single ion monitoring (SIM) mode was used for detection. The reagent gas for the NCI detection was methane. The GC was performed in pulsed splitless mode with a 1 min pulsed splitless-time. The oven temperature was initially 150 °C for 0.50 min, further increased to 305 °C at 20 °C/min and held at 305 °C for 3.60 min, and then to 335 °C at 30 °C/min and held at 335 °C for 1.7 min. The injection port and transfer line temperatures were respectively 290 and 280 °C. The flow-rate of helium (carrier gas) was maintained constant at 0.96 ml/min. The mass spectrometer CI source temperature was 220 °C. The linearity of steroid measurement was confirmed by plotting the ratio of the steroid peak response/internal standard (IS) peak response to the concentration of E2 for each calibration standard. Accuracy, target ions, corresponding deuterated internal control, range of detection, low limit of quantification (LLOQ), and intra & inter assay CVs of the quality control are reported in Supplemental Table 1.

2.3. Determination of total plasma cholesterol

Mice were anesthetized and blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus. Total plasma cholesterol was assayed using the CHOD-PAD kit (Horiba ABX, Montpellier, France).

2.4. Histological analysis

Paraffin-embedded transverse sections (4 μ m) from formalin-fixed uterine or vaginal specimens were stained as previously described with anti-Ki67 (Abot et al., 2013) (RM-9106; Thermo-scientific). Sections

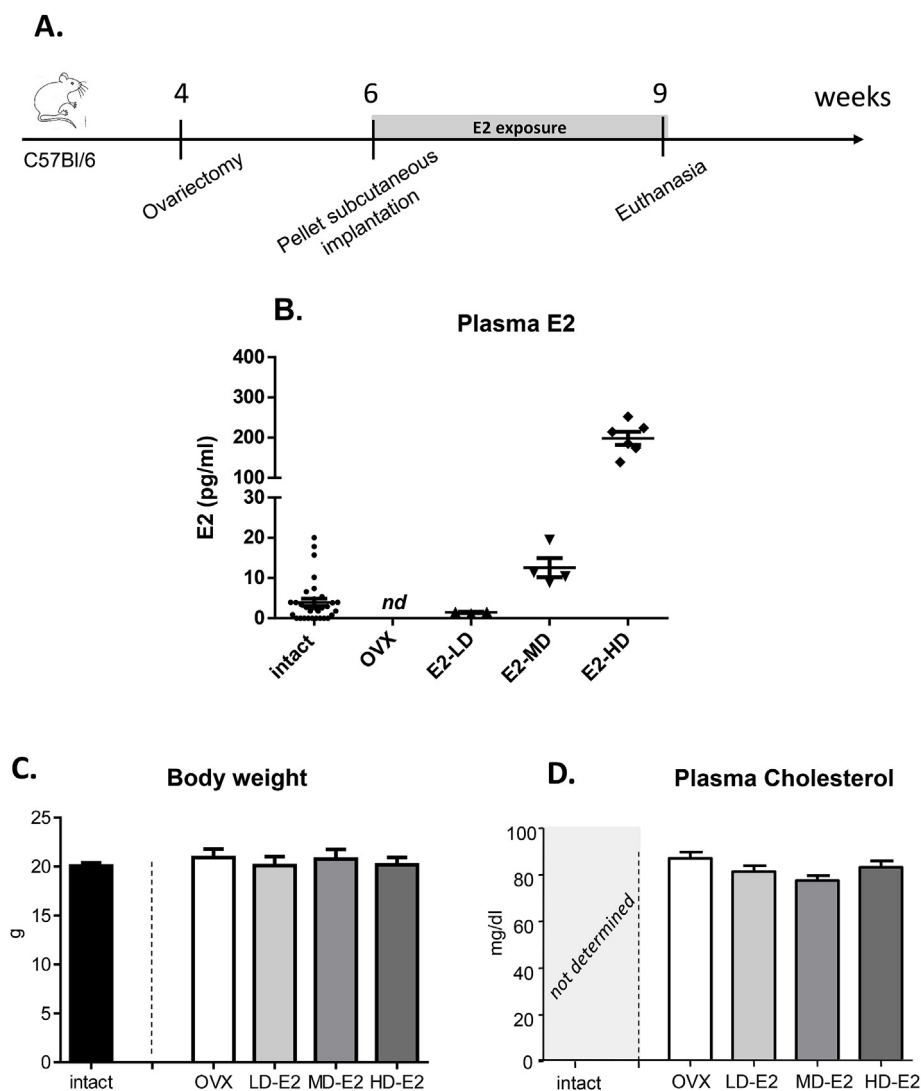


Fig. 1. Plasma estradiol (E2) and cholesterol concentrations in mice implanted with E2/cholesterol pellets.

Pellets releasing low dose (LD), medium dose (MD) or high dose (HD) of E2 were implanted subcutaneously into ovariectomized mice for a period of 3 weeks (A). Plasma E2 (B), body weight (C) and cholesterol content (D) of the mice were evaluated.

were examined after digitization using a NanoZoomer Digital Pathology[®]. To examine the proliferative effects of each treatment, the ratio of Ki67-positive epithelial cell/total cell number from two microscopic fields of measurement at $\times 20$ magnification for each uterine and vaginal section was evaluated. For uterus, the luminal epithelial height (LEH) of endometrium is the mean of 10 measurements.

2.5. Peripheral quantitative computed tomography (pQCT)

Computerized tomography scans were performed using the pQCT XCT RESEARCH M (version 4.5 B, Norland Stratec, Germany) with a voxel size of 70 μm , as previously described (Windahl et al., 1999). To measure trabecular volumetric bone marrow density (BMD), the scan was positioned in the distal metaphysis of the femur at a distance corresponding to 3.4% of the total femur length in the proximal direction from the distal growth plate. This area contains trabecular and cortical bone and the trabecular region was defined as the inner 45% of the total cross-sectional area. The cortical bone parameters were analyzed in the mid-diaphyseal region of femur (Vidal et al., 2000).

2.6. Cell culture and transfection

HeLa, HepG2 and MDA-MB231 cell lines were maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biowest) and antibiotics (Invitrogen) at 37 $^{\circ}\text{C}$ in 5% CO_2 . Transfections were carried out using jetPEI reagent according to manufacturer's instructions (Polyplus transfection). One day before transfection, cells were plated in 24-well plates at 50% confluence. One hour prior to transfection, the medium was replaced with phenol red-free DMEM (Invitrogen) containing 2.5% charcoal-stripped FCS (Biowest). Transfection was carried out with 100 ng of the reporter gene C3-LUC, 100 ng of CMV- βGal internal control and 50 ng of expression vectors pCR-ER α or pCR-ER $\alpha\text{AF-1}^0$ (Merot et al., 2004). Following an incubation overnight, cells were treated for 24 h with ethanol (vehicle control) or increasing concentration of E2. Cells were then harvested and luciferase and β -galactosidase assays were performed as previously described (Merot et al., 2004).

2.7. Western blot

One μg of pCR-ER αWT or pCR-ER αAF1^0 plasmid were transcribed and translated using TNT[®] quick system Promega. Total proteins were

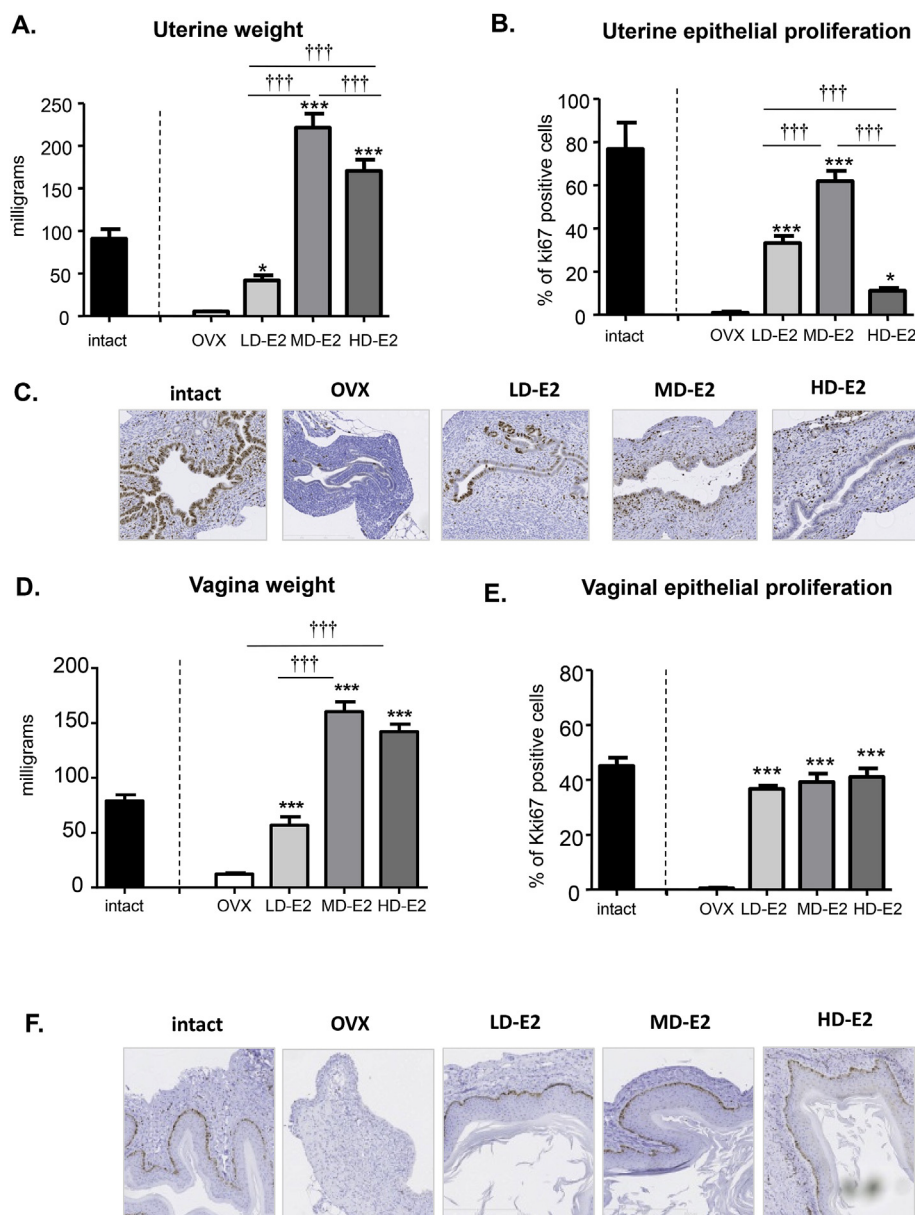


Fig. 2. E2 dose response analysis of uterine and vaginal parameters.

Pellets releasing low dose (LD), medium dose (MD) or high dose (HD) of E2 were implanted subcutaneously into ovariectomized mice for a period of 3 weeks and uterus (A, B, C) and vagina (D, E, F) were analyzed. Uterine (A) and vagina (D) weight. Percentage of uterine (B) and vagina (E) Ki67-positive epithelial cells. Results are expressed as means ± SEM. To test effect of E2 exposure, one-way ANOVA and a Fisher's LSD post test were performed (E2 exposure versus placebo *P < 0.05, ***P < 0.001, difference in E2 concentration †††P < 0.001 n = 10/12 mice/group). Representative Ki-67 detection in transverse uterine (C) and vaginal (F) sections.

Table 1
Analysis of uterine parameters in C57Bl/6 mice.

	OVX	LD-E2	MD-E2	HD-E2
Uterine LEH (µm)	12.1 +/- 0.6	20.2 +/- 1.2 **	37.6 +/- 1.9 ***	40.5 +/- 2.1 ***
Uterine Stromal Density	257 +/- 1.14	116.7 +/- 44.6 ***	87 +/- 35.5 ***	72.7 +/- 34.5 ***
Uterine Stromal proliferation (%Ki67positive cells)	0.3 +/- 0.5	8 +/- 5.6	42.1 +/- 11 ***	21.6 +/- 8 ***

Results are expressed as means ± SEM. To test the respective roles of each treatment, one-way ANOVA and a Fisher's LSD's post test were performed (treatment versus placebo **, P < 0.01, ***, P < 0.001)

separated on a 10% SDS/PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Primary antibody against ERα was purchased from Santa Cruz Biotechnology (SP1 ABCAM, 1/500). Revelation was performed using an HRP-conjugated secondary antibody and visualized by enhanced chemoluminescence (ECL) detection according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences/GE Healthcare), using ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

2.8. Statistics

Statistical analysis were performed using GraphPad Prism software (version 6, GraphPad Software, Inc). To test the different doses of E2, a 1-way ANOVA was performed, followed by a Fisher Least Significant Difference (LSD) multiple comparisons post test. To test the respective roles of E2 treatment and genotype, a 2-way ANOVA was performed. When a significant interaction was observed between the 2 factors, the difference between genotype and treatment was evaluated by a Fisher's LSD's multiple comparison post test. P < 0.05 was considered

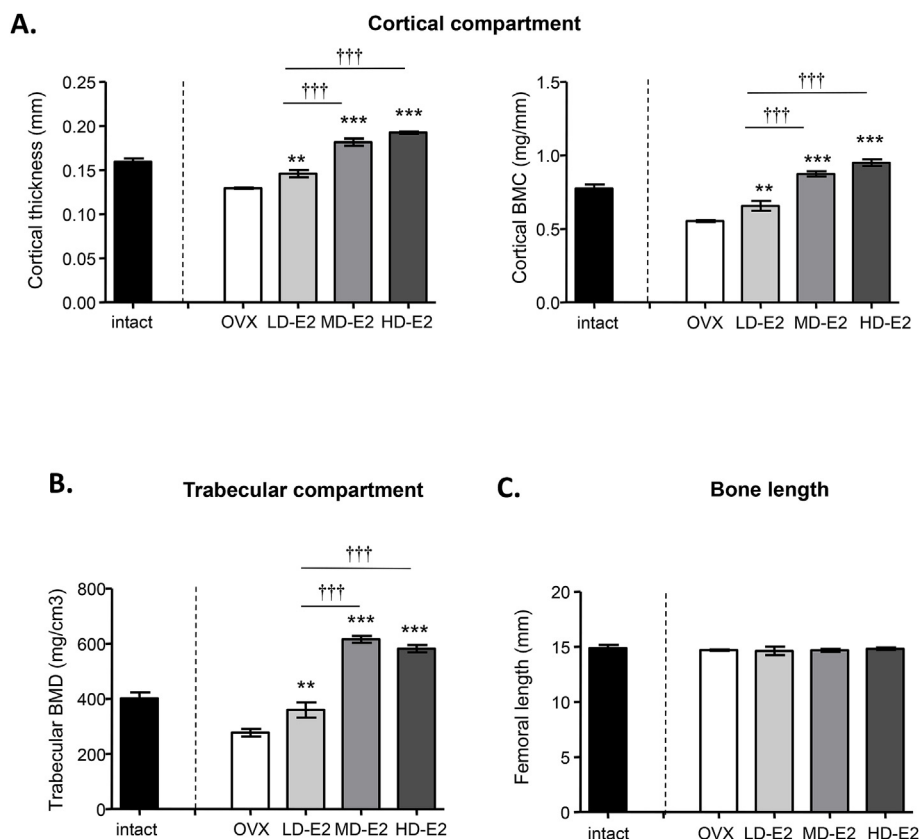


Fig. 3. E2 dose response analysis of bone parameters.

Pellets releasing low dose (LD), medium dose (MD) or high dose (HD) of E2 were implanted subcutaneously into ovariectomized mice for a period of 3 weeks and femurs were analyzed. Cortical thickness and cortical bone mineral content (BMC) (A) in the mid-diaphyseal part of femur. Trabecular bone mineral density (BMD) in the distal metaphyseal part of femur (B) and Bone length (C). Results are expressed as means \pm SEM. To test effect of E2 exposure, one-way ANOVA and a Fisher's LSD post test were performed (E2 exposure versus placebo **P < 0.01, ***P < 0.001, difference in E2 concentration $\dagger\dagger\dagger$ P < 0.001, n = 6/7 mice/group).

statistically significant.

3. Results

3.1. Dose-response profile to E2 is tissue specific in wild type mice

We first studied *in vivo* the tissue-specific response to different doses of long-term E2 administration (3 weeks) on ovariectomized C57Bl/6 mice (Fig. 1A). Plasma estradiol measurement allowed us to determine the E2/cholesterol ratio that mimicked either metestrus (low dose, LD-E2 ~1 pg/ml: 3pM) and proestrus (medium dose, MD-E2 ~10 pg/ml: 30pM) as previously reported (Nilsson et al., 2015), or a pharmacological dose (high dose HD-E2 ~200 pg/ml: 600pM) (Fig. 1B). In mice on a chow diet, E2 treatment had no impact on body mass (Fig. 1C) or plasma cholesterol content (Fig. 1D), regardless of the dose administered. The pharmacological dose led to high level of E2 especially in view of the absence of SHBG in mice. Importantly, in mice receiving the high dose of E2, fraction of E2 was converted into estrone (E1) and became detectable in the plasma (Supplementary Table 2). By contrast, the level of estrone in mice supplemented with LD-E2 or MD-E2 is below the threshold of 10 pg/ml.

Wet weight of the uterus represents the classic endpoint for measuring estrogenicity. As expected, ovariectomy led to uterine atrophy compared to intact mice, and all E2 doses increased uterine weight (Fig. 2A). The maximal response in terms of weight gain was reached using the MD-E2, with an attenuated response observed using the HD-E2 (Fig. 2A). We next evaluated the level of uterine epithelial proliferation using Ki67 staining. Epithelial proliferation in response to E2 was maximal at the medium dose, whereas the pharmacological dose of E2 led to a much lower epithelial proliferation; this represented a much greater decline than that reflected by uterine weight (Fig. 2B and C). Accordingly, analyses of the height increase of uterine epithelial cells (LEH) as well as stromal proliferation and density confirmed that the medium dose is required to obtain strongest E2 response (Table 1).

Although the evaluation of morphological changes in the vagina is less used to assess estrogenic exposure in the mouse compared to measurements of uterine parameters, this tissue is another major target for estrogenic action. A maximal response of vagina in terms of weight gain was observed using the medium dose of E2, and it then plateaued with the medium or high dose of E2 (Fig. 2D). By contrast, a low dose was sufficient to induce maximal epithelial proliferation (Fig. 2E and F).

We next analyzed dose response to E2 treatment in bone, a major non-reproductive target of estrogens. As expected, ovariectomy significantly altered both cortical (Fig. 3A) and trabecular (Fig. 3B) bone compartments, but did not impact bone length (Fig. 3C). Treatment with the lowest dose of E2 was sufficient to restore cortical thickness and cortical bone mineral content (Fig. 3A) as well as trabecular bone mineral density (Fig. 3B). As observed in reproductive tissues, the medium dose of E2 induced maximal tissue response thereafter reaching a plateau, with no additional elevation using the pharmacological dose.

Altogether, these results demonstrated that using pellets designed to release E2 levels similar to those encountered during metestrus (low dose) and proestrus (medium dose), the low dose of E2 was sufficient to stimulate 3 target tissues (*i.e.*, vagina, uterus and bone), whereas the medium dose was necessary to elicit a maximal effect.

3.2. Involvement of ER α AF1 action in mediating E2 response is dose dependent

Our results highlight that response to E2 is dose-dependent, with differences between tissues. In addition, we previously demonstrated that the role of ER α AF-1 is also tissue-specific, with a crucial role played in uterus and trabecular bone, but not in cortical bone (Abot et al., 2013; Borjesson et al., 2011). We first compared the dose response to E2 on an ERE-driven reporter gene (C3-LUC) in cells expressing either the wild type receptor (ER α 66) or the isoform having a

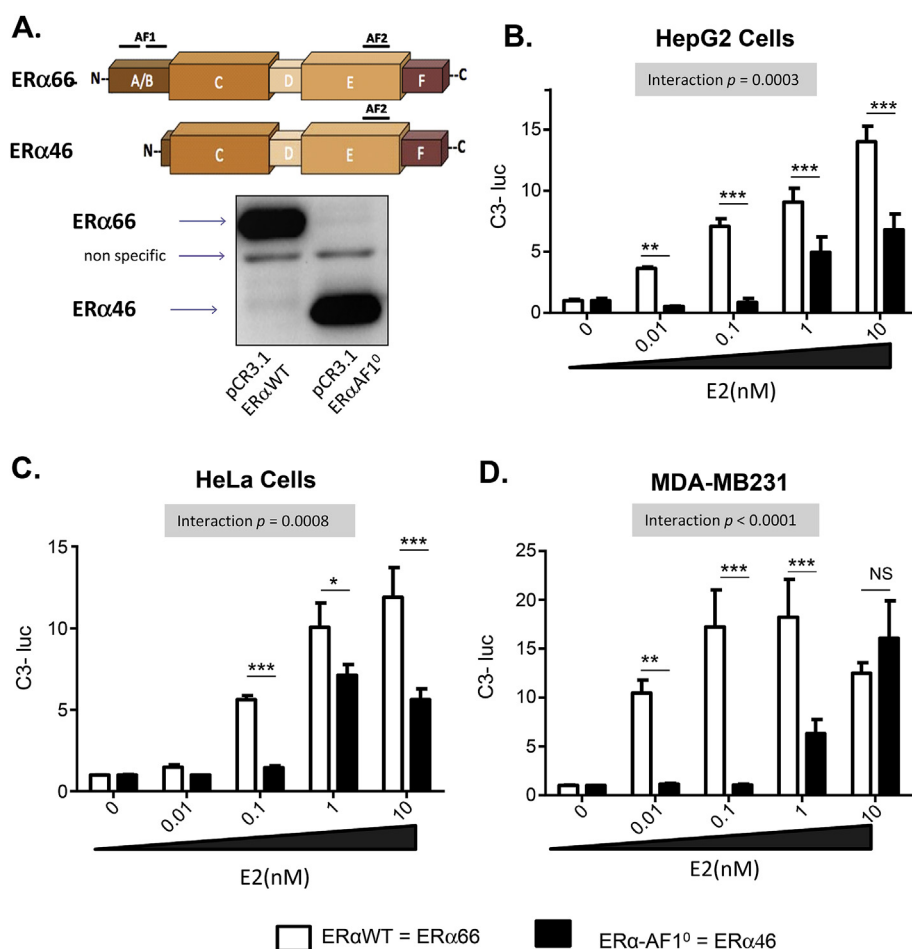


Fig. 4. Dose response of E2 transcriptional activity in cultured cells expressing ERα66 or ERα46.

Schematic representation of the wild-type ERα66 (ERαAF1^{+/+}) and ERα (ERαAF1⁰) isoforms and expression of these isoforms obtained from *in vitro* translation pCR-ERαWT or pCR-ERαAF1⁰ vectors performed with the TNT Coupled Reticulocyte Lysate System (A). HepG2 (B), HeLa (C) and MDA-MB231 (D) cells were transiently transfected with the C3-Luc reporter constructs in the presence of pCR-ERαWT, pCR-ERαAF1⁰, or empty pCR vectors. Cells were treated with the indicated dose of E₂ or vehicle (Ctrl) for 24 h. Normalized luciferase activities were expressed as fold increase above values measured with empty pCR and vehicle. Data correspond to the mean values \pm SEM of at least three separate transfection experiments. Two-way ANOVA followed by Fisher's LSD multiple comparison test were performed (ERαAF1^{+/+} versus ERαAF1⁰: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

deletion of AF1 (ERαAF1⁰ = ERα46) (Fig. 4A) that were introduced into three different cell lines by transient transfection (Fig. 4B–D). Expression vectors encoding wild type ERα and ERαAF1⁰ were expressed at similar level after transfection in these different cell types (Supplementary Fig. 1). In addition to the previously reported cell-specific differences in the transactivation efficiency between both receptors (Merot et al., 2004), we show here the need for higher doses of E₂ for ERαAF1⁰ than for ERαWT to induce the activity of the reporter gene. The EC₅₀ was about 10–100 fold higher for ERαAF1⁰ than for ERαWT, depending of the cell-type (Fig. 4B–D). In addition, even in higher dose, the maximum response was also much lower using ERαAF1⁰ (Fig. 4B and C), except for MDA-MB-231 cells (Fig. 4D).

We then decided to systematically assess the role of ERαAF-1 in the estrogenic response. To this end, we used ERαAF1⁰ mice expressing a 49-kDa truncated protein lacking the A domain and motifs constituting ERα AF-1 in the B domain (Fig. 5A) (Billon-Gales et al., 2009). Since some previous studies have used high doses of estrogens *in vivo*, until 5 mg E₂/pellet for 60 day release (Pedram et al., 2014), we have decided to add a very high dose (VHD-E₂: ~2000 pg/ml *i.e.* 2048 pg/ml \pm 242) to evaluate the role of AF-1 function *in vivo*. We previously reported that ERαAF1⁰ mice treated with pellets from Innovative Research (0.1 mg E₂/pellet: 60 day release) presented a moderate uterine hypertrophy that was essentially due to stromal edema, with minimal epithelial proliferation compared to WT mice (Abot et al., 2013). Here, we confirm that no uterine hypertrophy was observed in ERαAF1⁰ mice in response to LD and MD of E₂ (Fig. 5B). However, HD-E₂ or VHD-E₂ induced similar increase of uterine weight in ERαAF1⁰ and ERαWT mice, demonstrating that the deletion of the ERα AF1 function can be fully compensated by a 10 to 100-fold increase in the E₂ dose for some parameters such as uterine weight (Fig. 5B). For several other

parameters, such as endometrium epithelial proliferation (Fig. 5C) and vagina weight gain (Fig. 5D), E₂ action was not only shifted rightward but the magnitude of the response was also decreased, remaining below the full effect observed in control mice, even at the VHD-E₂ pharmacological dose. In addition, we demonstrate for the first time a role of ERαAF1 in vaginal epithelial proliferation, which as for uterine epithelial proliferation, is highly dependent of E₂ dose (Fig. 5E).

Finally, we reconsidered the question of the role of ERαAF1 in bone, and, as previously described, we demonstrated that ERαAF1 is dispensable for cortical response to E₂ regardless of the dose used, as revealed by the absence of interaction between genotype and E₂ treatment (Fig. 6A and B). It should be however noted a significant effect of genotype due to a smaller cortical thickness and a smaller cortical BMC in ERαAF1⁰ mice, independently on E₂. By contrast, ERαAF1 is required for the increase of bone mineral density (BMD) in response to E₂ in the trabecular compartment regardless of the dose (Fig. 6B). We confirmed that E₂ has no impact on bone length in both WT and ERαAF1⁰ mice but interestingly in ovariectomized mice, bone lengths from ERαAF1⁰ were smaller than in WT mice, as previously reported in older ERαAF1⁰ mice (Borjesson et al., 2012) (Fig. 6C). Altogether, these data definitely demonstrate that ERαAF1 is necessary for the full E₂ response in uterus, vagina and the trabecular bone compartment. However, depending on the phenotypic feature, ERαAF1 deficiency can be partially or fully overcome by using high E₂ levels.

4. Discussion

To understand the physiology of estrogens, as well as to optimize the use of female sex hormones in medicine, it is crucial to precisely delineate the sensitivity of the tissues to estrogen levels. It is a common

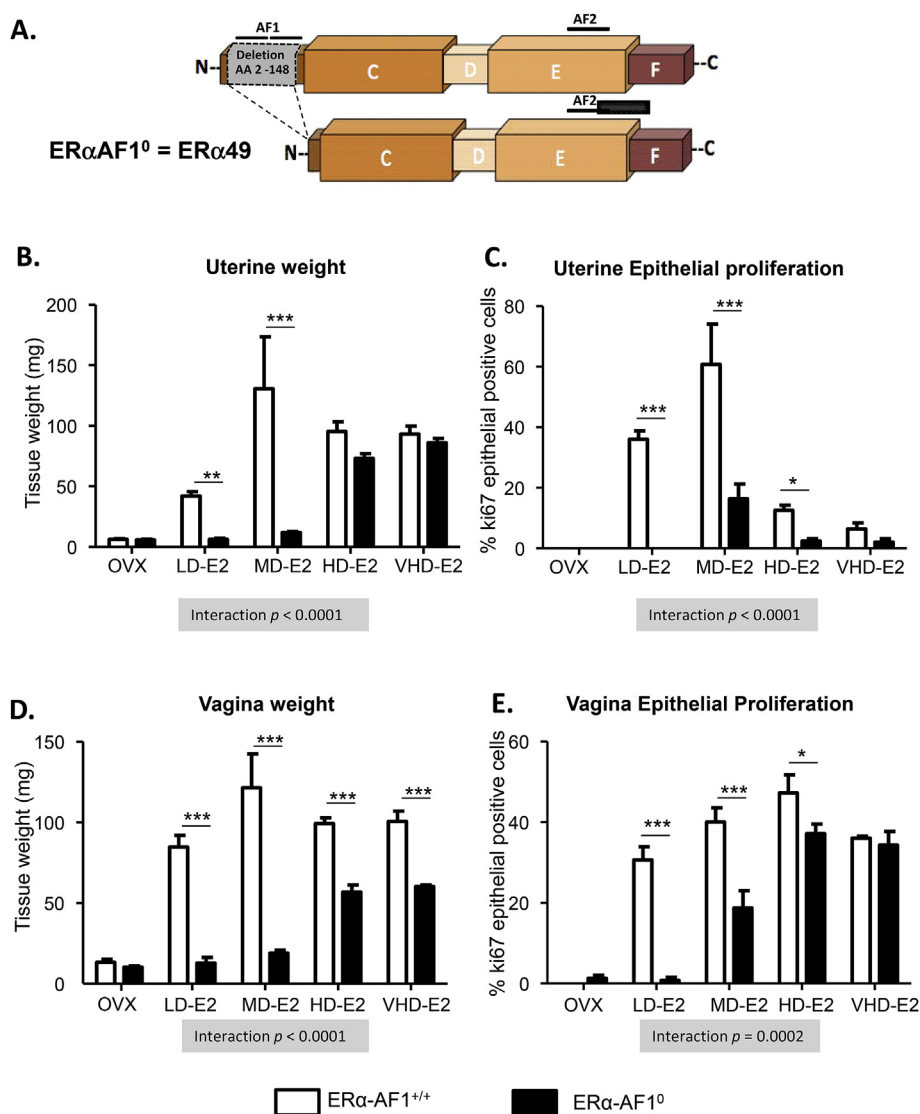


Fig. 5. The role of ERαAF1 in uterus and vagina is dependent of E2 dose.

Schematic representation of the wild-type ERαAF1^{+/+} and ERαAF1⁰ mouse constructs (A). Pellets releasing low dose (LD), medium dose (MD), high dose (HD) or very high dose (VHD) of E2 were implanted subcutaneously into ERαAF1⁰ ovariectomized mice during 3 weeks. Uterus (B, C) and vagina (D, E) were analyzed. Uterine (B) and vagina (D) weight. Percentage of uterine (C) and vagina (E) Ki67-positive epithelial cells. Representative Ki-67 detection in transverse uterus sections. Results are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA followed by Fisher's LSD multiple comparison test were performed (ERαAF1^{+/+} versus ERαAF1⁰: *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, n = 6/8 mice/group).

practice to ovariectomize mice to eliminate the main source of endogenous estrogens, and subsequently to administer E2 exogenously. Subcutaneous implantation of slow-release pellets is the most convenient and efficient way to deliver estrogen to mice; it avoids the stress associated with daily subcutaneous injections. In our study, the low dose of E2 (metestrus level) impacted vagina, uterus and bone tissues in ovariectomized mice, whereas the medium dose (proestrus level) was necessary to elicit a maximal effect. However, the use of a supraphysiological dose (HD-E2) did not confer any further stimulation compared to the medium dose in these tissues. The HD of E2 even induced a lesser response than the MD of E2 in the uterus, but not in bone nor in the vagina. There are numerous examples of estrogen hormesis, *i.e.* lowering activity levels while increasing doses, concerning a wide variety of endpoints, including cerebral (Strom et al., 2009, 2010, 2011), mammary gland differentiation (Vandenberg et al., 2006) and insulin sensitivity (Gonzalez et al., 2002). High concentrations of E2 can also lead to increased levels of metabolites, such as estrone (Supplementary Table 2), which can also influence the biological responses through either dependent or independent ER mechanisms (Thomas and Potter, 2013).

Remarkably, despite a significant effect on cortical thickness and BMC as well as on trabecular BMD, E2 even at a very high dose had no impact on bone length in our experimental conditions. This result differs from previous studies that reported a reduced bone length and

growth plate width using high dose of E2 in older mice (Borjesson et al., 2010, 2012). These apparent discrepancies underline the importance of the age of ovariectomy, age of mouse studied, and timing of E2 supplementation.

E2 effects are mediated by hormone binding to ERα, ERβ or GPR30 (Miller et al., 2017). ERα also exists as two isoforms, designated ERα66 and ERα46, based on their respective molecular weight, and both isoforms were reported to regulate E2-mediated proliferation in the mouse uterus (Abot et al., 2013). The expression of ERα46 in the rat uterus was demonstrated even before the use of antibodies against ERα (Faye et al., 1986). Importantly, we recently demonstrated that ERα46 is frequently and sometimes abundantly expressed in ERα-positive breast tumors, but the mechanisms of its generation as well as pathophysiological significance of its expression are essentially unknown (Chantalat et al., 2016). Furthermore, the specific signalling events associated with this AF1-deficient isoform as well as its interactions with the full length ERα66 remain unclear. Given the complexity of estrogen-mediated actions, which goes far beyond the single-receptor situation on which the linear dose-response model is based, it is not surprising that E2 can elicit hormetic responses. In particular, varied affinities for distinct receptors having different intrinsic activity levels would essentially lead to a “mixture” effect, where the summation of their individual dose-response curves would lead to composite behaviour that could be non-monotonic (Miller et al., 2017). In particular, we and others previously

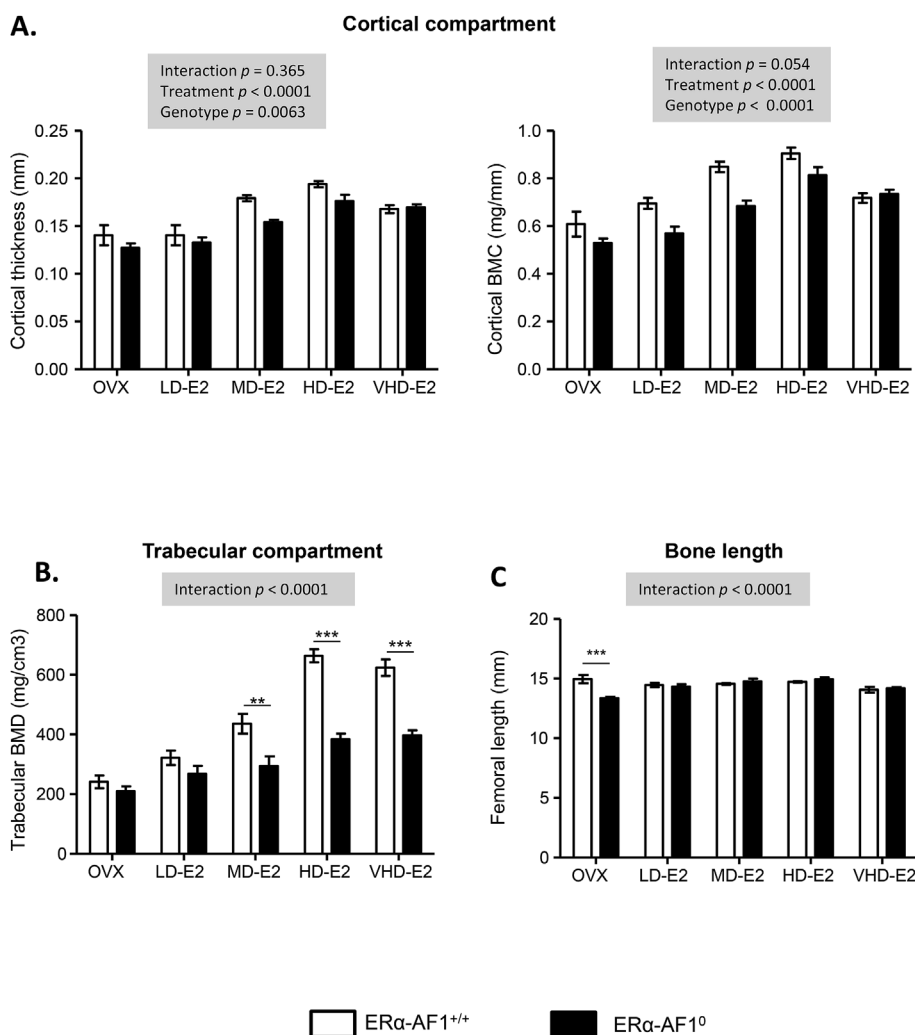


Fig. 6. E2 dose response analysis of trabecular and cortical bone parameters in wild-type ERαAF1^{+/+} and ERαAF1⁰ mice.

Pellets releasing low dose (LD), medium dose (MD), high dose (HD) or very high dose (VHD) of E2 were implanted subcutaneously to ERαAF1⁰ ovariectomized mice for a period of 3 weeks and femurs were analyzed. Cortical thickness and cortical bone mineral content (BMC) in the mid-diaphyseal part of femur. 2-way ANOVA test revealed no significant interaction, the overall effect of the treatment and genotype was analyzed (A). Trabecular bone mineral density (BMD) in the distal metaphyseal part of femur (B) and Bone length (C). Results are expressed as means \pm SEM. Since two-way ANOVA test revealed a significant interaction between the 2 factors (E2 exposure and genotype), a Fisher's LSD multiple comparison test were performed (ERαAF1^{+/+} versus ERαAF1⁰: **P < 0.01, ***P < 0.001, n = 6/8 mice/group) (B, C).

proposed that ERα46 counteracts ERα66 on E2-induced cell proliferation (Abot et al., 2013; Penot et al., 2005).

The structural difference between ERα66 and ERα46, according to our current knowledge, resides mainly in the absence of AF1 in ERα46 (Chantalat et al., 2016). Accordingly, both receptors exhibit different transactivation efficiencies in a cell-specific manner (Merot et al., 2004). It has been proposed that ERα46 could have a repressive role in AF1-permissive contexts through interference with ERα66 binding to DNA (Penot et al., 2005). The present study deepens the comparison between both ERα forms by revealing a major difference in their transcriptional sensitivity to the dose of E2. To reach the maximal level of ligand-dependent transcriptional activity, ERα46 requires an E2 dose 10 to 100 times higher than does ERα66. Several studies have shown that N-terminal truncated forms of ERα, including ERα46, have an affinity for E2 which is similar to that found for the wild-type ERα66, indicating that the hormone binding domain is able to function independently of the N-terminal half of the ER (Kumar et al., 1986; Carlson et al., 1997; Lin et al., 2013). However, differences in ERα binding to DNA and in coactivator and/or corepressor recruitment could explain the distinctively lower sensitivity of ERα46 versus ERα66 to the dose of E2. We previously reported that although the qualitative overall recruitment of cofactors is quite similar between ERα46 and ERα66, there is a quantitative differential modulation with some preference for cofactor binding to ERα66 over ERα46 (Chantalat et al., 2016). ERα46 is also able to recruit transcriptional repressors in a ligand-independent manner (Metivier et al., 2004). In accordance with the specific binding of coregulators, we reported that some genes were

specifically regulated by either the ERα46 or ERα66 isoforms, demonstrating that the absence of ERαAF1 affects specific transcriptional programs rather than leading to an overall decreased activity (Chantalat et al., 2016).

Using mice harbouring an ERα deleted for AF1 (ERαAF1⁰), we previously demonstrated that ERαAF1 is necessary to induce uterine hypertrophy, suggesting that ERα46 is not able to mediate E2 responses in uterus (Abot et al., 2013). Here, we demonstrate that with a HD of E2, the increase in uterine weight is similar between ERαAF1⁰ and ERαWT, although an attenuated response is observed in terms of epithelial proliferation. By contrast, physiological LD or MD doses of E2 leading to levels encountered during the estrous cycle were unable to induce a uterine response in ERαAF1⁰ mice in contrast to ERαWT mice. These results demonstrate that the involvement of ERαAF1 in the E2 response is highly dependent on ligand dose, and that different signalling pathways regulate epithelial proliferation and uterine weight gain. Similarly, the response to E2 in vagina and trabecular bone are dependent of ERαAF-1, since this response is not only shifted rightward but also decreased in intensity, suggesting that these tissues can be used as an index of ERαAF-1-dependent estrogenicity.

There is also evidence that amino acid phosphorylation located in the ERαAF-1 domain, regulates numerous aspects of ERα function, including protein stability, hormone binding, receptor dimerization, DNA binding, protein-protein interactions, and transcription activity (Orti et al., 1992; Lannigan, 2003; Weigel and Moore, 2007). In particular, Ser118 has been implicated in ERα mediated transcriptional regulation since a partial or complete attenuation of E2-induced transcription has

been observed in ER α S118A transfected cells (Ali et al., 1993; Duplessis et al., 2011). Appropriate transgenic mouse studies should be developed to determine the importance of ER α Ser118 phosphorylation *in vivo*.

5. Conclusion

We describe here the dose-effect of E2 on sexual targets and bone thanks to a simple, reliable and unexpensive slow release device. Our results demonstrate that the estrogenic effect on tissues is highly dependent on the dose used. Although the precise role of ER α AF1 both in physiology and in pathology remains to be clarified, the present work reveals that ER α AF1 provides an important layer of regulation through the sensitization of the response to estrogens. The role of ER α AF1 can be even more spectacular in the action of some selective ER modulators (SERMs) (Arao and Korach, 2019). For instance, tamoxifen selectively activates ER α AF1, and this activation is required for the beneficial effects of this SERM on arteries (Fontaine et al., 2013) and metabolism (Guillaume et al., 2017), while at the same time it prevents the recurrence of breast cancer. Whereas antagonist activity of tamoxifen is essentially through the ER α AF2 blockade, molecular mechanism of its partial agonist activity that involved ER α AF1 activation is not fully understood (Arao and Korach, 2019). Here, we report that importance of ER α AF1 domain in estrogenic response depend on both considered cell type/tissues and ligand dose, two parameters which could be determinant in the agonist activity of E2 or SERM that controls ER α AF1-mediated physiological response.

Funding

This work was also supported by the INSERM, the Université de Toulouse III, the Fondation pour la Recherche Médicale, the Fondation de France (N°00086486), the ANR (Agence nationale de la Recherche), the CNRS, the University of Rennes1 and by the Ligue Contre le Cancer. Support was also provided by the National Institutes of Health (NIH R01 DK015556 to JAK) and the Breast Cancer Research Foundation (BCRF 18–082 to BSK and BCRF 18–083 to JAK and BSK).

Declaration of competing interest

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

The staff of the animal facilities and of the “Plateforme d'expérimentation fonctionnelle” are acknowledged for their skillful technical assistance. We also thank P. Espagnol, G. Carcasses, S. Negroni and M. Lulka. We are also grateful to Céline Bleuart and Isabelle Pardo for providing excellent technical support and advice regarding the histology (ENVT).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110741>.

References

Abot, A., Fontaine, C., Raymond-Letron, I., Flouriot, G., Adlanmerini, M., Buscato, M., Otto, C., Berges, H., Laurell, H., Gourdy, P., Lenfant, F., Arnal, J.F., 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.

Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M., Chambon, P., 1993. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J.* 12, 1153–1160.

Almeida, M., Laurent, M.R., Dubois, V., Claessens, F., O'Brien, C.A., Bouillon, R., Vanderschueren, D., Manolagas, S.C., 2017. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 97, 135–187.

Arao, Y., Korach, K.S., 2019. Transactivation function-1-mediated partial agonist activity of selective estrogen receptor modulator requires homo-dimerization of the estrogen receptor alpha ligand binding domain. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Arnal, J.F., Fontaine, C., Abot, A., Valera, M.C., Laurell, H., Gourdy, P., 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.

Billon-Gales, A., Fontaine, C., Filipe, C., Douin-Echinard, V., Fouque, M.J., Flouriot, G., Gourdy, P., Lenfant, F., Laurell, H., Krust, A., Chambon, P., Arnal, J.F., 2009. The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculo-protective actions of 17beta-estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2053–2058.

Borjesson, A.E., Lagerquist, M.K., Liu, C., Shao, R., Windahl, S.H., Karlsson, C., Sjogren, K., Moverare-Skrtic, S., Antal, M.C., Krust, A., Mohan, S., Chambon, P., Savendahl, L., Ohlsson, C., 2010. The role of estrogen receptor alpha in growth plate cartilage for longitudinal bone growth. *J. Bone Miner. Res.* 25, 2690–2700.

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., Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., Ohlsson, C., 2011. Roles of transactivating functions 1 and 2 of estrogen receptor-alpha in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6288–6293.

Borjesson, A.E., Windahl, S.H., Karimian, E., Eriksson, E.E., Lagerquist, M.K., Engdahl, C., Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., Savendahl, L., Ohlsson, C., 2012. The role of estrogen receptor-alpha and its activation function-1 for growth plate closure in female mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E1381–E1389.

Carlson, K.E., Choi, I., Gee, A., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., 1997. Altered ligand binding properties and enhanced stability of a constitutively active estrogen receptor: evidence that an open pocket conformation is required for ligand interaction. *Biochemistry* 36, 14897–14905.

Chantalat, E., Boudou, F., Laurell, H., Paliere, G., Houtman, R., Melchers, D., Rochaix, P., Filleron, T., Stella, A., Burlet-Schiltz, O., Brouchet, A., Flouriot, G., Metivier, R., Arnal, J.F., Fontaine, C., Lenfant, F., 2016. The AF-1-deficient estrogen receptor ERalpha46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Res.* 18, 123.

Denger, S., Reid, G., Kos, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K.S., Sonntag-Buck, V., Gannon, F., 2001. ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol. Endocrinol.* 15, 2064–2077.

Duarte-Guterman, P., Yagi, S., Chow, C., Galea, L.A., 2015. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Horm. Behav.* 74, 37–52.

Duplessis, T.T., Williams, C.C., Hill, S.M., Rowan, B.G., 2011. Phosphorylation of Estrogen Receptor alpha at serine 118 directs recruitment of promoter complexes and gene-specific transcription. *Endocrinology* 152, 2517–2526.

Faye, J.C., Fargin, A., Bayard, F., 1986. Dissimilarities between the uterine estrogen receptor in cytosol of castrated and estradiol-treated rats. *Endocrinology* 118, 2276–2283.

Fontaine, C., Abot, A., Billon-Gales, A., Flouriot, G., Berges, H., Grunenwald, E., Vinel, A., Valera, M.C., Gourdy, P., Arnal, J.F., 2013. Tamoxifen elicits atheroprotection through estrogen receptor alpha AF-1 but does not accelerate reendothelialization. *Am. J. Pathol.* 183, 304–312.

Giton, F., Trabado, S., Maione, L., Sarfati, J., Le Bouc, Y., Brailly-Tabard, S., Fiet, J., Young, J., 2015. Sex steroids, precursors, and metabolite deficiencies in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism and panhypopituitarism: a GCMS-based comparative study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E292–E296.

Gonzalez, C., Alonso, A., Grueso, N.A., Diaz, F., Esteban, M.M., Fernandez, S., Patterson, A.M., 2002. Role of 17beta-estradiol administration on insulin sensitivity in the rat: implications for the insulin receptor. *Steroids* 67, 993–1005.

Guillaume, M., Handgraaf, S., Fabre, A., Raymond-Letron, I., Riant, E., Montagner, A., Vinel, A., Buscato, M., Smirnova, N., Fontaine, C., Guillou, H., Arnal, J.F., Gourdy, P., 2017. Selective activation of estrogen receptor alpha activation function-1 is sufficient to prevent obesity, steatosis, and insulin resistance in mouse. *Am. J. Pathol.* 187, 1273–1287.

Hamilton, K.J., Hewitt, S.C., Arao, Y., Korach, K.S., 2017. Estrogen hormone biology. *Curr. Top. Dev. Biol.* 125, 109–146.

Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2018. Estrogen receptors: new directions in the new millennium. *Endocr. Rev.* 39, 664–675.

Hsieh, C.Y., Santell, R.C., Haslam, S.Z., Helferich, W.G., 1998. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Canc. Res.* 58, 3833–3838.

Kumar, V., Green, S., Staub, A., Chambon, P., 1986. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J.* 5, 2231–2236.

Lannigan, D.A., 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1–9.

Lin, A.H., Li, R.W., Ho, E.Y., Leung, G.P., Leung, S.W., Vanhoutte, P.M., Man, R.Y., 2013. Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor-alpha isoforms. *PLoS One* 8, e63199.

Merot, Y., Metivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, 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, 26184–26191.

Metivier, R., Penot, G., Carmouche, R.P., Hubner, M.R., Reid, G., Denger, S., Manu, D., Brand, H., Kos, M., Benes, V., Gannon, F., 2004. Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *EMBO J.* 23, 3653–3666.

Miller, M.M., McMullen, P.D., Andersen, M.E., Clewell, R.A., 2017. Multiple receptors shape the estrogen response pathway and are critical considerations for the future of *in vitro*-based risk assessment efforts. *Crit. Rev. Toxicol.* 47, 564–580.

Murphy, A.J., Guyre, P.M., Wira, C.R., Pioli, P.A., 2009. Estradiol regulates expression of

- estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PloS One* 4, e5539.
- Nilsson, M.E., Vandenput, L., Tivesten, A., Norlen, A.K., Lagerquist, M.K., Windahl, S.H., Borjesson, A.E., Farman, H.H., Poutanen, M., Benrick, A., Maliqueo, M., Stener-Victorin, E., Ryberg, H., Ohlsson, C., 2015. Measurement of a comprehensive sex steroid profile in rodent serum by high-sensitive gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Endocrinology* 156, 2492–2502.
- Orti, E., Bodwell, J.E., Munck, A., 1992. Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr. Rev.* 13, 105–128.
- Pedram, A., Razandi, M., Lewis, M., Hammes, S., Levin, E.R., 2014. Membrane-localized estrogen receptor alpha is required for normal organ development and function. *Dev. Cell* 29, 482–490.
- Penot, G., Le Peron, C., Merot, Y., Grimaud-Fanouillere, E., Ferriere, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Metivier, R., Flouriot, G., 2005. The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 5474–5484.
- Rooney, A.M., van der Meulen, M.C.H., 2017. Mouse models to evaluate the role of estrogen receptor alpha in skeletal maintenance and adaptation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1410, 85–92.
- Strom, J.O., Theodorsson, A., Theodorsson, E., 2009. Dose-related neuroprotective versus neurodamaging effects of estrogens in rat cerebral ischemia: a systematic analysis. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* 29, 1359–1372.
- Strom, J.O., Theodorsson, E., Holm, L., Theodorsson, A., 2010. Different methods for administering 17beta-estradiol to ovariectomized rats result in opposite effects on ischemic brain damage. *BMC Neurosci.* 11, 39.
- Strom, J.O., Theodorsson, A., Theodorsson, E., 2011. Hormesis and female sex hormones. *Pharmaceuticals* 4, 726–740.
- Thomas, M.P., Potter, B.V., 2013. The structural biology of oestrogen metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 137, 27–49.
- Valera, M.C., Fontaine, C., Dupuis, M., Noirrit-Eclassan, E., Vinel, A., Guillaume, M., Gourdy, P., Lenfant, F., Arnal, J.F., 2018. Towards optimization of estrogen receptor modulation in medicine. *Pharmacol. Ther.* 189, 123–129.
- Vandenberg, L.N., Wadia, P.R., Schaeberle, C.M., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2006. The mammary gland response to estradiol: monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101, 263–274.
- Vidal, O., Lindberg, M.K., Hollberg, K., Baylink, D.J., Andersson, G., Lubahn, D.B., Mohan, S., Gustafsson, J.A., Ohlsson, C., 2000. Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5474–5479.
- Weigel, N.L., Moore, N.L., 2007. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol. Endocrinol.* 21, 2311–2319.
- Windahl, S.H., Vidal, O., Andersson, G., Gustafsson, J.A., Ohlsson, C., 1999. Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice. *J. Clin. Invest.* 104, 895–901.

Accuracy (%)	Analyte	Target ion analyte /IS (amu)	Range (pg/ml) R ²	Mean (pg/ml) 17 runs <i>Intra- & Inter assay CVs (%)</i>			
				LLOQ	Low QC	Middle QC	High QC
94-107	E2	660/664	0.2- 56.0 0.9994	0.22 17.3 -19.6	2.87 2.9-4.2	6.07 2.6-3.7	12.88 2.3-3.33

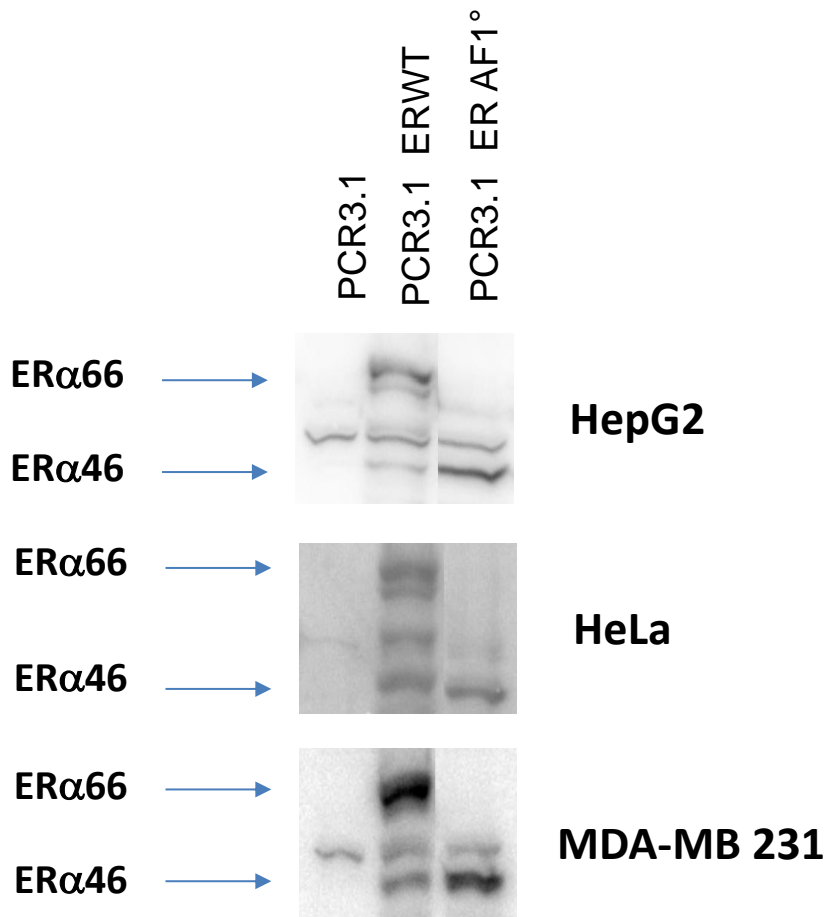
LLOQ : low limit of quantification; QC : quality control

Supplementary Table 1 : GC/MS plasma analytical control validation

	OVX	LD-E2	MD-E2	HD-E2
Estrone (E1)	< 10pg/ml	< 10pg/ml	< 10pg/ml	22,5 +/- 5,4

Results are expressed as means \pm SEM.

Supplementary Table 2: GC/MS plasma Estrone (E1) dosage



Supplementary Figure 1: Western blot analysis was performed on an equal amount of cellular extracts prepared from cells transfected with empty vectors (lane 1) expression vectors encoding wild type (lane 2), or ERαAF1⁰ mutant (lane 3).

ANNEXE 3 :

Estetrol prevents diet-induced metabolic disorders, such as obesity and atheroma, in an ER α liver-independent manner

Mélissa Buscato^{*}, Morgane Davezac^{*}, Rana Zahreddine, Marianne Fillet, Gael Cobraiville, Marine Adlanmerini, Cedric Moro, Raphaël Métivier, Françoise Lenfant, Pierre Gourdy, Jean-François Arnal^{*}, Coralie Fontaine^{*}

(Article en préparation)

Estetrol prevents western diet-induced obesity and atheroma independently of hepatic estrogen receptor (ER) α

Mélissa Buscato^{1(*)}, Morgane Davezac^{1(*)}, Rana Zahreddine¹, Marine Adlanmerini¹, Raphaël Métivier², Marianne Fillet³, Gael Cobraiville³, Cedric Moro¹, Jean-Michel Foidart⁴, Françoise Lenfant¹, Pierre Gourdy^{1,5}, Jean-François Arnal^{1(*)#}, Coralie Fontaine^{1(*)}.

1 I2MC, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U 1048, University of Toulouse3, Toulouse, France

2 CNRS, Univ Rennes, IGDR (Institut de Génétique De Rennes) – UMR 6290, F-35000 Rennes, France

3 Laboratory for the Analysis of Medicines, Center for Interdisciplinary Research on Medicines (CIRM), University of Liege, Quartier hospital, Avenue Hippocrate 15, 4000 Liege, Belgium

4 Université de Liège, Groupe Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée, Liège, Belgique

5 Département de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, CHU de Toulouse, Toulouse, France

(*) the authors equally contributed to this work

Corresponding author : Jean-François Arnal

INSERM/UPS UMR 1048 - I2MC

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

1 avenue Jean Poulhès, BP 84225

31432 Toulouse Cedex 4

Tel: +33 5 31 22 40 98

E-mail: jean-francois.arnal@inserm.fr

ABBREVIATIONS

CEE : Conjugate equine estrogens
E2 : 17- β estradiol
E4 : Estetrol
ER α : Estrogen receptor alpha
HT : Hormonal therapy
MISS : Membrane-initiated steroid signals
MPA : Medroxyprogesterone acetate
NAFLD : Non-alcoholic fatty liver disease
SERM : Selective estrogen receptor modulators
TAM : Tamoxifen

HIGHLIGHTS

- Estetrol (E4) is a fetal estrogen developed for the prevention of menopause symptoms.
- In women, E4 was found to have limited effects on hepatic-derived coagulation factors.
- E4 prevents obesity, steatosis and atherosclerosis in mice fed with western diet.
- Hepatic ER α is necessary for the prevention of steatosis, but not of obesity and atherosclerosis.

ABSTRACT

Objective: Estetrol (E4), a natural estrogen synthesized by the human fetal liver, is currently evaluated in phase III clinical studies as a new menopause hormone therapy. Indeed, E4 significantly improves vasomotor and genito-urinary menopausal symptoms and prevents bone demineralization. Compared to other estrogens, E4 was found to have limited effects on coagulation factors in the liver of women allowing to expect less thrombotic events. To fully delineate its clinical potential, the aim of this study was to assess the effect of E4 on metabolic disorders as well as the role of hepatic estrogen receptor (ER) α in this process.

Methods: We studied pathophysiological consequences of a western diet (42% kcal fat, 0.2% cholesterol) in ovariectomized female mice under chronic E4 treatment. To evaluate the role of hepatic ER α on the metabolic effects on E4 and associated disorders such as atherosclerosis and steatosis, mice harbouring a hepatocyte-specific ER α deletion (LERKO) were crossed with LDLR^{-/-} mice.

Results: We found that: 1) E4 reduced body weight gain and improved glucose tolerance in both C57Bl/6 and LDLR^{-/-} mice. 2) Liver ER α is dispensable for the E4 beneficial actions on obesity and atheroma, 3) but is necessary to prevent steatosis in mice.

Conclusion: To conclude, whereas E4 was found to have limited effects on coagulation factors in the liver of women, our results suggest that E4 confers a metabolic protection against obesity and associated diseases which complete its really promising clinical potential.

Key words: estetrol, estrogen receptor, menopause, fatty liver, atherosclerosis, metabolic syndrome

1. INTRODUCTION

The risk for women to develop metabolic disorders increases significantly after menopause, especially in countries with unbalanced diet habits. Accordingly, postmenopausal women exhibit a higher risk of developing type 2 diabetes, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis [1]. Estrogens are well-recognized as key regulators of energy balance and glucose homeostasis. Indeed, cessation production of 17- β estradiol (E2) by ovaries at menopause promotes visceral adiposity and insulin resistance resulting in an increased risk of type 2 diabetes [2]. In addition, hormonal therapy (HT) was found to reduce the incidence of type 2 diabetes in postmenopausal women [3]. In randomized placebo-controlled studies, a significant 21-35% decrease in diabetes occurrence was observed in menopausal women receiving the association of conjugate equine estrogens (CEE) and medroxyprogesterone acetate (MPA) [4]. However, HT is associated with two major adverse effects: i) an increased risk of thromboembolic events, probably as a consequence, at least in part, of an increase in hepatic-derived coagulation factors and ii) an increased incidence of breast cancer [5]. The identification of safer compounds for HT is thus needed.

Estetrol (E4) is a natural estrogen produced only by the human fetal liver from the 9th week gestation. Low levels of E4 (1% of the human plasma concentration) appear also in monkeys during the last three weeks of gestation (unpublished results). It could be an interesting candidate in oral contraception [6] but also for HT [7]. Indeed, E4 treatment did not appear to increase the level of hepatic-derived coagulation factors, and therefore might not increase the risk of thromboembolic events [7,8]. E4 used in clinical studies is synthesized from estrone contained in soy and is identical to the natural hormone with over 99% purity. E4 is currently evaluated in phase III clinical studies [9] and a recent multiple-rising-dose study showed that it had beneficial effects on vasomotor symptoms, bone metabolism and

genito-urinary syndrome in menopausal women [10,11]. However, the effect of E4 on metabolic disorders and associated diseases are poorly described.

E4 is a natural estrogen but its physiological role remains unknown. As E2, the main natural estrogen in adults, E4 activates the nuclear Estrogen Receptor alpha (ER α) to regulate genomic transcription [12]. But in contrast with E2, E4 does not activate membrane ER α and even inhibits this membrane-initiated steroid signals (MISS) effects of E2 [12]. Thus while E2 elicits endothelial NO synthase activation and accelerates endothelial healing, E4 exerts no effect by itself, and even abrogates these E2-induced actions [12]. E4 is thus considered as a natural estrogen with selective activation of ER α depending on the tissues, meaning that E4 can act as an agonist or an antagonist of ER α in some target cells.

Selective estrogen receptor modulators (SERMs) belong to a family of drugs used in various estrogen-related diseases such as tamoxifen (TAM) for the treatment of breast cancer, raloxifene for the treatment of osteoporosis, or bazedoxifene, in association to estrogens, for the management of postmenopausal symptoms. As E2, SERMs confer protection from metabolic disorders observed in response to high-fat diets [13–15]. However, molecular and cellular targets accounting for their protective action against a metabolic stress appear to differ greatly from that of E2, although mediated by ER α in all cases [15]. While E2 improves metabolic homeostasis, at least partially, by increasing hepatic production of fibroblast growth factor 21 (FGF21), bazedoxifene increases hepatic expression of Sirtuin1, PPAR α and AMPK activity [16]. In addition, we recently demonstrated that, whereas E2 still prevented obesity and glucose intolerance in liver-specific ER α knock out (LERKO) mice, similar beneficial metabolic actions of tamoxifen were totally abrogated in those mice. Furthermore, and by contrast to E2, the whole-body metabolic protection of tamoxifen is entirely dependent on the hepatokine growth differentiation factor 15 (GDF15) [17]. Interestingly, GDF15 is induced in response to chronic exposure to tamoxifen [17] and bazedoxifene [18] but not to E2.

Accordingly, ER α binding sites were found in *Gdf15* regulatory region in liver from TAM-treated mice but not in E2-treated mice, due to specific epigenetic modifications [17].

The aim of this study was to evaluate the ability of E4 to prevent obesity and associated metabolic and vascular disorders in ovariectomized female mice fed a western diet. We demonstrated that E4 protects against body weight gain and glucose intolerance in both C57Bl/6 and LDLR^{-/-} mice and also prevents steatosis and atherosclerosis. We finally demonstrate that, whereas liver ER α is necessary to the prevention of steatosis in response to E4, it is fully dispensable for E4 protection against obesity and atheroma, highlighting dissociation between global metabolic effect of E4 and its liver impact.

2. MATERIAL & METHODS

2.1 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. The investigation is consistent with the directive 2010/63/EU of the European parliament. ER α AF2⁰ mouse line was generated as described previously [19]. To generate the double-deficient mice, LDLR^{-/-} female mice, purchased from Charles River (L'Arbresle, France), were crossed with AlbCreER α ^{flox/flox} mice (LERKO) [17]. WT mice are on a C57Bl/6 background and genetically manipulated mice are systematically compared to their wild type littermates control (n= 7 to 12 per group).

2.2 *In vivo* experimental procedures

At 4 weeks of age, bilateral ovariectomy was performed after intraperitoneal injection of ketamine (100 mg.kg⁻¹) and xylazine (10 mg.kg⁻¹). Two weeks after surgery, mice were switched to a western diet (42% kcal fat, 0.2% cholesterol, Envigo) and concomitantly implanted with *s.c.* pellets releasing either placebo or E4 at 6, 9 and 12 weeks of age. Body weight was recorded weekly. Intra-peritoneal glucose tolerance test was performed at 13 weeks of age after overnight fasting. Blood glucose concentrations were monitored with a glucose meter (Roche Diagnostic, Meylan, France) at -30, 0, 30, 60, and 90 min after glucose injection (1 g/kg). Basal metabolism was evaluated by indirect calorimetry after 8 weeks of treatment. Data were collected after 24h of acclimatization in individual cages. Energy expenditure was measured (Phenomaster; TSE-Systems) in individual mice at 10-min intervals during a 24-h period at constant temperature (20°C). Physical activity was monitored by an infrared photocell beam interruption method.

2.3 Pellet preparation and E4 Dosage

To deliver E4 over prolonged periods of time, E4 (Mithra) and cholesterol (C3045 Sigma-Aldrich) were thoroughly mixed in powder form and compacted to obtain pellets (weight/weight ratio of E4/cholesterol at 1/20). Mice were implanted subcutaneously every 3 weeks with E4 pellets (1 mg E4/pellet total) or a vehicle (cholesterol only) pellets as recently described [20]. Preliminary experiments determined a 5 ng/ml plasma concentration of E4 after 3 weeks of this treatment, corresponding to the level observed 3h after a single oral administration of E4 at 1 mg/kg/day [21] (**Supplementary Figure 1**). This plasma concentration is clinically relevant, as it is comparable to those observed in women receiving chronically a daily administration of 15 mg E4 (2 to 5 fold higher) (Mithra communication study MIT ES 0001). To analyze hepatokine gene expression in the liver, 4 week-old mice were ovariectomised and were implanted subcutaneously with E4, E2 (weight/weight ratio of E2/cholesterol at 1/2500), TAM (weight/weight of TAM/cholesterol 0,5/20) or vehicle pellets for 2 weeks.

2.4 Liver and perigonadal adipose tissue histology

Liver and perigonadal adipose tissues were quickly excised, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (3 µm) were stained with haematoxylin/eosin (H&E) and oil red O as previously described [17]. Images were obtained with nanozoomer scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and analyzed with NDP view software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan).

2.5 Liver lipid content analysis

Hepatic levels of triglycerides and cholesterol esters were determined using Bligh & Dyer methodology and lipid extracts were analyzed by gas-liquid chromatography as previously described [17].

2.6 Gene expression analysis

Tissues were homogenized using a Precellys tissue homogenizer (Bertin Technol., Cedex, France) and total tissues RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA). 1000 ng for liver and 500 ng for aorta of RNA was reverse transcribed (RT) at 25°C for 10 min and then at 37°C for 2 h using the High Capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems). For gene expression in aorta and liver, qPCR were performed using SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) with primers efficiency validated using standard curves method (95% < efficiency < 105%). Gene expression was quantified using the comparative C_t (threshold cycle) method. *Tpt1* and *Ppia* were used as housekeeping gene to normalize the mRNA levels respectively in the aorta and the liver.

2.7 Analysis of atherosclerosis lesions

Overnight fasted mice were anesthetized, and blood was collected from the retro-orbital venous plexus before harvesting the heart. Lipid deposition was evaluated at the aortic sinus as previously described [22]. Briefly, each heart was frozen on a cryostat mount with OCT compound. One hundred 10- μ m thick sections 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. Ten sections out of the 100, each separated by 90 μ m, were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions using a computerized Biocom morphometry system. The first and most proximal section to the heart was taken 90 μ m distal to the point where the aorta first becomes rounded. The mean lesion size (expressed in μ m²) of these 10 sections was used for each animal.

2.8 Determination of plasma lipids

Plasma triglycerides were assayed using ABX Pentra Triglycerides CP (ABX Pentra, Horiba, Montpellier, France). The high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL)

fractions were isolated from 10 μ l of serum and assayed using the “ABX Pentra HDL Direct CP” method (ABX Pentra, Horiba, Montpellier, France).

2.9 Statistics

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis were performed using GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA; www.graphpad.com). T-test was used to analyse the effect of treatment in WT or LDLR^{-/-} mice. ANOVA-2 factor were used to analyse the effects of treatment and genotype. Fischer LSD post-test were subsequently performed in case of interaction. $P < 0.05$ was considered statistically significant (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

3. RESULTS

3.1 Estetrol prevents western diet induced-obesity and steatosis in ovariectomized C57Bl/6 wild type mice.

To evaluate the metabolic impact of E4, we first determined whether, as previously described for E2 and SERMs, E4 was able to confer protection against metabolic syndrome in response to western diet. To this aim, ovariectomized WT female mice were fed a western diet (42% kcal fat, 0.2% cholesterol) and concomitantly implanted with subcutaneous E4 pellets or a vehicle for 9 weeks (**Figure 1A**). Uterine impregnation was chosen as a positive control of estrogenic action. As expected, ovariectomy led to uterine atrophy, whereas chronic E4 treatment increased uterine weight (**Figure 1B**). Weekly body weight measurements revealed that E4-treated mice are protected against western diet induced-obesity from the first weeks of treatment (**Figure 1C**). After 9 weeks of treatment, E4-treated mice were remarkably leaner (**Figure 1D**) and characterised by reduced accumulation of subcutaneous, perigonadal and mesenteric adipose tissues (**Figure 1E**). Accordingly, the mean area of adipocytes from perigonadal adipose tissue was significantly lower in E4-treated mice compared to control mice (**Figure 1F**). Protection conferred by E4 against body weight gain was associated with improved glucose tolerance (**Figure 1G**) and lower lipid accumulation in the liver (**Figure 1H**). Importantly, this metabolic protection given by chronic E4 treatment was mediated by ER α , and more particularly by its nuclear signalling, since prevention of body weight gain and accumulation of subcutaneous, perigonadal and mesenteric adipose tissues in response to western diet were abolished in ER α AF2⁰ mice treated with E4 (**Table 1 and Supplementary Figure 2**).

To further explore the beneficial effect of E4 on metabolism, we analysed basal metabolism by indirect calorimetry after 8 weeks of E4 treatment. As expected, both control and E4 treated mice elicited a marked increase in physical activity during the dark (active) phase

(**Figure 2A**). More importantly, during this period the physical activity was significantly higher in E4-treated mice than in the control group. Accordingly, E4 treatment induced higher energy expenditure during the dark phase (**Figure 2B**). Altogether, these results suggest that E4 protects ovariectomized WT female mice from western diet-induced obesity, at least in part by increasing locomotor activity and energy expenditure.

3.2 Estetrol prevents obesity as well as associated vascular and hepatic metabolic disorders induced by western diet in ovariectomized LDLR^{-/-} mice.

We then evaluated the effect of E4 on lipid lesion deposits at the aortic sinus in response to western diet. To this aim, we used LDLR^{-/-} mice known to develop both atherosclerosis and steatosis in response to western diet [23–26] (**Figure 3A**). As previously observed in WT C57Bl/6J mice, E4 also prevented diet-induced obesity (**Figure 3B**), improved glucose tolerance (**Figure 3C**) and protected the liver against triglycerides and cholesterol ester accumulation (**Figures 3D and 3E**) in this LDLR^{-/-} mouse model. Importantly, this metabolic protection was associated with less fatty streak at the aortic sinus (**Figures 3F-G**) and a decreased expression of endothelial activation markers, such as Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1) and Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) (**Figure 3H**) in the aorta from E4-treated mice. Moreover, E4 treatment also decreased mRNA expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin IL β , macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP1 α), and of the macrophage marker CD68 (**Figure 3H**). Altogether, these results demonstrate that, in addition to the protection against diet-induced obesity and steatosis, E4 also conferred atheroprotection.

3.3 Hepatic ER α is necessary for estetrol-mediated prevention of steatosis but dispensable for its protective action against obesity and atherosclerosis.

Hepatic ER α has been proposed to contribute to the protective effect of E2 on both atherosclerosis [27] and steatosis [17,28–30], and is also necessary for the prevention against diet-induced obesity in response to some SERM such as TAM [17]. Therefore, it was important to determine the role of hepatic ER α in the beneficial metabolic action of E4. First, we analysed gene expression of several hepatokines known to modulate metabolism and to be regulated by either the full agonist (E2) or the partial agonist (TAM) of ER α in the liver. To this aim, ovariectomized mice were supplemented with E2, TAM, E4 or vehicle for two weeks and fed with regular chow diet, avoiding the bias of protective action induced by the three ER α ligands in the liver on western-diet (**Figure 4A**). As expected, all the hormonal treatments led to an increase in uterine weight (**Supplemental Figure 3**). E4 exposure modestly but significantly decreased angiopoietin-like 6 (Angptl6) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression, whereas it significantly increased mRNA level of FGF21, Angptl4, and GDF15 (3 to 6 fold increase) (**Figure 4B**). Interestingly, this transcriptional profile differs from those obtained in response to E2 and TAM (**Figure 4B**). Thus, E4 induces a specific transcriptional program in the liver that differs from the full agonist E2 or the well-known SERM TAM, consistent with its differential action on hepatic coagulation factors in women as compared to E2 [8,31].

Then, to directly evaluate the role of hepatic ER α on the metabolic and arterial actions of E4, we analysed the metabolic effects of chronic E4 treatment in mice harbouring a hepatocyte-specific ER α deletion (LERKO) bred with atheroprone LDLR^{-/-} mice. Efficiency of ER α deletion in hepatocytes was confirmed by the 80 % decrease of ER α mRNA level measured by qPCR in LERKO-LDLR^{-/-} mice compared to the control littermate mice (**Supplementary Figure 4**). Ovariectomized LERKO-LDLR^{-/-} mice treated or not with E4 were fed with western diet for 9 weeks. The protection conferred by E4 against western diet-induced obesity was fully preserved in LERKO-LDLR^{-/-} mice (**Figure 5A and supplementary Figure 5**),

demonstrating that hepatic ER α is not required to induce this beneficial action of E4. Hence, E4 reduced fat mass accumulation to a similar extent in WT-LDLR^{-/-} and LERKO-LDLR^{-/-} mice, at both subcutaneous and visceral sites (**Figure 5C**). In addition, E4 exposure protected similarly WT-LDLR^{-/-} and LERKO-LDLR^{-/-} female mice from glucose intolerance (**Figure 5B**) and atherosclerosis (**Figure 5D**) induced by western diet. Plasma HDL- and LDL-cholesterol profiles were also similar in WT-LDLR^{-/-} and LERKO-LDLR^{-/-} mice whereas the decrease in plasma triglycerides induced by E4 treatment in WT-LDLR^{-/-} mice was totally abrogated in LERKO-LDLR^{-/-} mice (**Figure 5E**). In addition, whereas E4 treatment prevented intrahepatic accumulation of triglycerides and cholesterol ester in WT-LDLR^{-/-} control mice, this effect was abolished in LERKO-LDLR^{-/-} mice (**Figure 6A-B**). Accordingly, analysis of lipid droplets revealed that the liver protection conferred by E4 treatment was no longer observed in LERKO-LDLR^{-/-} mice (**Figure 6C**), demonstrating the crucial role of hepatic ER α to the protection against steatosis in response to E4.

4. DISCUSSION

E4 is an estrogen currently considered for its highly promising clinical potential, in particular as a new HT. In this therapeutic indication, phase III development is ongoing but phase II clinical investigations already provided positive results [9]. Indeed, in a multiple-rising-dose study involving postmenopausal women, E4 improved vasomotor symptom and vaginal cytology, and a dose-dependent estrogenic effect was observed on endocrine parameters, bone turnover markers, lipids and lipoproteins, along with only a small effect on haemostatic parameters [10,11]. However, although this is an important issue to consider for HT, the ability of E4 to prevent post-menopausal metabolic disorders was still unknown. Indeed, the decline in endogenous estrogens at menopause leads to a redistribution of body fat, characterized by accumulation of visceral adiposity [2,3,32], which contributes to an increased risk of cardiovascular diseases, type 2 diabetes and steatosis [33]. The major finding

of this study is that a chronic E4 exposure prevents body weight gain, glucose intolerance and steatosis in ovariectomized C57Bl/6 mice given a western diet. These findings were confirmed in the atheroprone LDLR^{-/-} mouse model in which E4 treatment also prevents lipid accumulation at the aortic sinus highlighting the atheroprotective effect of E4 in obesity context.

In humans, oral route of estrogens (E2 or CEE) is associated with improved lipid profile, with decreased LDL and increased HDL cholesterol, but at the same time increases the circulating level of coagulation factors which in turn enhance the risk of venous thromboembolism [34]. By contrast to E2, E4 has only a limited impact on liver proteins and biomarkers of haemostasis, including sex hormone-binding globulin (SHBG) and angiotensinogen [31]. Here, we demonstrate that hepatic ER α is not necessary to the beneficial effects of E4 on body weight gain, glucose tolerance and atheroma. However, hepatic ER α is necessary for the prevention of steatosis conferred by E4. The increase in physical activity and energy expenditure contribute to the beneficial metabolic protection conferred by E4, reminiscent of the effects of a chronic E2 treatment that we and others previously reported [35,36]. These effects of E2 were found to be mediated by ER α [37], and more precisely *via* the activation of this receptor in specific area of the central nervous system [36–39]. Indeed, hepatic ER α was reported to play a role in steatosis prevention in response to E2 but to be dispensable for the prevention of body weight gain and the preservation of glucose tolerance [17,42], as demonstrated here for E4. However, contrary to E2, we found that E4 chronic treatment induces GDF15 mRNA level as does tamoxifen treatment. Interestingly, we recently showed that GDF15 induction by the selective modulation of hepatocyte ER α using tamoxifen is sufficient to prevent diet-induced obesity, type 2 diabetes, and NAFLD [17]. However, by contrast to tamoxifen, here, selective deletion of hepatic ER α does not impact beneficial actions of E4 on body weight gain and glucose tolerance. Altogether, these results suggest

that liver gene regulation differs between E2, E4 and Tamoxifen, underlining highly specific profiles of each molecule.

5. CONCLUSION

This study demonstrates that E4 confers metabolic protection in mice, with a similar impact than E2, and that hepatic ER α mediates its protection against steatosis but not against obesity and atheroma. Despite significant species specificities, E4 displays a specific program in the liver which differs from E2 as described in women for haemostatic parameters. Altogether, E4 treatment appears as an optimal estrogen for HT, conferring metabolic and osteoporosis protection without increasing the risk of thromboembolism.

ACKNOWLEDGMENTS

The staff of the animal facilities and of the “Plateforme d’expérimentation fonctionnelle” is acknowledged for their skillful technical assistance. We also thank P. Espagnolle and G. Carcasses. Estrogen receptor α activation function-2 deficient mice (ER α AF2) mice were kindly provided by Professor P. Chambon and Dr A. Krust. We acknowledge the skillful technical assistance of Anexplo-Genotoul (Sophie Le Gonidec, Laurent Monbrun), GeT-TQ Genopole (Frédéric Martins, Jean-José Maoret) and MetaToul-lipidomique (Justine Bertrand-Michel).

CONFLICT OF INTEREST

JM. Foidart is a consultant at Mithra, the company that develops estetrol-based women's healthcare products. JF Arnal at INSERM U 1048 / University of Toulouse 3 has received a research grant from Mithra. The remaining authors have no disclosures to report.

FUNDING

The work at INSERM U1048 was supported by INSERM, CHU and Université de Toulouse III, Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil, ANR (NOSE4), Fondation de France (FDF), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Institut Universitaire de France and Mithra Pharmaceuticals. Work at the CNRS UMR6290 was supported by the CNRS and University of Rennes1.

REFERENCES

- [1] Stols-Gonçalves, D., Hovingh, G.K., Nieuwdorp, M., Holleboom, A.G., 2019. NAFLD and Atherosclerosis: Two Sides of the Same Dysmetabolic Coin? *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 30(12): 891–902, Doi: 10.1016/j.tem.2019.08.008.
- [2] Carr, M.C., 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(6): 2404–11, Doi: 10.1210/jc.2003-030242.
- [3] Mauvais-Jarvis, F., Manson, J.E., Stevenson, J.C., Fonseca, V.A., 2017. Menopausal Hormone Therapy and Type 2 Diabetes Prevention: Evidence, Mechanisms, and Clinical Implications. *Endocrine Reviews* 38(3): 173–88, Doi: 10.1210/er.2016-1146.
- [4] Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., 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(3): 321–33, Doi: 10.1001/jama.288.3.321.
- [5] Scarabin, P.-Y., 2014. Hormones and venous thromboembolism among postmenopausal women. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society* 17 Suppl 2: 34–7, Doi: 10.3109/13697137.2014.956717.
- [6] Duijkers, I.J.M., Klipping, C., Zimmerman, Y., Appels, N., Jost, M., Maillard, C., et al., 2015. Inhibition of ovulation by administration of estetrol in combination with drospirenone or levonorgestrel: Results of a phase II dose-finding pilot study. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care: The Official Journal of the European Society of Contraception* 20(6): 476–89, Doi: 10.3109/13625187.2015.1074675.
- [7] Gaspard, U., Taziaux, M., Jost, M., Skouby, S.O., Lobo, R.A., Foidart, J.-M., 2019. Estetrol (E4), the next generation hormone therapy (HT) for menopausal symptoms: phase 2b clinical trial results. *Maturitas* 124: 153, Doi: 10.1016/j.maturitas.2019.04.122.
- [8] Kluft, C., Zimmerman, Y., Mawet, M., Klipping, C., Duijkers, I.J.M., Neuteboom, J., et al., 2017. Reduced hemostatic effects with drospirenone-based oral contraceptives containing estetrol vs. ethinyl estradiol. *Contraception* 95(2): 140–7, Doi: 10.1016/j.contraception.2016.08.018.
- [9] Genazzani, A.R., Gaspard, U., Foidart, J.-M., 2019. Oral investigational drugs currently in phase I or phase II for the amelioration of menopausal symptoms. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 28(3): 235–47, Doi: 10.1080/13543784.2019.1572114.

- [10] Coelingh Bennink, H.J.T., Verhoeven, C., Zimmerman, Y., Visser, M., Foidart, J.-M., Gemzell-Danielsson, K., 2016. Clinical effects of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Maturitas* 91: 93–100, Doi: 10.1016/j.maturitas.2016.06.017.
- [11] Coelingh Bennink, H.J.T., Verhoeven, C., Zimmerman, Y., Visser, M., Foidart, J.-M., Gemzell-Danielsson, K., 2017. Pharmacokinetics of the fetal estrogen estetrol in a multiple-rising-dose study in postmenopausal women. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society* 20(3): 285–9, Doi: 10.1080/13697137.2017.1291608.
- [12] Abot, A., Fontaine, C., Buscato, M., Solinhac, R., Flouriot, G., Fabre, A., et al., 2014. The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor α modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Molecular Medicine* 6(10): 1328–46, Doi: 10.15252/emmm.201404112.
- [13] Xu, B., Lovre, D., Mauvais-Jarvis, F., 2016. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. *Biochimie* 124: 92–7, Doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.018.
- [14] Xu, B., Lovre, D., Mauvais-Jarvis, F., 2017. The effect of selective estrogen receptor modulators on type 2 diabetes onset in women: Basic and clinical insights. *Journal of Diabetes and Its Complications* 31(4): 773–9, Doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.12.010.
- [15] Chen, K.L.A., Zhao, Y.C., Hieronymi, K., Smith, B.P., Madak-Erdogan, Z., 2017. Bazedoxifene and conjugated estrogen combination maintains metabolic homeostasis and benefits liver health. *PloS One* 12(12): e0189911, Doi: 10.1371/journal.pone.0189911.
- [16] Kim, J.H., Meyers, M.S., Khuder, S.S., Abdallah, S.L., Muturi, H.T., Russo, L., et al., 2014. Tissue-selective estrogen complexes with bazedoxifene prevent metabolic dysfunction in female mice. *Molecular Metabolism* 3(2): 177–90, Doi: 10.1016/j.molmet.2013.12.009.
- [17] Guillaume, M., Riant, E., Fabre, A., Raymond-Letron, I., Buscato, M., Davezac, M., et al., 2019. Selective Liver Estrogen Receptor α Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice. *Hepatology Communications* 3(7): 908–24, Doi: 10.1002/hep4.1363.
- [18] Buscato, M., Fontaine, C., Fabre, A., Vinel, A., Valera, M.-C., Noirrit, E., et al., 2018. The antagonist properties of Bazedoxifene after acute treatment are shifted to stimulatory action after chronic exposure in the liver but not in the uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 472: 87–96, Doi: 10.1016/j.mce.2017.11.022.
- [19] Billon-Galés, A., Krust, A., Fontaine, C., Abot, A., Flouriot, G., Toutain, C., et al., 2011. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor- α is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32): 13311–6, Doi: 10.1073/pnas.1105632108.
- [20] Fontaine, C., Buscato, M., Vinel, A., Giton, F., Raymond-Letron, I., Kim, S.H., et al., 2020. The tissue-specific effects of different 17 β -estradiol doses reveal the key sensitizing role of AF1 domain in ER α activity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 505: 110741, Doi: 10.1016/j.mce.2020.110741.
- [21] Gérard, C., Mestdagt, M., Tskitishvili, E., Communal, L., Gompel, A., Silva, E., et al., 2015. Combined estrogenic and anti-estrogenic properties of estetrol on breast cancer may provide a safe therapeutic window for the treatment of menopausal symptoms. *Oncotarget* 6(19): 17621–36, Doi: 10.18632/oncotarget.4184.

- [22] Billon-Galés, A., Fontaine, C., Douin-Echinard, V., Delpy, L., Berges, H., Calippe, B., et al., 2009. Endothelial estrogen receptor- α plays a crucial role in the atheroprotective action of 17 β -estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 120(25): 2567–76, Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.898445.
- [23] Subramanian, S., Goodspeed, L., Wang, S., Kim, J., Zeng, L., Ioannou, G.N., et al., 2011. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *Journal of Lipid Research* 52(9): 1626–35, Doi: 10.1194/jlr.M016246.
- [24] Wouters, K., van Gorp, P.J., Bieghs, V., Gijbels, M.J., Duimel, H., Lütjohann, D., et al., 2008. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48(2): 474–86, Doi: 10.1002/hep.22363.
- [25] Bieghs, V., Van Gorp, P.J., Wouters, K., Hendriks, T., Gijbels, M.J., van Bilsen, M., et al., 2012. LDL receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 7(1): e30668, Doi: 10.1371/journal.pone.0030668.
- [26] Jacobs, A., Warda, A.-S., Verbeek, J., Cassiman, D., Spincemille, P., 2016. An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Current Protocols in Mouse Biology* 6(2): 185–200, Doi: 10.1002/cpmo.3.
- [27] Zhu, L., Shi, J., Luu, T.N., Neuman, J.C., Trefts, E., Yu, S., et al., 2018. Hepatocyte estrogen receptor α mediates estrogen action to promote reverse cholesterol transport during Western-type diet feeding. *Molecular Metabolism* 8: 106–16, Doi: 10.1016/j.molmet.2017.12.012.
- [28] Hart-Unger, S., Arao, Y., Hamilton, K.J., Lierz, S.L., Malarkey, D.E., Hewitt, S.C., et al., 2017. Hormone signaling and fatty liver in females: analysis of estrogen receptor α mutant mice. *International Journal of Obesity (2005)* 41(6): 945–54, Doi: 10.1038/ijo.2017.50.
- [29] Della Torre, S., Mitro, N., Fontana, R., Gomaraschi, M., Favari, E., Recordati, C., et al., 2016. An Essential Role for Liver ER α in Coupling Hepatic Metabolism to the Reproductive Cycle. *Cell Reports* 15(2): 360–71, Doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.019.
- [30] Meda, C., Barone, M., Mitro, N., Lolli, F., Pedretti, S., Caruso, D., et al., 2020. Hepatic ER α accounts for sex differences in the ability to cope with an excess of dietary lipids. *Molecular Metabolism* 32: 97–108, Doi: 10.1016/j.molmet.2019.12.009.
- [31] Mawet, M., Maillard, C., Klipping, C., Zimmerman, Y., Foidart, J.-M., Coelingh Bennink, H.J.T., 2015. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estetrol in combined oral contraceptives. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care: The Official Journal of the European Society of Contraception* 20(6): 463–75, Doi: 10.3109/13625187.2015.1068934.
- [32] Thong, E.P., Codner, E., Laven, J.S.E., Teede, H., 2020. Diabetes: a metabolic and reproductive disorder in women. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology* 8(2): 134–49, Doi: 10.1016/S2213-8587(19)30345-6.
- [33] Ferrara, D., Montecucco, F., Dallegrì, F., Carbone, F., 2019. Impact of different ectopic fat depots on cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Cellular Physiology* 234(12): 21630–41, Doi: 10.1002/jcp.28821.

- [34] Tikkanen, M.J., 1996. The menopause and hormone replacement therapy: lipids, lipoproteins, coagulation and fibrinolytic factors. *Maturitas* 23(2): 209–16, Doi: 10.1016/0378-5122(95)00950-7.
- [35] Gourdy, P., Guillaume, M., Fontaine, C., Adlanmerini, M., Montagner, A., Laurell, H., et al., 2018. Estrogen receptor subcellular localization and cardiometabolism. *Molecular Metabolism* 15: 56–69, Doi: 10.1016/j.molmet.2018.05.009.
- [36] Mauvais-Jarvis, F., Clegg, D.J., Hevener, A.L., 2013. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews* 34(3): 309–38, Doi: 10.1210/er.2012-1055.
- [37] Riant, E., Waget, A., Cogo, H., Arnal, J.-F., Burcelin, R., Gourdy, P., 2009. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150(5): 2109–17, Doi: 10.1210/en.2008-0971.
- [38] Coyoy, A., Guerra-Araiza, C., Camacho-Arroyo, I., 2016. Metabolism Regulation by Estrogens and Their Receptors in the Central Nervous System Before and After Menopause. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 48(8): 489–96, Doi: 10.1055/s-0042-110320.
- [39] Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D.W., Mobbs, C.V., Yang, X.-J., Clegg, D.J., et al., 2007. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(7): 2501–6, Doi: 10.1073/pnas.0610787104.
- [40] Xu, Y., López, M., 2018. Central regulation of energy metabolism by estrogens. *Molecular Metabolism* 15: 104–15, Doi: 10.1016/j.molmet.2018.05.012.
- [41] Xu, Y., Nedungadi, T.P., Zhu, L., Sobhani, N., Irani, B.G., Davis, K.E., et al., 2011. Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metabolism* 14(4): 453–65, Doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.009.
- [42] Zhu, L., Brown, W.C., Cai, Q., Krust, A., Chambon, P., McGuinness, O.P., et al., 2013. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. *Diabetes* 62(2): 424–34, Doi: 10.2337/db11-1718.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Estetrol (E4) prevents western diet (WD)-induced obesity and steatosis in wild-type (WT) female mice.

Four-week-old ovariectomized female C57Bl/6 mice were implanted subcutaneously with E4 or Vehicle (Veh) pellets and concomitantly fed a western diet from the age of 6 to 15 weeks (A). Uterine weight (B), body weight gain (C), picture of representative mouse of each group at the end of the protocol (D), adipose tissue distribution (SC: subcutaneous, PG: perigonadal and Mes: mesenteric) (E), adipocyte mean area and representative photomicrographs of perigonadal adipose tissue sections (haematoxylin-eosin staining) (F). Intraperitoneal glucose tolerance test performed at 14 weeks, AUC (area under the curve) is expressed as means \pm SEM (G). Representative images of haematoxylin and eosin (H/E) staining on liver sections (H). *t*-test were used to analyse the effect of treatment, except for body weight gain and glucose tolerance test for which two-way ANOVA of variance test with repeated measures and a *Fisher's LSD post test* were performed. (E4 exposure *versus* vehicle **P < 0.01, ***P < 0.001 n=5/6 mice/group).

Figure 2: Estetrol (E4) enhances energy expenditure in wild-type (WT) female mice fed a western diet.

Daily profile of physical activity (A), and energy expenditure (B) measured in metabolic chambers. Results are expressed as means \pm SEM measured each hour. When two-way ANOVA test revealed a significant interaction between the 2 factors (treatment and periods), a *Fisher's LSD* multiple comparison test was performed (Veh *versus* E4: *P<0.05, ***P < 0.001 n=5/6 mice/group).

Figure 3: Estetrol (E4) prevents atherosclerosis and hepatic steatosis in LDLR^{-/-} female mice fed a western diet.

Four-week-old ovariectomized female LDLR^{-/-} mice were implanted subcutaneously with E4 or Vehicle (Veh) pellets and concomitantly fed a western diet from the age of 6 to 15 weeks (A). Body weight gain (B), Intraperitoneal glucose tolerance test was performed at 14 weeks. AUC (area under the curve) is expressed as means ± SEM (C). Representative images of haematoxylin and eosin (H/E) staining on liver sections (D) and intrahepatic triglycerides and cholesterol ester measurement (E). Representative image (F) and quantification of lipid deposition at the aortic sinus after Oil Red O staining (G), mRNA level of atherosclerotic markers in the aorta were quantified by qPCR and normalized to TPT1 mRNA levels (H). Results are expressed as means ± SEM. *t*-test were used to analyse the effect of treatment, except for body weight gain evolution and glucose tolerance test for which two-way ANOVA of variance test with repeated measures and a *Fisher's LSD post test* was performed. (E4 exposure *versus* vehicle *P<0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 n=5/6 mice/group).

Figure 4: Estetrol (E4) regulates hepatokine gene expression in mouse liver

Four-week-old ovariectomized female C57Bl/6 mice were implanted subcutaneously with E4, E2, TAM or Vehicle (Veh) pellets for 2 weeks (A). Hepatokine mRNA levels in the liver were quantified by qPCR and normalized to PPIA mRNA levels in response to E4 (upper panel), E2 (middle panel) and TAM (lower panel) (B). Results are expressed as means ± SEM. *t*-test were used to analyse the effect of treatment (treatment exposure *versus* vehicle *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 n=5/6 mice/group).

Figure 5: Hepatic ER α is not necessary for the beneficial effect of E4 on metabolic disorders and atherosclerosis in LDLR^{-/-} female mice fed with a western diet

Four-week-old ovariectomized female LERKO-LDLR^{-/-} mice and their littermates were implanted subcutaneously with E4 or Vehicle (Veh) pellets and concomitantly fed a western diet from the age of 6 to 15 weeks. Body weight gain evolution (A), Intraperitoneal glucose tolerance (B), adipose tissue distribution (C), quantification of lipid deposition at the aortic

sinus (**D**) and plasmatic HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides content (**E**). Two-way ANOVA were performed to evaluate interaction between Genotype (Gen) and treatment (E4). When a significant interaction between the 2 factors were revealed, a *Fisher's LSD* post-test was performed (Veh *versus* E4: ***P < 0.001 n=6 mice/group).

Figure 6: Hepatic ER α is necessary for the beneficial effect of E4 on hepatic steatosis in LDLR^{-/-} female mice fed with a western diet

Four-week-old ovariectomized female LERKO-LDLR^{-/-} mice and their littermates were implanted subcutaneously with E4 or Vehicle (Veh) pellets and concomitantly fed with western diet for 9 weeks from the age of 6 to 15 weeks. Quantification of intrahepatic triglycerides (**A**) and cholesterol ester (**B**) content. Representative images of haematoxylin and eosin (H/E) and Oil Red O staining on liver sections (**C**). Two-way ANOVA were performed to evaluate interaction between Genotype (Gen) and treatment (E4). When a significant interaction between the 2 factors were revealed, a *Fisher's LSD* post-test was performed (Veh *versus* E4: ***P < 0.001 n=6 mice/group).

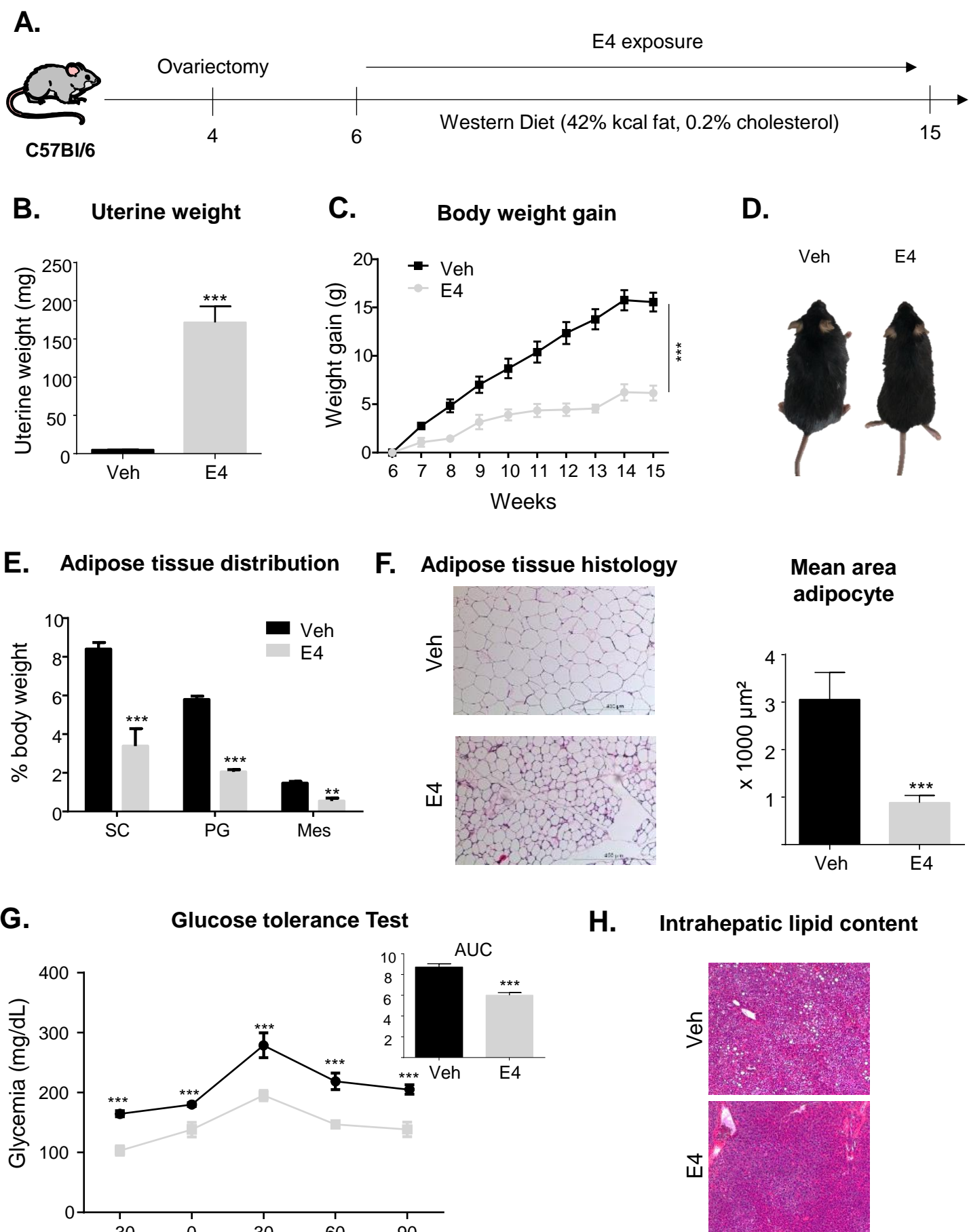
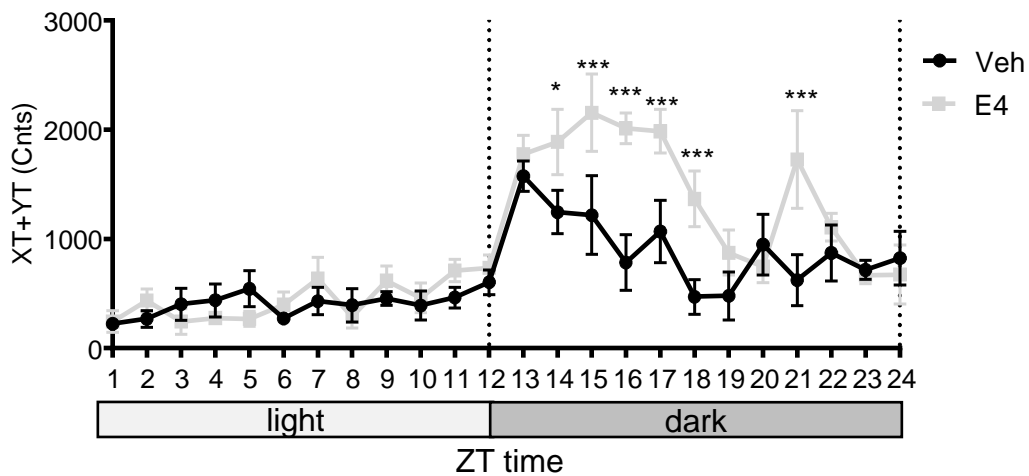
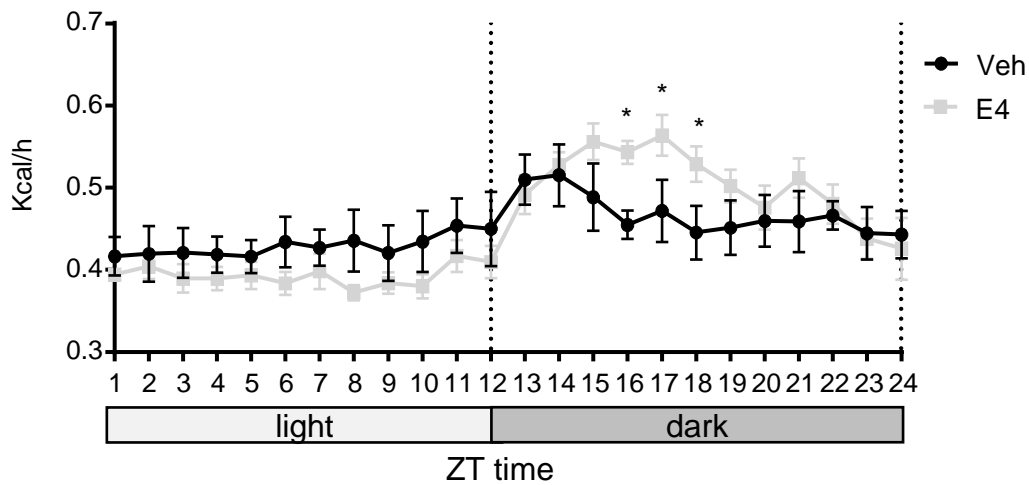


Figure 1

A.**Physical activity****B.****Energy expenditure****Figure 2**

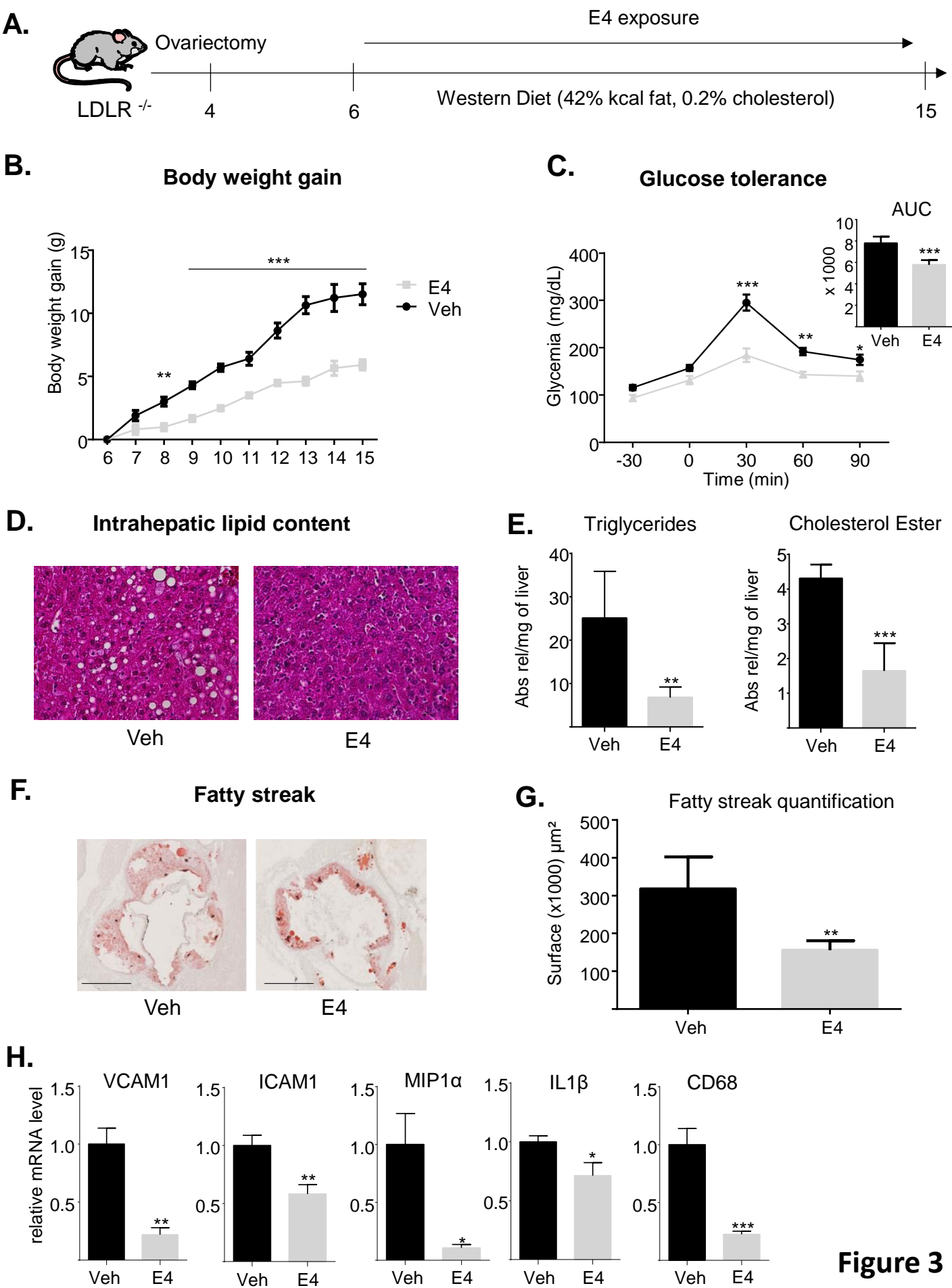


Figure 3

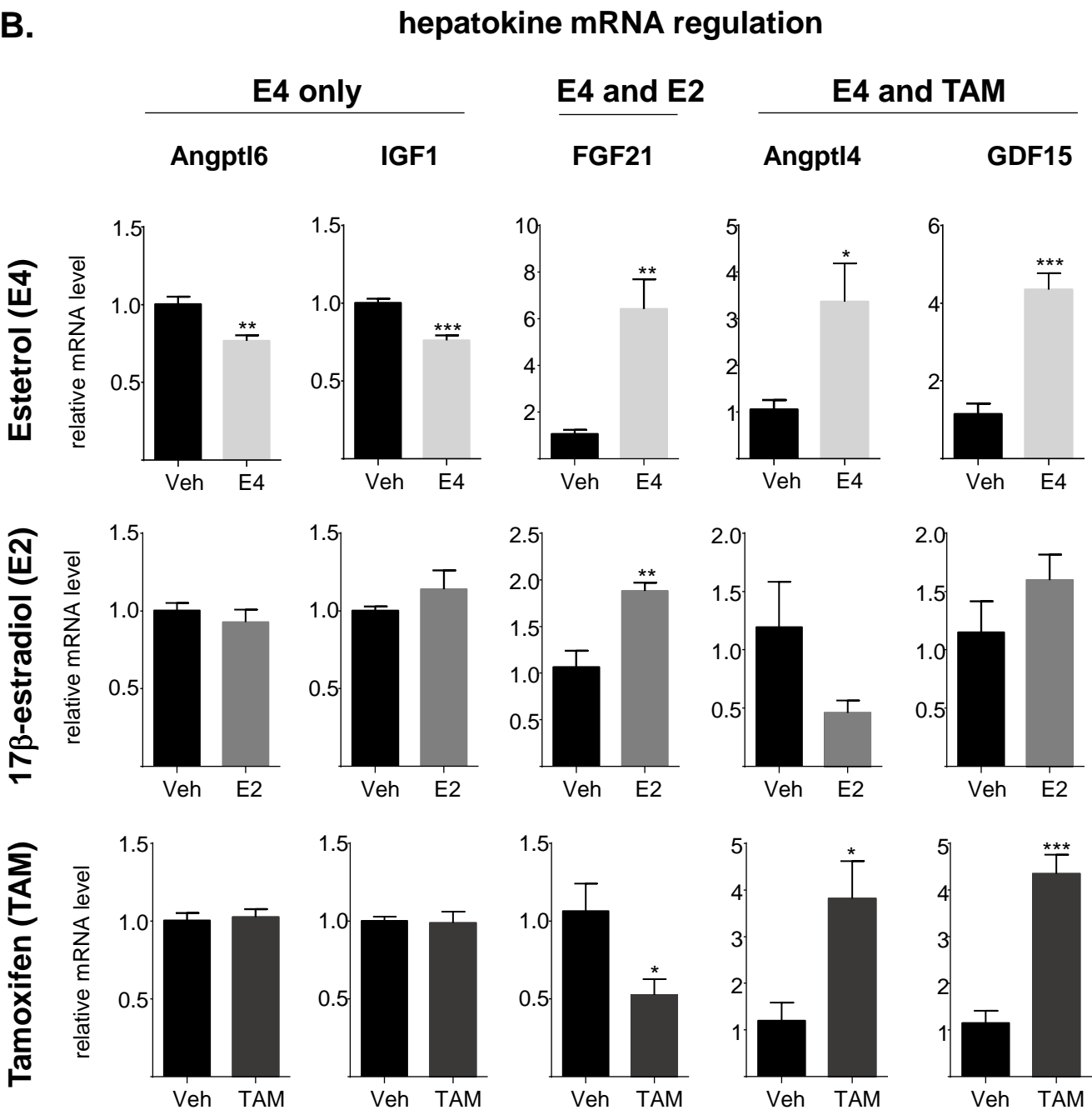
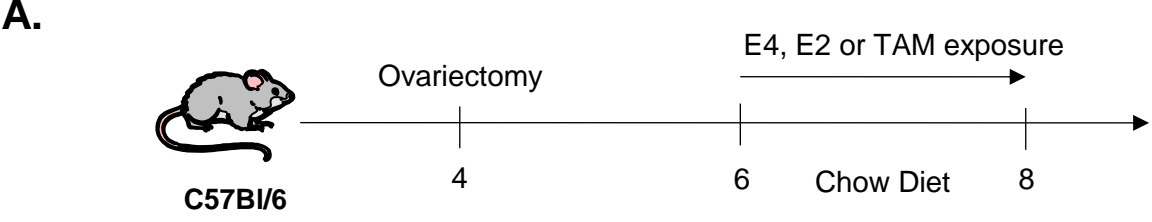


Figure 4

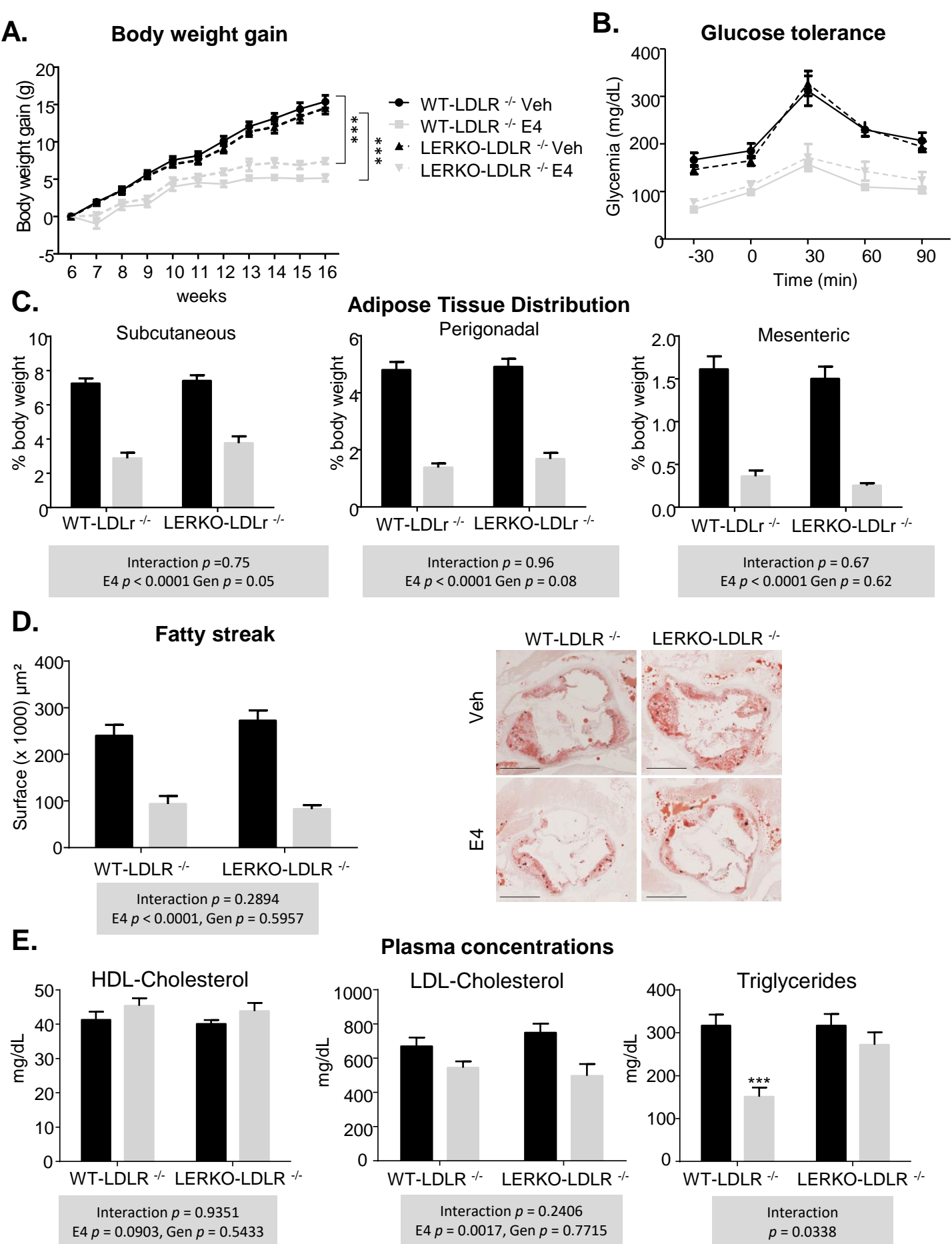
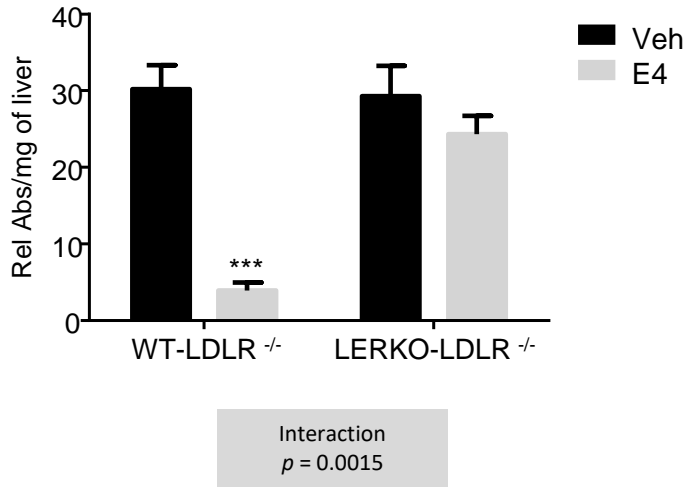


Figure 5

Intrahepatic content

A. Intrahepatic Triglyceride content



B. Intrahepatic Cholesterol ester content

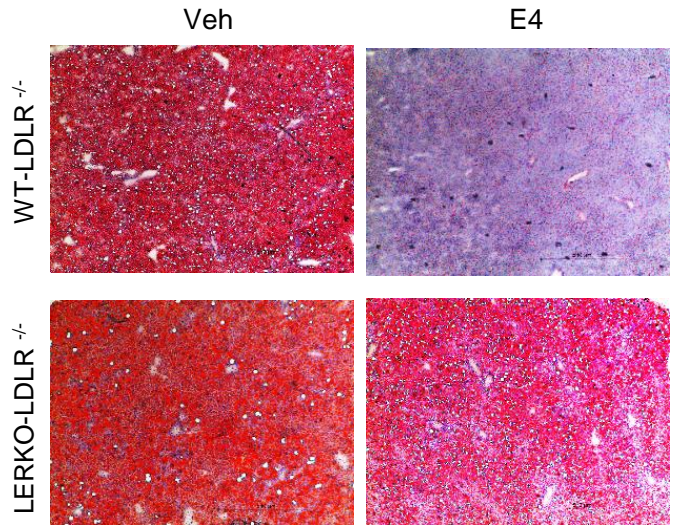
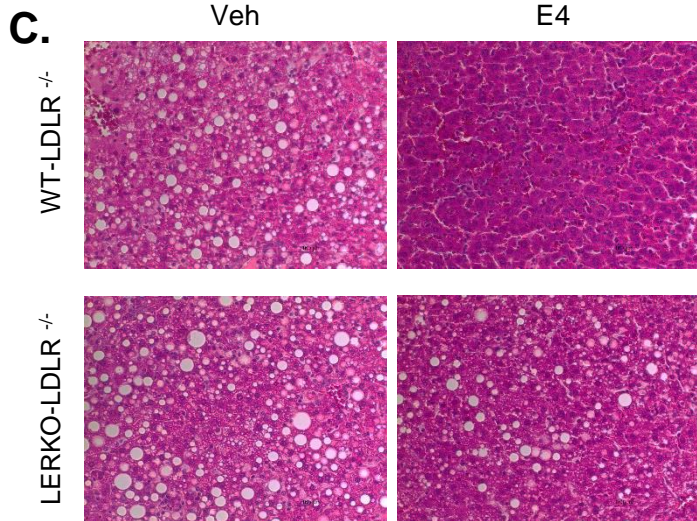
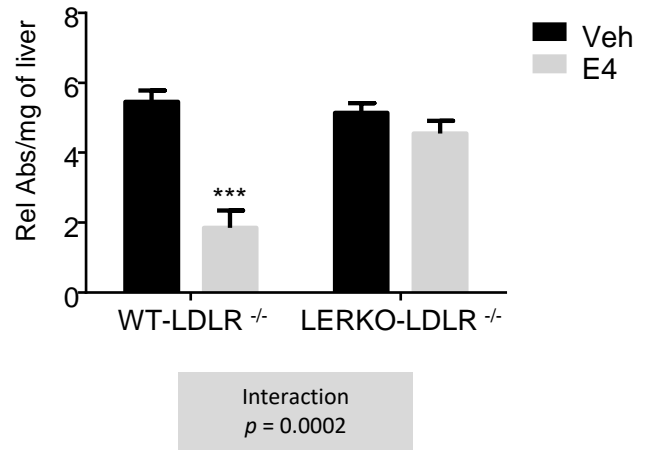


Figure 6

	ER α AF2 ^{+/+}		ER α AF2 ⁰		Two-factor ANOVA
	Veh	E4	Veh	E4	P, Interaction
Body weight (g)	38.3 ± 2	24.5 ± 0.9 ***	37.7 ± 0.7	37.1 ± 1.2	*** p<0.0001
Uterine weight (mg)	8.5 ± 1.2	109.2 ± 21 ***	5.5 ± 0.7	5.1 ± 0.5	*** p<0.0001
Subcutaneous Tissue (% body weight)	7.3 ± 0.3	2.5 ± 0.2 ***	8 ± 0.3	7.1 ± 0.2 *	*** p<0.0001
Perigonadal Tissue (% body weight)	5 ± 0.1	1.2 ± 0.05 ***	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.4	*** p<0.0001
Mesenteric Tissue (% body weight)	2.4 ± 0.3	1 ± 0.1 ***	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.1	** p=0.0015

Table 1:

Four-week-old ovariectomized ER α AF2⁰ female mice and their littermates were implanted subcutaneously with E4 of Vehicle pellets and concomitantly fed with western diet from the age of 6 to 15 weeks. Body weight, uterine weight and subcutaneous, perigonadal and mesenteric tissues weight were evaluated. Results are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA were performed to evaluate interaction between Genotype and treatment (E4). When a significant interaction between the 2 factors were revealed, a *Fisher's LSD* post-test was performed (Veh *versus* E4: ***P < 0.001 n=6-8 mice/group).

Supplementary Materials et Methods:

Sampling and sample preparation

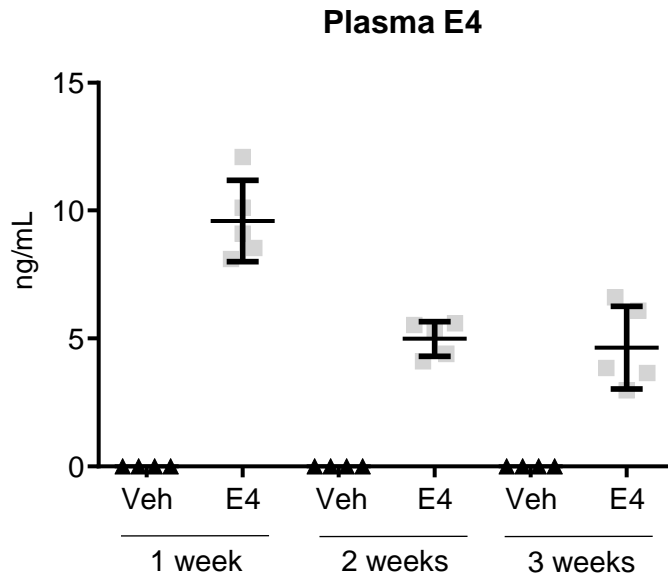
Once collected, the blood was allowed to dry for two hours and stored at -80°C . The extraction was made using 200 μl of MeOH containing 2.5 ng/ml of internal standard (ISTD). The VAMS were first incubated for 5 minutes in the solvent without agitation before being shaken for 5 additional minutes and subsequently passed through a phospholipid removal plate (OstroTM plate). VAMS plasma extracts were vacuum dried at 50°C for 1 hour using a CentriVap concentrator (LabConco, Kansas-City, MO, USA) and reconstituted in 50 μl $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (95/5 v/v). The entire analytical procedure was previously validated (Nys G. et al, JCA, 2017, 1524, 160-168).

Chromatographic conditions

UHPLC separation was performed with a 1290 infinity system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) on a reversed-phase F5 column (2.6 μm particle size, 100 x 2.1 mm ID) and a Security Guard Ultra F5 precolumn (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column compartment was thermostated at 40°C . The separation was achieved in gradient mode with mobile phase A ($\text{H}_2\text{O} + 0.1 \text{ mM NH}_4\text{F}$) and B (ACN/MeOH 1:1 v/v) at 0.5 ml/min. The gradient was as follows: 0-2 min, from 20% to 90% B; 2-4 min, 90% B; 4-4.1 min, 20% B. A 1.75 min post-time was allowed to re-equilibrate the column at 20% B before the next injection. The samples were thermostated at 6°C in the autosampler and kept in the dark. The injection volume was set at 5 μl .

MS/MS detection

MS/MS detection was performed on a 6495 LC-MS Triple Quadrupole equipped with the iFunnel Technology (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and operated using negative electrospray ionization (ESI⁻). The capillary and the nozzle voltages were set at - 2000 V. Nitrogen was used as drying (200 $^{\circ}\text{C}$, 11 l/min) and sheath gas (400 $^{\circ}\text{C}$, 12 l/min). The nebulizer pressure was set at 55 psi. Quantification was achieved with multiple reaction monitoring (MRM). The monitored transitions were m/z 303 \rightarrow 241 (quantifier) and m/z 303 \rightarrow 273 (qualifier) for E4 and m/z 307 \rightarrow 277 for E4-d4. Collision energies were set at 17 V. Cell accelerator voltage was set at 4 V. The total cycle time was 300 ms.

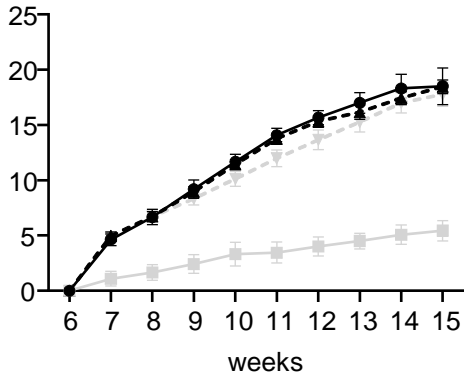


Supplementary Figure 1: Plasma dosage of Estetrol (E4) after subcutaneous E4 pellet implantation

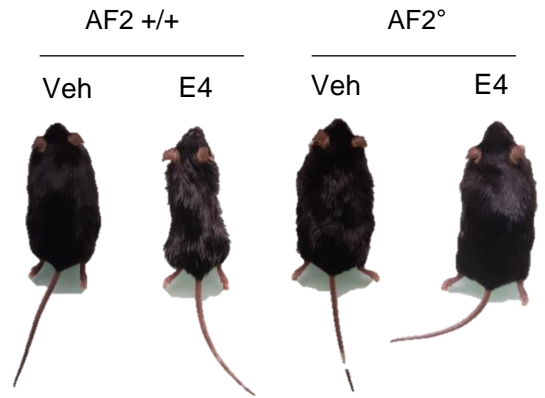
Four-week-old ovariectomized C57Bl/6 mice were implanted subcutaneously with pellets delivering the different hormones and plasma E4 was evaluated one, two or three weeks later, as previously described (1).

(1) Nys G, Gallez A, Kok MGM, Cobraiville G, Servais AC, Piel G, Pequeux C, Fillet M. Whole blood microsampling for the quantitation of estetrol without derivatization by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017;140:258-265.

A. Body weight gain



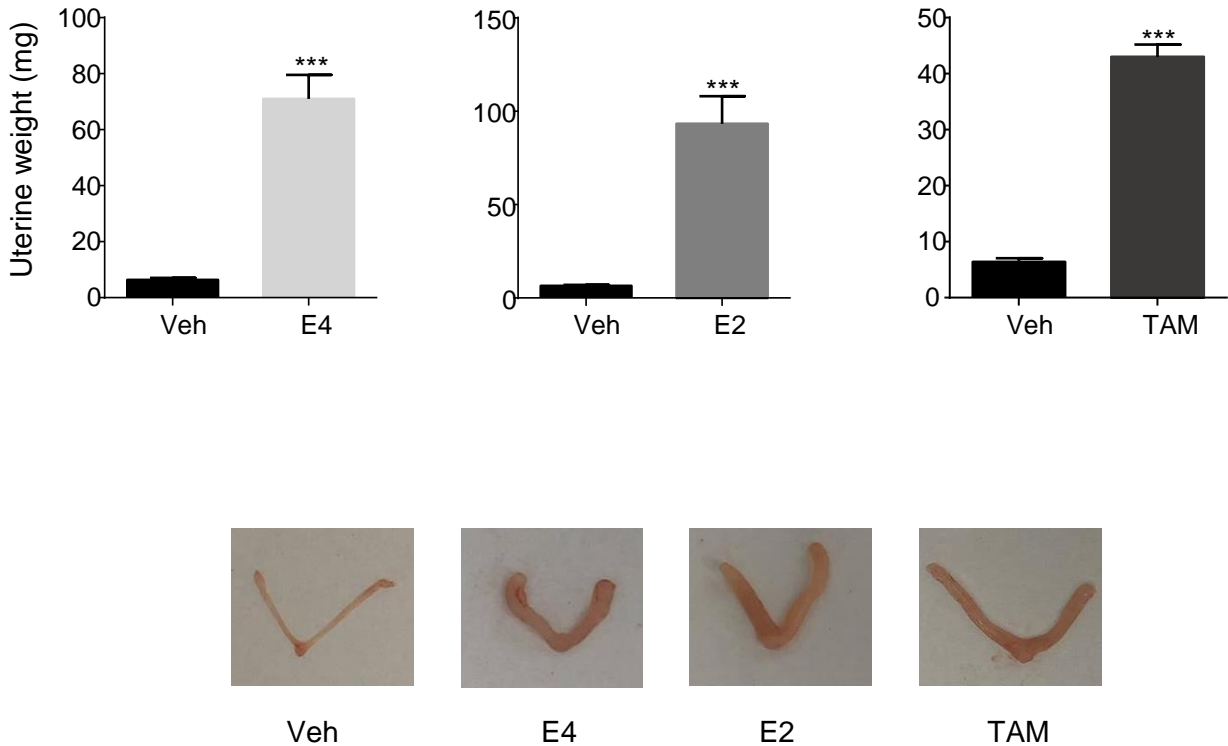
B.



Supplementary Figure 2:

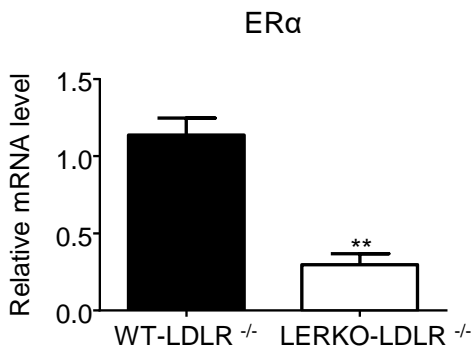
Four-week-old ovariectomized female AF2° and their littermates mice were implanted subcutaneously with E4 of Vehicle pellets and concomitantly fed a western diet for 9 weeks from the age of 6 to 15 weeks. Body weight gain evolution (A), picture of representative mouse of each group at the end of the protocol (B). Results are expressed as means ± SEM.

Uterine weight



Supplementary Figure 3:

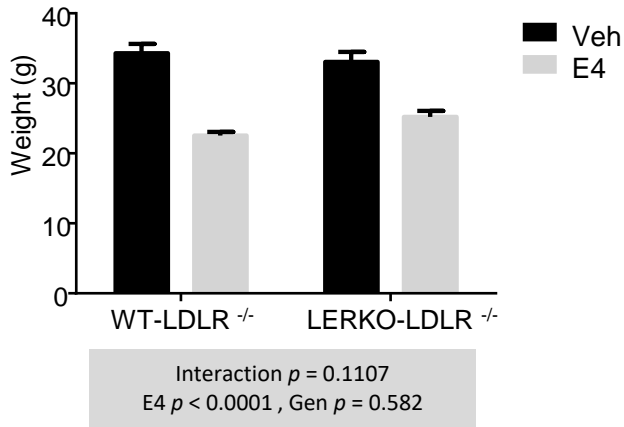
Four-week-old ovariectomized female C57Bl/6 mice were implanted subcutaneously with E4, E2, TAM or Vehicle pellets for 2 weeks. Uterine impregnation was chosen as a positive control of estrogenic action. *t*-test was used to analyse the effect of treatment (E4, E2 or TAM exposure *versus* vehicle ***P < 0.001, n=5/6 mice/group).



Supplementary Figure 4:

ER α mRNA level from liver of WT-LDLR^{-/-} and LERKO-LDLR^{-/-} mice was quantified by qPCR and normalized to PPIA mRNA levels. Results are expressed as means \pm SEM. *t*-test were used to analyse the effect of treatment.

Body weight



Supplementary Figure 5:

Four-week-old ovariectomized female LERKO-LDLR^{-/-} and their littermates mice were implanted subcutaneously with E4 or Vehicle pellets and concomitantly fed with western diet from the age of 6 to 15 weeks. Body weight was evaluated. Results are expressed as means \pm SEM.

Articles en co-auteure :

Selective Liver Estrogen Receptor α Modulation Prevents Steatosis, Diabetes, and Obesity Through the Anorectic Growth Differentiation Factor 15 Hepatokine in Mice.

Guillaume M, Riant E, Fabre A, Raymond-Letron I, **Buscato M**, Davezac M, Tramunt B, Montagner A, Smati S, Zahreddine R, Paliarne G, Valera MC, Guillou H, Lenfant F, Unsicker K, Metivier R, Fontaine C, Arnal JF, Gourdy P.

Hepatology Commun. 2019 Apr 29;3(7):908-924. doi: 10.1002/hep4.1363.

Effects of conjugated estrogen and bazedoxifene on hemostasis and thrombosis in mice.

Noirrit E, **Buscato M**, Dupuis M, Payrastre B, Fontaine C, Arnal JF, Valera MC.

Endocr Connect. 2019 Jun;8(6):788-795. doi: 10.1530/EC-19-0079.

Adaptive β -Cell Neogenesis in the Adult Mouse in Response to Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance.

Courty E, Besseiche A, Do TTH, Liboz A, Aguid FM, Quilichini E, **Buscato M**, Gourdy P, Gautier JF, Riveline JP, Haumaitre C, Buyse M, Fève B, Guillemain G, Blondeau B.

Diabetes. 2019 Jan;68(1):95-108. doi: 10.2337/db17-1314. Epub 2018 Oct 16.

Towards an optimization of the modulation of the estrogen receptor during menopausal hormonal therapy.

Valéra MC, Fontaine C, Noirrit-Esclassan E, Boudou F, **Buscato M**, Adlanmerini M, Trémollières F, Gourdy P, Lenfant F, Arnal JF.

Med Sci (Paris). 2018 Dec;34(12):1056-1062. doi: 10.1051/medsci/2018297.

Respective role of membrane and nuclear estrogen receptor (ER) α in the mandible of growing mice: Implications for ER α modulation.

Vinel A, Coudert AE, **Buscato M**, Valera MC, Ostertag A, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Berdal A, Babajko S, Arnal JF, Fontaine C.

J Bone Miner Res. 2018 Aug;33(8):1520-1531. doi: 10.1002/jbmr.3434.

The antagonist properties of Bazedoxifene after acute treatment are shifted to stimulatory action after chronic exposure in the liver but not in the uterus.

Buscato M*, Fontaine C*, Fabre A, Vinel A, Valera MC, Noirrit E, Guillaume M, Payrastre B, Métivier R, Arnal JF.

Mol Cell Endocrinol. 2018 Sep 5;472:87-96. doi: 10.1016/j.mce.2017.11.022.

Estetrol, a Fetal Selective Estrogen Receptor Modulator, Acts on the Vagina of Mice through Nuclear Estrogen Receptor α Activation.

Benoit T, Valera MC, Fontaine C, **Buscato M**, Lenfant F, Raymond-Letron I, Tremollieres F, Soulie M, Foidart JM, Game X, Arnal JF.

Am J Pathol. 2017 Nov;187(11):2499-2507. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.07.013.

Selective Activation of Estrogen Receptor α Activation Function-1 Is Sufficient to Prevent Obesity, Steatosis, and Insulin Resistance in Mouse.

Guillaume M, Handgraaf S, Fabre A, Raymond-Letron I, Riant E, Montagner A, Vinel A, **Buscato M**, Smirnova N, Fontaine C, Guillou H, Arnal JF, Gourdy P.

Am J Pathol. 2017 Jun;187(6):1273-1287. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.02.013.

Effect of chronic estradiol plus progesterone treatment on experimental arterial and venous thrombosis in mouse.

Valéra MC, Noirrit-Esclassan E, Dupuis M, **Buscato M**, Vinel A, Guillaume M, Briaux A, Garcia C, Benoit T, Lairez O, Fontaine C, Payrastre B, Arnal JF.

PLoS One. 2017 May 9;12(5):e0177043. doi: 10.1371/journal.pone.0177043.

Role of ER α MISS in the Effect of Estradiol on Cancellous and Cortical Femoral Bone in Growing Female Mice

Vinel A, Hay E, Valera MC, **Buscato M**, Adlanmerini M, Guillaume M, Cohen-Solal M, Ohlsson C, Lenfant F, Arnal JF, Fontaine C.

Endocrinology. 2016 Jun;157(6):2533-44. doi: 10.1210/en.2015-1994.

The Activation Function-1 of Estrogen Receptor Alpha Prevents Arterial Neointima Development Through a Direct Effect on Smooth Muscle Cells.

Smirnova NF, Fontaine C, **Buscato M**, Lupieri A, Vinel A, Valera MC, Guillaume M, Malet N, Foidart JM, Raymond-Letron I, Lenfant F, Gourdy P, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Laffargue M, Arnal JF.

Circ Res. 2015 Oct 9;117(9):770-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306416.

The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor α modulation, uncoupling nuclear and membrane activation.

Abot A, Fontaine C, **Buscato M**, Solinhac R, Flouriot G, Fabre A, Drougard A, Rajan S, Laine M, Milon A, Muller I, Henrion D, Adlanmerini M, Valéra MC, Gompel A, Gerard C, Péqueux C, Mestdagt M, Raymond-Letron I, Knauf C, Ferriere F, Valet P, Gourdy P, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Lenfant F, Greene GL, Foidart JM, Arnal JF.

EMBO Mol Med. 2014 Oct;6(10):1328-46. doi: 10.15252/emmm.201404112.

The AF-1 activation function of estrogen receptor α is necessary and sufficient for uterine epithelial cell proliferation in vivo.

Abot A, Fontaine C, Raymond-Letron I, Flouriot G, Adlanmerini M, **Buscato M**, Otto C, Bergès H, Laurell H, Gourdy P, Lenfant F, Arnal JF.

Endocrinology. 2013 Jun;154(6):2222-33. doi: 10.1210/en.2012-2059.

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Découplage de l'activation nucléaire et membranaire du ER α dans la protection artérielle et métabolique : Implication clinique pour un nouveau traitement substitutif de la ménopause

BUSCATO MéliSSa

23 Juin 2020

Les femmes occidentales passent maintenant plus d'un tiers de leur vie ménopausées. Le déclin de la production d'œstrogènes endogènes au cours de cette période s'accompagne de troubles fonctionnels qui affectent la qualité de vie. La ménopause est également associée à un risque de fractures élevé, ainsi qu'à une **augmentation des événements cardiovasculaires et des troubles métaboliques**. Ces désordres fonctionnels peuvent être limités par l'administration d'un traitement hormonal de la ménopause (THM) à base d'œstrogènes. Cependant ces traitements ont des effets délétères, comme l'augmentation du risque de thrombose veineuse et de cancer du sein. L'amélioration du THM représente donc un enjeu majeur pour la santé des femmes.

Une des stratégies d'optimisation du THM repose sur la modulation du récepteur alpha des œstrogènes (ER α) qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires. En plus de son action classique comme facteur de transcription, il peut également agir à la membrane en induisant des voies de signalisation cytoplasmique. Le découplage des effets membranaire/nucléaire pourrait améliorer la balance bénéfique/risque dans l'action de ce récepteur. **Le but de mon projet a été d'évaluer l'impact de ce découplage dans le développement des maladies cardiovasculaires et métaboliques.**

En combinant des modèles d'animaux invalidés pour les fonctions membranaires ou nucléaires de ER α et des approches pharmacologiques, ce travail a permis de montrer que la majorité des effets protecteurs des œstrogènes sur le plan vasculaire étaient relayés par le ER α nucléaire, avec un rôle minime des effets membranaires. Dans ce contexte, nous avons pu mettre en évidence que l'Estérol (E4), un œstrogène naturel et endogène ciblant spécifiquement le ER α nucléaire, était capable de prévenir l'obésité en réponse à un régime gras chez la souris ovariectomisée et les désordres vasculaires et métaboliques qui lui sont associés.

Cette étude s'inscrit dans une démarche plus globale de caractérisation des effets de l'Estérol puisque cette molécule est développée en clinique comme nouveau THM. Contrairement aux œstrogènes utilisés actuellement, l'E4 n'induit pas les facteurs de la coagulation hépatique aux doses utilisées, ce qui pourrait limiter le risque thrombotique. Mes résultats montrent un effet bénéfique à la fois sur le plan vasculaire et métabolique de cet œstrogène. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces effets pourrait permettre de positionner l'E4 comme le premier œstrogène naturel agissant comme un modulateur sélectif du ER α .

Mots clés : ménopause, récepteur nucléaire, œstrogènes, estérol, athérosclérose, syndrome métabolique