

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

**EFFETS DE L'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS ESTROGÈNES
ALPHA ET BÊTA SUR LA DIFFÉRENCIATION DE CELLULES
PROMYÉLOÏDES HL-60 EN NEUTROPHILES**

Par
Jill Hénault

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Examineur interne

Denis Girard
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé
humaine

Examineur externe

Patrice Hugo
Procrea, Division recherche et
développement

Directeur de recherche

Jacques Bernier
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé
humaine

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Jacques Bernier, pour sa confiance et son support.

Je tiens également à remercier Mlle Claudine Hamelin, technicienne de laboratoire, pour son soutien constant, son dynamisme et son éternelle bonne humeur.

Merci à mes collègues de laboratoire, Michele D'Élia, Julie Patenaude et Myrienne Columbo, pour leur aide et pour leurs conseils judicieux.

Merci à mes parents, Marc et Suzanne Hénault, pour la révision de ce document ainsi que pour leur appui constant fourni pendant ces deux années d'études.

Enfin, merci à Jacques Moisan, pour la révision de ce document, sa présence, sa patience et son amour inconditionnel.

Table des matières

REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	viii
INTRODUCTION	x
PREMIÈRE PARTIE	1
1. LES ESTROGÈNES	3
1.1. LA FAMILLE DES HORMONES STÉROÏDIENNES.....	3
1.2. SYNTHÈSE DES ESTROGÈNES.....	3
1.3. TRANSPORT DE L'ESTRADIOL DANS L'ORGANISME.....	5
1.4. RÔLE DES ESTROGÈNES DANS L'ORGANISME.....	5
2. LES RÉCEPTEURS ESTROGÈNES	7
2.1. LA FAMILLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES.....	7
2.2. RÉCEPTEURS ESTROGÈNES ALPHA ET BÊTA.....	7
2.2.1. Structure de ER α et ER β	8
2.2.2. Isoformes de ER α et ER β	13
2.3. VOIES D'ACTION GÉNOMIQUES DES ERs.....	14
2.3.1. Voie d'initiation classique.....	15
2.3.2. Voies d'initiation non classique.....	18
2.3.3. Voies d'initiation ligand-indépendante.....	21
2.4. VOIES D'ACTION NON GÉNOMIQUES DES ERs.....	23
2.5. DISTRIBUTION DES ERs DANS L'ORGANISME.....	26
2.6. LES MODÈLES MURINS α ERKO, β ERKO et $\alpha\beta$ ERKO.....	28
3. LES ESTROGÈNES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	31
3.1. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DÉPENDANTE DU SEXE.....	31
3.1.1. Les maladies auto-immunes.....	32
3.1.2. Effets des estrogènes sur les modèles murins de maladies auto-immunes.....	33
3.2. EFFETS DES ESTROGÈNES SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES SPÉCIFIQUES.....	35
3.2.1. Le thymus et le développement des lymphocytes T.....	35
3.2.2. Les lymphocytes T périphériques.....	38

3.2.3. Les lymphocytes B et la réponse humorale.....	43
3.3. LES CELLULES DU SYSTÈME IMMUNITAIRE NON SPÉCIFIQUE.....	46
3.3.1. Les neutrophiles.....	47
3.3.2. Monocytes et macrophages.....	48
3.3.3. Les cellules tueuses naturelles.....	49
4. MODÈLE CELLULAIRE UTILISÉ LORS DE L'ÉTUDE	50
4.1. INFLUENCE DES ESTROGÈNES SUR LA DIFFÉRENTIATION CELLULAIRE.....	50
4.2. LES MODÈLE DE DIFFÉRENTIATION CELLULAIRE.....	52
4.2.1. Les cellules HL-60.....	52
DEUXIÈME PARTIE	55
1. ARTICLE #1: EFFECTS OF ESTROGEN RECEPTOR ALPHA AND BETA EXPRESSION IN HL-60 CELLS ON DYMETHYL SULFOXYDE-INDUCED CELL DIFFERENTIATION INTO NEUTROPHILS	56
1.1. RÉSUMÉ FRANÇAIS DE L'ARTICLE #1.....	57
1.2. CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT.....	58
1.3. ARTICLE #1.....	59
TROISIÈME PARTIE	90
1. CONCLUSION	91
2. APPENDICE A	96
3. LISTE DES RÉFÉRENCES	104

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Hydroxylation de l'androsténédione et de la testostérone en estrone et en 17 β -estradiol.....	4
Figure 2 : Structure des récepteurs estrogène alpha et bêta.....	9
Figure 3 : Domaine de liaison avec l'ADN du ER	10
Figure 4 : Voie d'initiation classique des récepteurs estrogène.....	16
Figure 5 : Activation de la voie signalétique de ERK et blocage de la voie JNK par E ₂ -ER.....	24
Figure 6 :Hématopoïèse.....	51
Figure 7 : Expression de l'ARN messenger de ER α dans les thymus de fœtus de souris.....	101
Figure 8 : Expression de l'ARN messenger de ER β dans les thymus de fœtus de souris.....	102
Figure 9 : Expression relative de l'ARN messenger de ER α dans les thymus de fœtus de souris.....	103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des différents phénotypes rapportés des souris α ERKO et β ERKO.....	28
Tableau 2 : Ratio femmes vs homme atteints de maladies auto-immunes.....	32
Tableau 3 : Substances induisant la différenciation de cellules HL-60.....	53
Tableau 4 : Caractéristiques phénotypiques des cellules HL-60 différenciées.....	54

Liste des abréviations

AR :	Arthrite Rheumatoïde
CD :	Déterminant de complémentarité
ER :	Récepteur estrogènes
E₁ :	Estrone
E₂ :	Estradiol
E₃ :	Estriol
HAP :	Axe Hypothalamique Hypophysaire
IL :	Interleukine
LSE :	Lupus Systémique Érythémateux
MS :	Sclérose en plaque (Multiple Sclerosis)
NK :	Cellule tueuse naturelle (Natural Killer Cells)

Résumé

Les estrogènes sont des hormones capables d'affecter le système immunitaire. Il a été démontré que les estrogènes peuvent même moduler la maturation et le développement des cellules immunitaires dans la moelle osseuse et le thymus. Les mécanismes sous-jacents à cette modulation sont cependant encore très mal compris. Puisque les effets des estrogènes sont principalement médiés par l'entremise de récepteurs nucléaires, les récepteurs estrogènes alpha ($ER\alpha$) et bêta ($ER\beta$), et que ces récepteurs sont exprimés dans la plupart des cellules matures et immatures du système immunitaire, nous avons étudié de rôle de $ER\alpha$ et $ER\beta$ lors de la maturation de cellules immunitaires humaines.

Pour ce faire, un modèle de différenciation cellulaire *in vitro* a été utilisé : la différenciation de cellules humaines promyéloïdes HL-60 en neutrophiles par incubation avec du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les cellules HL-60 n'exprimant pas de façon endogène le $ER\beta$ et exprimant très peu le $ER\alpha$, il a été possible de les transfecter pour faire en sorte qu'elles surexpriment $ER\alpha$ (HL - 60 α) ou $ER\beta$ (HL - 60 β). Ces cellules nous ont permis d'étudier de façon spécifique le rôle de chacun des récepteurs estrogènes dans le contexte d'une différenciation cellulaire.

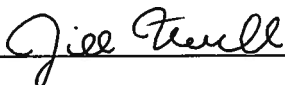
Les cellules HL-60, HL-60 α et HL-60 β ont été incubées pendant cinq jours dans un milieu contenant 1.25% de DMSO et différentes concentrations physiologiques de 17 β -estradiol (0 M, 10^{-8} M et 10^{-6} M). Les effets de la surexpression de $ER\alpha$ et $ER\beta$ sur la concentration, la viabilité et la morphologie cellulaire ainsi que sur la présence de différents marqueurs de différenciation ont été analysés.

En accord avec la littérature, nos résultats montrent que la viabilité des cellules HL-60 diminue lors d'une exposition au DMSO et que, parallèlement, le pourcentage de cellules exprimant des marqueurs de différenciation augmente, indiquant que les cellules se différencient en neutrophiles. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les cellules HL-60 α . Cependant, contrairement aux cellules HL-60 et HL-60 α , la viabilité des cellules HL-60 β n'est pas diminuée lors du traitement au DMSO. De plus, le pourcentage de cellules HL-60 β exprimant des marqueurs de différenciation n'est pas augmenté de façon


significative même après cinq jours d'exposition au DMSO. Une étude morphologique montre également des différences entre la forme du noyau des cellules HL-60 β et des cellules HL-60 et HL-60 α . Nos recherches permettent donc de conclure qu'en présence de DMSO, la surexpression de ER β dans les cellules HL-60 influence négativement la différenciation de ces cellules en neutrophiles.

Il a également été observé que l'ajout de différentes concentrations de 17 β -estradiol dans le milieu de culture lors de l'exposition au DMSO n'influence aucun des résultats obtenus lors de cette étude. Les effets modulateurs de ER β sur la différenciation des cellules HL-60 en neutrophiles sont donc de nature ligand indépendantes.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent pour la première fois qu'une modulation de l'expression de ER β dans une cellule immunitaire promyéloïde peut avoir un impact sur sa différenciation en cellule immunitaire plus mature et ce, même en absence d'estrogènes. La découverte du ER β est relativement récente et son rôle dans les cellules immunitaires est encore bien mal connu. Il est évident que des recherches plus approfondies sur le rôle de ce nouveau récepteur pourrait éventuellement nous permettre de mieux comprendre par quels mécanismes ce dernier influence la différenciation cellulaire.



Étudiant



Directeur de recherche

Introduction

Il est reconnu depuis longtemps que la manière dont le système immunitaire se développe et répond aux infections et autres stimuli diffère selon le sexe. En général, les femmes ont tendance à développer une réponse humorale plus forte et plus soutenue que les hommes, à rejeter les allogreffes plus rapidement et à mieux résister à certaines infections virales et bactériennes. Elles sont également plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes telles le lupus systémique érythémateux (LSE) et l'arthrite rhumatoïde (AR).

Parce que leurs concentrations varient inévitablement entre hommes et femmes, les hormones sexuelles, particulièrement les estrogènes, se sont vite imposées comme instigateurs potentiels de cette dichotomie immunitaire. Très tôt, en effet, des études ont démontré que les estrogènes ont la capacité de moduler la réponse immunitaire. En général, les estrogènes favorisent l'immunité humorale (sécrétion d'anticorps) et ont un effet suppresseur sur l'immunité cellulaire. Une des façons par laquelle ces hormones semblent influencer la réponse immunitaire est en affectant la maturation des cellules immunitaires dans le thymus et la moelle osseuse.

Les estrogènes causent l'atrophie du thymus, autant chez les femmes enceintes que chez les souris gestantes ou auxquelles on a administré de fortes doses d'estradiol. Les estrogènes affectent également la lymphopoïèse des cellules B dans la moelle osseuse et la concentration sanguines de granulocytes. Les mécanismes exacts par lesquels les estrogènes influencent la maturation des cellules immunitaires ne sont pas encore connus. Toutefois, étant donné que la majorité des cellules immunitaires matures et immatures expriment des récepteurs estrogènes (ERs), il est possible que les estrogènes agissent directement sur ces cellules pour moduler leur maturation.

Les effets des estrogènes sont principalement médiés par l'entremise de deux récepteurs nucléaires : le récepteur estrogène alpha ($ER\alpha$) et le récepteur estrogène bêta ($ER\beta$), récemment caractérisé.

La présente étude a été entreprise afin de mieux comprendre le rôle de chacun des ERs lors de la maturation et de la différenciation de cellules immunitaires. Pour ce faire, des cellules promyéloïdes HL-60 ont été transfectées de façon à ce qu'elles surexpriment ER α (HL-60 α) ou ER β (HL-60 β). Ces cellules ont par la suite été exposées simultanément au diméthyl sulfoxyde (DMSO), un composé chimique induisant une différenciation en neutrophiles, et à différentes concentrations de 17 β -estradiol. Durant et après les expositions, certains paramètres ont été évalués : la concentration cellulaire, la viabilité cellulaire et la présence de marqueurs de différenciation. Ainsi, les résultats obtenus permettront de déterminer l'influence de l'estradiol et de l'expression de chaque ER lors de la différenciation de cellules promyéloïdes en neutrophiles.

Première partie

Revue de la littérature

1. LES ESTROGÈNES

1.1. La famille des hormones stéroïdiennes

La famille des hormones stéroïdiennes regroupe toutes les hormones ayant pour précurseur le cholestérol. Elle comprend les hormones du cortex surrénal (glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes), et les hormones sexuelles (androgènes, estrogènes, progestérones). Principalement synthétisées par des cellules spécialisées du cortex surrénal, des gonades (testicules et ovaires) et du placenta, ces hormones liposolubles diffusent librement à travers les membranes cellulaires et entrent dans la circulation sanguine où elles seront transportées jusqu'à leur lieu d'action.

1.2 Synthèse des estrogènes

Les hormones stéroïdiennes synthétisées par les gonades sont appelées hormones sexuelles. Le type d'hormone produit par les cellules des différentes gonades (mâle ou femelle) dépend entièrement des enzymes qu'elles expriment. Ainsi, les cellules des testicules possèdent un groupe d'enzymes capables de convertir l'androsténédione en testostérone et les cellules des ovaires possèdent une deuxième série d'enzymes capables de convertir la testostérone en estrogènes. Il est à noter que les testicules produisent également des estrogènes en petite quantité.

La synthèse des estrogènes est catalysée par le complexe enzymatique d'aromatase monooxygénase P450 (C19 hydroxylase, 17 β -hydroxystéroïd déhydrogénase) (Krishnan, Heath et Bryant, 2000). En trois hydroxylations consécutives, l'androsténédione et la testostérone sont transformées respectivement en estrone (E₁) et en 17 β -estradiol (E₂) (Figure1). Il est généralement reconnu que, dans l'ovaire, la conversion du cholestérol en androgène se fait dans les cellules de la thèque et que les androgènes diffusent ensuite à l'intérieure des cellules granuleuses pour être convertis en estrogènes. De récentes évidences montrent toutefois que les deux types cellulaires auraient la capacité de produire à la fois des androgènes et des estrogènes (Lieberman, 1996).

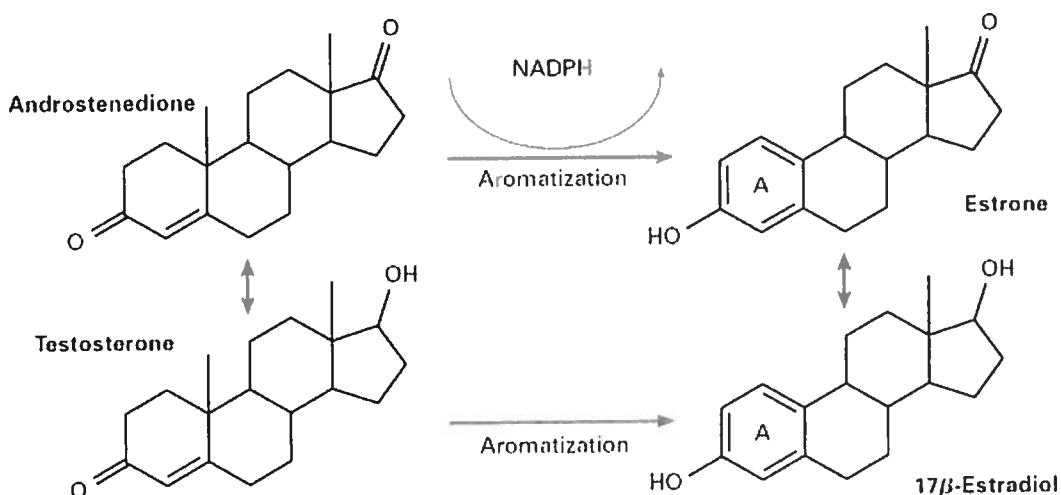


Figure 1. Hydroxylation de l'androsténédione et de la testostérone en estrone et en 17β-estradiol.

Bien que la plus grande partie des estrogènes soit synthétisée par les ovaires, il est à noter que d'autres cellules peuvent également en produire. Par exemple, chez les femmes ménopausées et les hommes, les estrogènes peuvent être produits par les cellules adipeuses, les ostéoblastes, l'endothélium vasculaire, les cellules musculaires de l'aorte, les cellules glandulaires de l'endomètre et certaines cellules du cerveau (Simpson et Davis, 2001). Les estrogènes produits dans ces différents tissus agissent surtout au niveau local de façon paracrine et autocrine (Labrie *et al*, 1997, Labrie *et al*, 1998).

Des trois estrogènes produits par l'organisme, le 17β-estradiol est le plus bioactif. L'estrone et l'estriol (E₃) sont surtout produits par le foie à partir de l'estradiol. Bien que moins bioactifs que leur précurseur, ils se retrouvent en plus grande concentration dans le sang, ce qui facilite leur excrétion dans la bile et l'urine sous forme de métabolites hydroxylés (Gruber *et al*, 2002). Les effets de l'estrone et de l'estriol sur les différents tissus de l'organisme sont encore mal connus.

1.3 Transport de l'estradiol dans l'organisme

Dans le sérum, l'estradiol est majoritairement lié de façon réversible à une protéine plasmatique appelée SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) (Anderson, 1974). L'estradiol peut également se lier avec une affinité réduite à l'albumine ou se retrouver libre dans le sérum (2-3 pourcent de l'E₂ total). Chez un adulte normal, la concentration plasmatique de SHBG est d'environ 3mg/l et varie selon la concentration d'estrogènes en circulation. Ainsi, lors de la grossesse, sa concentration peut devenir jusqu'à cinq fois plus élevée.

Arrivé au tissu cible, l'estradiol se dissocie du SHBG pour diffuser librement à l'intérieur des cellules. Il a été démontré récemment que certaines cellules peuvent exprimer à leur surface des récepteurs à SHBG (R_{SHBG}), ce qui porte à croire que le SHBG pourrait jouer un rôle dans l'internalisation de l'estrogène par les cellules ou participer à une voie de signalisation intracellulaire (Rosner *et al*, 1998).

1.4 Rôle des estrogènes dans l'organisme

Les estrogènes jouent un rôle prédominant dans le développement et le fonctionnement des organes sexuels chez la femme. Ils stimulent entre autres la croissance des ovaires, des follicules ovariens, de l'épithélium et des muscles lisses du vagin et de l'épithélium de l'utérus. Ils stimulent la croissance et la prolifération de l'épithélium ductal et des tissus conjonctifs de la glande mammaire (Porter, 1974). Ils contribuent à la féminisation du corps : épaules étroites, hanches larges, distribution des tissus adipeux.

Dans le système cardiovasculaire, les estrogènes semblent jouer un rôle vasoprotecteur. À court terme, ils provoquent une vasodilatation (Kim *et al*, 1999) alors qu'à long terme, ils protègent contre l'athérosclérose (Clarkson, Anthony et Klein, 1996, Iafrati *et al*, 1997), possiblement en induisant la production de NO et de prostacycline par les cellules épithéliales des vaisseaux sanguins (Mikkola, Viinikka et Ylikorkala, 1998, Kauser et Rubanyi, 1997). Cette production de NO inhiberait la prolifération des cellules

musculaires lisses et l'adhésion de plaquettes lors de blessures vasculaires (Gustafsson, 1997).

Au niveau de l'ossature, les estrogènes bloquent l'action des ostéoclastes (résorption du calcium) (Jilka, 1998) permettant ainsi le maintien de l'équilibre du ratio ostéoblastes/ostéoclastes et, par le fait même, le maintien de la densité osseuse. Chez les femmes ménopausées, les thérapies avec estrogènes permettent de rétablir la masse osseuse et de retarder l'apparition de l'ostéoporose (Christiansen, Christensen et Transbol, 1981).

Les estrogènes ont un effet sur l'axe hypothalamique hypophysaire (HAP) et sur le système nerveux central. Par leur régulation de l'HAP, ils influencent leur propre sécrétion par les gonades ainsi que la sécrétion d'autres hormones ayant des effets sur l'humeur, l'appétit, la régulation des tissus adipeux et la température corporelle (Warner, Nilsson et Gustafsson, 1999). Les estrogènes ont également un effet neuroprotecteur. Ils augmentent la sensibilité de certains récepteurs neuronaux (Woolley *et al*, 1997), facilitent le remodelage synaptique chez le rat (Garcia-Segura *et al*, 1999) et réduisent la production de peptides beta-amyloïdes par les neuroblastomas (Xu *et al*, 1998).

D'autres effets des estrogènes incluent la production de récepteurs à lipoprotéines par le foie et la diminution du taux de lipoprotéines à faible densité (LDL) dans le sang, la production de collagène par les cellules de la peau et la diminution des risques du cancer du colon (Gruber, 2002). Les estrogènes ont également des effets importants sur le système immunitaire. La troisième section de ce mémoire est d'ailleurs entièrement dédiée à ce sujet.

2. LES RÉCEPTEURS ESTROGÈNES

2.1. La famille des récepteurs nucléaires

La majorité des effets de l'estradiol sur l'organisme sont médiés par l'entremise de ses récepteurs nucléaires : le récepteur estrogène alpha (ER α) et le récepteur estrogène bêta (ER β). ER α et ER β font partie de la famille des récepteurs nucléaires qui est en fait une superfamille regroupant pas moins de 300 membres, tous impliqués dans la régulation de transcription de gènes (Whitfield *et al*, 1999). Bien que la majorité de ses membres n'ait toujours pas de ligand connu (récepteurs orphelins), il est généralement reconnu que le mécanisme de fonctionnement des récepteurs de cette famille implique : (1) la liaison du récepteur avec son ligand entraînant un changement de conformation du récepteur, (2) la migration du récepteur activé à l'intérieur du noyau de la cellule, (3) la liaison du récepteur activé sous forme de monomère ou de dimère à un site spécifique sur l'ADN provoquant l'activation ou la suppression de l'expression du gène sous contrôle du site spécifique.

Parmi les récepteurs les plus connus de cette famille, on compte ceux pour la testostérone, la progestérone, les glucocorticoïdes, les hormones thyroïdiennes, la vitamine A et la vitamine D (Enmark et Gustafsson, 1999). Contrairement aux ERs qui se retrouvent presque exclusivement dans le noyau, la plupart de ces récepteurs se retrouvent dans le cytosol et ne vont dans le noyau qu'une fois activés (Hager *et al*, 2000, Wilstrom *et al*, 2002). Comme pour les ERs, ces récepteurs possèdent plusieurs sous-types, souvent deux ou trois, qui peuvent être le résultat d'épissage alternatif de l'ARN messager (ARNm) d'un même gène ou le produit de gènes différents.

2.2 Récepteurs estrogènes alpha et bêta

Bien que la structure et les effets des estrogènes soient connus depuis les années 30s, ce n'est qu'en 1958 que le premier récepteur ER est caractérisé. Ce récepteur sera cloné en 1986 par Green *et al.*. S'installe alors le dogme du récepteur estrogène unique par lequel,

supposément, tous les effets des estrogènes sont médiés. Malheureusement, les évidences de la présence d'une autre voie d'action des estrogènes s'accumulent rapidement. En 1993, la première souris ER knock-out (ERKO) est créée (Lubahn *et al*, 1993), invalidant la théorie voulant que l'absence d'un gène codant pour les ERs soit une condition létale. De plus, l'étude des tissus de cette souris révèle des sites où les estrogènes se lient spécifiquement.

En 1994, Smith *et al*. rapportent le cas d'un homme ne produisant pas de ERs fonctionnels. Bien que souffrant d'ostéoporose sévère et d'une fertilité réduite, cet individu est la preuve que, autant chez la souris que chez l'homme, le récepteur estrogène n'est pas la seule voie d'action des estrogènes. Les conséquences de l'absence de ERs chez une femme ne sont malheureusement pas connues.

La recherche d'un deuxième récepteur estrogène se poursuit jusqu'en 1996, date où un nouveau récepteur estrogène, le ER β , est cloné chez le rat par Kuiper *et al*. Ce même récepteur sera par la suite cloné chez l'homme (Mosselman Polman et Dijkema, 1996), chez la souris (Tremblay *et al*, 1997) et chez le poisson téléostéen (Socorro *et al*, 2000).

2.2.1. Structure de ER α et ER β

ER, rebaptisé ER α , et ER β sont encodés par deux gènes différents. Chez l'humain, le premier est encodé par un gène situé dans le chromosome 6, alors que le second est encodé par un gène du chromosome 14 (Enmark et Gustafsson, 1999). Malgré le fait qu'ils soient le produit de deux gènes différents, ER α et ER β possèdent la même structure générale (Figure 2). Les ERs sont divisés en six domaines ayant chacun une fonction propre.

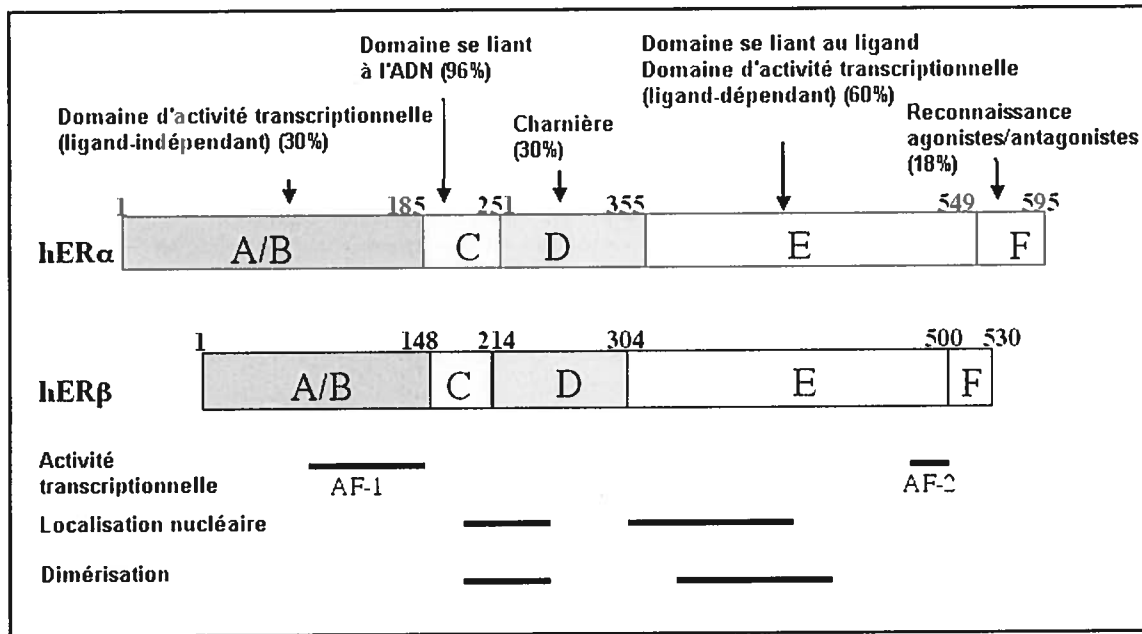


Figure 2. Structure des récepteurs estrogène alpha et bêta. Les chiffres entre parenthèses représentent le pourcentage d'homologie entre ERα et ERβ.

Le premier domaine, ou domaine A/B, se trouve à l'extrémité amino terminale de la protéine. Ce domaine contient la première fonction de transactivation (AF-1). AF-1 a pour fonction d'activer la transcription des gènes en interagissant avec les facteurs de transcription associés à la polymérase II (Horwitz *et al*, 1996). L'action de AF-1 est ligand indépendant, c'est-à-dire que son activité ne dépend pas de la liaison d'une molécule d'estradiol au récepteur, mais dépend plutôt du contexte cellulaire (Kobayashi *et al*, 2000). Le domaine A/B est un des domaines les moins bien conservé entre les deux récepteurs (alpha et bêta). En effet, le domaine A/B de ERβ est plus court (d'environ 38 acides aminés (Dechering, Boersma et Mosselman, 2000)) que ERα, avec une homologie de seulement 30 pourcent entre les deux récepteurs. Comme le laisse suggérer les divergences structurales entre les domaines A/B de ERα et ERβ, l'activité transcriptionnelle de la fonction AF-1 des deux récepteurs n'est pas la même. Ainsi, des études utilisant des chimères (chez lesquelles les domaines A/B des ERs ont été interchangeés) démontrent que l'activité transcriptionnelle de la fonction AF-1 de ERβ est beaucoup moins grande que celle de ERα (Cowley et Parker, 1999, Pettersson, Delaunay et Gustafsson, 2000). Le domaine A/B est donc responsable des différences observées dans l'amplitude de l'activité transcriptionnelle des deux ERs.

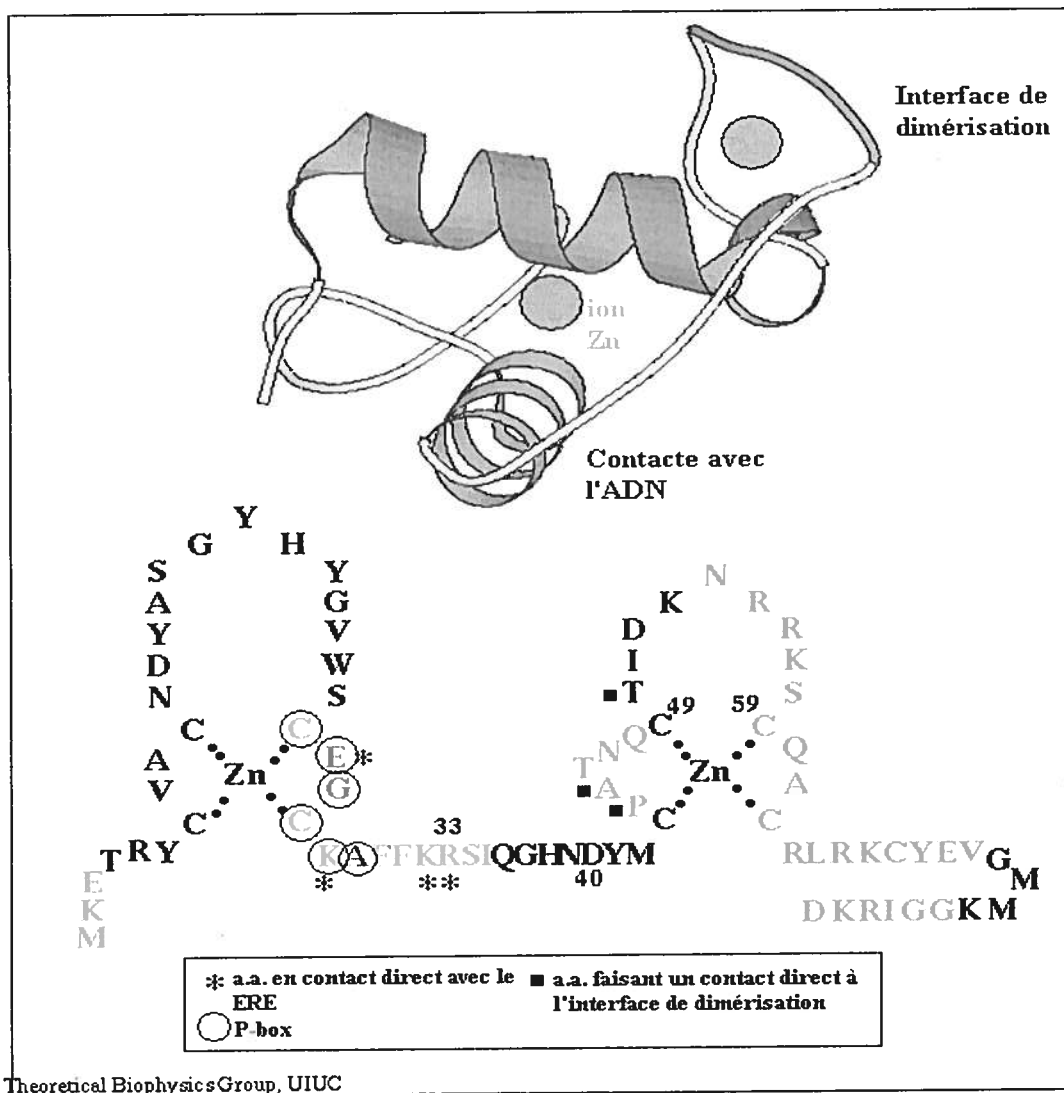


Figure 3. Domaine de liaison avec l'ADN du ER.

Le domaine suivant, le domaine C, est la partie hydrophobique de la protéine qui va se lier directement à l'ADN. Cette section de la protéine est conservée à plus de 96 pourcent entre les deux récepteurs. Elle contient deux motifs zinc (zinc-finger motif) qui consistent en fait en huit cystéines entourant deux ions Zn^{2+} . Cet arrangement moléculaire permet à certains acides aminés du domaine C, la boîte P, d'établir un contact direct et spécifique avec l'élément de réponse du récepteur estrogène (ERE) sur l'ADN (Schwabe *et al*, 1993) (Figure 3). L'ERE est généralement constitué du palindrome 5' AGGTCAnnnTGACCT 3' (Beato, 1989). Certains promoteurs possèdent toutefois des

EREs fonctionnels dont la séquence dévie légèrement de ce consensus (Kuntz et Shapiro, 1997). La dimérisation des ERs au site de liaison avec le ERE a pour effet de stabiliser cette liaison. Ainsi, une perte de spécificité peut être compensée jusqu'à un certain point par l'augmentation de l'affinité des dimères. Dans le domaine C, trois acides aminés du motif zinc participent au processus de dimérisation des ERs (Pettersson et Gustafsson, 2001).

Le domaine D est appelé «charnière» de la protéine. Cette partie permet en effet aux ERs de plier ou d'altérer leur conformation et leur est nécessaire pour se lier avec une affinité maximale aux molécules d'estradiol (Tsai et O'Malley, 1994). Le domaine D n'est conservé qu'à 30 pourcent entre ER α et ER β , mais ne semble pas influencer l'activité transcriptionnelle des récepteurs.

À l'extrémité carboxyle de la protéine, on retrouve le domaine E. Ce domaine contient principalement le domaine de liaison au ligand (ligand-binding domain ou LBD). Comme son nom l'indique, cette partie confère au récepteur sa spécificité pour l'estradiol (Mueller-Fahrnow et Egner, 1999). Le LBD est constitué de douze hélices alpha ainsi que deux courts feuillets bêta (Dechering *et al*, 2000). Leur structure secondaire forme un «sandwich alpha hélicoïdale» dans lequel s'incorpore le ligand. Bien qu'il n'y ait qu'environ 60 pourcent d'homologie entre les domaines E de ER α et ER β , la plupart des acides aminés conservés se situent aux endroits où la protéine contacte directement son ligand (Dechering *et al*, 2000), ce qui pourrait expliquer pourquoi l'affinité des deux récepteurs est quasiment le même pour l'estradiol. L'affinité des deux récepteurs n'est cependant pas le même pour tous les ligands.

Quoique principaux ligands physiologiques des ERs, les estrogènes ne sont pas les seuls à pouvoir se lier à ces récepteurs. De nombreuses autres molécules exogènes (i.e. qui ne se retrouvent pas naturellement dans l'organisme) peuvent en effet venir se lier au LBD des ERs et entraîner des réponses transcriptionnelles semblables ou carrément différentes de celles causées par l'estradiol. Ces molécules sont appelées SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) et ont un effet agoniste, total ou partiel, ou antagoniste sur

l'activité de transcription des ERs, dépendamment du type de récepteur impliqué (ER α ou ER β) et du contexte cellulaire. Parmi les SERMs les plus connus, on retrouve le tamoxifène et le raloxifène, deux agonistes partiels utilisés comme traitement contre le cancer du sein (Dutertre et Smith, 2000) et le ICI 182,780, un antagoniste pur que l'on utilise pour bloquer toute activité des ERs (Biberger et von Angerer, 1996). Il existe également toute une panoplie de phytoestrogènes (estrogènes dérivés de plantes), dont la génistéine, le coumestrole et l'entérodiole (Humfrey, 1998), qui ont généralement une plus grande affinité pour ER β (Kuiper et Gustafsson, 1997). Ainsi donc, le domaine E des ERs est responsable de l'affinité que chaque récepteur possède pour un ligand particulier.

Le domaine E referme également la seconde fonction d'activation (AF-2) du ER. Comme AF-1, AF-2 sert à l'activation de la transcription. Ce qui le distingue toutefois de AF-1 est sa dépendance à la liaison du ligand. AF-2 est constitué d'une hélice alpha (H12) essentielle à son activité et dont la conformation tend à changer en fonction de la présence et du type de ligand se liant au ER (Mueller-Fahrnow et Egner, 1999). H12 joue un peu le rôle d'un couvercle qui se referme sur la cavité du LBD dans lequel le ligand vient s'engouffrer. H12 ainsi placé devient capable de se lier à une série de co-activateurs qui faciliteront l'activation, ou la répression, de la transcription. Contrairement à la fonction AF-1, l'activité transcriptionnelle de la fonction AF-2 est relativement bien conservée entre les récepteurs ER α et ER β et ne semble pas être responsable des différences entre les activités transcriptionnelles des deux récepteurs (Cowley et Parker, 1999).

En plus du LBD et du AF-2, le domaine E contient : une région participant, avec le domaine C, à la dimérisation des monomères de ER (Forman et Samuels, 1990), une région d'interaction avec les protéines de «heat shock» (Pratt et Toft, 1997) et une région constituant le signal de translocation nucléaire du ER (Ylikomi *et al*, 1992). Cette dernière région permet la translocation du récepteur fraîchement synthétisé du cytoplasme au noyau cellulaire.

Le domaine F est très peu conservé entre les deux ERs. Il semble être impliqué dans le maintien de ER dans une conformation optimale pour interagir avec différents co-activateurs et co-répresseurs. Il serait également important pour l'activation ou la répression de la transcription lors d'une liaison avec un antiestrogène (Montano *et al*, 1995).

2.2.2. Isoformes de ER α et ER β

Bien qu'encodés par seulement deux gènes, ER α et ER β possèdent de nombreux isoformes. Ces isoformes sont soit le produit de la transcription d'un même gène, mais à partir de promoteurs différents, soit le produit de l'épissage alternatif d'un même ARNm. L'ARNm de ER α et ER β est constituée de huit exons et encode pour des protéines de 595 acides aminés (66KDa) et 530 acides aminés (59KDa) respectivement (Dechering, Boersma et Mosselman, 2000).

Les isoformes répertoriés de ER α sont surtout le produit d'épissage alternatif de l'ARNm aux jonctions intron/exon, ayant pour résultat des ARNms auxquels il manque un ou plusieurs exons complets (Fuqua *et al*, 1991, Koehorst *et al*, 1993, Miksicek, 1993, Zhang, Borg et Fuqua, 1993, Daffada *et al*, 1994, Pfeffer, Fecarotta et Vidali, 1995). Quoique certaines variantes de l'ARNm de ER α soient associées au cancer du sein chez l'humain (Daffafa *et al*, 1994, Leygue *et al*, 1996), très peu d'information est disponible sur la transcription de ces ARNms en protéines et sur le rôle physiologique de ces protéines. Récemment, une version tronquée de ER α , TERP-1 (Truncated Estrogen Receptor Product-1), a été rapportée chez le rat (Resnick *et al*, 2000). TERP-1, à laquelle il manque les domaines A/B, C et D, est capable d'inhiber la transcription de certains gènes en formant des hétérodimers inactifs avec les ERs. Chez la souris, cinq variantes de l'ARNm (mER α A, B, F1, F2 et H) ont été décrites, toutes étant des produits d'épissage à l'intérieur de l'exon 1 et toutes codant pour une même protéine de 66KDa (Kos *et al*, 2000).

ER β possède également plusieurs isoformes dont la fonction première semble être d'inhiber l'action des estrogènes. L'isoforme ER β cx, par exemple, est une version de ER β dont une partie de l'extrémité carboxyle (exon 8) a été remplacée par vingt-six nouveaux acides aminés et qui ne peut ni se lier à l'estradiol, ni se lier à l'ADN. ER β cx peut, par contre, former des hétérodimères avec ER α et l'empêcher de se lier au ERE, inhibant du même coup l'activation de la transcription (Ogawa *et al*, 1998). Trois autres variantes de ER β (ER β 3, ER β 4 et ER β 5) sont également caractérisées par le remplacement de l'exon 8 par d'autres acides aminés. Comme pour ER β cx, ces trois isoformes, ne lient pas l'estradiol et empêchent l'activation de gènes sous contrôle de EREs (Moore *et al*, 1998).

Une autre variante, ER β Δ 5, caractérisée cette fois par un épissage de l'exon 5, agit également en récepteur dominant négatif lorsque cotransfectée avec ER α ou ER β dans des cellules humaines 293T (Inoue *et al*, 2000).

Certains isoformes de ER β sont caractérisés non pas par la perte d'exons, mais par l'addition de nucléotides. Par exemple, chez le rat et la souris, ER β 2 possède une insertion de 54 nucléotides entre les exons 5 et 6, ce qui a pour effet de diminuer son affinité avec l'estradiol (Petersen *et al*, 1998, Lu *et al*, 2000).

La présence de tous ces isoformes de ER α et ER β laisse à penser qu'ils peuvent jouer un rôle spécifique dans certains tissus ou types cellulaires. Malheureusement, bien peu de données sont présentement disponibles quant à l'importance de leur rôle physiologique. Il est à noter que les gènes de ER α et ER β sont polymorphiques, et que cette source de variabilité, en plus des différents isoformes, vient encore complexifier l'étude des fonction des ERs (Nilsson *et al*, 2001).

2.3 Voies d'action génomiques des ERs

La voie d'action la plus importante des estrogènes est la voie génomique, c'est-à-dire celle passant par l'induction de l'expression de gènes. L'autre voie d'action, la voie non

génomique, fait référence à toute autre voie d'action des estrogènes qui ne requière pas l'activation de la transcription de gènes. Cette dernière sera le sujet de la section 2.4. Une fois liés à l'estradiol, les ERs dimérisent et vont se lier à un ERE sur l'ADN, entraînant l'expression ou la répression d'un gène. Les récentes études dans le domaine de la régulation de la transcription par les ERs commencent à peine à lever le voile sur la complexité réelle de cette régulation. La prochaine section traitera donc du mécanisme le plus connu d'initiation de transcription des ERs : la voie d'initiation «classique». Les sections subséquentes traiteront des mécanismes alternatifs.

2.3.1 Voie d'initiation classique

En absence d'estradiol, le récepteur estrogène se trouve majoritairement dans le noyau de la cellule, formant des hétérocomplexes avec des protéines chaperonnes (Pratt et Toft, 1997). Ces chaperonnes, comprenant entre autres les protéines Hsp-90 (Heat-shock protein-90), Hsp-70 (Heat-shock protein-70) et les immunophilines (Cyp40, FKBP51 et FKBP52), ont pour fonction de maintenir les ERs dans des conformations propices à la liaison avec l'estradiol (Heinlein et Chang, 2001). Une fois lié à son ligand, le ER se dissocie de ses chaperonnes, change de conformation et se lie au ERE sous forme de dimère. Dans le promoteur d'un gène régulé par l'estradiol, on retrouve généralement plusieurs copies de ERE auxquelles viennent se lier une multitude de dimères de ERs (Martinez et Wahli, 1989, Naar *et al*, 1991). Les ERs peuvent se lier aux ERES sous forme d'homodimères (ER α -ER α , ER β -ER β) ou encore sous forme d'hétérodimères (ER α -ER β) (Pettersson *et al*, 1997, Kuiper and Gustafsson, 1997).

Une fois lié au ERE, le dimère de ERs doit recruter une série de protéines, appelées communément co-régulateurs, qui permettront de stabiliser le complexe de préinitiation à la boîte TATA et le recrutement de la machinerie de transcription (Figure 4). L'activité transcriptionnelle des ERs dépend de AF-1 et AF-2. Comme il a été mentionné précédemment, la liaison d'un ligand au ER entraîne un changement de conformation de l'hélice 12 (H-12) de AF-2. Ce changement de conformation permet le recrutement des premiers co-régulateurs, les co-activateurs de la famille p160 (160-KDa coactivators

family). Cette famille est composée entre autres des protéines SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), TIF2 (Transcriptional Intermediary Protein 2)/ GRIP1 (Glucocorticoid

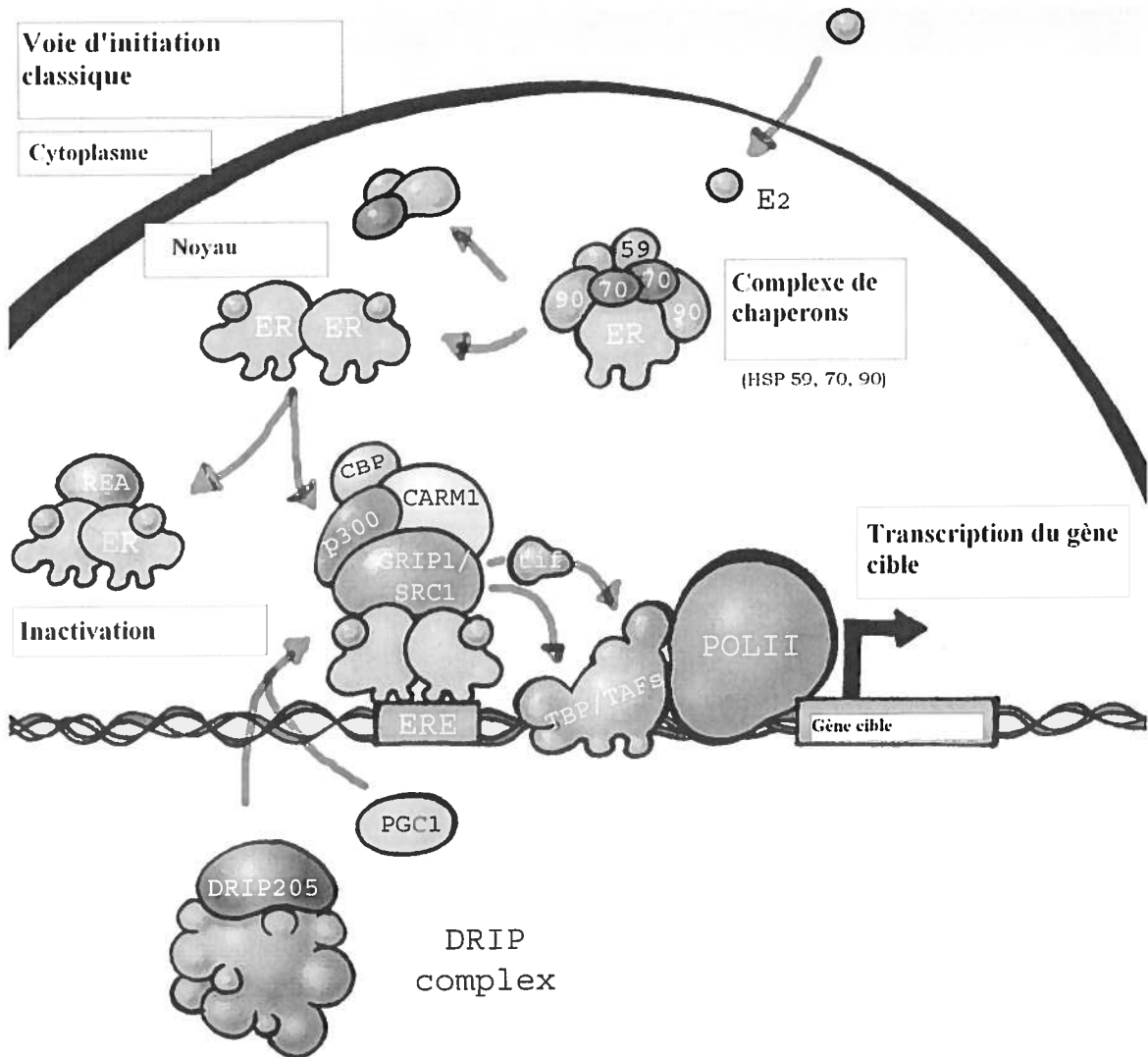


Figure 4. Voie d'initiation classique des récepteurs estrogène

Receptor Interacting Protein 1), et ACTR (Activator of Thyroid and Retinoid acid receptors)/AIB1 (Amplified In Breast cancer 1)/p300/cAMP-response element binding protein Binding Protein (CBP) interacting protein (Chen *et al*, 2000). Tous les membres de cette famille possède au moins trois motifs LXXLL (L pour leucine, X pour n'importe quel acide aminé) qui interagissent directement avec AF-2 (Torchia *et al*, 1997, Heery *et al*, 1997, Voegel *et al*, 1998). La fonction des protéines p160 est surtout de recruter d'autres activateurs de transcription comme p300/CBP, CARM1 (Coactivator-associated

Arginine Methyltransferase 1), pCAF (p300/CBP-associated factor) et BRG1 (Brahma-related gene 1) possédant la capacité intrinsèque de remodeler la chromatine. Ces protéines, la plupart connues sous le nom de HATs (ATP-dependent chromatin remodelling enzymes in conjunction with histone acetyltransferases), permettent le relâchement de la chromatine et facilite l'accès au site d'initiation de la transcription (Kingston et Narlikar, 1999).

Beaucoup d'autres co-activateurs interagissant directement avec AF-2 ont été décrits (LeDouarin *et al*, 1995, Yeh et Chang, 1996, Chen *et al*, 1997, Glass, Rose et Rosenfeld, 1997, Puigserver *et al*, 1998, Yanagisawa *et al*, 1999). Leur fonction demeure cependant incertaine. Plus récemment, plusieurs équipes de recherche ont découvert un imposant complexe capable d'interagir avec AF-2 et nécessaire à l'activité optimale des ERs. Ce complexe, le complexe DRIP/TRAP (VDR-interacting proteins/thyroid hormone receptor-associated proteins) est composé de plus de quinze nouvelles protéines dont l'une d'entre elles, DRIP205/TRAP220, lie directement AF-2 (Freedman, 1999, Ito *et al*, 1999, Burakov *et al*, 2000, Kang *et al*, 2002). Ce complexe, dont la fonction semble être de créer un «pont» entre le ER et l'appareil de transcription, est recruté plus facilement par ER β que par ER α (McKenna, Lanz et O'Malley, 1999). Cette préférence pour ER β pourrait expliquer en partie les différentes activités transcriptionnelles des deux récepteurs.

Bien que AF-2 soit responsable du recrutement de la plupart des co-régulateurs, plusieurs indices suggèrent que certains de ces co-régulateurs peuvent également lier AF-1. Ainsi, il a été démontré que p300/CBP et TIF2 peuvent se lier à AF-1 et AF-2 et permettre un effet de synergie entre les deux fonctions (Kobayashi *et al*, 2000, Benecke, Chambon et Gronemeyer, 2000). Il est connu que l'activité transcriptionnelle de AF-2 est équivalente entre les récepteurs ER α et ER β . Cependant, dépendamment du contexte cellulaire, l'activité transcriptionnelle de ER α est souvent beaucoup plus importante que celle de ER β . Sachant que l'activité de AF-1 chez ER β est faible relativement à l'activité de l'AF-1 de ER α (Cowley et Parker, 1999), l'effet synergique de p300/CBP et TIF2 entre AF-1 et AF-2 pourrait expliquer les différentes activités transcriptionnelles de ER α et ER β .

Le recrutement de co-activateurs par les ERs permet le recrutement subséquent du complexe de pré-initiation de transcription à la boîte TATA. Ce complexe est formé des TBP (TATA-box binding proteins) qui recruteront la polymérase d'ARN II au site d'initiation de transcription (Dechering *et al*, 2000).

En plus des co-activateurs, il existe des co-régulateurs qui, une fois liés aux ERs, inhibent la transcription au lieu de la promouvoir. Ces co-régulateurs sont appelés co-répresseurs et possèdent, pour la plupart, une activité de déacétylation. Cette activité, contrairement à celle des HATs, stabilise la structure de la chromatine et limite ainsi l'accès aux sites d'initiation de transcription. Parmi les co-répresseurs de ER les plus connus, on retrouve les protéines REA (repressor of estrogen receptor activity) (Montano *et al*, 1999, Delage-Mourroux *et al*, 2000), NCoR (nuclear receptor co-repressor) (Horlein *et al*, 1995) et SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) (Chen et Evans, 1995). Ces protéines entrent en compétition avec d'autres co-régulateurs pour les sites de liaisons sur AF-2. La liaison de AF-2 avec un co-activateur ou un co-répresseur dépend de plusieurs facteurs dont la nature du ligand lié au ER, la concentration relative de chaque co-régulateur ainsi que le contexte cellulaire.

2.3.2. Voies d'initiation non classiques

La liaison de ERs avec un ou plusieurs sites EREs dans un promoteur entraîne la transcription ou la répression du gène sous le contrôle de ce promoteur. C'est la voie d'action classique des ERs. Il existe toutefois plusieurs autres voies, dites alternatives, par lesquelles les ERs peuvent promouvoir ou réprimer l'expression d'un gène sans se lier directement à l'ADN.

Par exemple ER α et ER β peuvent interagir directement avec le complexe de facteurs de transcription nucléaires Jun-Fos (Teyssier *et al*, 2001) pour stimuler ou inhiber la transcription à partir d'un site AP-1 (activating protein-1) (Paech *et al*, 1997, Webb *et al*, 1999). En présence de ER α , l'estradiol agit comme agoniste et stimule la transcription à

partir de ce site, tandis qu'en présence de ER β , l'estradiol devient un antagoniste. Cette différence d'activité transcriptionnelle serait due au fait qu'une activation optimale du site AP-1 par les ERs requiert absolument les domaines AF-1 et AF-2. Ces domaines sont nécessaires à la stabilisation et à l'activation du complexe formé par les dimères Jun-Fos et leurs co-activateurs (SRC-1, GRIP1, etc.). Étant donné la faible activité du domaine AF-1 de ER β , ce dernier agit en inhibant la transcription aux sites AP-1 en présence d'estradiol (Hall, Couse et Korach, 2001). Cette action inhibitrice est dominante puisque dans des cellules MCF-7 exprimant ER α , la transfection de ER β cause une diminution de l'activité transcriptionnelle aux sites AP-1. Cette diminution est proportionnelle à la quantité de ER β transfectée dans les cellules (Maruyama *et al*, 2001).

ER β peut cependant favoriser l'activation de la transcription aux sites AP-1 s'il est en présence d'anti-estrogènes tel le tamoxifène (Paech *et al*, 1997, Maruyama *et al*, 2001). En effet, en présence de ER β -tam, l'activation de la transcription à partir de AP-1 devient indépendante de la présence des sites AF-1 et AF-2 (Webb *et al*, 1999).

L'activation de la transcription par les ERs aux sites AP-1 dépend donc non seulement de la concentration relative des deux types de récepteurs (ER α et ER β) dans la cellule, mais également du ligand présent. Parmi les gènes possédant un site AP-1 et dont la transcription peut être activée par l'estradiol, on retrouve certains gènes pro-inflammatoires comme les gènes de l'IL-1 β et de l'interleukine 6 (IL-6) (Wisdom, 1999) et le gène de la cycline D1 impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. La modulation de la transcription par ERs-Jun-Fos pourrait donc jouer un rôle important dans la pathogénèse de certains cancers du sein (Castro-Rivera, Samudio et Safe, 2001, Foster *et al*, 2001, Kovacs *et al*, 2001).

Une deuxième voie alternative d'initiation de transcription implique l'interaction des ERs avec le facteur de transcription nucléaire Sp1. Les ERs se lient directement au Sp1, permettant à ce dernier d'être recruté à un site spécifique (GC-rich promoter sequence) sur l'ADN. Lors de l'activation de la transcription par ERs-Sp1, l'estradiol agit en agoniste autant en présence de ER α qu'en présence de ER β . Cependant, l'activité

transcriptionnelle de l'estradiol avec ER β est beaucoup moindre que celle avec ER α , phénomène due, encore une fois, à la faible activité du domaine AF-1 de ER β (Saville *et al*, 2000, Safe, 2001).

Parmi les gènes régulés par E₂/Sp1, on retrouve *c-fos*, cathepsin D, le récepteur d'acide rétinoïde 1 α , l'adénosine déaminase, E₂F1, *bcl-2* et la protéine se liant au facteur de croissance «insuline-like» 4 (insuline-like growth factor-binding protein 4) (Porter *et al*, 1997, Duan, Poter et Safe, 1998, Sun, Porter et Safe, 1998, Wang *et al*, 1998, Xie, Duan et Safe, 1999, Qin, Singh et Safe, 1999, Wang *et al*, 1999, Dong *et al*, 1999). Ces gènes, comme la cycline D1, semblent jouer un rôle important dans le fonctionnement des cellules cancéreuses mammaires.

Récemment, Vyhldal *et al*. ont rapporté la présence de sites 'GC-rich' couplés à des moitiés de palindromes de sites EREs (ERE1/2) dans le promoteur du gène TGF α (transforming growth factor α). Ces sites ERE1/2 ont un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle des complexes ERs-Sp1 (Vyhldal *et al*, 2000, Safe, 2001). Cette découverte suggère que l'activité transcriptionnelle médiée par les ERs aux sites GC-rich pourrait être modulée par la présence ou l'absence de séquences ERE1/2 contiguës.

Les ERs peuvent également influencer la transcription à partir d'éléments de réponse de NF κ B (NF κ B RE). Ainsi, il est reconnu que ER α inhibe la transcription à partir de ces sites. Les mécanismes par lesquels cette inhibition est accomplie restent cependant matière à controverse. Par exemple, ER α inhibe la transcription du gène de l'IL-6. Galien et Garcia démontre que ER α peut interagir avec la sous unité *c-rel* du complexe NF κ B et empêcher ce complexe de se lier à son élément de réponse dans le promoteur de l'IL-6 (Galien et Garcia, 1997). Les résultats de Kurebayashi *et al*, pour leur part, semblent indiquer que ER α prévient la transcription de l'IL-6 sans empêcher NF κ B de se lier à NF κ B RE (Kurebayashi *et al*, 1997). Une meilleure connaissance des mécanismes par lesquels les ERs régulent l'activité de NF κ B pourrait permettre de mieux comprendre comment l'estradiol régule l'expression de gènes pro-inflammatoires comme TNF- α (tumor necrosis factor- α), RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted), interleukine-2 (IL-2) et IL-6 (Evans *et al*, 2001, McMurray *et al*, 2001, Galien

et Garcia, 1997). Comme des sites AP-1 sont également impliqués dans la transcription de certains gènes pro-inflammatoires, il est fort probable que les ERs puissent influencer la transcription de ces gènes à partir de plusieurs sites d'initiation différents.

D'autres éléments de réponse dont l'élément de réponse électrophilique/antioxydant (EpRE/ARE) (Montano *et al*, 1999, Montano et Katzenellenbogen, 1997) et un élément de réponse du gène *c-fos* (0.4-kb human *c-fos* gene promoter) (Ishibashi et Kawashima, 2001) peuvent également être activés par l'entremise des ERs. Les mécanismes sous-jacents restent cependant obscurs.

2.3.3 Voies d'initiation ligand indépendante

Il est de plus en plus clair que l'activation du récepteur estrogène peut se produire en absence de ligand. Cette activation est appelée «activation ligand indépendante» et semble étroitement reliée à l'activité kinase/phosphatase des cellules. En effet, lorsqu'un ER se lie à son ligand, des enzymes comme la tyrosine kinase E₂ dépendante phosphorylent le récepteur, ce qui permet son activation (Denton, Koszewski et Notides, 1992, Ali *et al*, 1993). Conséquemment, un signal intracellulaire capable d'induire la phosphorylation des ERs pourrait provoquer l'activation de ces récepteurs, et ce, même en l'absence de leur ligand.

Ainsi, la cascade intracellulaire Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase), initiée par le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), induit la phosphorylation de résidus sérines du domaine AF-1 de ER α et de ER β . Cette phosphorylation ne dépend pas de la présence de E₂ et cause l'activation des ERs (Kato *et al*, 1995, Bunone *et al*, 1996, Tremblay *et al*, 1997). Cette voie d'activation pourrait expliquer pourquoi les effets de EGF sur certains tissus (épithélium mammaire et utérus) imitent ceux de l'E₂ chez les souris ovariectomisées (Ignar-Trowbridge *et al*, 1992, Briand *et al*, 1999) et pourquoi ces effets sont abolis chez les souris ERKO (Curtis *et al*, 1996). D'autres facteurs de croissance peuvent également activer les ERs tels l'insuline et le facteur de croissance «insulin-like»-1 (IGF-1) (Newton *et al*, 1994).

Le domaine AF-1 n'est pas leur seul lieu de phosphorylation des ERs. L'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) active la protéine kinase A (PKA) qui induit l'activation de ER α . Bien qu'il ait été démontré que cette activation dépend de la présence de AF-2 (El-Tanani et Green, 1997), le site de phosphorylation à l'intérieur de ce domaine n'a pas encore été déterminé. Cependant, il est certain que PKA phosphoryle une sérine (Ser 236) dans le DBD de ER α , ce qui accroît la dimérisation des ERs (Pettersson et Gustafsson, 2001).

Les cyclines sont des protéines régulant la progression du cycle cellulaire. Certaines d'entre elles sont également impliquées dans une voie d'activation ligand indépendante des ERs. Le complexe cycline A-cdk2 (cyclin-dependent kinase 2) phosphoryle les résidues sérines 104 et 106 de ER α , augmentant l'activité transcriptionnelle du récepteur indépendamment de la présence de E₂. Cette augmentation a pour conséquence une augmentation de la prolifération cellulaire (Trowbridge, Rogatsky et Garabedian, 1997, Rogatsky, Trowbridge et Garabedian, 1999). La cycline D1 active également les ERs en l'absence de E₂. Toutefois, cette activation n'implique pas de phosphorylation et serait plutôt due au fait que la cycline D1 est capable de former un «pont» entre le ER et SRC-1 (Zwijssen *et al*, 1998). Ainsi, la cycline D1 (par la voie ligand indépendante) et les ERs (par l'intermédiaire de AP-1) s'activent réciproquement. Cette activation réciproque pourrait être impliquée dans la pathogénèse de certains cancers du sein.

Il existe d'autres molécules capables d'activer les ERs en absence de E₂. Parmi elles on retrouve la dopamine, l'héréguline, la toxine du choléra et le 3-isobutyle-1-méthylxanthine (IBMX) (Smith, Conneely et O'Malley, 1993, Kato *et al*, 1995, Ince, Montano et Katzenellenbogen, 1994). Cependant, leur capacité d'activation des ERs dépend grandement du promoteur ainsi que du type de cellules dans lequel ils sont étudiés.

2.4 Voies d'action non génomiques des ERs

La plupart des effets de l'estradiol sont médiés par la régulation de la transcription de gènes. Cependant, un nombre croissant d'études fait état d'effets estrogéniques trop rapides pour être expliqués par une voie d'action génomique des ERs. Ainsi, il est de plus en plus évident que les estrogènes peuvent agir par une voie dite non génomique.

Les effets non génomiques des estrogènes ont les caractéristiques suivantes : (1) ils sont trop rapides (de quelques secondes à quelques minutes) pour être compatibles avec une modification de la synthèse d'ARNm ou de protéines, (2) ils peuvent être observés même dans des cellules hautement spécialisées (ex. spermatozoïdes) qui ne font pas de synthèse *de novo* d'ARNm ou de protéines, (3) ils peuvent être induits par des estrogènes couplés à des protéines de masse moléculaire trop grande pour traverser les membranes cellulaires et se rendre au noyau (ex. E₂-bovine serum albumin (E₂-BSA)), (4) ils ne sont pas bloqués par des inhibiteurs de synthèse d'ARNm ou de protéines, (5) ils sont très spécifiques aux estrogènes (Revelli, Massobrio et Tesarik, 1998).

La majorité des effets non génomiques des estrogènes sont compatibles avec l'hypothèse d'un récepteur estrogène membranaire (ERm), c'est-à-dire exprimé à la surface des cellules. Bien que ces récepteurs n'aient pas encore été clonés, les preuves de leur présence ne cessent de s'accumuler.

Pietras et Szego sont les premiers à avoir décrit une protéine de surface capable de lier spécifiquement l'E₂ et de provoquer une augmentation rapide de la concentration cellulaire d'AMPc (Pietras et Szego, 1977, 1980). Subséquemment, plusieurs études démontrèrent que l'E₂ pouvait activer des cascades signalétiques intracellulaires pouvant mener entre autres à l'augmentation de la concentration cellulaire d'ions Ca²⁺ (Tesarik et Mendoza, 1995), à l'activation de la synthase d'oxyde d'azote (eNOS, cNOS) (Chen *et al*, 1999, Stefano *et al*, 1999), à l'activation de la phospholipase C (Le Mellay, Grosse et Lieberherr, 1997) et à la génération d'inositol triphosphate (IP₃) (Lieberherr *et al*, 1993).

Les voies signalétiques menant à ces effets non génomiques des estrogènes ne sont pas encore claires. Cependant, des études faites avec la lignée cellulaire MCF-7 montrent que l'E₂ est capable de stimuler l'activation de la voie signalétique des kinases MAP (mitogen-activated protein), en passant plus particulièrement par l'activation de ERK (extracellular-régulated kinase) (Figure 5). Cette activation est rapide (cinq minutes) et résulte de l'activation de kinases proximales telles Ras, raf, et MEK (mitogen-activated protein kinase kinase) (Migliaccio *et al*, 1996, Levin, 2001). Activé par cette cascade, ERK contribue à la prolifération (Castoria *et al*, 1999) et à la survie (Razandi, Pedram et Levin, 2000a) des cellules MCF-7. Cette voie de signalisation intracellulaire a également été observée chez les ostéoblastes et les cellules HeLa (Kousteni *et al*, 2001). Dans les cellules du cancer du sein, il a été démontré que l'E₂ peut également bloquer l'activation de JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), empêchant l'activation subséquente de la cascade des caspases et de l'apoptose (Razandi, Pedram et Levin, 2000b).

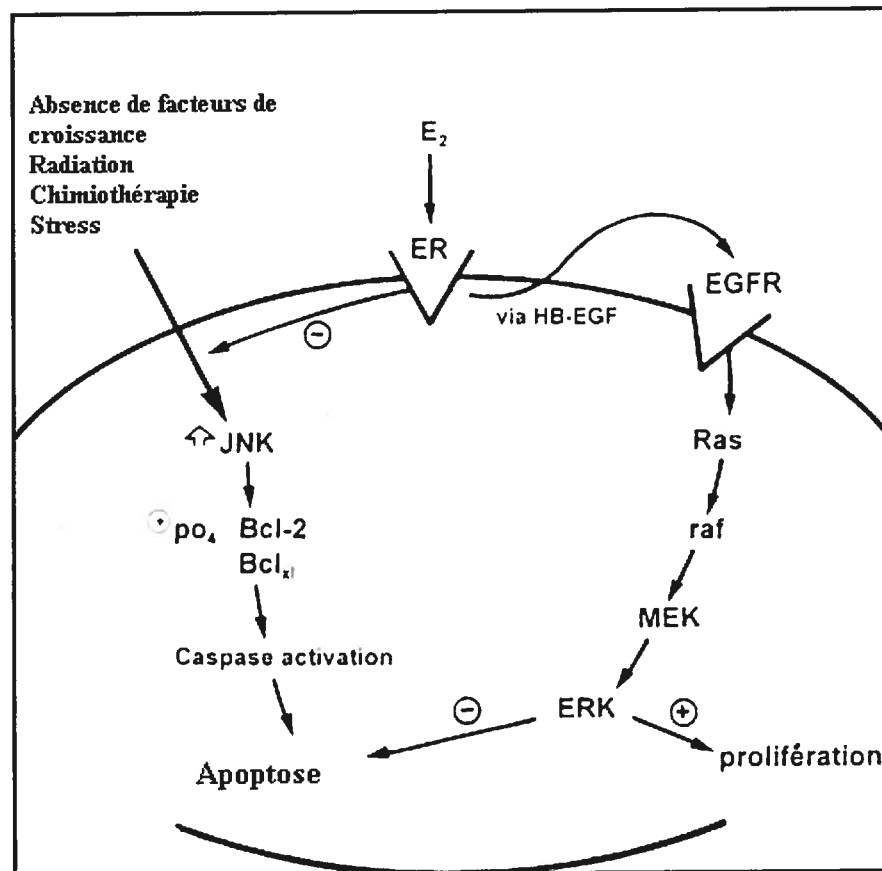


Figure 5. Activation de la voie signalétique de ERK et blocage de la voie JNK par E₂-ER (Levin, 2001).

D'autres voies signalétiques passant par un ERm ont également été rapportées, notamment dans les cellules épithéliales (ECs). E₂ stimule l'activation de la phosphoinositol-3-hydroxide kinase, ce qui mène à l'activation de l'Akt kinase et à la génération d'oxyde nitrique (Simoncini *et al*, 2000). Dans ces mêmes cellules, E₂ active l'isoforme p38 β de la famille des MAP kinases, menant à la phosphorylation de HSP27 (heat shock protein 27) (Razandi *et al*, 2000a). Ces deux voies signalétiques protègent les ECs de la mort cellulaire.

La plupart des effets non génomiques de l'E₂ cités plus haut sont inhibés par l'ajout d'antagonistes de ER tel ICI-182,780, suggérant fortement que le ERm et les ERs nucléaires soient en fait deux produits dérivés des mêmes gènes. Cette hypothèse est soutenue par le fait que plusieurs anticorps spécifiques à ER α reconnaissent également une protéine membranaire présente dans de nombreuses lignées cellulaires (Pappas, Gametchu et Watson, 1995) et que la transfection de cellules CHO avec un seul cADN de ER résulte en l'apparition, dans ces cellules, de ERs nucléaires et de ERms (Razandi *et al*, 1999). Bien que ces ERms soient encore très peu caractérisés, ils semblent jouer un rôle important dans les mécanismes d'action des estrogènes et agissent peut-être de façon synergique avec leurs cousins nucléaires.

Certaines études font état d'actions non génomiques des estrogènes qui ne sont pas inhibées par des antagonistes de ERs. Par exemple, l'augmentation rapide (moins de cinq secondes) de l'influx d'ion Ca²⁺ dans les cellules granuleuses de porc causée par E₂ n'est pas affectée par l'ajout de l'antagoniste tamoxifène (Morley *et al*, 1992) et l'activation de cNOS par E₂ dans les monocytes humains n'est pas bloquée par ICI-182,780 (Stefano *et al*, 1999). Dans les cellules pancréatiques bêta, E₂ module la sécrétion de l'insuline en se liant à un récepteur membranaire ayant le profil pharmacologique des récepteurs γ -adrénergiques (Nadal *et al*, 1998, Nadal *et al*, 2000). Ces études suggèrent qu'il existe une voie d'action des estrogènes passant par un récepteur autre que les ERms dérivés des ERs nucléaires.

Plus récemment, il a été démontré que les ERs nucléaires peuvent être eux aussi impliqués dans une voie de signalisation non-génomique en interagissant directement avec d'autres molécules ou complexes moléculaires. Ainsi, Simoncini *et al.* décrivent un mécanisme d'action non transcriptionnel des ERs dans lequel ces récepteurs interagissent physiquement et fonctionnellement avec la kinase PI3K. Cette interaction déclenche l'activation de la cascade de signalisation PI3K. De cette activation découle plusieurs effets intracellulaires rapides, dont la polyphosphorylation et la subséquente activation de la synthèse d'oxyde nitrique eNOS (Simoncini *et al.*, 2002).

Il est clair qu'une meilleure compréhension des interactions entre les diverses voies d'action des estrogènes (génomiques et non génomiques) est d'une importance capitale pour le développement de nouveaux SERMs plus sélectifs, capables de traiter plus efficacement des maladies comme le cancer du sein, l'ostéoporose et les maladies autoimmunes.

2.5 Distribution des ERs dans l'organisme

Comme il a été mentionné précédemment, les estrogènes ont des effets sur une grande variété de tissus, effets qui sont majoritairement médiés par les ERs. Il n'est donc pas surprenant de voir que les ERs sont exprimés un peu partout dans l'organisme. Cependant, la distribution des deux types de ERs (ER α et ER β) dans les tissus n'est pas la même, suggérant qu'ils puissent avoir des rôles différents.

Chez l'humain, ER α et ER β sont co-exprimés dans la glande mammaire, (Masood, 1992, Roger *et al.*, 2001), dans l'utérus et les ovaires (Moore *et al.*, 1998, Lu *et al.*, 1999), dans l'endothélium vasculaire, les cellules musculaires et les cellules du myocarde (Karas, Patterson et Mendelsohn, 1994, Register et Adams, 1998, Grohé *et al.*, 1997), dans le système digestif (petit intestin, colon et estomac), et dans le thymus (Brandenberger *et al.*, 1997, Olsen et Kovaks, 1996, Staples *et al.*, 1999, Igarashi *et al.*, 2001). ER α est également exprimé dans les ostéoblastes et les ostéoclastes (Komm *et al.*, 1988, Oursler *et al.*, 1994, Hofbauer *et al.*, 1999), dans les cellules stromales de la prostate (Mäkelä *et al.*,

2000), et en petite quantité dans les testicules, les reins et la rate (Brandenberger *et al*, 1997). Pour sa part, ER β est exprimé dans les poumons, les reins, la rate, les testicules, la prostate et les cellules adipeuses (Brandenberger *et al*, 1997, Moore *et al*, 1998). Même si les effets des estrogènes sur le cerveau humain sont connus, on sait encore peu de chose sur l'expression des ERs dans cet organe. Chez le rat, ER α est plus abondant dans les noyaux périventriculaire et ventromédiale de l'hypothalamus, tandis que ER β prédomine dans les noyaux paraventriculaire et supraoptique (Laflamme *et al*, 1998). ER α et ER β sont cependant co-localisés dans le noyau hypothalamique préoptique ainsi que dans l'hypophyse (Laflamme *et al*, 1998, Mitchner, Garlick et Ben-Jonathan, 1998).

Il est intéressant de souligner que la distribution des ERs dans l'organisme diffère quelque peu entre l'humain et les rongeurs. À l'instar du premier, le rat exprime ER α dans l'utérus, les testicules, les ovaires, et les reins. ER β est surtout exprimé dans les poumons, la prostate, et les ovaires (Kuiper *et al*, 1996). Cependant, dans la prostate, ER β est exprimé à des niveaux beaucoup plus élevés chez le rat que chez l'humain. Les testicules, pour leur part, montrent des niveaux d'expression de ER β plus élevés chez l'humain que chez le rat (Enmark *et al*, 1997). Ces données font toutefois référence aux niveaux d'ARN messager trouvés les organes et ne reflètent pas automatiquement les niveaux de protéines exprimés. Chez la souris, les testicules ne semblent pas exprimer ER β du tout (Couse *et al*, 1997). Dans les ovaires, les cellules stromales du cortex expriment ER β chez l'humain et non chez le rat (Kuiper *et al*, 1998). Le système digestif est un autre endroit où ER β est exprimé en plus grande quantité chez l'humain que chez les rongeurs (Enmark et Gustafsson, 1997). On retrouve également des différences d'expression des ERs dans les organes immunitaires, notamment dans le thymus où ER β se retrouve en grande quantité chez l'humain et où les niveaux d'expression de ce récepteur sont relativement faibles chez le rat (Enmark et Gustafsson, 1997). Notre laboratoire a récemment démontré par amplification d'ARN (RT-PCR) la présence ER β dans le thymus de souris (Appendice A, données non publiées). Ces résultats sont en contradiction avec deux précédentes études montrant, par buvardage Northern et par protection d'ARN (RNAse protection assay), l'absence d'expression de ER β dans le thymus de souris (Tremblay *et al*, 1997, Couse *et al*, 1997). Les différences entre nos

résultats et ceux des précédentes études sont probablement dues aux différentes méthodes de détection utilisées, le RT-PCR étant plus sensibles. Il est de plus en plus évident que des différences interespèces importantes existent quant à la distribution des ERs dans les tissus. Ces différences invitent à la prudence lors d'extrapolations chez l'humain de résultats obtenus lors d'études utilisant des modèles animaux.

2.6 Les modèles murins α ERKO, β ERKO et $\alpha\beta$ ERKO

Chez l'humain, on commence à peine à élucider le rôle de chacun des ERs dans les différents tissus. Cependant, plusieurs modèles murins n'exprimant pas un ou les deux ERs sont maintenant disponibles pour faciliter l'étude des différents rôles des ERs.

Les souris α ERKO et β ERKO se développent normalement et ont approximativement la même durée de vie que les souris WT (wild-type) (Couse et Korach, 1999). Cependant, lorsque ces souris atteignent la maturité sexuelle, elles montrent des signes de déficience, surtout au niveau du développement des organes reproducteurs et de la fertilité. Une liste des caractéristiques des souris α ERKO et β ERKO est présentée dans le tableau 1. Les différences dans le phénotype de ces souris démontrent que ER α et ER β n'agissent pas seulement de façon complémentaire, mais ont également leurs fonctions propres.

On connaît encore très peu de chose au sujet des souris $\alpha\beta$ ERKO. Les premières études semblent indiquer que ces souris possèdent un phénotype proche de celui des souris α ERKO, mais avec des déficiences un peu plus marquées au niveau du développement des organes sexuels (Couse *et al*, 1999, Ogawa *et al*, 2000).

Tableau 1. Résumé des différents phénotypes rapportés des souris α ERKO et β ERKO

<u>Modèle murin</u>	<u>Description du phénotype</u>
Létalité de la mutation :	
ER α , ER β	Non

Fertilité :

- α ERKO Les deux sexes sont infertiles
- β ERKO Les femelles sont moins fertiles (portée moins grande); les mâles sont fertiles
- Générale : α ERKO expriment normalement ER β

Système reproducteur des femelles :

- α ERKO Se développe normalement jusqu'à la maturité sexuelle, mais est insensible à l'estradiol, au DES et à l'hydroxytamoxifène pendant l'âge adulte.
Perte de l'action mitogénique de EGF.
Sensible à l'action mitogénique des androgènes.
Les ovaires se développent normalement jusqu'à la maturité. Cependant, à l'âge adulte ils ne produisent pas d'ovaires, contiennent des cystes hémorragiques et ne possèdent pas de *corpora lutea*.
30-40 % d'incidence de tumeurs aux ovaires à l'âge de 18 mois.
- β ERKO Le système reproducteur se développe normalement jusqu'à la maturité sexuelle et est sensible aux estrogènes ovariens durant l'âge adulte.
Les ovaires se développent normalement jusqu'à l'âge adulte mais n'ont pas une fréquence d'ovulation normale, ont une sensibilité moindre aux traitements de superovulation, présentent de multiples follicules préovulatoires ne mûrissant pas et une production réduite d'oocytes.

Glandes mammaires :

- α ERKO Se développent normalement jusqu'à la maturité sexuelle, mais sont insensibles au développement induit par l'estradiol à l'âge adulte.
Répondent à la progestérone et à la prolactine.
- β ERKO Se développent normalement jusqu'à la maturité sexuelle. Les glandes vierges ressemblent grossièrement à celles des souris WT du même âge.
Se différencient normalement à l'âge adulte et permettent la lactation durant et après la gestation.

Système reproducteur des mâles :

- α ERKO Se développe normalement jusqu'à la maturité sexuelle.
Phénotype à la maturité sexuelle : réabsorption atténuée de fluides menant à la dilatation du *Rete testis*, à l'atrophie de l'épithélium du tubule séminifère et à une baisse du nombre de spermatozoïdes viables.
Perte de fonction chez les spermatozoïdes illustrée par une incapacité de fertiliser.
Augmentation avec l'âge du poids des vésicules séminales.

	Diminution avec l'âge du poids des testicules.
β ERKO	Se développe normalement avec aucun signe de défectuosité dans la synthèse des spermatozoïdes et dans la fertilité.
Système neuroendocrinien des femelles :	
α ERKO	La partie antérieure de l'hypophyse possède tous les types cellulaires retrouvés normalement dans la glande, mais produit un nombre plus élevé de sous-unités de gonadotropine (α -gonadotropine, LH- β , FSH- β). Niveaux plus élevés dans le sérum d'estradiol, de testostérone et de LH, mais niveaux normaux de progestérone et de FSH. Réduction significative de la transcription du gène PRL dans l'hypophyse antérieure ainsi que réduction de la concentration de PRL dans le sérum. La région préoptique médiale de l'hypothalamus montre un plus grand niveau de transcription du gène PR. L'action rapide de l'estradiol sur les neurones de l'hippocampe est conservée.
β ERKO	Niveau normal d'estradiol dans le sérum.
Système neuroendocrinien des mâles :	
α ERKO	Réduction significative de la transcription du gène LH- β dans l'hypophyse antérieure. Niveaux élevés d'estradiol, de testostérone et de LH dans le sérum, mais niveaux normaux de progestérone et de FSH.
Comportement des femelles :	
α ERKO	N'ont pas les comportements sexuelles normaux induits par l'estradiol et la progestérone, ont un comportement plus agressif à l'égard des mâles et des petits.
β ERKO	N'ont aucuns problèmes comportementaux pouvant nuire à la fertilité.
Comportement des mâles :	
α ERKO	Sont attirés par les femelles et les montent normalement mais sans pénétration ou éjaculation. Ont un comportement moins agressif que leurs homologues WT.
β ERKO	N'ont aucuns problèmes comportementaux pouvant nuire à la fertilité.
Système cardiovasculaire :	
α ERKO	L'angiogénèse médiée par l'estradiol ainsi que le niveau basal d'oxyde nitrique produit par les cellules vasculaires sont réduits. Montre une réponse normale à l'estradiol lors d'études avec le modèle de la blessure de la carotide.

Montre une augmentation de l'expression des canaux Ca^{2+} de type L.

Montre une production réduite d'apolipoprotéine E dans le sérum en réponse à l'estradiol.

Autres :

α ERKO

Les mâles et les femelles montrent un arrêt de la croissance des os longitudinaux.

Ont une tolérance réduite au glucose.

Ne montrent pas de défectuosité dans la synthèse des lymphocytes B.

Source : Couse et Korach, 1999

3. LES ESTROGÈNES ET LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

3.1 La réponse immunitaire dépendante du sexe

Il est reconnu depuis longtemps que la manière dont le système immunitaire se développe et répond aux infections et autres stimuli diffère selon le sexe. En général, les femmes ont tendance à développer une réponse humorale plus forte et plus soutenue que les hommes, à produire plus d'immunoglobulines M (IgM) (Butterworth, McMlellan et Allansmith, 1967, Eidinger et Garrett, 1972), à posséder un plus grand ratio de lymphocytes CD4/CD8 dû à un moins grand nombre de cellules CD8 en circulation (Nagel, Chrest et Adler, 1981, Mylvaganam *et al*, 1985, Bizzarro *et al*, 1987, Amadori *et al*, 1995) et à rejeter les allogreffes plus rapidement (Graff, Lappe et Snell, 1969). Elles sont également plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes tels le lupus systémique érythémateux (LSE) et l'arthrite rhumatoïde (AR) (Olsen et Kovacs, 1996). Cette dichotomie immunitaire entre les sexes peut avoir plusieurs explications, dont l'influence des chromosomes sexuels et l'influence des hormones sexuelles et/ou du système neuroendocrinien (Grossman, Roselle et Mendenhall, 1991).

Bien que le niveau basal d'estrogènes ne diffère pas tellement entre les hommes et les femmes, ces dernières sont exposées dès la maturité à de plus fortes concentrations d'estrogènes, que ce soit de façon cyclique (pendant l'ovulation) ou chronique (pendant la grossesse). Les estrogènes ont donc le potentiel d'être responsables de façon directe (par l'entremise de récepteurs estrogènes dans les organes et cellules du système immunitaire)

et/ou indirecte (par l'entremise d'autres voies signalétiques) des différences entre les réponses immunitaires des hommes et des femmes.

3.1.1. Les maladies auto-immunes

Depuis plus de 100 ans, la gente clinicienne soupçonne les estrogènes de pouvoir moduler la réponse immunitaire. C'est l'étude des maladies auto-immunes qui, en premier, met la puce à l'oreille aux cliniciens. Les maladies auto-immunes sont des maladies causées par une attaque incontrôlée du système immunitaire contre des tissus sains du soi. L'attaque cause une inflammation chronique et une destruction, souvent totale, des tissus visés. Elle peut être systémique, c'est-à-dire que plusieurs tissus ou organes sont attaqués en même temps (ex. SLE), locale (un seul organe est atteint, ex. diabète juvénile) ou un mélange des deux. Les causes des différentes maladies auto-immunes sont encore très mal connues. Ce qui est connu par contre, c'est la prépondérance du nombre de femmes atteintes de ces maladies comparativement au nombre d'hommes. Le tableau 2 montre les différents ratios femme/homme des maladies auto-immunes les plus répandues.

Tableau 2. Ratio femmes vs homme atteints de maladies auto-immunes

Thyroïdite d'Hashimoto	50:1
Lupus Systémique Érythémateux	9:1
Maladie de Sjogren	9:1
Maladie de Graves	7:1
Arthrite Rheumatoïde	4:1
Sclérodermie	2:1
Diabète de Type I	2:1
Sclérose en plaques	2:1

Source: American Autoimmune Related Diseases Association Inc. (1995)

L'idée que les estrogènes puissent jouer un rôle dans le développement, la progression et/ou la gravité de ces maladies vient en grande partie des trois observations suivantes : (1) le ratio femme/homme est généralement plus élevé chez les patients pubères et que chez les patients prépubères ou âgés de 55 ans et plus (ménopause chez la femme) (Lahita, 1996), (2) les symptômes de certaines maladies auto-immunes peuvent fluctuer

en fonction du cycle menstruel (Arnason et Richman, 1969, Latman, 1983) et (3) la gravité des symptômes peut également être modulée lors de la grossesse et/ou la période *postpartum* (Østensen, 1999). Ces observations semblent en effet corrélées avec une variation des niveaux d'estrogènes chez la femme. L'étude des maladies auto-immunes chez l'humain est multiparamétrique et les cliniciens devront attendre les résultats d'études de modèles murins de ces maladies pour confirmer le rôle des estrogènes dans leur modulation.

3.1.2. Effets des estrogènes sur les modèles murins de maladies auto-immunes

Un des modèles murins les plus étudiés est l'hybride NZB/NZW F1, un croisement entre les souris NZB et les souris NZW. Ces souris hybrides développent une maladie similaire au SLE humain (Howie et Helyer, 1965, 1968). Chez l'humain, le SLE est caractérisé par une production anormale de cytokines par les lymphocytes T, une suractivation des lymphocytes B et la formation d'auto-anticorps et de complexes immunitaires se déposant dans les petits capillaires. Ces dépôts causent notamment de l'arthrite, des éruptions cutanées (ailes de papillon), des atteintes glomérulaires et néphrotiques et de la pleurésie (Elbourne, Keisler et McMurray, 1998).

Les femelles NZB/NZW développent la maladie à un plus jeune âge, produisent plus d'auto-anticorps et ont une espérance de vie plus courte que les mâles de la même espèce. Le traitement de souris NZB/NZW ovariectomisées avec différentes doses physiologiques d'estradiol, provoque une augmentation de la concentration de prolactine dans le sérum et l'accélération de la maladie auto-immune (Elbourne Keisler et McMurray, 1998). La castration des mâles peu après la naissance entraîne également une accélération de la maladie, montrant que si l'estradiol a le potentiel d'exacerber la réponse auto-immune chez les femelles NZB/NZW, les hormones mâles, notamment les androgènes, ont plutôt un effet suppresseur (Roubinian, Papoian et Talal, 1977, Roubinian *et al.*, 1978).

Chez d'autres modèles murins de SLE, telles les souris MRL *lpr/lpr* et SWRxSJL F1, les femelles développent également la maladie plus vite que leurs congénères mâles. À sept

mois, la plupart des femelles MRL *lpr/lpr* sont déjà mortes, alors que 20 à 30 pourcent des mâles sont encore en vie. Chez les souris SWRxSJL F1, les femelles développent la maladie sept fois plus vite que les mâles (Steinberg *et al*, 1980, Vidal, Gelpi et Rodriguez-Sanchez, 1994). Cette dichotomie tend à disparaître une fois les femelles ovariectomisées. Il est donc probable que pour ces modèles, l'estradiol stimule la réponse immunitaire humorale et par le fait même accélère la progression de la maladie.

Il faut cependant noter que les effets modulateurs de l'estradiol ne sont pas observés chez tous les modèles murins de SLE. Par exemple, chez les souris BXSB, ce sont les mâles qui développent la forme la plus sévère de la maladie et la castration, autant chez les mâles que les femelles, n'affecte pas la progression du lupus (Eisenberg et Dixon, 1980).

Si l'estradiol semble avoir un effet néfaste sur la progression des maladies auto-immunes médiées par une réponse humorale, il en va autrement pour les maladies auto-immunes médiées par une réponse cellulaire. Parmi ces maladies on retrouve l'arthrite rhumatoïde (AR) et la sclérose en plaque (Multiple Sclerosis, (MS)). Ces maladies sont caractérisées par le développement continu ou sporadique de lésions dues à l'infiltration dans les tissus (joints pour AR, cerveau pour MS) de lymphocytes T auto-réactifs, de lymphocytes B et de macrophages. Bien que ces maladies soient associées à certains allèles du gène HLA, leur cause demeure encore incertaine (Jansson et Holmdahl, 1998).

Le modèle d'arthrite induite par le collagène de type II (CIA) est une maladie auto-immune non spontanée provoquée chez les souris et les rats par injection de collagène de cartilage. Cette injection cause le développement d'une polyarthrite ressemblant à AR. Après injection, les femelles sont plus susceptibles de développer le CIA que les mâles (Larsson et Holmdahl, 1987). Cependant, lorsque des femelles ovariectomisées atteintes de CIA sont traitées avec des doses physiologiques d'estradiol, l'inflammation arthritique est supprimée (Holmdahl *et al*, 1987). Ces résultats sont en accord avec de nombreuses études démontrant qu'une majorité de femmes (54-83 %) atteintes de AR voient leur condition s'améliorer lors de la grossesse (au moment où le niveau d'estradiol dans le sang est le plus élevé) (Neely et Persellin, 1977, Østensen et Husby, 1983, Nelson *et al*,

1993) et voient (dans 98 % des cas) leurs symptômes revenir quatre mois après l'accouchement (quand le niveau d'estradiol est redevenu normal) (Neely et Persellin, 1977, Østensen *et al*, 1983).

La grossesse améliore également les symptômes de MS et protège les souris contre l'encéphalomyélite autoimmune (EAE), un modèle murin de MS (Bernardi *et al*, 1991, Hutchinson, 1993, Abramsky *et al*, 1984, Brenner, Evron et Abramsky, 1991). Le EAE est une maladie induite chez les rongeurs par l'injection de protéines de myéline et d'adjuvants. Le traitement de souris atteintes de EAE avec des doses d'estradiol semblables à celles observées durant la gestation ralentit la progression de la maladie (Jansson, Olsson et Holmdahl, 1994).

3.2 Effets des estrogènes sur les cellules immunitaires spécifiques

L'étude des modèles murins de maladies auto-immunes ainsi que les observations faites chez l'humain montrent clairement que les estrogènes peuvent moduler la réponse immunitaire. Cependant, la manière dont les estrogènes influencent cette réponse au niveau cellulaire et le rôle des récepteurs ER α et ER β ne sont pas encore clairement déterminés.

3.2.1. Le thymus et le développement des lymphocytes T

Le thymus est un organe majeur du système immunitaire. Il est situé juste au-dessus du cœur et est le lieu de maturation des lymphocytes T. Le thymus est divisé en plusieurs lobules comprenant chacun une portion périphérique, le cortex, et une portion centrale plus pâle, la médulla. Les cellules lymphoïdes T immatures quittent la moelle osseuse pour venir s'entasser dans la partie corticale du thymus, où elles entrent dans une phase d'intense prolifération avant de continuer leur migration vers la jonction cortico-médullaire. C'est à cette jonction que se font les sélections positive (reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi) et négative (élimination des lymphocytes autoréactifs). Ces sélections sont médiées entre autres par les cellules

épithéliales, dendritiques et par les macrophages présents dans le thymus (Anderson *et al*, 1996). Seulement 2 % des lymphocytes T immatures seront sélectionnés. Une fois matures, les lymphocytes T quittent le thymus pour aller circuler dans le sang et la lymphe (Janeway et Traverse, 1997).

Dépendamment de leur stade de maturation, les lymphocytes T expriment différentes molécules de surface. À leur arrivée dans le cortex, les lymphocytes immatures n'expriment ni le CD8, ni le CD4. Ces cellules sont appelées doubles négatives (DN) (Olsen et Kovacs, 1996). À la barrière cortico-médullaire, les lymphocytes se mettent à exprimer ces marqueurs de surface et deviennent des cellules $CD4^+CD8^+pT\alpha:\beta CD3^+$ ou doubles positives (DP). Après sélection, les lymphocytes T deviennent soit $TCR/CD3^+CD4^+$ (Helper T cells, Th cells) ou $TCR/CD3^+CD8^+$ (cellules CD8 cytotoxiques).

Le thymus est grandement affecté par les estrogènes. Autant chez l'humain que chez la souris, cet organe s'atrophie durant la grossesse ou après administration de doses pharmacologiques d'estrogènes (Fosberg, 1984, Hirahara *et al*, 1994, Rijhsinghani *et al*, 1996, Endo et Kanayama, 1998). Aussi, chez le rat, l'augmentation du poids du thymus suite à une ovariectomie est inhibée par une administration d'estrogènes (Windmill, Meade et Lee, 1993). Plusieurs études commencent à faire la lumière sur les mécanismes reliés à cette diminution de la masse et de la cellularité du thymus suite à une exposition aux estrogènes.

Les estrogènes provoquent l'arrêt de la maturation des lymphocytes au stade de cellules DN, causant ainsi la perte presque totale des cellules DP ($CD4^+CD8^+$) dans le thymus de souris Balb/c. Paradoxalement, les estrogènes causent une augmentation significative de la proportion de lymphocytes matures $CD3^+CD4^+$. Une légère augmentation de la population de lymphocytes $CD3^+CD8^+$ est également observée. (Screpanti *et al*, 1989, Brunelli *et al*, 1992, Rijhsinghani *et al*, 1996).

La diminution drastique de la population de cellules DP suite à une exposition aux estrogènes pourrait être médiée par l'apoptose de ces cellules. Les cellules DP sont en effet très sensibles à l'apoptose. Les thymocytes prélevés chez des souris traitées avec des estrogènes ont des niveaux d'apoptose plus élevés en culture que ceux de souris non traitées (Okasha *et al*, 2001). L'augmentation de la sensibilité à l'apoptose causée par une exposition aux estrogènes est spécifique à la population DP. Cette spécificité pourrait être expliquée par la distribution des récepteurs estrogènes dans le thymus. ER α et ER β sont tous deux présents dans les thymocytes (Carbone *et al*, 1986, Danel *et al*, 1983, Kawashima *et al*, 1992, Appendice A, données non publiées). Cependant, l'expression des ERs est surtout localisée dans la population DP (Mor *et al*, 2001), alors que les populations CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺CD8⁺ expriment moins ces récepteurs (Kawashima *et al*, 1992). Une plus forte expression des ERs chez les cellules DP pourrait faire en sorte que ces cellules soient plus sensibles aux effets des estrogènes que les autres populations de thymocytes. Théoriquement donc, les estrogènes pourraient agir directement et de façon spécifique sur les cellules DP pour augmenter leur susceptibilité à l'apoptose.

Toutefois, certaines études suggèrent que l'apoptose des thymocytes dans le thymus est due non pas à un effet direct des estrogènes sur les thymocytes, mais par l'entremise d'effets induits par ces hormones sur les cellules épithéliales du thymus. Ces cellules possèdent en effet des niveaux d'expression de ERs beaucoup plus élevés que les thymocytes (Seiki et Sakabe, 1997, Kawashima, *et al*, 1992, Mor *et al*, 2001). En effet, de récentes études démontrent que les estrogènes augmentent l'expression de FasL dans les cellules épithéliales du thymus (Zhou *et al*, 1997, Mor *et al*, 2001). La voie de signalisation Fas/FasL est une voie capable d'induire l'apoptose chez les cellules exprimant Fas. Les thymocytes expriment fortement Fas (Mor *et al*, 2001). Une augmentation de l'expression de FasL chez les cellules épithéliales du thymus médiée par les estrogènes pourrait donc induire une augmentation des niveaux d'apoptose chez les thymocytes. (Zhou *et al*, 1997, Mor *et al*, 2001).

Les mécanismes par lesquels les ERs induisent l'expression de FasL dans le thymus et influencent la sensibilité à l'apoptose des cellules DP restent encore inconnus. Il est

intéressant de noter que l'expression de ER α dans les cellules stromales est essentielle au développement normal du thymus chez la souris. ER α est également nécessaire à la réponse maximale d'atrophie causée par les estrogènes (Staples *et al*, 1999). Ainsi, quoique moins marquée que dans les souris WT, une atrophie du thymus après traitement à l'estradiol est également observée chez les souris ERKO. Cette observation démontre que ER α n'est pas la seule voie par laquelle les estrogènes peuvent induire l'atrophie thymique et que ER β pourrait également être un candidat. Il est clair que les estrogènes peuvent causer l'atrophie du thymus ainsi que la perte de la population de cellules DP. Il reste cependant à déterminer comment ces phénomènes affectent la réponse immunitaire. L'atrophie du thymus pourrait avoir un lien avec les changements dans le système immunitaire observés lors de la grossesse.

À part le thymus, d'autres organes, comme le foie et les intestins, peuvent également permettre le développement de lymphocytes T (Abo, 1992, Sato *et al*, 1993). Toutefois, la sélection négative dans ces organes serait moins rigoureuse, permettant ainsi la survie d'une plus grande proportion de lymphocytes T potentiellement auto-réactifs (Abo *et al*, 1991, Okuyama *et al*, 1992). Les estrogènes semblent également avoir un effet sur la maturation extrathymique des lymphocytes T puisqu'il a été démontré chez la souris que l'ovariectomie inactive cette voie de développement dans le foie, tandis que l'administration d'estrogènes a la capacité de la réactiver (Yahata *et al*, 1996). Collectivement, ces observations pourraient expliquer pourquoi les femmes ont plus tendance que les hommes à développer des maladies auto-immunes.

3.2.2. Les lymphocytes T périphériques

Les effets des estrogènes sur l'activité des différentes populations de lymphocytes T en périphérie sont complexes et encore très mal compris. En général, les estrogènes ont tendance à tempérer l'immunité cellulaire, soit de manière directe, soit en stimulant la production d'autres hormones ou cytokines. L'hypersensitivité de type retardée (type IV) (DTH) est une réponse médiée par des lymphocytes T spécifiques mémoires (c'est-à-dire qui ont déjà rencontré le même antigène dans une réponse antérieure). Cette réponse se

développe quelques heures ou quelques jours après l'immunisation. De nombreuses études ont démontré que les estrogènes ont un effet suppresseur sur la réponse DTH, autant chez la souris que chez l'humain (Luster *et al*, 1980, Holmdahl et Jansson, 1988, Kato *et al*, 1988, Carlsten *et al*, 1989, Carlsten, Holmdahl et Tarkowski, 1991, Carlsten, Verdrengh et Taube, 1996). Chez les souris femelles ayant subi une brûlure sévère (15 % de la surface du corps), la réponse DTH est abolie 10 jours suivant la brûlure. Chez les mâles, la réponse DTH n'est pas abolie au jour 10, mais plutôt au jour 1 après la brûlure (Gregory *et al*, 2000a, 2000b). De plus, chez les femelles, la réponse DTH est rétablie par l'ovariectomie et de nouveau supprimée lors d'administration d'estradiol (Gregory *et al*, 2000a). L'estradiol serait donc responsable de la suppression à long terme de la réponse DTH chez les souris femelles ayant subi une brûlure sévère. Paradoxalement, l'administration d'estradiol chez des souris mâles restaure la réponse DTH chez ces souris 48 heures après la brûlure. (Messingham, Heinrich et Kovacs, 2001).

Cette dichotomie entre mâles et femelles ayant subi une brûlure sévère n'est pas encore bien expliquée, mais elle aurait un lien avec les niveaux d'interleukine-6 (IL-6). Chez les souris mâles et femelles ayant subi une brûlure sévère, l'abolition de la réponse DTH est associée à une augmentation de la production d'IL-6 par les macrophages (Gregory *et al*, 2000a, 2000b). En effet, l'administration d'anticorps anti-IL-6 chez ces souris restaure partiellement la réponse DTH (Gregory *et al*, 2000b). Chez les souris femelles sévèrement brûlées, l'estradiol provoque une augmentation de la production d'IL-6 par les macrophages et une suppression de la réponse DTH au jour 10 après la brûlure. Chez les mâles, on observe le phénomène contraire au jour 1 après la brûlure, c'est-à-dire que l'administration d'estradiol entraîne une diminution de la production d'IL-6 par les macrophages et une restauration de la réponse DTH (Messingham, Heinrich et Kovacs, 2001). L'IL-6 est une cytokine qui active l'HAP et qui, par le fait même, cause une augmentation de la production de glucocorticoïdes dans l'organisme et une diminution de la réponse immunitaire cellulaire (Bethin, Vogt et Muglia, 2000). La régulation de l'immunité cellulaire par les estrogènes semble donc se faire par des mécanismes complexes impliquant plus que des effets directs sur les lymphocytes T. Si, en général,

les estrogènes tempèrent la réponse immunitaire cellulaire, cette règle n'est pas absolue et peut varier selon les modèles étudiés.

Chez les souris développant le CIA, les traitements à l'estradiol suppriment la prolifération de lymphocytes T antigènes spécifiques ainsi que la production d'interféron γ (IFN γ) par ces cellules (Jansson et Holmdahl, 1998). L'estradiol entraîne également une diminution du nombre et de l'activité des lymphocytes T CD8⁺ (Ansar Ahmed, Dauphinee et Talal, 1985, Ansar Ahmed et Talal, 1990). La suppression par l'estradiol de certaines réponses immunitaires cellulaires est en accord avec les observations montrant l'effet bénéfique des estrogènes sur les maladies auto-immunes tels le AR, le MS et leur équivalent murin, le CIA et le EAE.

L'activité des lymphocytes T CD4⁺ peut aussi être modulée par les estrogènes. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être grossièrement divisés en deux sous-groupes dépendamment des cytokines qu'ils produisent. Les cellules Th1 se caractérisent surtout par leur production d'interleukine 2 (IL-2), d'IFN γ et de TNF- α (tumor necrosis factor- α). Elles activent la réponse cellulaire en permettant la prolifération et l'activation des autres lymphocytes et des macrophages.

Les cellules Th2 pour leur part sécrètent de l'interleukine 4 (IL-4), une cytokine importante pour activer la production d'anticorps par les lymphocytes B et bloquer l'activation des macrophages, l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine reconnue pour son rôle anti-inflammatoire et l'interleukine 5 (IL-5), importante pour la production d'IgA. Ces cellules ont donc plutôt tendance à activer la réponse humorale. Les cellules Th1 et Th2 s'inhibent réciproquement : l'IFN γ bloque la prolifération des cellules Th2 alors que l'IL-10 inhibe celle des cellules Th1 (Janeway et Travers, 1997).

Il est reconnu que les femmes ont une réponse immunitaire biaisée vers le profile Th2 (Giròn-González *et al*, 2000). Plusieurs études démontrent en effet que les estrogènes ont tendance à stimuler la production de cytokines de type Th2. Ainsi, une stimulation *in vitro* à l'estradiol de cellules CD4⁺ prélevées chez des sujets normaux ou des personnes

atteintes de MS provoque une augmentation de la production d'IL-10 et une baisse de production de TNF- α (Tumor necrosis factor- α) (Cutolo *et al*, 1995, Gilmore, Weiner et Correale, 1997). La baisse de production de TNF- α dépend cependant de la dose d'estradiol puisque des doses correspondant à celles retrouvées normalement dans la circulation augmente la production de cette cytokine, tandis que des doses voisines de celles retrouvées lors de la grossesse inhibe sa production (Gilmore, Weiner et Correale, 1997). Des doses physiologiques d'estradiol sont par contre suffisantes pour faire diminuer l'expression *in vitro* d'IL-2 et de son récepteur (IL-2R) dans les cellules CD4⁺ activées de la périphérie (McMurray *et al*, 2001).

L'influence des estrogènes chez les cellules CD4⁺ des souris est en accord avec celle observée chez l'humain. Plusieurs études montrent que chez ces rongeurs, des traitements d'estrogènes (doses physiologiques) diminuent significativement la production d'IL-2 par les lymphocytes T (Henriksen et Frey, 1982, Pung *et al*, 1985, Rijhsinghani *et al*, 1996, Salem *et al*, 1999). Chez des souris atteintes d'EAE, l'estradiol stimule la production d'IL-10 par des lymphocytes CD4⁺ activés de la périphérie, améliorant par le fait même la condition des souris (Offner *et al*, 2000). Certaines études montrent que l'IL-4 a également un effet bénéfique sur les symptômes de l'EAE (Shaw *et al*, 1997, Falcone *et al*, 1998). Toutefois, une certaine amélioration des symptômes de l'EAE est également observée chez les souris IL-10 KO et IL-4 KO (Ito *et al*, 2001). Ainsi donc, les estrogènes peuvent influencer la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2 même en l'absence de certaines cytokines pro-Th2.

Les effets pro immunité humorales des estrogènes sont particulièrement évidents dans les modèles murins du SLE. Chez les souris NZB/NZW et les souris MRL *lpr/lpr* exposées à des doses physiologiques d'estradiol, on observe généralement une aggravation du lupus due à un intense accroissement de l'activité des lymphocytes B et de la production d'anticorps. Paradoxalement, les lésions causées par une attaque cellulaire (ex. sialadénite, vasculite rénale, inflammations des articulations) connaissent toutes des améliorations (Carlsten *et al*, 1992, Carlsten et Tarkowski, 1993).

Les mécanismes intracellulaires impliqués dans la modulation de la production de cytokines par les estrogènes sont encore bien mal connus. Les lymphocytes T humains et murins expriment dans leur noyau ER α et ER β (Moore *et al*, 1998, Suenaga *et al*, 1998, 2001, Appendice A, résultats non publiés). Les effets des estrogènes pourraient donc être médiés par des voies génomiques.

C'est ce qui semble être le cas pour la régulation de l'expression de TNF- α par l'estradiol. An *et al.* ont récemment démontré que la répression de la transcription du gène TNF- α causée par l'estradiol nécessite le domaine AF-2 des ERs et la présence d'un site ressemblant à un site AP-1, appelé TNF- α RE (TNF- α response element) dans le promoteur du gène (An *et al*, 1999). Les ERs n'interagissent toutefois pas directement avec ce site pour médier la suppression du gène. Le mécanisme semble en effet plus complexe. Srivastava *et al*, montrent que l'activité répressive des estrogènes sur l'expression de TNF- α passe par une cascade impliquant JNK et c-Jun. Le complexe E₂/ER réprime (par un mécanisme encore inconnu) l'activité de JNK qui ne peut ainsi plus phosphoryler le domaine d'activation du gène c-Jun et augmenter sa transcription. Une diminution de la protéine c-Jun entraîne une diminution de la liaison de complexes c-Jun/c-Fos au site AP-1 (TNF- α RE) dans le promoteur de TNF- α , causant finalement une baisse de l'expression de TNF- α (Srivastava *et al*, 1999).

Une autre voie génomique des ERs semble également impliquée dans le contrôle de l'expression de l'IL-2 dans les lymphocytes T de personnes atteintes de SLE. La calcineurine joue un rôle clé dans la cascade intracellulaire initiée par l'activation du TCR et une surrexpression de cette enzyme provoque une augmentation significative de la production d'IL-2 par les lymphocytes (Clipstone et Crabtree, 1992). Il a été démontré que l'estradiol active la transcription de l'ARNm de la calcineurine dans les lymphocytes T périphériques de patients atteints de SLE, mais pas dans ceux provenant de sujets normaux (Rider *et al*, 1998). Cette activation est probablement médiée par une voie d'action génomique des ERs puisqu'elle est observée en moyenne 6 heures après le début des traitements à l'estradiol et est inhibée par l'ICI 182,780 (voir p.25). Ces résultats démontrent qu'un dérèglement dans une voie de signalisation des estrogènes pourrait

altérer indirectement la production de cytokines par les lymphocytes T et causer des réponses inflammatoires aberrantes telles celles observées lors de maladies auto-immunes.

L'estradiol peut également moduler l'expression de l'IL-2R dans les lymphocytes T, cette fois par une voie non génomique. Ainsi, l'estradiol, couplé ou non à une molécule de BSA, se lie à des ERs membranaires et induit dans les lymphocytes T une rapide augmentation des niveaux cytoplasmiques d'ions Ca^{2+} (Benten *et al*, 1997, Azenabor et Hoffman-Goetz, 2000, 2001). Cette augmentation a pour effet de diminuer l'expression de l'IL-2R. Cette diminution pourrait expliquer en partie comment les estrogènes inhibent certaines réponses immunitaires cellulaires (ex. DTH). Le mécanisme sous-jacent à cette diminution de IL-2R est cependant inconnu. Étonnamment, une hausse de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est nécessaire à la différenciation et à la prolifération des lymphocytes T (Crabtree, 1989). Il sera intéressant de découvrir comment ces deux évènements à priori contradictoires peuvent être induits par des voies similaires.

Les quelques exemples ci-haut montrent que les estrogènes, par l'entremise de leur récepteur, sont capables d'induire des changements drastiques dans le comportement des lymphocytes T. Les lymphocytes T ne sont cependant pas les seules cellules du système immunitaire à pouvoir être influencées par ces hormones. Pour avoir une vue d'ensemble plus réaliste des effets des estrogènes sur la réponse immunitaire, il est donc essentiel de comprendre comment ils modulent les réponses chez ces autres cellules.

3.2.3. Les lymphocytes B et la réponse humorale

Toutes les étapes de la genèse, du développement et de la sélection des lymphocytes B se déroulent exclusivement dans la moelle osseuse (sauf chez le fœtus où le foie peut également produire des cellules B). Une fois matures, ces cellules quittent la moelle et entrent dans la circulation à la recherche de leur antigène spécifique. Une fois activés, les lymphocytes B produisent des anticorps dont le rôle sera soit de neutraliser des toxines

soit de faciliter la phagocytose de corps étrangers, avec ou sans la participation des compléments. Les cellules B ainsi que les anticorps qu'elles produisent forme l'essentiel de l'immunité dite humorale. Un dérèglement de ce type d'immunité est à la base des maladies tel le SLE où une production d'auto-anticorps provoque la destruction de tissus sains.

Durant la grossesse, on observe une hausse de la proportion d'IgM produite durant une réponse immunitaire (Baines et Pross, 1982). Comme il a été mentionné précédemment, la grossesse, ainsi que les traitements aux estrogènes, tendent à empirer les symptômes et la progression de la maladie chez les souris développant le lupus. Dans ces modèles murins, l'aggravation de la maladie est associée à une augmentation de la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B (Verthelyi et Ahmed, 1994, 1998, Evans *et al*, 1997, Kanda, Tsuchida et Tamaki, 1999). Les estrogènes auraient donc le potentiel de stimuler l'activité des cellules B. Malheureusement, il semble que les choses ne soient pas si simples.

Les effets des estrogènes sur la lymphopoïèse et l'activité des cellules B sont quelques peu paradoxaux. Ainsi, quoique capables d'augmenter la réponse humorale, les estrogènes ont un effet inhibiteur sur la genèse des lymphocytes B. Les cellules B immatures provenant de moelle osseuse peuvent continuer à pousser sur de l'agar semi-solide en présence d'interleukine 7 (IL-7) (Lee *et al*, 1989). Ce test a permis de démontrer que la croissance de cellules B immatures chez les souris gestantes est significativement diminuée par rapport à celle des souris non gestantes (Medina, Smithson et Kincade, 1993). Des traitements aux estrogènes avec des doses légèrement au-dessus des concentrations physiologiques ont le même effet (Medina *et al*, 2001). La progestérone ne peut à elle seule inhiber la production de cellules B. Toutefois, lorsque administrée avec l'estradiol, la progestérone a une effet synergique qui permet une réduction de plus de 90 % de la dose d'estradiol requise pour inhiber la lymphopoïèse (Medina et Kincade, 1994). Donc, une élévation de la concentration d'estradiol dans le sang peut causer un ralentissement de la production de nouvelles cellules B dans la moelle osseuse sans

toutefois affecter le nombre de cellules B matures en circulation (Medina, Smithson et Kincade, 1993).

Le mécanisme par lequel les estrogènes inhibent la lymphopoïèse semble impliquer le gène de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Les souris E μ -*bcl-2* expriment constitutivement la protéine Bcl-2 dans leurs cellules B immatures. Chez ces souris, les estrogènes n'inhibent pas la maturation des lymphocytes B. Ce résultat suggère que les estrogènes inhibent la maturation des cellules B par une voie apoptotique et que cette voie est bloquée par une expression constitutive de Bcl-2 (Medina, Strasser et Kincade, 2000). Quoique les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose par les estrogènes soient encore mal compris, ils semblent nécessiter la présence des ERs. ER α est normalement exprimé en faible quantité dans les précurseurs de lymphocytes B (Smithson *et al*, 1995). Une étude faite avec des souris ER^{-/-} indique que l'inhibition de la lymphopoïèse par les estrogènes est quelque peu compromise lorsque les précurseurs de cellules B n'expriment pas ER α . (Thurmond *et al*, 2000). Chez le fœtus, les précurseurs de cellules B n'expriment pas de ERs et ces cellules ne sont pas sensibles à l'apoptose induite par des traitements aux estrogènes (Igarashi *et al*, 2001).

Comme pour le thymus, certaines études suggèrent que les effets des estrogènes sur les lymphocytes B immatures soient en partie indirects et se fassent par l'entremise de cellules non hématopoïétiques (cellules épithéliales, cellules présentatrices d'antigène (CPA)) de la moelle osseuse. Ainsi, il a été démontré que l'expression de ER α dans les cellules non hématopoïétiques est essentielle au développement des populations les plus immatures (pro et pré-B) de lymphocytes B (Thurmond *et al*, 2000). Aussi, des expériences *in vitro* ont montré que chez les cellules non hématopoïétiques de la moelle, l'estradiol induit la production de cytokines comme l'IL-7 nécessaire au développement des lymphocytes B immatures (Bellido *et al*, 1993).

Contrairement à ce qui est observé chez les précurseurs de cellules B dans la moelle osseuse, les estrogènes semblent avoir un effet anti-apoptotique chez les lymphocytes B périphériques. Une étude faite avec des souris BALB/c transgéniques (exprimant

uniquement la chaîne lourde $\gamma 2b$ d'un auto-anticorps spécifique pour l'ADN) montre que les estrogènes pourraient eux-mêmes induire une augmentation de l'expression de Bcl-2 dans les lymphocytes B périphériques, bloquant ainsi l'apoptose et l'induction de la tolérance chez ces cellules (Bynoe *et al*, 2000). En temps normal, le sang de ces souris ne contient qu'une quantité négligeable de lymphocytes pouvant produire des auto-anticorps, indiquant une induction de la tolérance chez les cellules B matures. Toutefois, après administration d'E₂, le nombre de cellules B auto-réactives est accru dans la rate et l'augmentation de la concentration d'anti-ADN en circulation cause l'apparition d'agrégats d'immunoglobulines dans les reins. Ce résultat suppose que les estrogènes pourraient, par l'intermédiaire de Bcl-2, abolir le processus de sélection des cellules B en périphérie, provoquant une augmentation du nombre de cellules potentiellement auto-réactives en circulation. Le promoteur de Bcl-2 contient des EREs (Teixeira, Reed et Pratt, 1995) et les lymphocytes B matures expriment ER α et ER β (Suenaga *et al*, 1998). Il serait donc possible que l'estradiol puisse agir directement sur l'expression du gène de Bcl-2, rendant les cellules B plus résistantes à l'apoptose et par le fait même, plus résistantes à l'induction de la tolérance en périphérie. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les femmes auraient plus tendance que les hommes à développer des maladies-autoimmunes.

Il est intéressant de noter que les lymphocytes B matures expriment une plus grande quantité de ERs que leurs précurseurs dans la moelle osseuse (Igarashi *et al*, 2001). Cette différence pourrait expliquer en partie comment les estrogènes peuvent avoir des effets contraires sur les populations immatures et matures de cellules B.

3.3. Les cellules du système immunitaire non spécifique

Les effets immunomodulateurs des estrogènes ne se font pas uniquement sentir chez les protagonistes de l'immunité acquise. Lors d'une première exposition à un pathogène, une série de cellules immunitaires, la plupart phagocytaires, s'activent à contrôler rapidement l'indésirable. Ces cellules qui, pour agir, n'ont pas besoin de cellules présentatrices d'antigènes (APCs) constituent ce que l'on appelle le système immunitaire inné ou non

spécifique. La première ligne de défense l'organisme est constituée entre autres de neutrophiles, de macrophages et de cellules tueuses naturelles (NK). De plus en plus d'études démontrent que les estrogènes peuvent également influencer les réponses de ces cellules.

L'injection intradermale d'une petite quantité de toxine du choléra (0.1 µg) dans la patte de la plupart des lignées de souris provoque une inflammation qui (1) est rapide et observée même chez des souris n'ayant pas été exposées à la toxine précédemment et (2) n'est pas atténuée chez des souris MRL/l déficientes en lymphocytes T. Cette méthode représente donc un bon modèle pour étudier l'inflammation indépendante de l'immunité acquise. Chez des souris castrées traitées de cette façon, l'enflure de la patte est significativement réduite si les souris sont co-traitées avec des doses physiologiques d'estrogènes (Josefsson, Tarkowski et Carlsten, 1992). Une étude histologique du site d'inflammation révèle une diminution de l'infiltration de cellules polymorphonucléées (neutrophiles et autres granulocytes) chez les souris traitées aux estrogènes. Les estrogènes peuvent donc influencer la réponse immunitaire non spécifique.

3.3.1. Les neutrophiles

Au point de vue cellulaire, l'estradiol affecte négativement l'activité chimiotactique et la dégranulation des neutrophiles (Buyon *et al*, 1984, Hammerschmidt *et al*, 1988).

Les neutrophiles sont les premières cellules à être recrutées à un site d'inflammation. Ils contrôlent l'invasion des pathogènes en libérant le contenu de leurs granules (substances bactéricides) dans les tissus. Ces granules contiennent entre autres des dérivés d'oxygène très toxiques dont des ions superoxydes. Il a été démontré que chez les neutrophiles humains, l'E₂ réduit significativement la production d'ions superoxydes (Bekesi *et al*, 2000). Cette réduction pourrait expliquer en partie comment les estrogènes arrivent à diminuer l'inflammation non spécifique.

Pour médier leurs actions, les neutrophiles doivent d'abord se rendre au lieu d'inflammation par chimiotaxie. Le mécanisme par lequel les estrogènes compromettent la migration des neutrophiles implique vraisemblablement l'oxyde nitrique (NO). Le NO produit par les neutrophiles réduit l'adhérence de ces cellules et pourrait nuire à la migration dans les tissus (Kubes, Suzuki et Granger, 1991). Les neutrophiles prélevés chez les femmes en phase folliculaire (niveaux d'estrogènes bas) produisent moins de protéines nNOS (responsable de la synthèse du NO) que ceux prélevés durant l'ovulation (niveaux d'estrogène élevés). Les neutrophiles prélevés chez des hommes et traités *in vitro* avec de l'E2 produisent également plus de nNOS que ceux non traités (García-Durán *et al.*, 1999). Une augmentation de l'expression de nNOS par les estrogènes pourrait donc être un mécanisme par lequel ces hormones réduisent la migration des neutrophiles vers les sites d'inflammation.

Le rôle des ERs dans l'induction de l'expression de nNOS chez les neutrophiles n'est pas clair, mais ces récepteurs sont néanmoins essentiels à cette induction. En effet, l'augmentation de la production de nNOS par les estrogènes est complètement abrogée par l'ajout de ICI 182, 780. Les neutrophiles expriment ER α et ER β (Klebanoff, 1977, García-Durán *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 2001) et cette expression est augmentée en présence d'E₂ (García-Durán *et al.*, 1999). Il sera donc intéressant de voir comment l'augmentation de l'expression des ERs influence l'expression de nNOS.

3.3.2. Monocytes et macrophages

Les estrogènes ont généralement un effet suppressif sur l'activité des macrophages. Ces cellules, comme les neutrophiles, ont surtout une fonction phagocytaire. Quoique capable d'éliminer les pathogènes de façon non spécifique, les macrophages ont besoin de la stimulation de lymphocytes T pour atteindre leur niveau d'activation maximal. Ces cellules agissent donc en étroite collaboration avec les cellules Th1. Comme il a été mentionné précédemment (section 3.2.2.) les estrogènes inhibent la production de TNF- α par les cellules T. Chez les cellules épithéliales, le TNF- α induit la production de

molécules adhésives spécifiques tel le MCP-1 pour les macrophages. Des traitements aux estrogènes réduisent la production systémique de TNF- α par les lymphocytes T, compromettant ainsi la migration des macrophages vers les sites d'inflammation (Seli *et al*, 2001, Ito *et al*, 2002).

Plus directement, la pré-incubation *in vitro* de macrophages murins avec des doses physiologiques d'estradiol cause une diminution significative de la production de TNF- α (Zhang *et al*, 2001) et de nitrite (Savita et Rai, 1998), contrairement au neutrophiles, par ces cellules après activation. Chez les macrophages activés du cerveau (microglia), l'E₂ inhibe la production de plusieurs médiateurs d'inflammation dont l'iNOS, la prostaglandine-E(2) (PGE₂ et la metalloprotéinase-9 (MMP-9) (Vegeto *et al*, 2001).

La plupart des effets supresseurs des estrogènes sur les macrophages sont bloqués par le ICI 182,780, indiquant que les estrogènes agissent par l'entremise des ERs. L'expression des ERs chez les macrophages semble dépendre de leur localisation. Ainsi, les macrophages du cerveau, des tissus synoviaux et ceux en périphérie (monocytes) expriment ER α et ER β (Vegeto *et al*, 2001, Cutolo *et al*, 1996, Suenaga *et al*, 1996) tandis qu'aucun ER n'a été détecté dans les macrophages des tissus pulmonaires (Zhao *et al*, 2001). Les mécanismes par lesquels les ERs médient leurs action dans les macrophages ne sont pas encore connus.

3.3.3. Les cellules tueuses naturelles

Les cellules NK regroupent une population hétérogène de cellules caractérisées par leurs actions cytolytiques et l'expression de certains marqueurs cellulaires propres (NKR-P1, KIR). Ces cellules jouent un rôle primordial dans l'élimination non spécifique de pathogènes et de cellules potentiellement cancéreuses.

En général, les estrogènes inhibent les fonctions cytotoxique des cellules NK (Seaman et Gindhart, 1979, Seaman *et al*, 1979, Pfeifer et Patterson, 1985, Nilsson et Carlsten, 1994).

Par exemple, des cellules NK prélevées de souris castrées traitées aux estrogènes (doses physiologiques) montrent une baisse significative de leur capacité de lyser des cellules YAC-1 comparativement à la capacité des cellules de souris castrées non traitées (Nilsson et Carlsten, 1994). L'effet suppresseur des estrogènes sur les cellules NK varie cependant d'une race de souris à l'autre.

Comme les cellules NK expriment les récepteurs ER α et ER β (Currant *et al*, 2001), ces récepteurs sont fort probablement impliqués dans les mécanismes régissant les effets suppresseurs des estrogènes. Par contre, ER α n'est pas essentiel à ces mécanismes puisque les estrogènes inhibent également la cytotoxicité des cellules NK chez les souris ERKO. Ces résultats suggèrent donc que ER β et non ER α serait impliqué dans la diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK (Curran *et al*, 2001).

4. MODÈLE CELLULAIRE UTILISÉ LORS DE L'ÉTUDE

4.1. Influence des estrogènes sur la différenciation cellulaire

Les estrogènes peuvent influencer le développement de cellules immunitaires immatures, que ce soit dans le thymus, la moelle osseuse ou le foie (section 3). Les cellules immunitaires ont toutes un précurseur commun dans la moelle osseuse : la cellule hématopoïétique pluripotente. Cette cellule se différencie ensuite en précurseur de cellules lymphoïdes (qui se différenciera en lymphocytes T ou B) ou en précurseur de cellules myéloïdes (qui donnera naissance aux leucocytes polymorphonucléés, aux plaquettes et aux érythrocytes) (Figure 6). On sait bien peu de choses sur les mécanismes par lesquels les estrogènes influencent la différenciation cellulaire et les rôles des récepteurs ER α et ER β dans ces mécanismes. Les modèles de différenciation cellulaires sont un moyen simple et pratique d'étudier les effets de diverses substances sur le développement des cellules immunitaires.

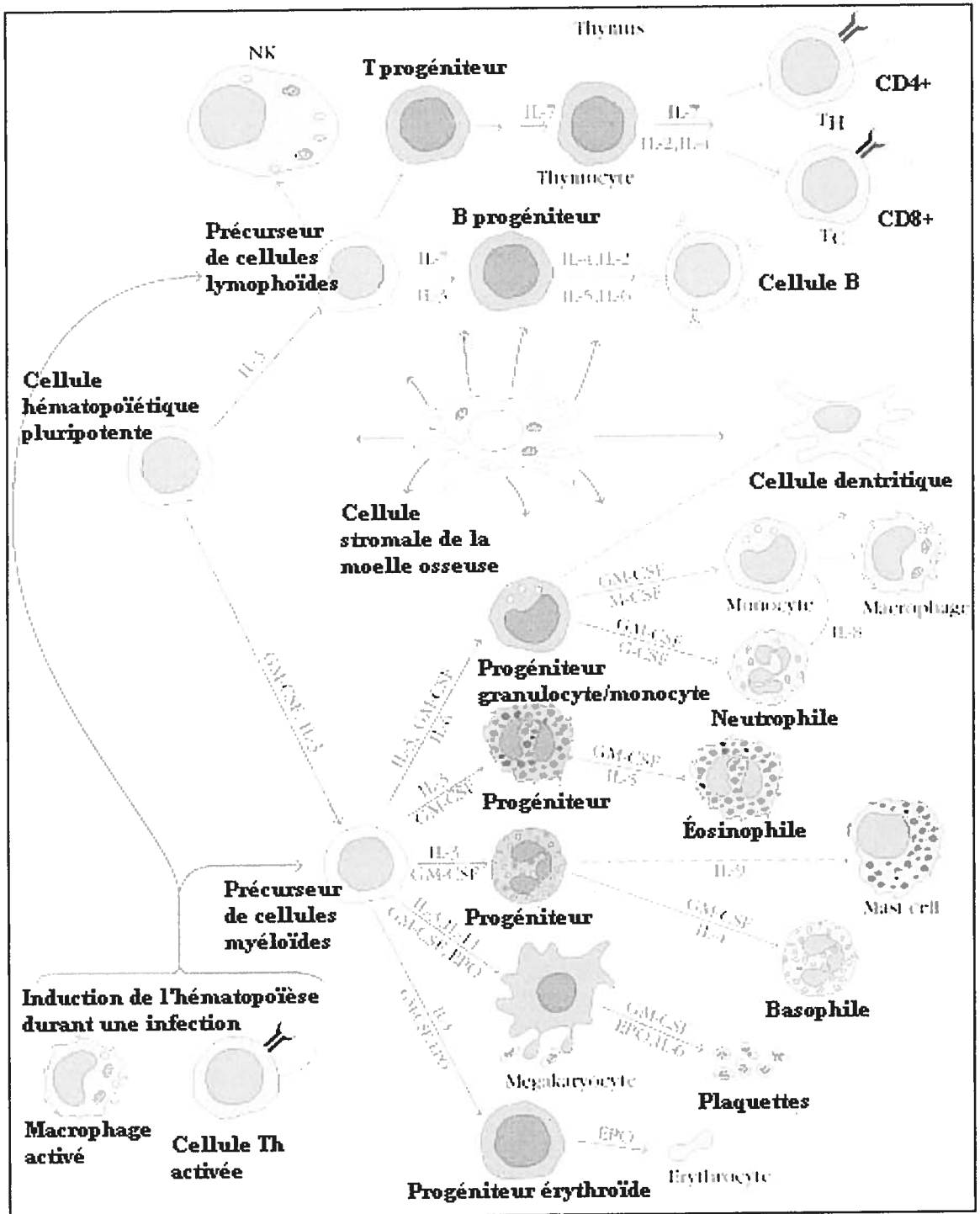


Figure 6. Hématopoïèse chez l'humain.

4.2. Les modèles de différenciation cellulaire

Un dérèglement de la lymphopoïèse ou de la leucopoïèse peut dégénérer en maladies auto-immunes ou en cancers (leucémie, lymphome). La compréhension des mécanismes régulant la différenciation cellulaire est donc primordiale pour le développement de stratégies thérapeutiques capables de prévenir ces conditions.

Les modèles de différenciation cellulaires sont généralement générés à partir de cellules tumorales. Par exemple, Lozzio et Lozzio ont établi la lignée K562 à partir de cellules prélevées chez un patient atteint de leucémie myéloïde chronique (Lozzio et Lozzio, 1975). Collins *et al.* pour leur part, ont généré la lignée promyéloïde HL-60 à partir du sang d'une patiente atteinte de leucémie promyélocytaire aigüe (Collins *et al.*, 1977). Cette lignée est celle utilisée dans la présente étude et la section suivante lui est consacrée.

Les lignées servant de modèles de différenciation cellulaire ont généralement les caractéristiques suivantes : (1) elles sont éternelles (peuvent être cultivées indéfiniment), (2) sont au stade blaste, myéloblaste ou promyélocyte et (3) on peut induire leur différenciation en les traitant avec diverses substances chimiques (Koeffler et Golde, 1980). Dans l'ensemble cependant, les lignées présentent des caractéristiques très variées.

4.2.1. Les cellules HL-60

Les cellules HL-60 sont au stade promyélocyte et ont la capacité de se différencier en une variété de cellules myélomonocytiques. Dépendamment de l'agent utilisé, ces cellules peuvent devenir des granulocytes (neutrophiles), des monocytes, des macrophages ou des éosinophiles. La différenciation n'est cependant jamais parfaite, c'est-à-dire que les cellules HL-60 différenciées n'ont pas toutes les caractéristiques de leurs homologues normaux (Newburger *et al.*, 1979).

La différenciation en granulocyte peut être induite par plusieurs substances dont le diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Collins *et al*, 1978) et l'acide rétinoïde (Breitman, Selonick et Collins, 1980). Cette différenciation est terminale et produit majoritairement des métamyélocytes et des «banded neutrophils» (c.i. stade précédent le neutrophile mature) plutôt que des neutrophiles. Ces cellules se rapprochent toutefois assez des neutrophiles pour être capables de tuer des bactéries par phagocytoses ou dégranulation comme leurs homologues sanguins (Collins *et al*, 1979, Newburger *et al*, 1979, Miyaura *et al*, 1981). Il faut entre quatre et cinq jours pour que les cellules HL-60 exposées à 1.25 % de DMSO se différencient (Collins *et al*, 1978). Peu après leur différenciation, ces cellules entrent spontanément en apoptose, comme le font les neutrophiles de la périphérie

Les mécanismes par lesquels les substances comme le DMSO induisent la différenciation cellulaire sont encore inconnus.

Les tableaux 3 et 4 présentent les substances pouvant induire la différenciation des cellules HL-60 et les caractéristiques phénotypiques des cellules différenciées.

Tableau 3. Substances induisant la différenciation de cellules HL-60.

	Type cellulaire induit			
	Neutrophile	Monocyte	Macrophage	Éosinophil
Substances	DMSO	Vitamine D ₃	Phorbol esters	Medium alcalin
	Acide rétinoïde	Butyrate de Na	Téléocidine	Acide butyrique
	Actinomycine D	DIF		GM-CSF
	Hypoxanthine	IFN- γ		
	Ab Antithymocyte	TNF		

Source: Collins, 1987

Tableau 4. Caractéristiques phénotypiques des cellules HL-60 différenciées

Caractéristique	Non induite	Neutrophile	Monocyte	Macrophage	Éosinophil
Myéloperoxydase	+	↓	↓	↓	+
Adhérence au plastique	-	-	-	+	
Chimiotaxie	-	+	+	-	
Récepteurs à complément	+	↑	↑	↑	
Lysosyme	+	↑		↑↑	
Réduction de NBT	-	+	+	-	
Phagocytose	-	+	+	+	
Récepteur à insuline	+	↓	↑		
Récepteur à transferrine	+	↓		↓	
Activité antimicrobienne	-	+		+	

Source : Collins, 1987. (+) = présent, (-) = absent, (↓) = diminution, (↑) = augmentation, blanc = non mentionné dans la littérature.

Ainsi, parmi les nombreux modèles cellulaires de différenciation, la lignée de cellules promyéloïdes HL-60 est une des plus utilisée et également une des mieux caractérisée. De plus, les protocoles de différenciation pour cette lignée sont bien établis et très bien documentés. Les cellules HL-60 ont donc été choisies comme modèle cellulaire lors de cette étude. La présence d'une littérature détaillée sur la différenciation de ces cellules induite par le DMSO permet en effet une analyse approfondie de l'influence de certaines substances, comme les hormones stéroïdiennes, ou de la surexpression de certaines molécules, comme les ERs, sur cette différenciation.

Deuxième partie

Article

Article #1 :

Effects of Estrogen Receptor alpha and beta Expression on Dymethyl Sulfoxyde-Induced Differentiation of HL-60 Cells into Neutrophils.

Résumé de l'article #1 (Effects of Estrogen Receptor alpha and beta Expression on Dymethyl Sulfoxyde-Induced Differentiation of HL-60 cells into Neutrophils.)

De nombreuses études ont démontré que les estrogènes peuvent influencer la maturation et le développement des cellules immunitaires. Comme les effets des estrogènes sont principalement médiés par l'entremise de récepteurs nucléaires, les récepteurs estrogène alpha ($ER\alpha$) et bêta ($ER\beta$), nous avons étudié le rôle de ces récepteurs lors de la maturation de cellules promyéloïdes HL-60 en neutrophiles. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules HL-60 pour qu'elles surexpriment soit $hER\alpha$ (HL-60 α) ou $hER\beta$ (HL-60 β). La différenciation en neutrophiles a ensuite été induite avec 1.25 % de diméthyle sulfoxyde (DMSO) en présence de différentes concentrations de 17 β -estradiol. Les effets de l'estradiol ainsi que de la surexpression de $hER\alpha$ et $hER\beta$ sur la viabilité et la différenciation des cellules HL-60 ont été analysés par la méthode d'exclusion de bleu de Trypan, cytométrie en flux et test de réduction de Nitro Bleu de tétrazolium (NBT).

Comme prévu, nos résultats montrent que la viabilité des cellules HL-60 diminue lors d'une exposition au DMSO et que, parallèlement, le pourcentage de cellules capable de réduire le NBT et d'exprimer le marqueur de différenciation CD11b augmente, indiquant que les cellules se différencient en neutrophiles. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les cellules HL-60 α . Cependant, contrairement aux cellules HL-60 et HL-60 α , la viabilité des cellules HL-60 β n'est pas diminuée lors du traitement au DMSO. De plus, le pourcentage de cellules HL-60 β capable de réduire le NBT et d'exprimer le marqueur de différenciation CD11b n'est pas augmenté de façon significative même après cinq jours d'exposition au DMSO. Une étude morphologique montre également des différences entre la forme du noyau des cellules HL-60 β , HL-60 et HL-60 α . La présence de 17 β -estradiol dans le milieu de culture n'a eu aucun effet sur les paramètres étudiés. Nous concluons que la surexpression de $ER\beta$ dans les cellules HL-60 affecte négativement leur différenciation en neutrophiles lors d'une exposition au DMSO.

Contribution de l'étudiant à l'article #1 (Effects of Estrogen Receptor alpha and beta Expression on Dymethyl Sulfoxyde-Induced Differentiation of HL-60 cells into Neutrophils)

Montage expérimental: L'étudiant a procédé lui-même à toutes les manipulations requises par son protocole expérimental (i.e. : culture cellulaire, transfection, isolation d'ARN, RT-PCR, traitement des cellules, dénombrement des cellules, cytométrie en flux, etc. (voir article #1, section matériels et méthodes)).

Collecte des données : L'étudiant a procédé lui-même à la collecte de toutes les données.

Compilation et analyse des résultats : L'étudiant a procédé lui-même à la compilation et à l'analyse de tous les résultats (voir article #1, section résultats).

Interprétation des résultats : L'étudiant a procédé lui-même à l'interprétation des résultats (voir article #1, section discussion).

Rédaction de l'article : L'étudiant est premier auteur de l'article #1. L'article #1 a été soumis au journal suivant: Journal of Leukocyte Biology.

Contribution des autres auteurs : Mlle Claudine Hamelin a généreusement offert ses conseils techniques lors du montage de la démarche expérimentale. M. Jacques Bernier est le directeur de recherche.

Article #1:

Effects of Estrogen Receptor alpha and beta Expression on Dymethyl Sulfoxyde-Induced Differentiation of HL-60 Cells into Neutrophils.

Jill Hénault, Claudine Hamelin, Jacques Bernier

Human Health Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier, 245 Hymus Boulevard, Université du Québec, Pointe-Claire, QC, H9R 1G6, Canada.

Running Title: ER β and DMSO-induced cell differentiation

Key words: HL-60 cells - Estrogen receptor β - β -estradiol – cell differentiation - neutrophil.

Correspondence to: Jacques Bernier

Human Health Research Center
INRS-Institut Armand-Frappier

245 Hymus Boulevard

Pointe-Claire, QC

H9R 1G6

Canada.

Telephone #: (514) 630-8813

e-mail: jacques.bernier@inrs-sante.quebec.ca

Abstract

Numerous studies in the thymus and bone marrow have shown that the steroid hormone estrogen can influence the maturation of immune cells. Since estrogen effects are principally mediated by the estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β), we have investigated the role of these receptors during cell differentiation. HL-60 promyeloid cells engineered to express either hER α (HL-60 α) or hER β (HL-60 β) were induced to differentiate into neutrophils using 1.25% DMSO in presence of different concentrations of 17 β -estradiol. The viability and rate of differentiation of DMSO-treated cells were then assessed. Our results showed that HL-60 β cell viability did not decrease during DMSO treatment contrarily to HL-60 and HL-60 α cells. Moreover, the percentage of DMSO-treated HL-60 β cells capable of reducing NBT or expressing CD11b did not increase during the treatment as observed in HL-60 and HL-60 α cells. Morphological studies also showed differences between nuclei shape of DMSO-treated HL-60 β and the other cells. The presence of 17 β -estradiol did not significantly influence any of the results. We conclude that ER β negatively modulate DMSO-induced neutrophil differentiation of HL-60 cells using estradiol-independent mechanisms.

Introduction

The phenomenon of sexual dimorphism of the immune response has been recognized for many years. In general, females have heightened humoral responses (1, 2) and are at higher risk of developing autoimmune diseases than males (3-8). Sex steroids are thought to play a key role in immune functions. Several observations suggest that estrogens are particularly potent immunomodulators. For example, the severity of the symptoms of autoimmune diseases like systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) is influenced by pregnancy when estrogen levels are increased (9-11). Furthermore, gonadectomy and estrogen therapy alter the onset and the development of autoimmune diseases in mice (12-15).

The exact mechanisms by which estrogens influence the immune response are still unknown but they could involve estrogen-mediated modulation of immune cell maturation. Indeed, it has been demonstrated in humans and mice that an increased concentration of estrogens can provoke thymus involution with a marked decrease of the double positive ($CD4^+/CD8^+$) thymocyte population (16-18). Inversely, estrogens accelerate the generation of primordial T lymphocytes in the liver (19). Estrogen treatments have also been shown to inhibit B lymphocytes maturation in the bone marrow (20-22) while affecting the distribution of polymorphonuclear cells in peripheral blood (23).

Estrogen effects are mostly mediated by the two nuclear receptors: estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) and the recently characterized estrogen receptor beta ($ER\beta$) (24, 25). Most immune cells express both receptors (26-32), but their role in estrogen-mediated modulation of cellular differentiation remains to be elucidated. The aim of this study was therefore to investigate the role of $ER\alpha$ and $ER\beta$ during cellular differentiation in presence or absence of 17β -estradiol (E_2). The human promyeloid cells HL-60, developed in 1977 by Collins and coworkers (33), can easily be induced to differentiate *in vitro* into a variety of different cell types of the myelomonocytic lineage (34). Because

these cells do not endogenously express high levels of estrogen receptors, they could be transiently transfected with either ER α or ER β to study the influence of the expression of each of these receptors on cell differentiation. Our results suggest that ER β negatively modulate dimethyl sulfoxide-induced neutrophil differentiation of HL-60 cells using E₂-independent mechanisms.

Materials and Methods

Cells and cell cultures. Promyelocytic HL-60 cells were obtained from Dr. Rafick-Pierre Sékaly (University of Montreal, Montreal, Canada). Cells were kept in 75 cm² flasks (Sarstedt, Montreal, Can.) in RPMI 1640 (Bio Media, Drummonville, Can) with Phenol Red supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum in a fully humidified environment with 5% CO₂ at 37°C. The medium also contained Pen/Strept (100µg/ml), HEPES (10mM) and Glutamine (2mM), all bought from Bio Media, Can. Cell concentration never exceeded 1 x 10⁶ cells per ml.

Transfections. HL-60 cells were transfected with either plasmid pCMV5-hER α (generously provided by Professor Benita S. Katzellenbogen, University of Illinois, Urbana, IL), plasmid pSG5-hER β (generously provided by Professor Jan-Åke Gustafsson laboratory, Karolinska Institute, Novum, Sweden) or plasmid pCI-neo (Promega, Madison, WI, USA) as control. Transfections were done by electroporation. Briefly, 10 x 10⁶ cells in 800 µl RPMI 1640 medium were transferred in Gene Pulser cuvettes (BIO RAD, Hercules, CA, USA) and electroporation was done using Bio Rad Gene Pulser II, with set high cap at 925 µF and set volts at 320 V. Electroporated cells were incubated 15 minutes at room temperature before their transfer into complete RPMI 1640 medium.

Differentiation and Estradiol treatments. Twelve hours before beginning of treatment, cells were transferred in steroid depleted medium (Bio Media RPMI 1640 w/o Phenol Red supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS stripped with charcoal/dextran, Pen/Strept, HEPES and Glutamine in concentrations mentioned earlier). The residual concentration of 17 β -estradiol in serum treated with charcoal/dextran is approximately 5.00 pg/mL (35). For the treatment, 3.0 x 10⁶ cells were transferred into 25cm² flasks (Sarstedt, Can) containing 10 ml of steroid depleted medium. Cell differentiation into neutrophils was induced by adding 1.25% DMSO in the culture medium. 17 β -estradiol treatments began simultaneously. Cells were incubated for five days with DMSO 1.25%

and two different concentrations of 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, Canada) (10^{-8} or 10^{-6} M), or with vehicle only (0.02% EtOH 100%) (V). A negative control without DMSO or 17 β -estradiol was made (C-) at the same moment. Cell number was determined daily with a hemocytometer (Hausser Scientific, USA). Cell viability was determined daily by trypan blue exclusion. Differentiation was assessed by Nitro Blue Tetrazolium (Sigma-Aldrich, Can) reduction (500 μ l of cells suspended at 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 w/o phenol red were incubated 30 min. at 37°C with 0.1% w/v of NBT (Sigma-Aldrich, Can) in the presence of 10^{-7} M of PMA).

Flow cytometry analysis. At day 5 of DMSO treatment, cell mortality was examined by flow cytometry analysis of propidium iodine (PI) coloration of fixed cells. Briefly, 1×10^6 cells were washed once in PBS and once in Krishan Buffer (PI+ 1% p-formaldehyde (PFA)) before being incubated 30 min. at 37°C in Krishan Buffer. Cell differentiation was assessed using human anti-CD11b-FITC (Sigma-Aldrich, Can). 2.5×10^5 cells were washed twice in PBS before and after incubation with Abs (30 min on ice). Negative controls consisted of cells that were washed in PBS but not incubated with Abs. Cells were then fixed in 1% PFA and analysed by flow cytometry. Fluorescence was detected using Becton Dickinson FACScan flow cytometer equipped with Cellquest Pro software.

Morphological study. For morphological assessment of the cells, Cytospin slide preparations of 250 μ l aliquots of cell suspensions (2.0×10^6 cells) were prepared using a Cyto-TEK centrifuge (Miles Scientific, IL, USA) and stained with Wright-Giemsa. A minimum of 200 cells were analysed under light microscope for each experiment.

RT-PCR. 10×10^6 cells were first washed twice in PBS. Total RNA was isolated using 1 ml TRIZOL (Life Technology, Germany). RNA (1 μ g) was then treated with Dnase I Amp Grade (Life Technology, Ger) and then reverse-transcribed into cDNA using oligo (dT) primers (Life Technology, Ger) and 80 U reverse transcriptase Moloney murine leukemia virus (M-MLV; Life Technology, Ger). 5 μ l of RT products were then used for PCR amplification (50 μ l total) in a Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 with primers for hER α (1st amplification: upstream primer: 5'- AAT-TCA-GAT-AAT-CGA-

CGC-CAG-3', downstream primer: 5'- GTG-TTT-CAA-CAT-TCT-CCC-TCC-TC-3'; 2nd amplification: upstream nested primer: 5'- GAC-AAG-GGA-AGT-ATG-GCT-ATG-GA-3', downstream nested primer: 5'- TTC-ATC-ATT-CCC-ACT-TCG-TAG-C-3', 260 bp product), and hER β (1st amplification: upstream primer: 5'- TAG-TGG-TCC-ATC-GCC-AGT-TAT-3', downstream primer: 5'- GGG-AGC-CAC-ACT-TCA-CCA-T-3'; 2nd amplification: upstream nested primer: 5'- CGG-AAC-CTC-AAA-AGA-GTC-CCT-GG-3', downstream nested primer: 5'- CCG-AAG-TCG-GCA-GGC-CTG-GCA-G-3', 310 bp product). For control GAPDH was used (upstream primer: 5'-ACC-ACA-GTC-CAT-GCC-ATC-AC-3', downstream primer: 5'-TCC-ACC-ACC-ATG-TTG-CTG-TA-3', 450-bp product). PCR for hER α (1st and 2nd amplification: 15 minutes at 95.0 °C , 25 cycles: 30 second at 94.0 °C, 1 minute at 54.0 °C, 1 minutes at 72.0 °C), hER β (1st and 2nd amplification: 15 minutes at 95.0 °C, 25 cycles: 30 seconds at 94.0 °C, 1 minute at 54.0 °C, 1 minute 72.0 °C; and GAPDH (15 minutes at 95.0 °C, 20 cycles: 30 seconds at 94.0 °C, 1 minute at 58.0 °C, 1 minute at 72.0 °C) were performed using 1.25 U *HotStartTaq* DNA Polymerase (Qiagen, Canada). PCR products were analyzed by agarose gel (1.5%) electrophoresis with ethidium bromide and quantification was done using Fluor-S MultiImager (BioRad, Can) and Multi-Analyst 1.1.

Statistical analysis. Results are expressed as mean \pm SD. Where appropriate, results were analysed by the Mann-Whitney non-parametric test of significance using the Statistica software (Statsoft, Tulsa, Ok, USA). Each experiment was repeated at least two times with similar or identical results.

Results

Expression of ER α and ER β in HL-60-transfected cells

HL-60 cells are a widely used model of *in vitro* myeloid cell differentiation. Experiments done in our laboratory have shown that HL-60 cells do not express ER β mRNA nor ER α mRNA (Figure 1a). These cells could therefore be induced to produce ER α or ER β to examine the influence of each receptor on cell differentiation. ER α and ER β mRNA expression was examined by RT-PCR following transfection (Figure 1a). ER α mRNA could not be detected in non-transfected HL-60 cells or HL-60 cells transfected with pSG5-hER β (HL-60 β) or pCI-neo plasmids (HL-60Neo) after 25/25 PCR cycles. However, hER α mRNA could be detected in HL-60 cells transfected with pCMV5-hER α (HL-60 α) and in Jurkat cells (positive control). It has to be noted that hER α could be detected in non-transfected HL-60 cells and HL-60Neo cells after 30/35 PCR cycles (data not shown). hER β expression could not be detected in non-transfected HL-60, HL-60 α or HL-60Neo cells but was expressed in HL-60 β and Jurkat cells. It is to be noted that transfection of either hER α or hER β in HL-60 did not influence the expression of the other receptor mRNA (Figure 1a). cDNA reaction efficiency was controlled by amplification of GAPDH mRNA.

Changes in cell growth kinetics of HL-60, HL-60 α , and HL-60 β cells treated with DMSO

Previous studies have shown that HL-60 cells treated with DMSO (1.25%) gradually lose their capacity to proliferate. Growth arrest is due to terminal differentiation of the majority of cells into neutrophil-like cells (36). 24 hours after differentiation, HL-60 cells undergo spontaneous apoptosis like peripheral blood neutrophils (37, 38). We investigated the influence of 17 β -estradiol on proliferation and viability of non-transfected and ER α - or ER β -transfected HL-60 cells induced to differentiate with 1.25% DMSO. Non-induced cells continued to proliferate normally during the 5 days with viability higher than 95% (Figure 2). The growth curves of HL-60 and HL-60 α DMSO-treated cells reached a plateau 2 days after beginning of the treatment and trypan blue exclusion assay showed that cell viability started to decrease (down to 75% at day 5 after beginning of DMSO treatment in both cases) (Figure 3 a-c). These results indicate that,

as expected, DMSO-induced cells no longer have the capacity to proliferate and start to die after differentiation. The growth curve of HL-60 β cells induced with DMSO was slower to reach a plateau. Indeed, HL-60 β cells continued to proliferate until the third day of DMSO treatment (Figure 2c). Moreover, DMSO-treated HL-60 β cells viability never decreased during the 5 days of treatment, staying above 90% (Figure 3c). These last results suggested that ER β somehow compromised cell apoptosis or cell differentiation, or both. 17 β -estradiol treatment (10^{-6} M and 10^{-8} M) did not influence cell proliferation in any cases.

HL-60 cell expressing ER β do not enter apoptosis following DMSO treatment

It has been previously reported that HL-60 cells induced to differentiation toward neutrophils subsequently die by apoptosis (39). To verify if the expression of ER β was compromising apoptosis in DMSO-treated HL-60 cells, we analyzed the DNA content of the cells at day five after beginning of DMSO treatment. Cells were sampled, fixed with PFA, and stained with propidium iodine (PI). Fluorescence was then analyzed by flow cytometry. Cells showing a subdiploid DNA content were considered apoptotic. Table 1 shows that the percentage of HL-60 and HL-60 α DMSO-treated cells undergoing apoptosis increased significantly compared to non-treated HL-60 and HL-60 α cells, reaching values of 29.3 and 25.2 respectively. However, the percentage of HL-60 β -DMSO-treated cells undergoing apoptosis did not increased significantly compared to non-treated HL-60 β cells. These results are in accordance with trypan blue exclusion assay results and demonstrate that ER β expression prevents induction of spontaneous apoptosis in HL-60 cells treated with DMSO for 5 days. Once again, 17 β -estradiol treatments did not influence induction of apoptosis.

HL-60 β cells are less efficient in reducing NBT than HL-60 and HL-60 α cells

To assess whether expression of ER β in HL-60 cells only inhibited apoptosis of differentiated cells or directly interfered with differentiation, we measured daily (day 1 to 5 after beginning of DMSO treatment) the capacity of cells to reduce NBT. HL-60 differentiation into neutrophils induces respiratory burst activity with the conversion of oxygen to superoxide anion (40). NBT reduction test is commonly used to quantitate HL-

60 differentiation since undifferentiated HL-60 cells do not reduce NBT. As expected, the percentage of non-treated cells capable of NBT reduction never went above 5% during the 5 days of DMSO treatment. The percentage of HL-60 and HL-60 α DMSO-treated cells reducing NBT steadily increased during the treatment to reach 65% and 80% respectively at day 5 (Figure 4a,b). On the other hand, the percentage of HL-60 β DMSO-treated cells reducing NBT started to increase 2 days after beginning of DMSO treatment to reach only 40% at day 5 (Figure 4c). Fig. 5d allows for a comparison of the percentages of DMSO-treated HL-60, HL-60 α and HL-60 β capable of NBT reduction. The percentage of HL-60 β DMSO-treated cells capable of NBT reduction was significantly lower ($p < 0.01$) than the percentage of HL-60 and HL-60 α DMSO-treated cells at day 3, 4 and 5 of treatment. This last result suggested that ER β expression could compromise to a certain extent neutrophil differentiation of HL-60 cells, accounting of the low levels of HL-60 β cells undergoing apoptosis at day 5 after beginning of DMSO treatment.

We also found that contrarily to HL-60 β , HL-60 α had a tendency to be more efficient than non-transfected HL-60 in reducing NBT. Strangely, this higher percentage of HL-60 α cells capable of NBT reduction was not paralleled with increased apoptosis, suggesting that ER α expression does not accelerate cell differentiation but could stimulate respiratory burst activity in HL-60 cells not yet terminally differentiated. However, this hypothesis needs to be confirmed. Addition of 17 β -estradiol in medium did not affect significantly cell capacity to reduce NBT in any cases.

CD11b surface expression is not upregulated in DMSO-treated HL-60 β cells

Monocytes and neutrophils express surface receptor CD11b (CR3), the β -subunit of the integrin- $\alpha_M\beta_2$ (MAC-1), important for attachment to C3bi-coated particles and endothelial cells (41, 42). HL-60 cells that have differentiated into neutrophils also express CD11b, but immature HL-60 cells do not (43). To assess whether ER β could also affect the expression of surface marker of differentiation, we quantitated surface CD11b expression on non-treated and DMSO-treated HL-60 β and compared the results with surface CD11b expression on HL-60 and HL-60 α cells. We performed indirect immunofluorescence with a monoclonal antibody (mAb) directed against CD11b, followed by flow cytometry.

There was a significant increase of CD11b expression on HL-60 and HL-60 α DMSO-treated cells compared to non-treated cells, indicating that these cells were indeed differentiating. However, this increase was not seen for HL-60 β DMSO-treated cells (Table 2). 17 β -estradiol treatments did not alter the pattern of CD11b expression for any cell line.

Taken together, the results of NBT reduction and CD11b expression suggest that expression of ER β negatively influence HL-60 cell differentiation into neutrophils.

Morphological study

DMSO treatment of HL-60 cells induces well characterized morphological changes (35). We did a morphological study of non-treated or DMSO-treated HL-60, HL-60 α and HL-60 β cells at day 5 after beginning of treatment using Giemsa-stained cytopsin preparations of randomly sampled cells. Non-treated cells showed, as expected, a promyelocytic morphology (Figure 5a, c, e). In DMSO-induced HL-60 and HL-60 α cells, we observed a striking morphological change characteristic of terminal differentiation of myeloid cells. Differentiated cells were smaller, had larger cytoplasm and exhibited a marked convolution and segmentation of the nuclei, indicating that these cells were indeed becoming neutrophil-like cells (Fig. 5b, d). HL-60 β -induced cells also exhibited larger cytoplasm but their size did not decrease and their nuclei were less segmented compared to HL-60 and HL-60 α induced cells (Figure 5f). These morphological differences suggest once again that the expression of ER β in HL-60 cells affect negatively HL-60 cells capacity to differentiate into neutrophils. 17 β -estradiol treatments did have any impact on the morphological characteristics displayed by induced cells.

Discussion

Numerous studies have shown that immune cell differentiation and maturation can be influenced by estrogens. However, few studies have focused on the potential roles of estrogen receptor alpha (ER α) and the newly characterized estrogen receptor beta (ER β) during such differentiation. Surprisingly, our results demonstrate that estrogen receptors, and most notably ER β , can influence *in vitro* immune cell differentiation in a ligand-independent manner.

Promyeloid HL-60 cells were used as a model of neutrophil differentiation. Our HL-60 subline did not express ER β mRNA and was expressing very low levels of ER α mRNA, allowing us to transfect HL-60 cells with plasmids coding for either ER α or ER β and to study the influence of the overexpression of each of these receptors on DMSO-induced neutrophil differentiation. It has to be noted that previously published results have reported the expression of ER β in HL-60 cells (44). Differences in ER expression between HL-60 sublines may be explained by the chromosomal instability of this cell line (39). The overexpression of ER β in HL-60 cells had many interesting effects on cell differentiation, effects not seen in HL-60 cells or HL-60 cells overexpressing ER α .

A 4-6 day treatment with 1.25% DMSO induces HL-60 cells to terminally differentiate into neutrophil-like cells (36). Once differentiated, these cells can no more proliferate and normally undergo apoptosis after 24 hours. As expected, DMSO-treated HL-60 cells stopped to proliferate after two days of treatment and subsequently started to undergo apoptosis. The same pattern was observed for HL-60 overexpressing ER α (HL-60 α cells). However, DMSO-treated HL-60 cells overexpressing ER β (HL-60 β) continued to proliferate until day three of the DMSO treatment and did not become apoptotic even after five days of treatment (Fig 1, Table 1). Prolonged proliferation and absence of spontaneous apoptosis in HL-60 β cells treated with DMSO suggest that ER β compromises terminal differentiation of HL-60 cells into neutrophils. This hypothesis is supported by the finding that, contrarily to DMSO-treated HL-60 and HL-60 α cells, the percentage of HL-60 β cells capable of nitro blue tetrazolium (NBT) reduction is not

increased by DMSO treatment (Fig 2). Moreover, the expression of neutrophil differentiation marker CD11b is not up-regulated on the surface of DMSO-treated HL-60 β , as it is on surface of HL-60 and HL-60 α cells (Table 2). Increased NBT reduction and CD11b surface expression are two well characterized phenotypic characteristics of HL-60 cells that have been induced to differentiate into neutrophil-like cells (40, 43). The failure of HL-60 β cells to harbour these distinctive characteristics after exposure to DMSO confirms the negative influence of ER β on differentiation of HL-60 cells into neutrophils. Many studies have shown that ER β is often less effective in gene transcription transactivation than ER α , sometimes even acting as negative dominant regulator of ER α activity (45-48). It is therefore possible that the overexpression of ER β in an immature cell could lead to the partial or complete inhibition of transcription of genes necessary for normal cell differentiation. As mentioned earlier, HL-60 cells endogenously express low levels of ER α . It is therefore most likely that there is formation of ER α /ER β heterodimers in HL-60 β cells. Heterodimer formation may block the activity of ER α , consequently amplifying the negative effect of ER β on gene transcription transactivation.

Morphological studies shows that, as expected, HL-60 cells treated with DMSO acquire the morphological characteristics of neutrophil-like cells, as assessed by the reduction in size, the decrease of chromatin/cytoplasm ratio, and the segmentation of the nuclei (40). There are no marked differences between the morphology of HL-60, HL-60 α and HL-60 β undifferentiated cell or between HL-60 and HL-60 α DMSO-treated cells. However, DMSO-treated HL-60 β shows aberrant nuclei shape and no reduction of cell size, suggesting that differentiation into neutrophil-like cells is somehow deficient compared to HL-60 and HL-60 α cells. The morphological studies lend additional support for our hypothesis that ER β acts as a repressor of neutrophil differentiation.

Interestingly, the suppressive effects of ER β on neutrophil differentiation do not depend on the presence of estradiol. In fact, estradiol treatments (10^{-8} M and 10^{-6} M) did not significantly influence any results during this series of experiments, whether HL-60 cells were overexpressing ER α , ER β , or not expressing ERs. These observations correlate with

other studies that have shown that estradiol treatments in mice do not directly alter differentiation of bone marrow myeloid precursors into neutrophils (23, 49, 50). However, estradiol-treated mice have a tendency to develop neutropenia. Since estradiol does not influence mature neutrophil survival *in vitro* (51), it is probable that the observed diminution of the peripheral neutrophil population is mediated via estradiol effects on hematopoietic microenvironment.

Many studies have shown that ERs can be activated in a ligand-independent manner, usually by phosphorylation of the receptor (52-54). Therefore, the suppressive effect of the overexpression of ER β on DMSO-induced neutrophil differentiation of HL-60 cells could be due to ligand-independent phosphorylation of the receptor. Activated ER β s could then activate or interfere with other transcriptional pathways. For example, it has been demonstrated that AP-1 activity is decreased in HL-60 cells undergoing DMSO-induced differentiation into neutrophils (55). Although ER β has been found to inhibit transcription from an AP-1 site when coupled to E₂, it has the opposite effect when coupled to anti-estrogens like tamoxifen (56). Aberrant activation of ER β by ligand-independent mechanisms could lead to alterations of AP-1 activity and deregulation of cell differentiation. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B block CD11b expression and alter adhesion properties of DMSO-treated HL-60 (57). ER β has also been found to be able to inhibit the NF-kappa B pathway (58). Therefore, inhibition of NF-kappa B activity by overexpressed ER β could explain, at least in part, the absence of CD11b up-regulation observed for DMSO-treated HL-60 β cells. The reason why overexpression of ER α does not result in repression of differentiation is probably related to the differences in transcriptional activities between the two estrogen receptors.

Lately, aberrant ER expression has been associated with deregulation of cell proliferation in many types of cancer (59-61). Although 17 β -estradiol itself does not seem to have sensible effects on neutrophil maturation, it was important to verify if overexpression of its receptors could influence myelocytic differentiation. As we have shown, overexpression of ER β can block HL-60 cell differentiation. It is therefore possible that aberrant ER expression in immature or mature immune cells could contribute to immune-

related diseases, independently of the presence of estrogens. How the expression of ER α and ER β is modulated throughout myeloid maturation into mature immune cells is not well known. Our findings may give important clues to the understanding of how estrogen receptor expression in immune cells can be implicated in development of conditions like neutropenia that have been associated with autoimmune diseases. Further studies on the role of ERs in immune cells may lead to new therapy options in treatment of immune diseases.

Acknowledgments

We thank Professor Benita S. Katzellenbogen for the gift of the pCMV5-hER α plasmid and Professor Jan-Åke Gustafsson for the gift of the pSG5-hER β plasmid.

Legend

Figure 1. RT-PCR analysis of mRNA expression. Expression of hER α (A) and hER β (B) mRNA expression in non-transfected and transfected HL-60 cells was analysed. The length of the amplification product is reported on the right of each panel. Jurkat mRNA was used as positive control (C). Data of a representative experiment are shown here.

Figure 2. The effect of hER α and hER β expression on proliferation of DMSO-treated HL-60 cells. 1.25% DMSO was added to cell culture media at day 0 and cell number was measured by trypan blue exclusion on a cell counter grid. (A, B) Proliferation of HL-60 and HL-60 α cells: non-treated cells (\blacklozenge) continued to proliferate while DMSO-treated cells plus vehicle (\blacksquare), E $_2$ (10^{-8} M) (\times) and E $_2$ (10^{-6} M) (\blacktriangle) stopped increasing at day 2 after DMSO addition. (C) Proliferation of HL-60 β cells: non-treated cells continued to proliferate while treated cell population stopped increasing at day 3 after DMSO addition. The results are given as mean \pm SD of 6 different cell concentration counts from two independent experiments

Figure 3. The effect of hER α and hER β expression on viability of DMSO-treated HL-60 cells. 1.25% DMSO was added to cell culture media at day 0 and cell viability was measure daily by trypan blue exclusion under light microscopy. (A, B) Viability of non-treated (\blacklozenge) HL-60 and HL-60 α cells always stayed above 95% while viability of treated cells plus vehicle (\blacksquare) or E $_2$ (10^{-8} M) (\blacktriangle) steadily decreased during the treatment. (C) Percentage of viable DMSO-treated HL-60 β cells did not decrease compared to non-treated cells. The results are given as percent of viable cell (mean \pm SD) of 6 different counts from two independent experiments.

Figure 4. The effect of hER α and hER β expression on NBT reduction of DMSO-treated HL-60 cells. The percentage of cells capable of NBT reduction was assessed daily over the 5 days of the DMSO treatment. (A, B) The percentage of non-treated (\blacklozenge) HL-60 and HL-60 α cells reducing NBT never went over 5% while the percentage of treated cells plus vehicle (\blacksquare), E $_2$ (10^{-8} M) (\times) or E $_2$ (10^{-6} M) (\blacktriangle) steadily increased to reach

65 and 80% at day 5. (C) The percentage of treated HL-60 β capable of NBT reduction increased more slowly, reaching only 40% at day 5. (D) Comparison of the percentage of HL-60 (•), HL-60 α (■) and HL-60 β (●) cells positives for NBT reduction after five days of DMSO treatment in presence of vehicle only. The differences in NBT reduction capacity at day 3, 4 and 5 of DMSO treatment in presence of vehicle only were shown to be statistically significant ($p < 0.01$) by using a Mann-Whitney non-parametric test. The results are given as percent of cell positive for NBT reduction (mean \pm SD) of 6 different counts from two independent experiments.

Figure 5. The effect of hER α and hER β expression on the morphology of DMSO-treated HL-60 cells. Photomicrographs of Giemsa-stained cytospin preparations of non-treated and DMSO-treated cells taken at day 5 after beginning of DMSO treatment are shown here. (A, C, E) HL-60, HL-60 α and HL-60 β non-treated cells respectively. (B, D, F) HL-60, HL-60 α and HL-60 β DMSO-treated cells respectively. Scale bar, 20 μ m.

Table 1. The effect of hER α and hER β expression on mortality of DMSO-treated HL-60 cells. Cell mortality was assessed at day 5 after addition of DMSO by flow cytometry analysis of PI incorporation into DNA of fixed cells. Cells were considered dead when the quantity of PI incorporation was under the value of cells in G0. Results are given as percent of dead cells (mean \pm SD) of two independent experiments.

Table 2. The effect of hER α and hER β expression on CD11b expression on DMSO-treated HL-60 cells. Cells were treated with 1.25% DMSO for 5 days and analysed by flow cytometry for CD11b cell-surface expression at day 5. The results are given as percent of cells positive of CD11b expression (mean \pm SD) of two different experiments.

Figure 1.

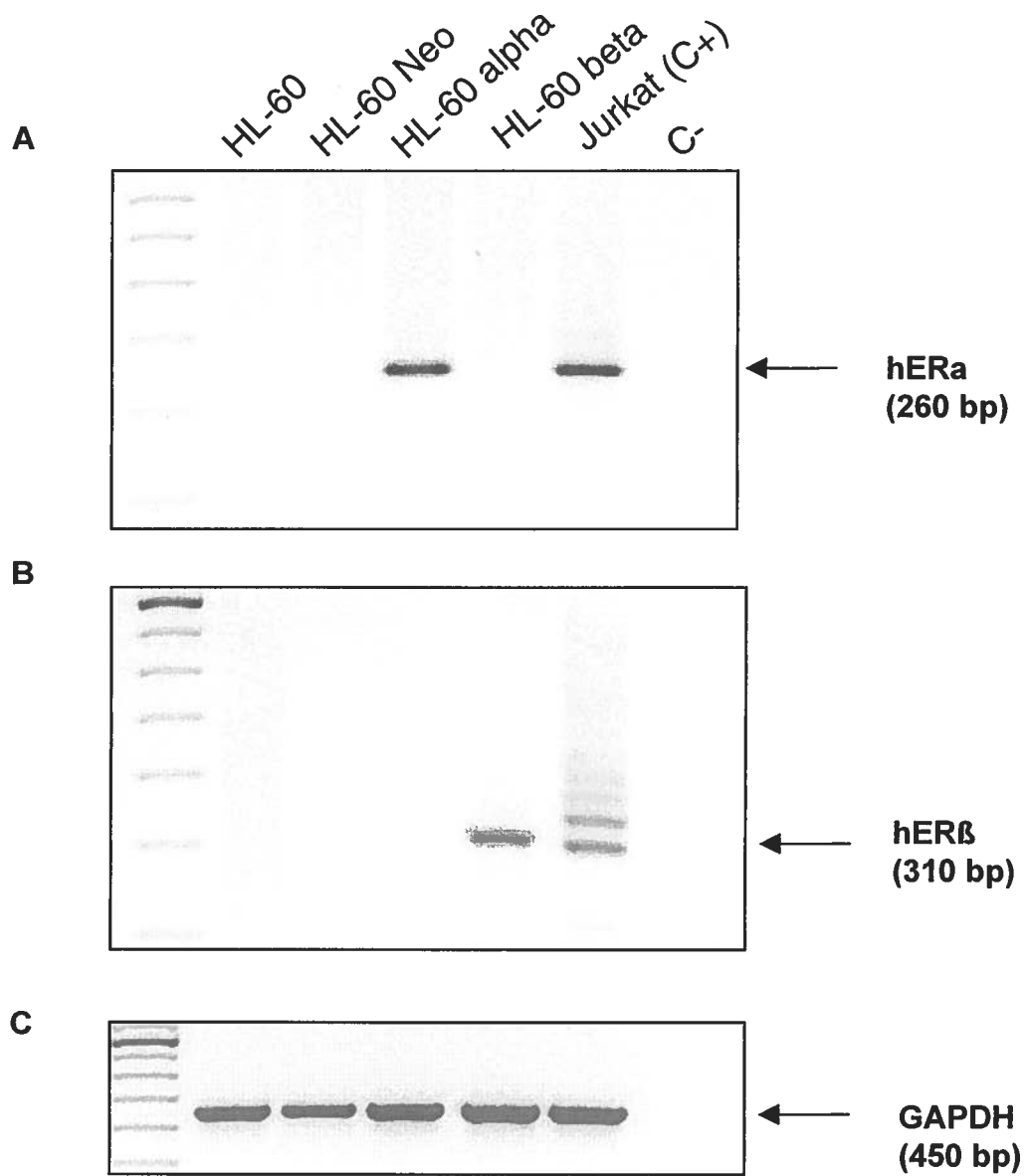


Figure 2.

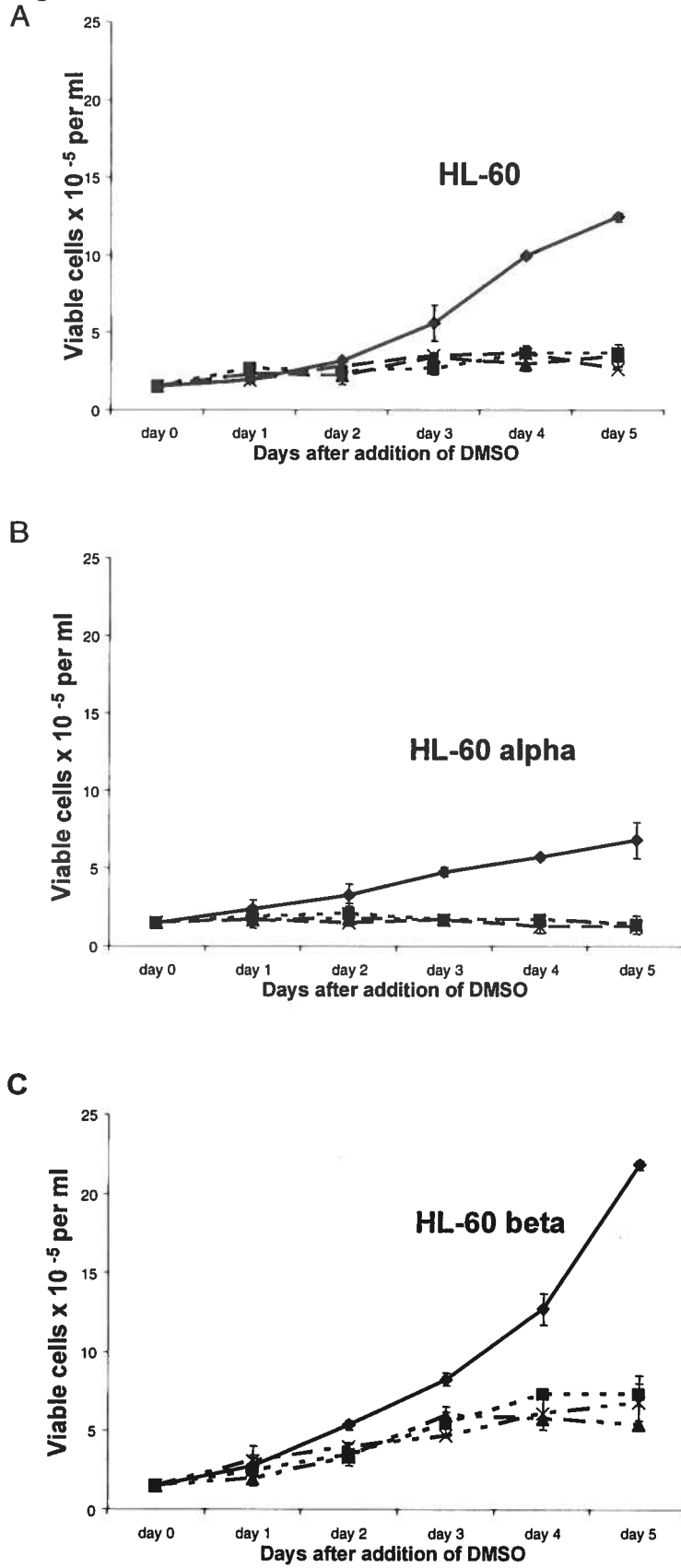


Figure 3.

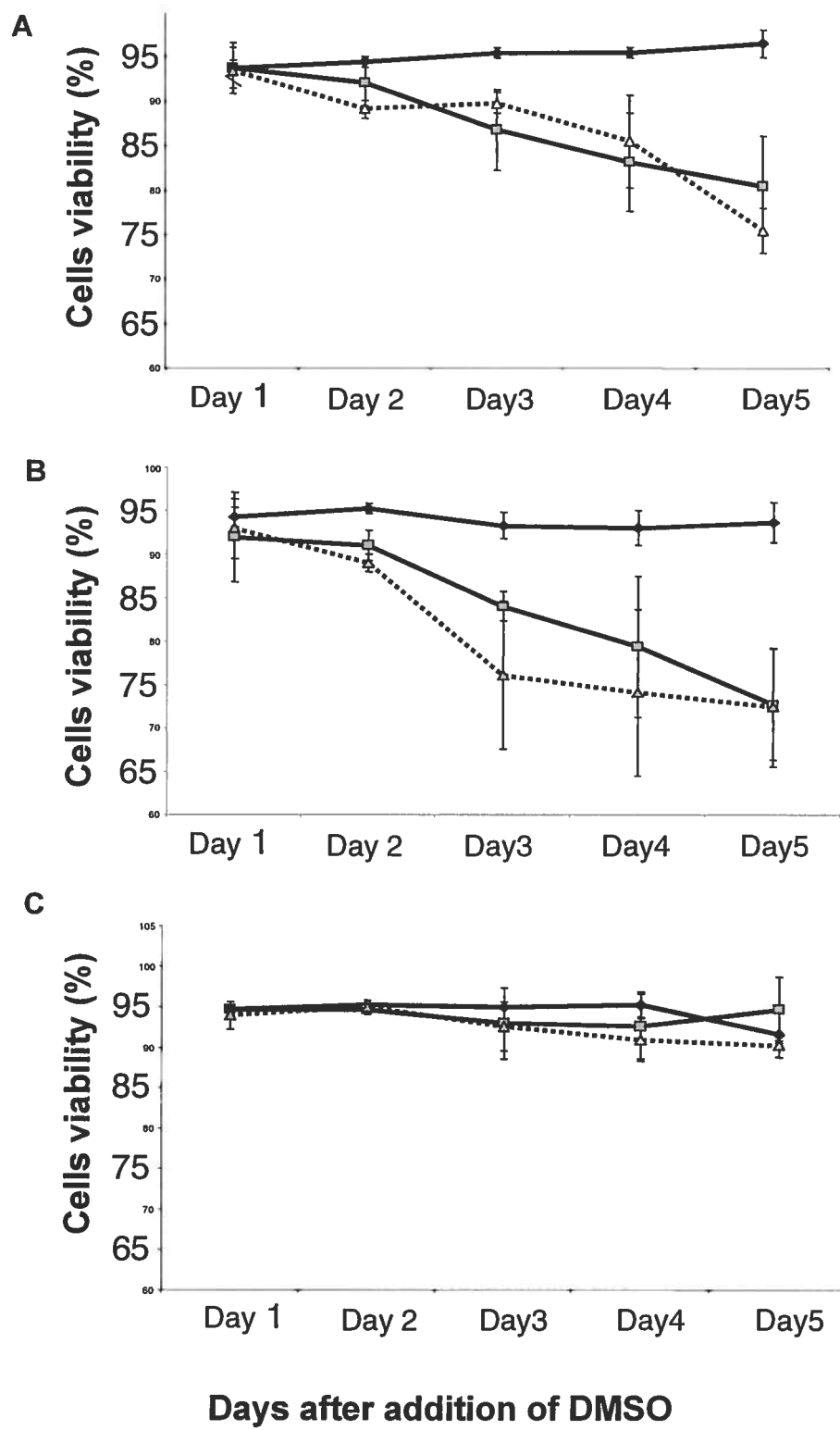


Figure 4.

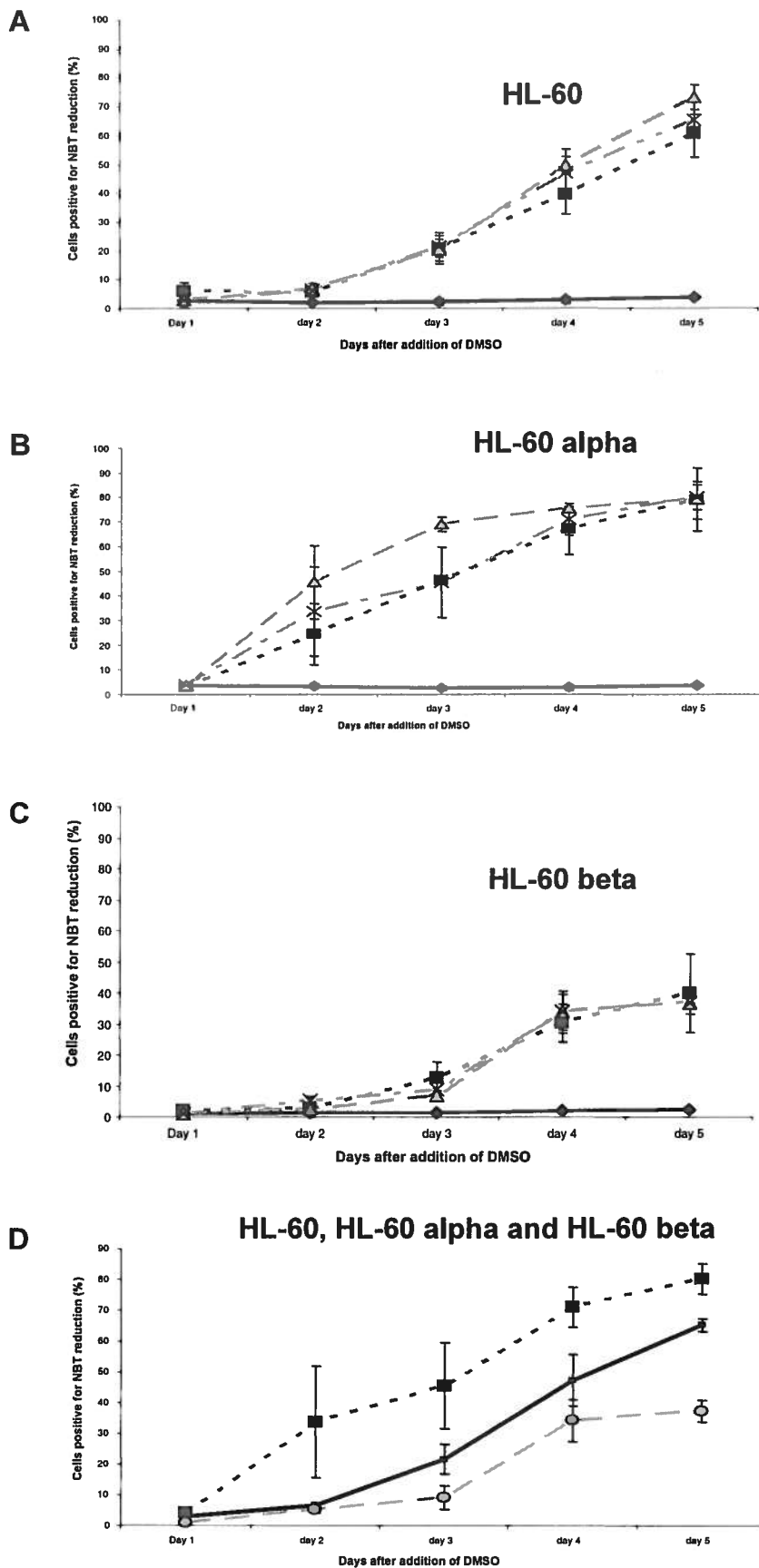


Figure 5.

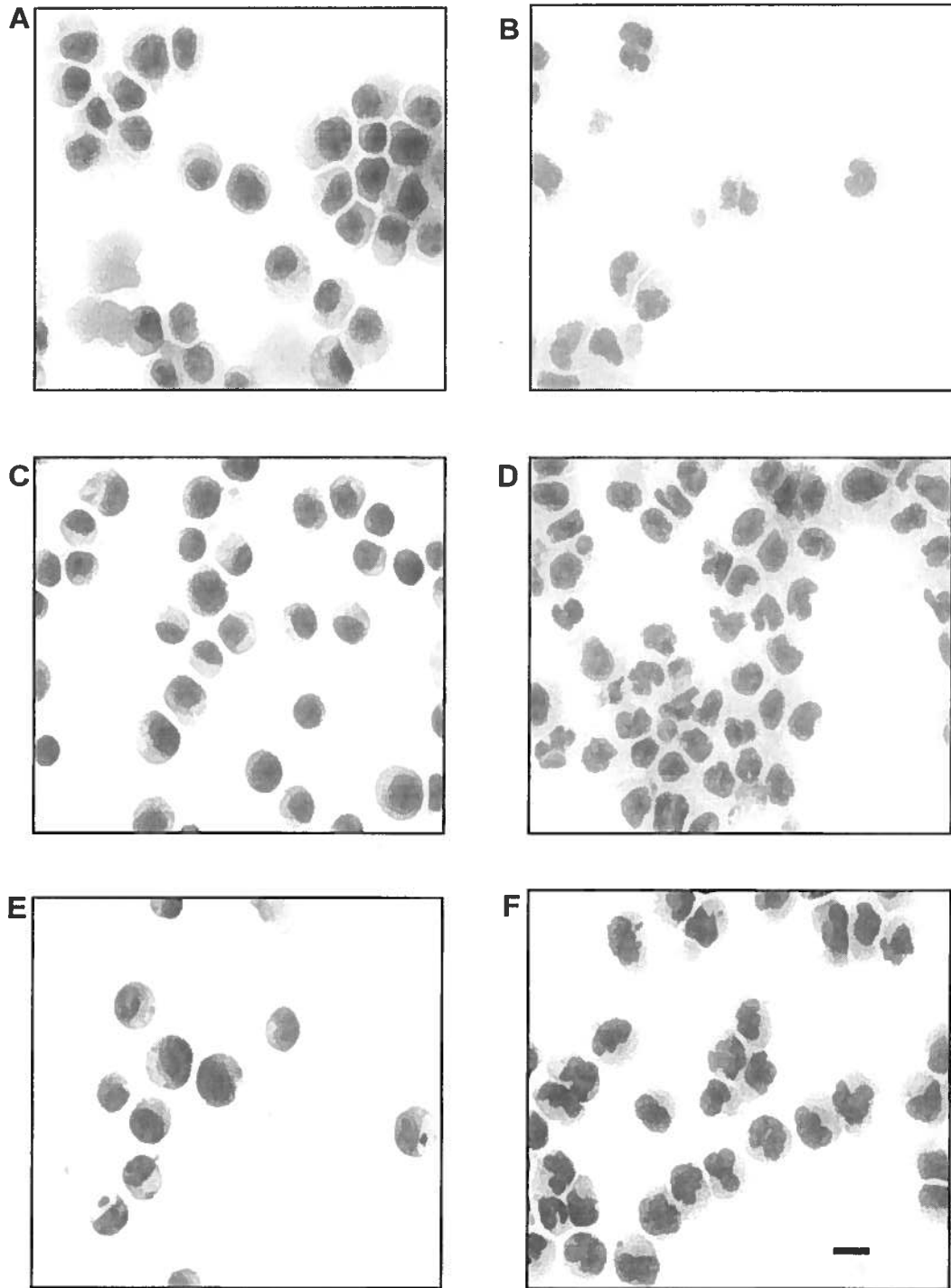


Table 1.

Cellular mortality

Cells	Treatment	Cell death (%)
HL-60	None	7.0 ± 0
	DMSO+V	28.4 ± 5
	DMSO+E ₂ (10-8M)	29.3 ± 9
HL-60 a	None	5.9 ± 3
	DMSO+V	20.9 ± 2
	DMSO+E ₂ (10-8M)	25.2 ± 6
HL-60 B	None	4.2 ± 2
	DMSO+V	9.3 ± 8
	DMSO+E ₂ (10-8M)	4.4 ± 1

Table 2.**Cell surface expression of CD11b**

Cells	Treatment	Cells expressing CD11b (%)
HL-60	None	4.1 ± 3
	DMSO+V	34.2 ± 1
	DMSO+E ₂ (10 ⁻⁸ M)	26.6 ± 2
HL-60 a	None	3.4 ± 4
	DMSO+V	27.3 ± 1
	DMSO+E ₂ (10 ⁻⁸ M)	25.9 ± 8
HL-60 β	None	2.5 ± 3
	DMSO+V	6.9 ± 8
	DMSO+E ₂ (10 ⁻⁸ M)	4.9 ± 5

Reference List

1. Butterworth, M., McClellan, B., and Allansmith, M. (1967) Influence of sex in immunoglobulin levels. 214, 1224-5.
2. Eidinger, D. and Garrett, T.J. (1972) Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. 136, 1098-116.
3. Mikkelsen, W.M., Dodge, H.J., Duff, I.F., and Kato, H. (1967) Estimates of the prevalence of rheumatic diseases in the population of Tecumseh, Michigan, 1959-60. 20, 351-69.
4. Furszyfer, J., Kurland, L.T., McConahey, W.M., Woolner, L.B., and Elveback, L.R. (1972) Epidemiologic aspects of Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease in Rochester, Minnesota (1935-1967), with special reference to temporal trends. 21, 197-204.
5. Sherlock, S. and Scheuer, P.J. (1973) The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis. 289, 674-8.
6. Inman, R.D. (1978) Immunologic sex differences and the female predominance in systemic lupus erythematosus. 21, 849-52.
7. Hochberg, M.C. and Spector, T.D. (1990) Epidemiology of rheumatoid arthritis: update. 12, 247-52.
8. Lahita, R.G. (1996) The connective tissue diseases and the overall influence of gender. 41, 156-65.
9. Ostensen, M., Aune, B., and Husby, G. (1983) Effect of pregnancy and hormonal changes on the activity of rheumatoid arthritis. 12, 69-72.
10. Latman, N.S. (1983) Relation of menstrual cycle phase to symptoms of rheumatoid arthritis. 74, 957-60.

11. Ostensen, M. and Husby, G. (1984) Pregnancy and rheumatic disease. A review of recent studies in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. 62, 891-5.
12. Elbourne, K.B., Keisler, D., and McMurray, R.W. (1998) Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. 7, 420-7.
13. Holmdahl, R., Jansson, L., Meyerson, B., and Klareskog, L. (1987) Oestrogen induced suppression of collagen arthritis: I. Long term oestradiol treatment of DBA/1 mice reduces severity and incidence of arthritis and decreases the anti type II collagen immune response. 70, 372-8.
14. Bebo, B.F. Jr, Fyfe-Johnson, A., Adlard, K., Beam, A.G., Vandebark, A.A., and Offner, H. (2001) Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. 166, 2080-9.
15. Jansson, L., Olsson, T., and Holmdahl, R. (1994) Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. 53, 203-7.
16. Phuc, L.H., Papiernik, M., Berrih, S., and Duval, D. (1981) Thymic involution in pregnant mice. I. Characterization of the remaining thymocyte subpopulations. 44, 247-52.
17. Screpanti, I., Morrone, S., Meco, D., Santoni, A., Gulino, A., Paolini, R., Crisanti, A., Mathieson, B.J., and Frati, L. (1989) Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. 142, 3378-83.
18. Rijhsinghani, A.G., Bhatia, S.K., Tygrett, L.T., and Waldschmidt, T.J. (1996) Effect of pregnancy on thymic T cell development. 35, 523-8.
19. Narita, J., Miyaji, C., Watanabe, H., Honda, S., Koya, T., Umezu, H., Ushiki, T., Sugahara, S., Kawamura, T., Arakawa, M., and Abo, T. (1998) Differentiation of

forbidden T cell clones and granulocytes in the parenchymal space of the liver in mice treated with estrogen. 185, 1-13.

20. Medina, K.L., Smithson, G., and Kincade, P.W. (1993) Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. 178, 1507-15.
21. Masuzawa, T., Miyaura, C., Onoe, Y., Kusano, K., Ohta, H., Nozawa, S., and Suda, T. (1994) Estrogen deficiency stimulates B lymphopoiesis in mouse bone marrow. 94, 1090-7.
22. Medina, K.L., Strasser, A., and Kincade, P.W. (2000) Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. 95, 2059-67.
23. Josefsson, E., Tarkowski, A., and Carlsten, H. (1992) Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. 142, 67-78.
24. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. 93, 5925-30.
25. Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. 392, 49-53.
26. Suenaga, R., Evans, M.J., Mitamura, K., Rider, V., and Abdou, N.I. (1998) Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. 25, 1305-12.
27. Smithson, G., Medina, K., Ponting, I., and Kincade, P.W. (1995) Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture. 155, 3409-17.
28. Igarashi, H., Kouro, T., Yokota, T., Comp, P.C., and Kincade, P.W. (2001) Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. 98, 15131-6.

29. Garcia-Duran, M., de Frutos, T., Diaz-Recasens, J., Garcia-Galvez, G., Jimenez, A., Monton, M., Farre, J., Sanchez de Miguel, L., Gonzalez-Fernandez, F., Arriero, M.D., Rico, L., Garcia, R., Casado, S., and Lopez-Farre, A. (1999) Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. 85, 1020-6.
30. Vegeto, E., Bonincontro, C., Pollio, G., Sala, A., Viappiani, S., Nardi, F., Brusadelli, A., Viviani, B., Ciana, P., and Maggi, A. (2001) Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. 21, 1809-18.
31. Cutolo, M., Accardo, S., Villaggio, B., Barone, A., Sulli, A., Coviello, D.A., Carabbio, C., Felli, L., Miceli, D., Farruggio, R., Carruba, G., and Castagnetta, L. (1996) Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. 81, 820-7.
32. Curran, E.M., Berghaus, L.J., Verneti, N.J., Saporita, A.J., Lubahn, D.B., and Estes, D.M. (2001) Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor- alpha-mediated pathway. 214, 12-20.
33. Collins, S.J., Gallo, R.C., and Gallagher, R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. 270, 347-9.
34. Collins, S.J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. 70, 1233-44.
35. Wilkinson, R.F. (1993) Art to Science in Tissue Culture, HyClone Laboratories, Inc. 12 (3/4), 6.
36. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. (1978) Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. 75, 2458-62.
37. Santos-Beneit, A.M. and Mollinedo, F. (2000) Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during

neutrophil differentiation of HL-60 cells. 67, 712-24.

38. Watson, R.W., Rotstein, O.D., Parodo, J., Bitar, R., Hackam, D., and Marshall, J.C. (1997) Granulocytic differentiation of HL-60 cells results in spontaneous apoptosis mediated by increased caspase expression. 412, 603-9.
39. Martin, S.J., Bradley, J.G., and Cotter, T.G. (1990) HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. 79, 448-53.
40. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C. (1979) Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. 149, 969-74.
41. Arnaout, M.A., Todd, R.F. 3rd, Dana, N., Melamed, J., Schlossman, S.F., and Colten, H.R. (1983) Inhibition of phagocytosis of complement C3- or immunoglobulin G-coated particles and of C3bi binding by monoclonal antibodies to a monocyte- granulocyte membrane glycoprotein (Mol). 72, 171-9.
42. Beller, D.I., Springer, T.A., and Schreiber, R.D. (1982) Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. 156, 1000-9.
43. Hickstein, D.D., Back, A.L., and Collins, S.J. (1989) Regulation of expression of the CD11b and CD18 subunits of the neutrophil adherence receptor during human myeloid differentiation. 264, 21812-7.
44. Hughes, P.J., Twist, L.E., Durham, J., Choudhry, M.A., Drayson, M., Chandraratna, R., Michell, R.H., Kirk, C.J., and Brown, G. (2001) Up-regulation of steroid sulphatase activity in HL60 promyelocytic cells by retinoids and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. 355, 361-71.
45. Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., and Giguere, V. (1997) Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. 11, 353-65.
46. McInerney, E.M., Weis, K.E., Sun, J., Mosselman, S., and Katzenellenbogen, B.S.

- (1998) Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. 139, 4513-22.
47. Cowley, S.M. and Parker, M.G. (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. 69, 165-75.
 48. Pettersson, K., Delaunay, F., and Gustafsson, J.A. (2000) Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. 19, 4970-8.
 49. Crandall, T.L., Joyce, R.A., and Boggs, D.R. (1980) Estrogens and hematopoiesis: characterization and studies on the mechanism of neutropenia. 95, 857-67.
 50. Medina, K.L., Garrett, K.P., Thompson, L.F., Rossi, M.I., Payne, K.J., and Kincade, P.W. (2001) Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. 2, 718-24.
 51. Nittoh, T., Fujimori, H., Kozumi, Y., Ishihara, K., Mue, S., and Ohuchi, K. (1998) Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. 354, 73-81.
 52. Smith, C.L., Conneely, O.M., and O'Malley, B.W. (1993) Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. 90, 6120-4.
 53. Newton, C.J., Buric, R., Trapp, T., Brockmeier, S., Pagotto, U., and Stalla, G.K. (1994) The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals. 48, 481-6.
 54. Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., and et, a.l. (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen- activated protein kinase. 270, 1491-4.
 55. Mollinedo, F., Gajate, C., Tugores, A., Flores, I., and Naranjo, J.R. (1993) Differences in expression of transcription factor AP-1 in human promyelocytic HL-

- 60 cells during differentiation towards macrophages versus granulocytes. 294 (Pt 1), 137-44.
56. Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. 277, 1508-10.
 57. Sokoloski, J.A., Sartorelli, A.C., Rosen, C.A., and Narayanan, R. (1993) Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. 82, 625-32.
 58. Pelzer, T., Neumann, M., de Jager, T., Jazbutyte, V., and Neyses, L. (2001) Estrogen effects in the myocardium: inhibition of NF-kappaB DNA binding by estrogen receptor-alpha and -beta. 286, 1153-7.
 59. Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (1998) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. 58, 3197-201.
 60. Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., and Vignon, F. (2001) ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. 142, 4120-30.
 61. Roger, P., Sahla, M.E., Makela, S., Gustafsson, J.A., Baldet, P., and Rochefort, H. (2001) Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. 61, 2537-41.

Troisième partie

Conclusion

Les estrogènes peuvent moduler la réponse immunitaire. Cette modulation passe en partie par l'influence de ces hormones sur la maturation des cellules immunitaires dans les organes tels le thymus et la moelle osseuse. Puisque la plupart des cellules immunitaires matures et immatures expriment des ERs, il est possible que les estrogènes agissent directement sur ces cellules pour moduler leur différenciation.

Le but de cet étude était d'étudier les effets de l'expression des deux récepteurs estrogènes, ER α et ER β , sur la différenciation d'une cellule immunitaire. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules HL-60, HL-60 α et HL-60 β que nous avons exposées au diméthyl sulfoxyde (DMSO) pour induire leur différenciations en neutrophiles. Les cellules étaient simultanément incubées avec différentes concentrations de 17 β -estradiol pour étudier les effets de cette hormone sur l'activité des ERs. Il est à noter que la concentration de 17 β -estradiol est ajustée au jour 1 de la différenciation seulement. Le 17 β -estradiol est très rapidement métabolisé dans l'organisme (une demi-vie d'environ 30 minutes). La demi-vie du 17 β -estradiol *in vitro* est de l'ordre de 6-12 heures, dépendamment du milieu de culture et des cellules. Une

Nos résultats démontrent que la surexpression de ER β dans les cellules promyéloïdes HL-60 influence négativement la différenciation de ces cellules en neutrophiles. Cette influence est ligand indépendante puisque l'ajout de différentes concentrations de 17 β -estradiol dans le milieu n'a pas affecté les résultats. Ces résultats montre pour la première fois que l'expression de ER β dans les cellules promyéloïdes peut influencer leur différenciation *in vitro*, indépendamment de la présence d'estradiol dans le milieu de culture.

Il est cependant important de noter qu'étant donné la rareté d'anticorps commerciaux dirigés contre les ERs, il nous a été impossible de vérifier par buvardage Western la présence des protéines ER α et ER β dans les cellules transfectées durant l'étude. Il faut donc souligner que cette étude ne tient pas compte des possibles variations dans les

niveaux de transcription des plasmides transfectés. Ainsi, les effets inhibiteurs de la surexpression de ER β observés chez les cellules HL-60 pourraient être du en partie à une meilleure transcription des ARN messagers de ER β , comparativement aux ARN messagers de ER α .

L'absence d'effets Le récepteur ER β été caractérisé en 1996 et l'on sait très peu de chose quant à son rôle dans les cellules immunitaires. L'expression aberrante de ER β dans les cellules cancéreuses a déjà été associée à une modulation de la prolifération de ces cellules. Il a également été démontré que ER β inhibe la différenciation des ostéoclastes et des ostéoblastes (voir article #1, discussion). Il est possible que l'expression aberrante de ER β dans les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes puissent compromettre le cours normale de maturation de ces cellules et contribuer au développement de conditions immunitaires anormales comme la neutropénie pouvant entraîner des maladies immunitaires plus graves.

Les mécanismes ligand-indépendants par lesquels ER β régule la différenciation des cellules HL-60 en neutrophils ne sont pas connus. Plusieurs études ont montré que ER β est généralement un activateur de transcription moins efficace que ER α , allant même jusqu'à jouer le rôle d'un régulateur négatif dominant de ER α dans certaines conditions (voir article, section discussion). Il est donc possible que la surexpression de ER β dans les cellules promyéloïdes HL-60 puisse mener à l'inhibition partielle ou totale de la transcription de gène nécessaire à la différenciation normale des cellules.

Les corégulateurs de transcriptions se liant avec les récepteurs estrogènes pour activer la transcription sont également impliqués dans plusieurs autres voies signalétiques, notamment celles d'autres récepteurs d'hormones. Ainsi, un des mécanismes par lequel les ER β pourraient inhiber la différenciation des cellules HL-60 est la compétition pour les corégulateurs de transcription. Privé de leurs coactivateurs, plusieurs facteurs de transcription ne pourraient plus activer efficacement la transcription de gènes nécessaire à la maturation des cellules myéloïdes. Comme certains corégulateurs ont plus d'affinité

pour ER β que pour ER α , la surexpression de ce dernier ne causerait pas le même degré de compétition, laissant assez de coactivateurs libres pour les autres facteurs de transcription.

Il est également possible que les conditions de culture favorisent l'activation par phosphorylation des récepteurs estrogènes. En effet, la phosphorylation des récepteurs estrogènes peut mener à leur activation et ce, même en absence de ligand. Cependant, les sites de phosphorylation de ER α et de ER β ne sont pas tous les mêmes (voir revue de la littérature, section 2.3.3.). Ainsi, il est possible que les conditions de culture favorisent la phosphorylation de ER β et, par le fait même, son activation.

Un autre mécanisme pouvant expliquer les différentes influences de ER α et de ER β sur la différenciation des cellules HL-60 est l'activation de voies de signalisation non classiques. Par exemple, il a été démontré que l'activité de AP-1 dans les cellules HL-60 induites à différencier en neutrophiles par exposition au DMSO est réduite comparativement aux cellules non exposées au DMSO (voir article #1, discussion). Bien qu'il ait été démontré qu'en présence d'estradiol les ER β inhibent la transcription à partir de sites AP-1, ces récepteurs peuvent également activer la transcription à partir de ces sites en présence d'anti-estrogènes. Il serait donc possible qu'une activation ligand-indépendante des ER β par phosphorylation ait un effet positif sur l'activité des AP-1 et mène à une dérégulation des mécanismes de différenciation. Parce que ER α n'a pas les mêmes activités transcriptionnelles à partir des sites AP-1, cette dérégulation ne serait pas présente chez les cellules HL-60 α .

NF-kappa B est une autre voie de signalisation non classique qui pourrait être affectée différemment par les ER α et les ER β . Il a été démontré qu'un blocage de la voie NF-kappa B lors de la différenciation de cellules HL-60 en neutrophiles inhibe l'expression du marqueur de différenciation CD11b. Les récepteurs estrogènes influencent différemment l'activité de la voie NF-kappa B (voir revue de la littérature, section 2.3.2.). Comme pour la voie AP-1, une différence d'activation de la voie NF-kappa B entre les cellules HL-60 α

et HL-60 β pourrait mener aux différences observées quant à la différenciation des cellules en neutrophiles.

Finalement, il est évident que des recherches plus avancées sur le sujet seront nécessaires pour mettre en lumière les mécanismes par lesquels les récepteurs estrogènes influencent la différenciation des cellules immunitaires. Il est également évident que ces recherches devront tenir compte non seulement des voies de signalisation ligand-dépendantes, mais également des voies ligand-indépendantes, voies dont on ne sait que très peu de chose à ce jour. De plus, le fait que certaines cellules non immunitaires, comme les cellules présentatrice d'antigène et certaines cellules épithéliales, expriment elles aussi des ERs, il faudra considérer les effets des estrogènes sur ces cellules et leurs répercussion sur les cellules immunitaires environnantes. Une meilleure connaissance des rôles de chaque ER lors de la maturation et la différenciation cellulaire pourra sans doute nous permettre d'élargir nos options quant aux thérapies offertes pour traiter certaines pathologies immunitaires.

Appendice A :

Expérience sur les cultures de thymus de fétus de souris

Appendice A: Résumé des expériences sur les cultures de thymus de fœtus de souris

Les estrogènes ont des effets importants sur le thymus et les populations cellulaires thymiques. Il a été observé lors de la grossesse, alors que les concentrations d'estrogènes dans le sang décuplent, que le thymus s'atrophie et la population de thymocytes double négatifs (CD4⁻, CD8⁻) décline. Cette atrophie thymique est également observée chez les souris gestantes et les souris non gestantes ayant reçu de fortes doses d'estradiol. Il est reconnu que les effets des estrogènes sont principalement médiés par l'entremise de deux récepteurs nucléaires : ER α et ER β . Il est donc très probable que les ERs aient un rôle à jouer dans le mécanisme de l'atrophie thymique causé par les estrogènes.

ER α a depuis longtemps été détecté dans le thymus, autant chez l'humain que chez le rat et la souris. Jusqu'à très récemment, ce récepteur était tenu comme seul responsable des effets des estrogènes sur le thymus. Toutefois, une étude récente a démontré qu'une atrophie thymique se produit également chez des souris ER α ^{-/-} (ERKO) exposées à l'estradiol (Staples *et al*, 1999). Chez ces souris, l'absence de ER α pourrait peut-être être compensée par la présence de ER β dans le thymus. ER β a été détecté dans les thymus humains et de rats (Mosselman *et al*, 1996, Kuiper *et al*, 1996). Cependant, deux études utilisant la détection par buvardage Northern et protection d'ARN (RNase protection assay) n'ont pas décelé la présence de ce récepteur dans les thymus de souris (Tremblay *et al*, 1997, Couse *et al*, 1997).

Cette série d'expérimentations sur les cultures de thymus de fœtus de souris avait donc pour buts de (1) vérifier par RT-PCR (une méthode de détection plus sensible) la présence de ER β dans les thymocytes de souris et (2) analyser l'effet d'une exposition au 17 β -estradiol sur l'expression des ERs dans les thymocytes de souris.

Les résultats de notre étude montre que les thymocytes de fœtus de souris expriment l'ARN messager de ER α et ER β (Figures 7 et 8). De plus, l'addition de 17 β -estradiol cause une augmentation de l'expression de l'ARN messager de ER α dans les thymocytes (Figure 9).

Notre étude montre pour la première fois que ER β est exprimé dans le thymus des souris C57BL/6. Cette expression a été mesurée par RT-PCR et l'identité de l'ARN messenger a été confirmée par séquençage. L'amplification des ARNs messagers a l'avantage d'être beaucoup plus sensible que les méthodes de détection employées précédemment et explique probablement pourquoi, contrairement aux autres études, nous avons détecté la présence de l'ARN messenger de ER β dans le thymus de souris. Il reste cependant à déterminer si la protéine ER β est également exprimée dans cet organe. La présence de ER β dans le thymus pourrait expliquer pourquoi les estrogènes causent l'atrophie du thymus chez les souris ERKO. L'étude de cette hypothèse pourrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à l'induction de l'atrophie thymique par les estrogènes.

Notre étude montre également que la présence de 17 β -estradiol dans le milieu de culture induit une augmentation de l'expression de ER α dans les thymus. Les effets de cette augmentation ainsi que les mécanismes conduisant à cette augmentation ne sont pas encore connus et seront le sujet de futures études.

Appendice A : Matériels et méthodes

Souris

Les couples de souris C57BL/6 ont été achetés chez Charles River Labs (Wilmington, MA, USA). Les animaux ont ensuite été accouplés pour obtenir des femelles gestantes. Les embryons de souris ont été prélevés au jour 15 de la gestation.

Culture de thymus provenant de fœtus de souris

La méthode de culture des thymus c'est fait comme suit : huit à dix lobes de thymus étaient prélevés stérilement sur les fœtus de souris âgés de quinze jours et placés sur des membranes filtres Whatman Nucleopore Track-Etch (épaisseur : 25 μ m, grandeur des pores : 0.8 μ m) supportées par des blocs Surgical Gelfoam (Pharmacia & Upjohn, NJ, USA) baignant dans 3ml de milieu dans des flacons de cultures de tissus à six puits à fond plat (Sarstedt, NC, USA). Le milieu dans lequel les lobes de thymus étaient cultivés est un milieu Bio Media RPMI 1640 sans rouge de phénol et supplémenté avec 10% de sérum foetal désactivé (FBS, Bio Media, Canada) et traité au charbon/dextran pour diminuer les quantités endogènes d'hormones stéroïdes. Le milieu contenait également des antibiotiques Pen/Strept (100 μ g/ml) (Bio Media), de l'HEPES (10mM) (Bio Media) et de la Glutamine (2mM). 0.1nM de 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, Canada) était ajouté aux cultures en utilisant comme véhicule 0.1% EtOH (100%). Les cultures étaient conservées dans un environnement humide, à une température de 37°C et contenant 5% CO₂. Les lobes étaient récoltés aux jours 0, 2.5 et 5 après le début des incubations *in vitro* et étaient homogénéisés dans du RPMI 1640 sans rouge de phénol pour en extraire les thymocytes et lymphocytes. La viabilité des cellules était vérifiée par exclusion au bleu de Trypan et c'est avéré être de plus de 90% à chaque vérification.

RT-PCR

L'ARN total des cellules était extrait en utilisant du TRIZOL (Life Technology, Germany). L'ARN (1.0 µg) isolé était premièrement traité avec de la Dnase I Amp Grade (Life Technology) et ensuite transcrite en ADN complémentaire en utilisant des amorces oligos (dT) (Life Technology) et 80 U de transcriptase inverse Moloney murine leukemia virus (M-MLV; Life Technology). 5 µl de produit de la transcription inverse étaient ensuite amplifiés par PCR (50 µl totale) dans un amplificateur Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 en utilisant les amorces suivantes : mER α (amorce sens: 5'-CTA-CCT-GGA-GAA-CGA-GCC-CA-3', amorce antisens: 5'-AAG-GCA-CTG-ACC-ATC-TGG-TC-3', produit 567-bp), et mER β (série #1: amorce sens: 5'-CAT-TCT-ACA-GTC-CTG-CTG-TGA-TGA-3', amorce antisens: 5'-GGG-TCT-CTC-TGT-TTA-CAG-GCA-A-3', série #2: amorce sens: 5'-CAT-TCT-ACA-GTC-CTG-CTG-TGA-TGA-3', amorce antisens: 5'-CGC-CAA-GCT-TCC-TCT-TCA-GGG-T-3', produit 230-bp). Comme témoin de quantification, GAPDH était utilisé (amorce sens: 5'-ACC-ACA-GTC-CAT-GCC-ATC-AC-3', amorce antisens: 5'-TCC-ACC-ACC-ATG-TTG-CTG-TA-3', produit 450-bp). PCR pour mER α (15 minutes à 95.0 °C, 35 cycles: 1 minute à 94.0 °C, 1 minute à 54.0 °C, 2 minutes à 72.0 °C), mER β (1^{ère} amp, Touchdown: 15 minutes à 95.0 °C, 25 cycles: 30 secondes à 94.0 °C, 30 secondes à 68.0 °C (-0.5 °C par cycle), 1 minute 72.0 °C; 2^e amp: 15 minutes à 95.0 °C, 25 cycles: 30 secondes à 94.0 °C, 30 secondes à 58.0 °C, 1 minute à 72.0 °C), et GAPDH (15 minutes à 95.0 °C, 20 cycles: 30 secondes à 94.0 °C, 1 minute à 58.0 °C, 1 minute à 72.0 °C). L'amplification était faite en utilisant 1.25 U *HotStartTaq* DNA Polymerase (Qiagen, Canada). Les produits de PCR étaient analysés par migration sur gel d'agarose (1.5%) avec du bromure d'éthidium et quantifiés en utilisant le Fluor-S MultiImager (BioRad, Canada) et le programme d'analyse Multi-Analyst 1.1. Les résultats sont semi-quantitatifs lorsqu'obtenus de cette façon.

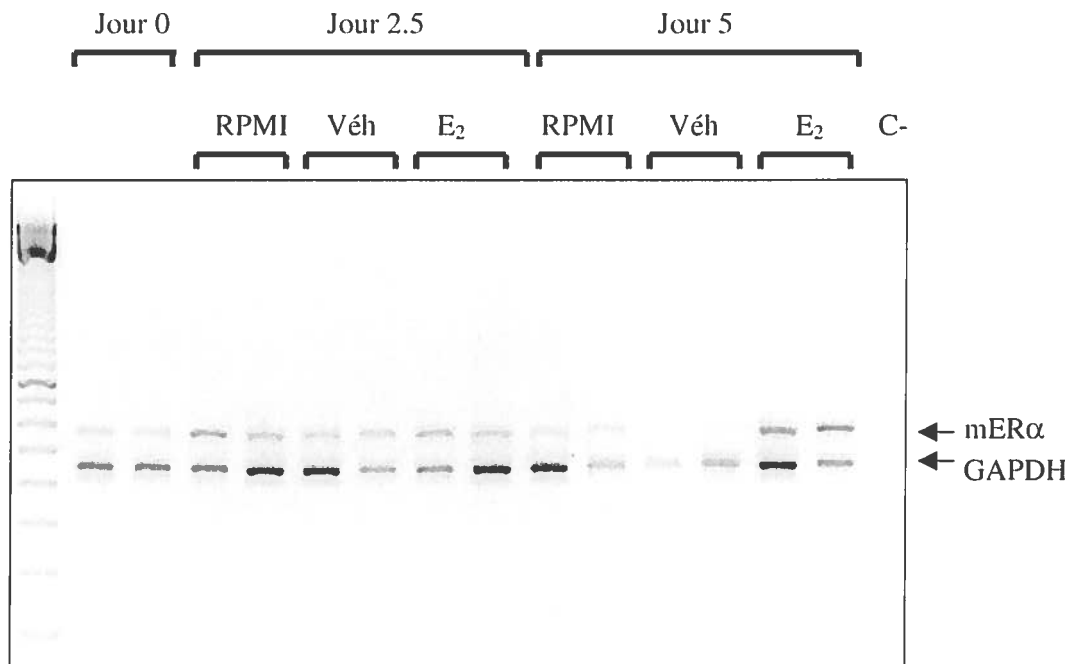


Fig.7 Expression de l'ARN messager de ER α dans les thymus de fétus de souris. L'expression a été vérifiée aux jour 0, 2.5 et 5 après mise en culture dans un milieu RPMI seul (RPMI), un milieu RPMI plus véhicule EtOH 100% (Véh) ou un milieu RPMI plus véhicule plus 17 β -estradiol 0.1nM (E₂). L'expression de l'ARN messager de GAPDH a été utilisé comme contrôle de quantité d'ARN total. Un contrôle négatif sans ARN a également été ajouté (C-). Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes.

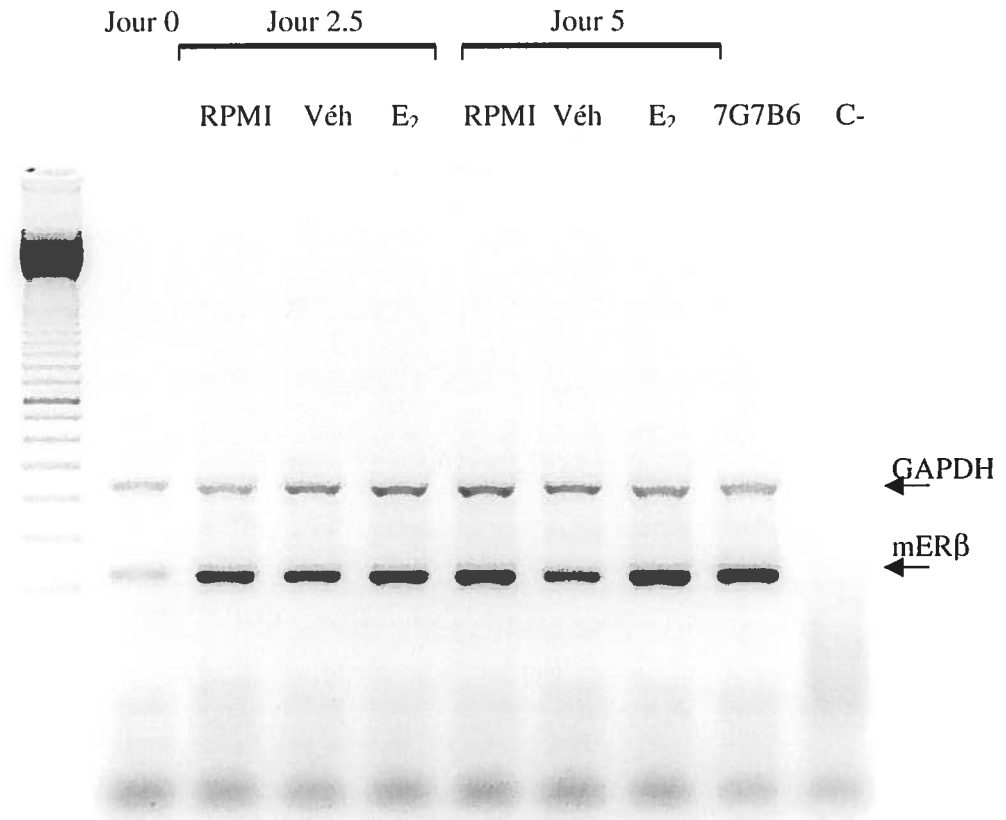


Fig.8 Expression de l'ARN messager de ER β dans les thymus de fétus de souris. L'expression a été vérifiée aux jour 0, 2.5 et 5 après mise en culture dans un milieu RPMI seul (RPMI), un milieu RPMI plus véhicule EtOH 100% (Véh) ou un milieu RPMI plus véhicule plus 17 β -estradiol 0.1nM (E₂). L'expression de l'ARN messager de GAPDH a été utilisé comme contrôle de quantité d'ARN total. Un contrôle positif a été utilisé (cellules 7G7B6). Un contrôle négatif sans ARN a également été ajouté (C-). Ce résultat est représentatif de trois expériences indépendantes.

**Expression de ERalpha dans le Thymus de Fetus de Souris
C57BL/6 au Jours 0, 2.5 et 5**

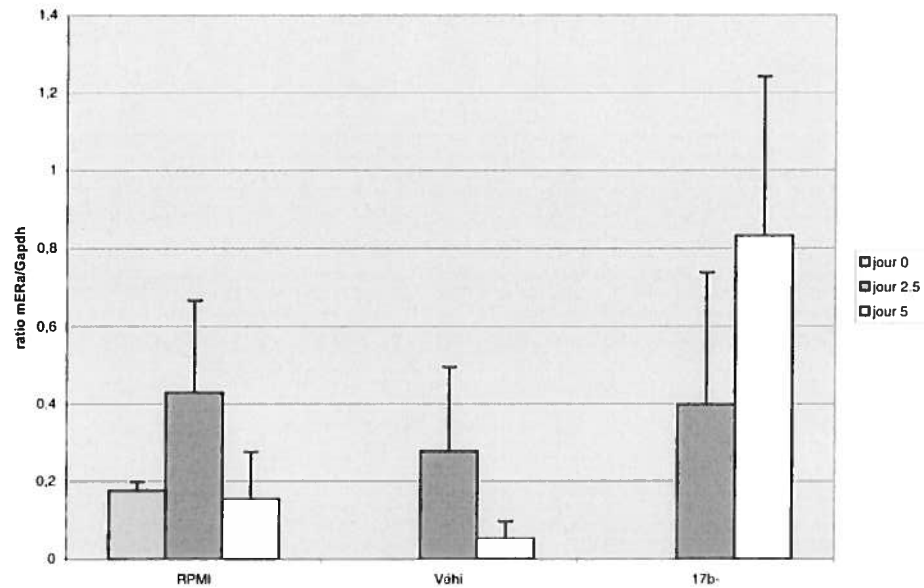


Fig.9 Expression relative de l'ARN messenger de ER α dans les thymus de fétus de souris aux jours 0, 2.5 et 5 après mise en culture dans un milieu RPMI seul (RPMI), un milieu RPMI plus véhicule EtOH 100% (Véh) ou un milieu RPMI plus véhicule plus 17 β -estradiol 0.1nM (17 β). La quantification de l'expression c'est faite par comparaison avec l'expression de l'ARN messenger de GAPDH. Les résultats sont semi-quantitatifs. n=6 (trois expériences indépendantes, doublet pour chaque échantillons).

Liste des Références

ABO, T., A. Kusumi, S. Seki, T. Ohteki, K. Sugiura, T. Masuda, H. Rikiishi, T. Iiai et K. Kumagai. 1992. Activation of extrathymic T cells in the liver and reciprocal inactivation of intrathymic T cells by bacterial stimulation. Cell Immunol 142: 125-136.

ABO, T., T. Ohteki, S. Seki, N. Koyamada, Y. Yoshikai, T. Masuda, H. Rikiishi et K. Kumagai. 1991. The appearance of T cells bearing self-reactive T cell receptor in the livers of mice injected with bacteria. J Exp Med 174: 417-424.

ABRAMSKY, O., I. Lubetzki-Korn, S. Evron et T. Brenner. 1984. Suppressive effect of pregnancy on MS and EAE. Prog Clin Biol Res 146: 399-406.

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

AMADORI, A., R. Zamarchi, G. De Silvestro, G. Forza, G. Cavatton, G. A. Danieli, M. Clementi et L. Chieco-Bianchi. 1995. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. Nat Med 1: 1279-1283.

ANDERSON, D. C. 1974. Sex-hormone-binding globulin. Clin Endocrinol (Oxf) 3: 69-96.

ANDERSON, G., N. C. Moore, J. J. Owen et E. J. Jenkinson. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. Annu Rev Immunol 14: 73-99.

ANSAR AHMED, S., M. J. Dauphinee et N. Talal. 1985. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. J Immunol 134: 204-210.

ANSAR AHMED, S. et N. TALAL. 1990. Sex hormones and the immune system--Part 2. Animal data. Baillieres Clin Rheumatol 4: 13-31.

ARNASON, B. G. et D. P. RICHMAN. 1969. Effect of oral contraceptives on experimental demyelinating disease. Arch Neurol 21: 103-108.

AZENABOR, A. A. et L. HOFFMAN-GOETZ. 2001. 17 beta-estradiol increases Ca(2+) influx and down regulates interleukin-2 receptor in mouse thymocytes. Biochem Biophys Res Commun 281: 277-281.

AZENABOR, A. A. et L. HOFFMAN-GOETZ. 2000. Effect of exhaustive exercise on membrane estradiol concentration, intracellular calcium, and oxidative damage in mouse thymic lymphocytes. Free Radic Biol Med 28: 84-90.

BAINES, M. G. et H. F. PROSS. 1982. Impairment of the thymus-dependent humoral immune response by syngeneic or allogeneic pregnancy. J Reprod Immunol 4: 337-348.

BEATO, M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. Cell 56: 335-344.

BEKESI, G., R. Kaducs, S. Varbiro, K. Racz, D. Sprintz, J. Feher et B. Szekacs. 2000. In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. Steroids 65: 889-894.

BELLIDO, T., G. Girasole, G. Passeri, X. P. Yu, H. Mocharla, R. L. Jilka, A. Notides et S. C. Manolagas. 1993. Demonstration of estrogen and vitamin D receptors in bone marrow- derived stromal cells: up-regulation of the estrogen receptor by 1,25-dihydroxyvitamin-D3. Endocrinology 133: 553-562.

BENECKE, A., P. Chambon et H. Gronemeyer. 2000. Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. EMBO Rep 1: 151-157.

BENTEN, W. P., M. Lieberherr, C. E. Sekeris et F. Wunderlich. 1997. Testosterone induces Ca²⁺ influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. FEBS Lett 407: 211-214.

BERNARDI, S., M. G. Grasso, R. Bertollini, F. Orzi et C. Fieschi. 1991. The influence of pregnancy on relapses in multiple sclerosis: a cohort study. Acta Neurol Scand 84: 403-

406.

BETHIN, K. E., S. K. Vogt et L. J. Muglia. 2000. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone- independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9317-9322.

BIBERGER, C. et E. VON ANGERER. 1996. 2-Phenylindoles with sulfur containing side chains. Estrogen receptor affinity, antiestrogenic potency, and antitumor activity. J Steroid Biochem Mol Biol 58: 31-43.

BIZZARRO, A., G. Valentini, G. Di Martino, A. Daponte, A. De Bellis et G. Iacono. 1987. Influence of testosterone therapy on clinical and immunological features of autoimmune diseases associated with Klinefelter's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 64: 32-36.

BRANDENBERGER, A. W., M. K. Tee, J. Y. Lee, V. Chao et R. B. Jaffe. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER- beta) mRNA in the midgestational human fetus. J Clin Endocrinol Metab 82: 3509-3512.

BREITMAN, T. R., S. E. Selonick et S. J. Collins. 1980. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. Proc Natl Acad Sci U S A 77: 2936-2940.

BRENNER, T., S. Evron et O. Abramsky. 1991. Effect of experimental autoimmune encephalomyelitis on pregnancy: studies in rabbits and rats. Isr J Med Sci 27: 181-185.

BRIAND, P., B. K. Lundholt, J. Skouv et A. E. Lykkesfeldt. 1999. Growth response of breast epithelial cells to estrogen is influenced by EGF. Mol Cell Endocrinol 153: 1-9.

BRUNELLI, R., D. Frasca, S. Baschieri, M. Spano, A. Fattorossi, L. F. Mosiello, R. D'Amelio, L. Zichella et G. Doria. 1992. Changes in thymocyte subsets induced by estradiol administration or pregnancy. Ann N Y Acad Sci 650: 109-114.

BUNONE, G., P. A. Briand, R. J. Miksicek et D. Picard. 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct

phosphorylation. EMBO J 15: 2174-2183.

BURAKOV, D., C. W. Wong, C. Rachez, B. J. Cheskis et L. P. Freedman. 2000. Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. J Biol Chem 275: 20928-20934.

BUTTERWORTH, M., B. McClellan et M. Allansmith. 1967. Influence of sex in immunoglobulin levels. Nature 214: 1224-1225.

BUYON, J. P., H. M. Korchak, L. E. Rutherford, M. Ganguly et G. Weissmann. 1984. Female hormones reduce neutrophil responsiveness in vitro. Arthritis Rheum 27: 623-630.

BYNOE, M. S., C. M. Grimaldi et B. Diamond. 2000. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 2703-2708.

CARBONE, A., M. Piantelli, P. Musiani, L. M. Larocca, F. B. Aiello, N. Maggiano, C. Scopetta, F. Crucitti et F. O. Ranelletti. 1986. Estrogen binding sites in peripheral blood mononuclear cells and thymocytes from 2 myasthenia gravis patients. J Clin Lab Immunol 21: 87-91.

CARLSTEN, H., R. Holmdahl et A. Tarkowski. 1991. Analysis of the genetic encoding of oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in (NZB x NZW) F1 mice. Immunology 73: 186-190.

CARLSTEN, H., R. Holmdahl, A. Tarkowski et L. A. Nilsson. 1989. Oestradiol suppression of delayed-type hypersensitivity in autoimmune (NZB/NZW)F1 mice is a trait inherited from the healthy NZW parental strain. Immunology 67: 205-209.

CARLSTEN, H., N. Nilsson, R. Jonsson, K. Backman, R. Holmdahl et A. Tarkowski. 1992. Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell-mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL lpr/lpr mice. Cell Immunol 144: 190-202.

CARLSTEN, H. et A. TARKOWSKI. 1993. Histocompatibility complex gene products

and exposure to oestrogen: two independent disease accelerating factors in murine lupus. Scand J Immunol 38: 341-347.

CARLSTEN, H., M. Verdrengh et M. Taube. 1996. Additive effects of suboptimal doses of estrogen and cortisone on the suppression of T lymphocyte dependent inflammatory responses in mice. Inflamm Res 45: 26-30.

CASTORIA, G. M.V. Barone, M. Di Domenico, A. Bilancio, D. Ametrano, A. Migliaccio et F. Auricchio. 1999. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. EMBO J 18: 2500-2510.

CASTRO-RIVERA, E., I. Samudio et S. Safe. 2001. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. J Biol Chem 276: 30853-30861.

CHEN, D., S. M. Huang et M. R. Stallcup. 2000. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. J Biol Chem 275: 40810-40816.

CHEN, H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nakatani et R. M. Evans. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. Cell 90: 569-580.

CHEN, J. D. et R. M. EVANS. 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. Nature 377: 454-457.

CHEN, Z., I. S. Yuhanna, Z. Galcheva-Gargova, R. H. Karas, M. E. Mendelsohn et P. W. Shaul. 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. J Clin Invest 103: 401-406.

CHRISTIANSEN, C., M. S. Christensen et I. Transbol. 1981. Bone mass in postmenopausal women after withdrawal of oestrogen/gestagen replacement therapy. Lancet 1: 459-461.

CLARKSON, T. B., M. S. Anthony et K. P. Klein. 1996. Hormone replacement therapy and coronary artery atherosclerosis: the monkey model. Br J Obstet Gynaecol 103 Suppl 13: 53-7; discussion 57-58.

CLIPSTONE, N. A. et G. R. CRABTREE. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T- lymphocyte activation. Nature 357: 695-697.

COLLINS, S. J., R. C. Gallo et R. E. Gallagher. 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature 270: 347-349.

COLLINS, S. J., F. W. Ruscetti, R. E. Gallagher et R. C. Gallo 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc Natl Acad Sci U S A 75: 2458-2462.

COLLINS, S. J., F. W. Ruscetti, R. E. Gallagher et R. C. Gallo. 1979. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. J Exp Med 149: 969-974.

COUSE, J. F., S. C. Hewitt, D. O. Bunch, M. Sar, V. R. Walker, B. J. Davis et K. S. Korach. 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. Science 286: 2328-2331.

COUSE, J. F. et K. S. KORACH. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev 20: 358-417.

COUSE, J.F., J. Lindzey, K. Grandien, J.A. Gustafsson et K.S. Korach. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. Endocrinology 138: 4613-4621.

COWLEY, S. M. et M. G. PARKER. 1999. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. J Steroid Biochem Mol Biol 69: 165-175.

CRABTREE, G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte

activation. Science 243: 355-361.

CURRAN, E. M., L. J. Berghaus, N. J. Verneti, A. J. Saporita, D. B. Lubahn et D. M. Estes. 2001. Natural Killer Cells Express Estrogen Receptor-alpha and Estrogen Receptor-beta and Can Respond to Estrogen Via a Non-Estrogen Receptor- alpha-Mediated Pathway. Cell Immunol 214: 12-20.

CURTIS, S. W., T. Washburn, C. Sewall, R. Diaugustine, J. Lindzey, J. F. Couse et K. S. Korach. 1996. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 12626-12630.

CUTOLO, M., S. Accardo, B. Villaggio, A. Barone, A. Sulli, D. A. Coviello, C. Carabbio, L. Felli, D. Miceli, R. Farruggio, G. Carruba et L. Castagnetta. 1996. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. J Clin Endocrinol Metab 81: 820-827.

CUTOLO, M. et L. CASTAGNETTA. 1996. Immunomodulatory mechanisms mediated by sex hormones in rheumatoid arthritis. Ann N Y Acad Sci 784: 237-251.

CUTOLO, M., A. Sulli, B. Seriole, S. Accardo et A. T. Masi. 1995. Estrogens, the immune response and autoimmunity. Clin Exp Rheumatol 13: 217-226.

DAFFADA, A. A., S. R. Johnston, J. Nicholls et M. Dowsett. 1994. Detection of wild type and exon 5-deleted splice variant oestrogen receptor (ER) mRNA in ER-positive and -negative breast cancer cell lines by reverse transcription/polymerase chain reaction. J Mol Endocrinol 13: 265-273.

DANEL, L., G. Souweine, J. C. Monier et S. Saez. 1983. Specific estrogen binding sites in human lymphoid cells and thymic cells. J Steroid Biochem 18: 559-563.

DECHERING, K., C. Boersma et S. Mosselman. 2000. Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? Curr Med Chem 7: 561-576.

DELAGE-MOURROUX, R., P. G. Martini, I. Choi, D. M. Kraichely, J. Hoeksema et B.

S. Katzenellenbogen. 2000. Analysis of Estrogen Receptor Interaction with a Repressor of Estrogen Receptor Activity (REA) and the Regulation of Estrogen Receptor Transcriptional Activity by REA. J Biol Chem 275: 35848-35856.

DENTON, R. R., N. J. Koszewski et A. C. Notides. 1992. Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding. J Biol Chem 267: 7263-7268.

DONG, L., W. Wang, F. Wang, M. Stoner, J. C. Reed, M. Harigai, I. Samudio, M. P. Kladde, C. Vyhlidal et S. Safe. 1999. Mechanisms of transcriptional activation of bcl-2 gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. J Biol Chem 274: 32099-32107.

DUAN, R., W. Porter et S. Safe. 1998. Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. Endocrinology 139: 1981-1990.

DUTERTRE, M. et C. L. SMITH. 2000. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. J Pharmacol Exp Ther 295: 431-437.

EIDINGER, D. et T. J. GARRETT. 1972. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. J Exp Med 136: 1098-1116.

EISENBERG, R. A. et F. J. DIXON. 1980. Effect of castration on male-determined acceleration of autoimmune disease in BXSB mice. J Immunol 125: 1959-1961.

EL-TANANI, M. K. et C. D. GREEN. 1997. Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. Mol Endocrinol 11: 928-937.

ELBOURNE, K. B., D. Keisler et R. W. McMurray. 1998. Differential effects of estrogen and prolactin on autoimmune disease in the NZB/NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. Lupus 7: 420-427.

ENDO, T. et K. KANAYAMA. 1998. Changes in the weight of the thymus after birth and

in pregnancy in mice. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 101: 307-310.

ENMARK, E. et J. A. GUSTAFSSON. 1999. Oestrogen receptors - an overview. J Intern Med 246: 133-138.

ENMARK, E., M. Peltö-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjöld et J.A. Gustafsson. 1997. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. J Clin Endocrinol Metab 82: 4258-4265.

EVANS, M.J., A. Eckert, K. Lai, S.J. Adelman et D.C. Harnish. 2001. Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF-kappaB activity in vivo. Circ Res 89: 823-830.

EVANS, M. J., S. MacLaughlin, R. D. Marvin et N. I. Abdou. 1997. Estrogen decreases in vitro apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from women with normal menstrual cycles and decreases TNF-alpha production in SLE but not in normal cultures. Clin Immunol Immunopathol 82: 258-262.

FALCONE, M., J. Lee, G. Patstone, B. Yeung et N. Sarvetnick. 1998. B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. J Immunol 161: 1163-1168.

FORMAN, B. M. et H. H. SAMUELS. 1990. Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. Mol Endocrinol 4: 1293-1301.

FORSBERG, J. G. 1984. Short-term and long-term effects of estrogen on lymphoid tissues and lymphoid cells with some remarks on the significance for carcinogenesis. Arch Toxicol 55: 79-90.

FOSTER, J. S., D. C. Henley, A. Bukovsky, P. Seth et J. Wimalasena. 2001. Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. Mol Cell Biol 21: 794-810.

FREEDMAN, L. P. 1999. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. Cell 97: 5-8.

FUQUA, S. A., S. D. Fitzgerald, G. C. Chamness, A. K. Tandon, D. P. McDonnell, Z. Nawaz, B. W. O'Malley et W. L. McGuire. 1991. Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. Cancer Res 51: 105-109.

GALIEN, R. et T. GARCIA. 1997. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. Nucleic Acids Res 25: 2424-2429.

GARCIA-DURAN, M., T. De Frutos, J. Diaz-Recasens, G. Garcia-Galvez, A. Jimenez, M. Monton, J. Farre, L. Sanchez De Miguel, F. Gonzalez-Fernandez, M. D. Arriero, L. Rico, R. Garcia, S. Casado et A. Lopez-Farre. 1999. Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. Circ Res 85: 1020-1026.

GARCIA-SEGURA, L. M., F. Naftolin, J. B. Hutchison, I. Azcoitia et J. A. Chowen. 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. J Neurobiol 40: 574-584.

GILMORE, W., L. P. Weiner et J. Correale. 1997. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein- specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. J Immunol 158: 446-451.

GIRON-GONZALEZ, J. A., F. J. Moral, J. Elvira, D. Garcia-Gil, F. Guerrero, I. Gavilan et L. Escobar. 2000. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. Eur J Endocrinol 143: 31-36.

GLASS, C. K., D. W. Rose et M. G. Rosenfeld. 1997. Nuclear receptor coactivators. Curr Opin Cell Biol 9: 222-232.

GRAFF, R. J., M. A. Lappe et G. D. Snell. 1969. The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. Transplantation 7: 105-111.

GREEN, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos et P. Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v- erb-A.

Nature 320: 134-139.

GREGORY, M. S., L. A. Duffner, D. E. Faunce et E. J. Kovacs. 2000a. Estrogen mediates the sex difference in post-burn immunosuppression. J Endocrinol 164: 129-138.

GREGORY, M. S., D. E. Faunce, L. A. Duffner et E. J. Kovacs. 2000b. Gender difference in cell-mediated immunity after thermal injury is mediated, in part, by elevated levels of interleukin-6. J Leukoc Biol 67: 319-326.

GROHE, C., S. Kahlert, K. Lobbert, M. Stimpel, R. H. Karas, H. Vetter et L. Neyses. 1997. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. FEBS Lett 416: 107-112.

GROSSMAN, C. J., G. A. Roselle et C. L. Mendenhall. 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. J Steroid Biochem Mol Biol 40: 649-659.

GRUBER, C.J., W. Tschugguel, C. Schneeberger et J. C. Huber. 2002. Production and actions of estrogens. New Engl J Med 346: 340-352.

GUSTAFSSON, J. A. 1997. Estrogen receptor beta--getting in on the action? Nat Med 3: 493-4.

HAGER, G.L., C.S. Lim, C. Elbi et C.T. Baumann. 2000. Trafficking of nuclear receptors in living cells. J Steroid Biochem Mol Biol 74: 249-254.

HALL, J. M., J. F. Couse et K. S. Korach. 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. J Biol Chem 276: 36869-36872.

HAMMERSCHMIDT, D. E., A. C. Knabe, P. T. Silberstein, H. R. Lamche et P. A. Coppo. 1988. Inhibition of granulocyte function by steroids is not limited to corticoids. Studies with sex steroids. Inflammation 12: 277-284.

HEERY, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare et M. G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. Nature 387: 733-736.

HEINLEIN, C. A. et C. CHANG. 2001. Role of chaperones in nuclear translocation and

transactivation of steroid receptors. Endocrine 14: 143-149.

HENRIKSEN, O. et J. R. FREY. 1982. Control of the expression of interleukin-2 activity. Cell Immunol 73: 106-114.

HIRAHARA, H., M. Ogawa, M. Kimura, T. Iiai, M. Tsuchida, H. Hanawa, H. Watanabe et T. Abo. 1994. Glucocorticoid independence of acute thymic involution induced by lymphotoxin and estrogen. Cell Immunol 153: 401-411.

HOFBAUER, L. C., S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. C. Spelsberg et B. L. Riggs. 1999. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology 140: 4367-4370.

HOLMDAHL, R. et L. JANSSON. 1988. Estrogen-induced suppression of collagen arthritis. III. Adult thymectomy does not affect the course of arthritis or the estrogen-mediated suppression of T-cell immunity. Brain Behav Immun 2: 123-132.

HOLMDAHL, R., L. Jansson, B. Meyerson et L. Klareskog. 1987. Oestrogen induced suppression of collagen arthritis: I. Long term oestradiol treatment of DBA/1 mice reduces severity and incidence of arthritis and decreases the anti type II collagen immune response. Clin Exp Immunol 70: 372-378.

HORLEIN, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass et A. L. Et. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature 377: 397-404.

HORWITZ, K. B., T. A. Jackson, D. L. Bain, J. K. Richer, G. S. Takimoto et L. Tung. 1996. Nuclear receptor coactivators and corepressors. Mol Endocrinol 10: 1167-1177.

HOWIE, J. B. et B. J. HELYER. 1965. Autoimmune disease in mice. Ann N Y Acad Sci 124: 167-177.

HOWIE, J. B. et B. J. HELYER 1968. The immunology and pathology of NZB mice. Adv Immunol 9: 215-266.

HUMFREY, C. D. 1998. Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence. Nat Toxins 6: 51-59.

HUTCHINSON, M. 1993. Pregnancy in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 56: 1043-1045.

IAFRATI, M. D., R. H. Karas, M. Aronovitz, S. Kim, T. R. Sullivan Jr, D. B. Lubahn, T. F. O'Donnell Jr, K. S. Korach et M. E. Mendelsohn. 1997. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. Nat Med 3: 545-548.

IGARASHI, H., T. Kouro, T. Yokota, P. C. Comp et P. W. Kincade. 2001. Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 15131-15136.

IGNAR-TROWBRIDGE, D. M., K. G. Nelson, M. C. Bidwell, S. W. Curtis, T. F. Washburn, J. A. McLachlan et K. S. Korach. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 4658-4662.

INCE, B. A., M. M. Montano et B. S. Katzenellenbogen. 1994. Activation of transcriptionally inactive human estrogen receptors by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and ligands including antiestrogens. Mol Endocrinol 8: 1397-1406.

INOUE, S., S. Ogawa, K. Horie, S. Hoshino, W. Goto, T. Hosoi, O. Tsutsumi, M. Muramatsu et Y. Ouchi. 2000. An Estrogen Receptor beta Isoform That Lacks Exon 5 Has Dominant Negative Activity on both ERalpha and ERbeta. Biochem Biophys Res Commun 279: 814-819.

ISHIBASHI, O. et H. KAWASHIMA. 2001. Cloning and characterization of the functional promoter of mouse estrogen receptor beta gene. Biochim Biophys Acta 1519: 223-229.

ITO, A., A. C. Buenafe, A. Matejuk, A. Zamora, M. Silverman, J. Dwyer, A. A. Vandenbark et H. Offner. 2002. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha(+) T cells and macrophages into the CNS of mice

developing experimental encephalomyelitis. Clin Immunol 102: 275-282.

ITO, M., C. X. Yuan, S. Malik, W. Gu, J. D. Fondell, S. Yamamura, Z. Y. Fu, X. Zhang, J. Qin et R.G. Roeder. 1999. Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators. Mol Cell 3: 361-370.

ITO, A. B.F. Bebo Jr, A. Matejuk, A. Zamora, M. Silverman, A. Fyfe-Johnson et H. Offner. 2001. Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. J Immunol 167: 542-552.

JANSSON, L. et R. HOLMDAHL. 1998. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. Inflamm Res 47: 290-301.

JANSSON, L., T. Olsson et R. Holmdahl. 1994. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. J Neuroimmunol 53: 203-207.

JANEWAY, C.A. et P. Travers. 1997. The immune system in health and disease. London: Current Biology Ltd.

JILKA, R. L. 1998. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. Bone 23: 75-81.

JOSEFSSON, E., A. Tarkowski et H. Carlsten. 1992. Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. Cell Immunol 142: 67-78.

KANDA, N., T. Tsuchida et K. Tamaki. 1999. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 42: 328-337.

KANG, Y. K., M. Guermah, C. X. Yuan et R. G. Roeder. 2002. The TRAP/Mediator

coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function invitro. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 2642-2647.

KARAS, R. H., B. L. Patterson et M. E. Mendelsohn. 1994. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. Circulation 89: 1943-1950.

KARPUZOGLU-SAHIN, E., Y. Zhi-Jun, A. Lengi, N. Sriranganathan et S. Ansar Ahmed. 2001. Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. Cytokine 14: 208-217.

KATO, K., Y. Chen, A. Nakane, T. Minagawa, K. Fujieda, T. Kimura et K. Yamamoto. 1988. Suppression of delayed-type hypersensitivity in mice pretreated with diethylstilbesterol: involvement of sex hormones in immunomodulation. J Leukoc Biol 43: 530-538.

KATO, S., H. Endoh, Y. Masuhiro, T. Kitamoto, S. Uchiyama, H. Sasaki, S. Masishige, Y. Gotoh, E. Nishida, H. Kawashima et A. L. Et. 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen- activated protein kinase. Science 270: 1491-1494.

KAUSER, K. et G. M. RUBANYI. 1997. Potential cellular signaling mechanisms mediating upregulation of endothelial nitric oxide production by estrogen. J Vasc Res 34: 229-236.

KAWASHIMA, I., K. Seiki, K. Sakabe, S. Ihara, A. Akatsuka et Y. Katsumata. 1992. Localization of estrogen receptors and estrogen receptor-mRNA in female mouse thymus. Thymus 20: 115-121.

KIM, H. P., J. Y. Lee, J. K. Jeong, S. W. Bae, H. K. Lee et I. Jo. 1999. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. Biochem Biophys Res Commun 263: 257-262.

KINGSTON, R. E. et G. J. NARLIKAR. 1999. ATP-dependent remodeling and

acetylation as regulators of chromatin fluidity. Genes Dev 13: 2339-2352.

KLEBANOFF, S.J. 1977. Estrogen binding by leukocytes during phagocytosis. J Exp Med 145: 983-998.

KOBAYASHI, Y., T. Kitamoto, Y. Masuhiro, M. Watanabe, T. Kase, D. Metzger, J. Yanagisawa et S. Kato. 2000. p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. J Biol Chem 275: 15645-15651.

KOEFFLER, H. P. et D. W. GOLDE. 1980. Human myeloid leukemia cell lines: a review. Blood 56: 344-350.

KOEHORST, S. G., H. M. Jacobs, J. H. Thijssen et M. A. Blankenstein. 1993. Wild type and alternatively spliced estrogen receptor messenger RNA in human meningioma tissue and MCF7 breast cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol 45: 227-233.

KOMM, B. S., C. M. Terpening, D. J. Benz, K. A. Graeme, A. Gallegos, M. Korc, G. L. Greene, B. W. O'Malley et M. R. Haussler. 1988. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 241: 81-84.

KOS, M., S. O'Brien, G. Flouriot et F. Gannon. 2000. Tissue-specific expression of multiple mRNA variants of the mouse estrogen receptor alpha gene. FEBS Lett 477: 15-20.

KOUSTENI, S., T. Bellido, L. I. Plotkin, C. A. O'Brien, D. L. Bodenner, L. Han, K. Han, G. B. Digregorio, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, P. K. Roberson, R. S. Weinstein, R. L. Jilka et S. C. Manolagas. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. Cell 104: 719-730.

KOVACS, K. A., A. Oszter, P. M. Gocze, J. L. Kornyei et I. Szabo. 2001. Comparative analysis of cyclin D1 and oestrogen receptor (alpha and beta) levels in human leiomyoma and adjacent myometrium. Mol Hum Reprod 7: 1085-1091.

KRISHNAN, V., H. Heath et H. U. Bryant. 2000. Mechanism of action of estrogens and selective estrogen receptor modulators. Vitam Horm 60: 123-147.

KUBES, P., M. Suzuki et D. N. Granger. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 4651-4565.

KUIPER, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson et J. A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 138: 863-870.

KUIPER, G. G., E. Enmark, M. Peltto-Huikko, S. Nilsson et J. A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 5925-5930.

KUIPER, G. G. et J. A. GUSTAFSSON. 1997. The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. FEBS Lett 410: 87-90.

KUIPER, G. G., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. Van Der Saag, B. Van Der Burg et J. A. Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139: 4252-4263.

KUNTZ, M. A. et D. J. SHAPIRO. 1997. Dimerizing the estrogen receptor DNA binding domain enhances binding to estrogen response elements. J Biol Chem 272: 27949-27956.

KUREBAYASHI, S., Y. Miyashita, T. Hirose, A. Kasayama, S. Akira et T. Kishimoto. 1997. Characterization of mechanisms of interleukin-6 gene repression by estrogen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 60: 11-17.

LABRIE, F., A. Belanger, L. Cusan et B. Candas. 1997. Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. J Clin Endocrinol Metab 82: 2403-2409.

LABRIE, F., A. Belanger, V. Luu-The, C. Labrie, J. Simard, L. Cusan, J. L. Gomez et B.

Candas. 1998. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. Steroids 63: 322-328.

LAFLAMME, N., R. E. Nappi, G. Drolet, C. Labrie et S. Rivest. 1998. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. J Neurobiol 36: 357-378.

LARSSON, P. et R. HOLMDAHL. 1987. Oestrogen-induced suppression of collagen arthritis. II. Treatment of rats suppresses development of arthritis but does not affect the anti- type II collagen humoral response. Scand J Immunol 26: 579-583.

LAHITA R.G. 1996. The connective tissue diseases and the overall influence of gender. Int J Fertl Menopausal Stud 41: 156-165.

LATMAN, N. S. 1983. Relation of menstrual cycle phase to symptoms of rheumatoid arthritis. Am J Med 74: 957-960.

LE DOUARIN, B., C. Zechel, J. M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, P. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon et R. Losson. 1995. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand- dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. EMBO J 14: 2020-2033.

LE MELLAY, V., B. Grosse et M. Lieberherr. 1997. Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. J Biol Chem 272: 11902-11907.

LEE, G., A. E. Namen, S. Gillis, L. R. Ellingsworth et P. W. Kincade. 1989. Normal B cell precursors responsive to recombinant murine IL-7 and inhibition of IL-7 activity by transforming growth factor-beta. J Immunol 142: 3875-3883.

LEVIN, E. R. 2001. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. J Appl Physiol 91: 1860-1867.

LEYGUE, E., A. Huang, L. C. Murphy et P. H. Watson. 1996. Prevalence of estrogen receptor variant messenger RNAs in human breast cancer. Cancer Res 56: 4324-4327.

LIEBERHERR, M., B. Grosse, M. Kachkache et S. Balsan. 1993. Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. J Bone Miner Res 8: 1365-1376.

LIEBERMAN, S. 1996. Are estradiol-producing cells incompletely endowed? A chronicle of the emergence of certitude from conjecture. Gynecol Obstet Invest 41: 147-172.

LOZZIO, C. B. et B. B. LOZZIO. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 45: 321-334.

LU, B., H. Dotzlaw, E. Leygue, L. J. Murphy, P. H. Watson et L. C. Murphy. 1999. Estrogen receptor-alpha mRNA variants in murine and human tissues. Mol Cell Endocrinol 158: 153-161.

LU, B., E. Leygue, H. Dotzlaw, L. J. Murphy et L. C. Murphy. 2000. Functional characteristics of a novel murine estrogen receptor-beta isoform, estrogen receptor-beta 2. J Mol Endocrinol 25: 229-242.

LU, B., E. Leygue, H. Dotzlaw, L. J. Murphy, L. C. Murphy et P. H. Watson. 1998. Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. Mol Cell Endocrinol 138: 199-203.

LUBAHN, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach et O. Smithies. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 11162-11166.

LUSTER, M. I., G. A. Boorman, J. H. Dean, R. W. Luebke et L. D. Lawson. 1980. The effect of adult exposure to diethylstilbestrol in the mouse: alterations in immunological functions. J Reticuloendothel Soc 28: 561-569.

MAKELA, S., L. Strauss, G. Kuiper, E. Valve, S. Salmi, R. Santti et J. A. Gustafsson. 2000. Differential expression of estrogen receptors alpha and beta in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract. Mol Cell Endocrinol 170: 219-229.

MARTINEZ, E. et W. WAHLI. 1989. Cooperative binding of estrogen receptor to imperfect estrogen-responsive DNA elements correlates with their synergistic hormone-dependent enhancer activity. EMBO J 8: 3781-3791.

MARUYAMA, S., N. Fujimoto, K. Asano et A. Ito. 2001. Suppression by estrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha. J Steroid Biochem Mol Biol 78: 177-184.

MASOOD, S. 1992. Estrogen and progesterone receptors in cytology: a comprehensive review. Diagn Cytopathol 8: 475-491.

MCKENNA, N. J., R. B. Lanz et B. W. O'Malley. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. Endocr Rev 20: 321-344.

MCMURRAY, R. W., K. Ndebele, K. J. Hardy et J. K. Jenkins. 2001. 17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. Cytokine 14: 324-333.

MEDINA, K. L., K. P. Garrett, L. F. Thompson, M. I. Rossi, K. J. Payne et P. W. Kincade. 2001. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. Nat Immunol 2: 718-724.

MEDINA, K.L., A.Strasser et P.W. Kincade. 2000. Estrogen influences the differentiation, proliferation, and survival of early B-lineage precursors. Blood 95: 59-67.

MEDINA, K. L. et P. W. KINCADE. 1994. Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 5382-5386.

MEDINA, K. L., G. Smithson et P. W. Kincade. 1993. Suppression of B lymphopoiesis during normal pregnancy. J Exp Med 178: 1507-1515.

MESSINGHAM, K. A., S. A. Heinrich et E. J. Kovacs. 2001. Estrogen restores cellular immunity in injured male mice via suppression of interleukin-6 production. J Leukoc Biol 70: 887-995.

MIGLIACCIO, A., M. Di Domenico, G. Castoria, A. De Falco, P. Bontempo, E. Nola et

F. Auricchio. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. EMBO J 15: 1292-1300.

MIKKOLA, T., L. Viinikka et O. Ylikorkala. 1998. Estrogen and postmenopausal estrogen/progestin therapy: effect on endothelium-dependent prostacyclin, nitric oxide and endothelin-1 production. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 79: 75-82.

MIKSICEK, R. J. 1993. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. Mol Pharmacol 44: 37-43.

MITCHNER, N. A., C. Garlick et N. Ben-Jonathan. 1998. Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. Endocrinology 139: 3976-3983.

MIYAURA, C., E. Abe, T. Kuribayashi, H. Tanaka, K. Konno, Y. Nishii et T. Suda. 1981. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. Biochem Biophys Res Commun 102: 937-943.

MONTANO, M. M., K. Ekena, R. Delage-Mourroux, W. Chang, P. Martini et B. S. Katzenellenbogen. 1999. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 6947-6952.

MONTANO, M.M. et B.S. KATZENELLENBOGEN. 1997. The quinone reductase gene: a unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 2581-2586.

MONTANO, M. M., V. Muller, A. Trobaugh et B. S. Katzenellenbogen. 1995. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. Mol Endocrinol 9: 814-825.

MOORE, J. T., D. D. McKee, K. Slentz-Kesler, L. B. Moore, S. A. Jones, E. L. Horne, J. L. Su, S. A. Kliewer, J. M. Lehmann et T. M. Willson. 1998. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. Biochem Biophys Res

Commun 247: 75-78.

MOR, G., A. Munoz, R. Redlinger Jr, I. Silva, J. Song, C. Lim et F. Kohen. 2001. The role of the Fas/Fas ligand system in estrogen-induced thymic alteration. Am J Reprod Immunol 46: 298-307.

MORLEY, P., J. F. Whitfield, B. C. Vanderhyden, B. K. Tsang et J. L. Schwartz. 1992. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. Endocrinology 131: 1305-1312.

MOSELMAN, S., J. Polman et R. Dijkema. 1996. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett 392: 49-53.

MUELLER-FAHRNOW, A. et U. EGNER. 1999. Ligand-binding domain of estrogen receptors. Curr Opin Biotechnol 10: 550-556.

MYLVAGANAM, R., Y. S. Ahn, W. J. Harrington, C. I. Kim et H. G. Gratzner. 1985. Differences in T cell subsets between men and women with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 66: 967-972.

NAAR, A. M., J. M. Boutin, S. M. Lipkin, V. C. Yu, J. M. Holloway, C. K. Glass et M. G. Rosenfeld. 1991. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. Cell 65: 1267-1279.

NADAL, A., A. B. Roper, O. Laribi, M. Maillet, E. Fuentes et B. Soria. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 11603-11608.

NADAL, A., J. M. Rovira, O. Laribi, T. Leon-Quinto, E. Andreu, C. Ripoll et B. Soria. 1998. Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. FASEB J 12: 1341-1348.

NAGEL, J. E., F. J. Chrest et W. H. Adler. 1981. Enumeration of T lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans. J Immunol 127: 2086-2088.

NEELY, N. T. et R. H. PERSELLIN. 1977. Activity of rheumatoid arthritis during pregnancy. Tex Med 73: 59-63.

NELSON, J. L., K. A. Hughes, A. G. Smith, B. B. Nisperos, A. M. Branchaud et J. A. Hansen. 1993. Maternal-fetal disparity in HLA class II alloantigens and the pregnancy-induced amelioration of rheumatoid arthritis. N Engl J Med 329: 466-471.

NEWBURGER, P. E., M. E. Chovaniec, J. S. Greenberger et H. J. Cohen. 1979. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. J Cell Biol 82: 315-322.

NEWBURGER, P. E., M. E. Chovaniec, J. S. Greenberger et H. J. Cohen 1979. Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. J Cell Biol 82: 315-322.

NEWTON, C. J., R. Buric, T. Trapp, S. Brockmeier, U. Pagotto et G. K. Stalla. 1994. The unliganded estrogen receptor (ER) transduces growth factor signals. J Steroid Biochem Mol Biol 48: 481-486.

NILSSON, B., A. Bergqvist, D. Lindblom, O. Ljungberg, R. Sodergard et B. Von Schoultz. 1986. Characterization and localization of specific oestrogen binding in the human thymus. Gynecol Obstet Invest 21: 150-157.

NILSSON, N. et H. CARLSTEN. 1994. Estrogen induces suppression of natural killer cell cytotoxicity and augmentation of polyclonal B cell activation. Cell Immunol 158: 131-139.

NILSSON, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner et J. A. Gustafsson. 2001. Mechanisms of estrogen action. Physiol Rev 81: 1535-1565.

OFFNER, H., K. Adlard, A. Zamora et A. A. Vandenbark. 2000. Estrogen potentiates treatment with T-cell receptor protein of female mice with experimental encephalomyelitis. J Clin Invest 105: 1465-1472.

OGAWA, S., A. E. Chester, S. C. Hewitt, V. R. Walker, J. A. Gustafsson, O. Smithies, K. S. Korach et D. W. Pfaff. 2000. From the cover: abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). Proc Natl Acad Sci U S A 97: 14737-14741.

OGAWA, S., S. Inoue, A. Orimo, T. Hosoi, Y. Ouchi et M. Muramatsu. 1998. Cross-inhibition of both estrogen receptor alpha and beta pathways by each dominant negative mutant. FEBS Lett 423: 129-132.

OKASHA, S. A., S. Ryu, Y. Do, R. J. McKallip, M. Nagarkatti et P. S. Nagarkatti. 2001. Evidence for estradiol-induced apoptosis and dysregulated T cell maturation in the thymus. Toxicology 163: 49-62.

OKUYAMA, R., T. Abo, S. Seki, T. Ohteki, K. Sugiura, A. Kusumi et K. Kumagai. 1992. Estrogen administration activates extrathymic T cell differentiation in the liver. J Exp Med 175: 661-669.

OLSEN, N. J. et W. J. KOVACS. 1996. Gonadal steroids and immunity. Endocr Rev 17: 369-384.

OSTENSEN, M. 1999. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Ann N Y Acad Sci 876: 131-143; discussion 144.

OSTENSEN, M., B. Aune et G. Husby. 1983. Effect of pregnancy and hormonal changes on the activity of rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 12: 69-72.

OSTENSEN, M. et G. HUSBY. 1983. A prospective clinical study of the effect of pregnancy on rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 26: 1155-1159.

OURSLER, M. J., L. Pederson, L. Fitzpatrick, B. L. Riggs et T. Spelsberg. 1994. Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 5227-5231.

PAECH, K., P. Webb, G. G. Kuiper, S. Nilsson, J. Gustafsson, P. J. Kushner et T. S.

Scanlan. 1997. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. Science 277: 1508-1510.

PAPPAS, T. C., B. Gametchu et C. S. Watson. 1995. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. FASEB J 9: 404-410.

PETERSEN, D. N., G. T. Tkalcevic, P. H. Koza-Taylor, T. G. Turi et T. A. Brown. 1998. Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues. Endocrinology 139: 1082-1092.

PETTERSSON, K., K. Grandien, G. G. Kuiper et J. A. Gustafsson. 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. Mol Endocrinol 11: 1486-1496.

PETTERSSON, K., F. Delaunay et J.A. Gustafsson. 2000. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. Oncogene 19: 4970-4978.

PETTERSSON, K. et J. GUSTAFSSON. 2001. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. Annu Rev Physiol 63: 165-192.

PFEFFER, U., E. Fecarotta et G. Vidali. 1995. Coexpression of multiple estrogen receptor variant messenger RNAs in normal and neoplastic breast tissues and in MCF-7 cells. Cancer Res 55: 2158-2165.

PFEIFER, R. W. et R. M. PATTERSON. 1985. Modulation of lymphokine-induced macrophage activation by estrogen metabolites. J Immunopharmacol 7: 247-263.

PIETRAS, R. J. et C. M. SZEGO. 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature 265: 69-72.

PIETRAS, R. J. et C. M. SZEGO. 1980. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. Biochem J 191: 743-760.

PORTER, J. C. 1974. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. J Invest Dermatol 63: 85-92.

PORTER, W., B. Saville, D. Hoivik et S. Safe. 1997. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. Mol Endocrinol 11: 1569-1580.

PRATT, W. B. et D. O. TOFT. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr Rev 18: 306-360.

PUIGSERVER, P., Z. Wu, C. W. Park, R. Graves, M. Wright et B. M. Spiegelman. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell 92: 829-839.

PUNG, O. J., A. N. Tucker, S. J. Vore et M. I. Luster. 1985. Influence of estrogen on host resistance: increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. Infect Immun 50: 91-96.

QIN, C., P. Singh et S. Safe. 1999. Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. Endocrinology 140: 2501-2508.

RAZANDI, M., A. Pedram, G. L. Greene et E. R. Levin. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. Mol Endocrinol 13: 307-319.

RAZANDI, M., A. Pedman et E. R. Levin. 2000a. Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. Mol Endocrinol 14: 1434-1447.

RAZANDI, M., A. Pedman et E. R. Levin. 2000b. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function. J Biol Chem 275: 38540-38546.

REGISTER, T. C. et M. R. ADAMS. 1998. Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta. J Steroid Biochem Mol Biol 64: 187-191.

RESNICK, E.M., D.A. Schreihof, A. Periasamy et M.A. Shupnick. 2000. Truncated estrogen receptor product-1 suppresses estrogen receptor transactivation by dimerization with estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 275: 7158-7166.

REVELLI, A., M. Massobrio et J. Tesarik. 1998. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19: 3-17.

RIDER, V., R. T. Foster, M. Evans, R. Suenaga et N. I. Abdou. 1998. Gender differences in autoimmune diseases: estrogen increases calcineurin expression in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 89: 171-180.

Notes: COMMENTS: Comment in: *Clin Immunol Immunopathol* 1998 Dec; 89(3):192-5

RIJHSINGHANI, A. G., K. Thompson, S. K. Bhatia et T. J. Waldschmidt. 1996. Estrogen blocks early T cell development in the thymus. *Am J Reprod Immunol* 36: 269-277.

ROGATSKY, I., J. M. Trowbridge et M. J. Garabedian. 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274: 22296-22302.

ROGER, P., M. E. Sahla, S. Makela, J. A. Gustafsson, P. Baldet et H. Rochefort. 2001. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61: 2537-2541.

ROSNER, W., D. J. Hryb, M. S. Khan, A. M. Nakhla et N. A. Romas. 1998. Androgens, estrogens, and second messengers. *Steroids* 63: 278-281.

ROUBINIAN, J. R., R. Papoian et N. Talal. 1977. Effects of neonatal thymectomy and splenectomy on survival and regulation of autoantibody formation in NZB/NZW F1 mice. *J Immunol* 118: 1524-1529.

ROUBINIAN, J. R., N. Talal, J. S. Greenspan, J. R. Goodman et P. K. Siiteri. 1978. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti- nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp Med* 147: 1568-1583.

SAFE, S. 2001. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. Vitam Horm 62: 231-252.

SALEM, M. L., G. Matsuzaki, G. A. Madkour et K. Nomoto. 1999. Beta-estradiol-induced decrease in IL-12 and TNF-alpha expression suppresses macrophage functions in the course of *Listeria monocytogenes* infection in mice. Int J Immunopharmacol 21: 481-497.

SATO, Y., K. Tsukada, T. Iiai, K. Ohmori, K. Yishida, T. Muto, H. Watanabe, Y. Matsumoto et T. Abo. 1993. Activation of extrathymic T cells in the liver during liver regeneration following partial hepatectomy. Immunology 78: 86-91.

SAVILLE, B., M. Wormke, F. Wang, T. Nguyen, E. Enmark, G. Kuiper, J. A. Gustafsson et S. Safe. 2000. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. J Biol Chem 275: 5379-5387.

SAVITA et U. RAI. 1998. Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: receptor mediated modulation. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 119: 199-204.

SCHWABE, J. W., L. Chapman, J. T. Finch et D. Rhodes. 1993. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. Cell 75: 567-578.

SCREPANTI, I., S. Morrone, D. Meco, A. Santoni, A. Gulino, R. Paolini, A. Crisanti, B. J. Mathieson et L. Frati. 1989. Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. J Immunol 142: 3378-3383.

SEAMAN, W. E. et T. D. GINDHART. 1979. Effect of estrogen on natural killer cells. Arthritis Rheum 22: 1234-1240.

SEAMAN, W. E., T. D. Gindhart, J. S. Greenspan, M. A. Blackman et N. Talal. 1979. Natural killer cells, bone, and the bone marrow: studies in estrogen- treated mice and in congenitally osteopetrotic (mi/mi) mice. J Immunol 122: 2541-2547.

SEIKI, K. et K. SAKABE. 1997. Sex hormones and the thymus in relation to thymocyte proliferation and maturation. Arch Histol Cytol 60: 29-38.

SELI, E., B. Selam, G. Mor, U. A. Kayisli, T. Pehlivan et A. Arici. 2001. Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. Menopause 8: 296-301.

SHAW, M. K., J. B. Lorens, A. Dhawan, R. Dalcanto, H. Y. Tse, A. B. Tran, C. Bonpane, S. L. Eswaran, S. Brocke, N. Sarvetnick, L. Steinman, G. P. Nolan et C. G. Fathman. 1997. Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med 185: 1711-1714.

SIMONCINI, T.A., L. Fornari, P. Manella, G. Varone, A. Caruso, J.K. Liao, et A.R. Genazzani. 2002. Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase. Steroids 67: 935-939.

SIMONCINI, T.A., Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil, K. Ley, W. W. Chin and J. K. Liao. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. Nature 407: 538-541.

SIMPSON, E. R. et S. R. DAVIS. 2001. Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives. Endocrinology 142: 4589-4594.

SMITH, C. L., O. M. Conneely et B. W. O'Malley. 1993. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 6120-6124.

SMITH, E. P., J. Boyd, G. R. Frank, H. Takahashi, R. M. Cohen, B. Specker, T. C. Williams, D. B. Lubahn et K. S. Korach. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. N Engl J Med 331: 1056-1061.

SMITHSON, G., K. Medina, I. Ponting et P. W. Kincade. 1995. Estrogen suppresses stromal cell-dependent lymphopoiesis in culture. J Immunol 155: 3409-3417.

SOCORRO, S., D.M. Power, P.E. Olsson et A.V. Canario. 2000. Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. J Endocrinol 166: 293-306.

SRIVASTAVA, S., M. N. Weitzmann, S. Cenci, F. P. Ross, S. Adler et R. Pacifici. 1999. Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD. J Clin Invest 104: 503-513.

STAPLES, J. E., T. A. Gasiewicz, N. C. Fiore, D. B. Lubahn, K. S. Korach et A. E. Silverstone. 1999. Estrogen receptor alpha is necessary in thymic development and estradiol-induced thymic alterations. J Immunol 163: 4168-4174.

STEFANO, G. B., V. Prevot, J. C. Beauvillain, C. Fimiani, I. Welters, P. Cadet, C. Breton, J. Pestel, M. Salzet et T. V. Bilfinger. 1999. Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. J Immunol 163: 3758-3763.

STEINBERG, A. D., J. B. Roths, E. D. Murphy, R. T. Steinberg et E. S. Raveche. 1980. Effects of thymectomy or androgen administration upon the autoimmune disease of MRL/Mp-lpr/lpr mice. J Immunol 125: 871-873.

SUENAGA, R., M. J. Evans, K. Mitamura, V. Rider et N. I. Abdou. 1998. Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. J Rheumatol 25: 1305-1312.

SUENAGA, R., V. Rider, M. J. Evans et N. I. Abdou. 2001. In vitro-activated human lupus T cells express normal estrogen receptor proteins which bind to the estrogen response element. Lupus 10: 116-122.

SUN, G., W. Porter et S. Safe. 1998. Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. Mol Endocrinol 12: 882-890.

TEIXEIRA, C., J. C. Reed et M. A. Pratt. 1995. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. Cancer Res 55: 3902-3907.

TESARIK, J. et C. MENDOZA. 1995. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. J Clin Endocrinol Metab 80: 1438-1443.

TEYSSIER, C., K. Belguise, F. Galtier et D. Chalbos. 2001. Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. J Biol Chem 276: 36361-36369.

THURMOND, T. S., F. G. Murante, J. E. Stapples, A. E. Silverstone, K. S. Korach et T. A. Gasiewicz. 2000. Role of estrogen receptor alpha in hematopoietic stem cell development and B lymphocyte maturation in the male mouse. Endocrinology 141: 2309-2318.

TORCHIA, J., D. W. Rose, J. Inostroza, Y. Kamei, S. Westin, C. K. Glass et M. G. Rosenfeld. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. Nature 387: 677-684.

TREMBLAY, G. B., A. Tremblay, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, F. Labrie et V. Giguere. 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. Mol Endocrinol 11: 353-365.

TROWBRIDGE, J. M., I. Rogatsky et M. J. Garabedian. 1997. Regulation of estrogen receptor transcriptional enhancement by the cyclin A/Cdk2 complex. Proc Natl Acad Sci U S A 94: 10132-10137.

TSAI, M. J. et B. W. O'MALLEY. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu Rev Biochem 63: 451-486.

VEGETO, E., C. Bonincontro, G. Pollio, A. Sala, S. Viappiani, F. Nardi, A. Brusadelli, B. Viviani, P. Ciana et A. Maggi. 2001. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. J Neurosci 21: 1809-1818.

VERTHELYI, D. et S. A. AHMED. 1994. 17 beta-estradiol, but not 5 alpha-dihydrotestosterone, augments antibodies to double-stranded deoxyribonucleic acid in nonautoimmune C57BL/6J mice. Endocrinology 135: 2615-2622.

VERTHELYI, D. I. AND S. A. AHMED. 1998. Estrogen increases the number of plasma cells and enhances their autoantibody production in nonautoimmune C57BL/6 mice. Cell Immunol 189: 125-134.

VIDAL, S., C. Gelpi et J. L. Rodriguez-Sanchez. 1994. (SWR x SJL)F1 mice: a new model of lupus-like disease. J Exp Med 179: 1429-1435.

VOEGEL, J. J., M. J. Heine, M. Tini, V. Vivat, P. Chambon et H. Gronemeyer. 1998. The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. EMBO J 17: 507-519.

VYHLIDAL, C., I. Samudio, M. P. Kladde et S. Safe. 2000. Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. J Mol Endocrinol 24: 329-338.

WANG, F., D. Hoivik, R. Pollenz et S. Safe. 1998. Functional and physical interactions between the estrogen receptor Sp1 and nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. Nucleic Acids Res 26: 3044-3052.

WANG, H., Y. Stjernholm, G. Ekman, H. Eriksson et L. Sahlin. 2001. Different regulation of oestrogen receptors alpha and beta in the human cervix at term pregnancy. Mol Hum Reprod 7: 293-300.

WANG, W., L. Dong, B. Saville et S. Safe. 1999. Transcriptional activation of E2F1 gene expression by 17beta-estradiol in MCF-7 cells is regulated by NF-Y-Sp1/estrogen receptor interactions. Mol Endocrinol 13: 1373-1387.

WARNER, M., S. Nilsson et J. A. Gustafsson. 1999. The estrogen receptor family. Curr Opin Obstet Gynecol 11: 249-254.

WEBB, P., P. Nguyen, C. Valentine, G. N. Lopez, G. R. Kwok, E. McInerney, B. S. Katzenellenbogen, E. Enmark, J. A. Gustafsson, S. Nilsson et P. J. Kushner. 1999. The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. Mol Endocrinol 13: 1672-1685.

- WILSTROM, A.C., C. Widen, A. Erlandsson, E. Hedman et J. Zilliacus. 2002 Cytosolic glucocorticoid receptor-interacting proteins. Ernst Schering Res Found Workshop 40: 177-196.
- WHITACRE, C. C. 2001. Sex differences in autoimmune disease. Nat Immunol 2: 777-780.
- WHITFIELD, G. K., P. W. Jurutka, C. A. Haussler et M. R. Haussler. 1999. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. J Cell Biochem Suppl 32-33: 110-122.
- WINDMILL, K. F., B. J. Meade et V. W. Lee. 1993. Effect of prepubertal gonadectomy and sex steroid treatment on the growth and lymphocyte populations of the rat thymus. Reprod Fertil Dev 5: 73-81.
- WISDOM, R. 1999. AP-1: one switch for many signals. Exp Cell Res 253:180-185.
- WOOLLEY, C. S., N. G. Weiland, B. S. McEwen et P. A. Schwartzkroin. 1997. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. J Neurosci 17: 1848-1859.
- XIE, W., R. Duan et S. Safe. 1999. Estrogen induces adenosine deaminase gene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor-Sp1 interactions. Endocrinology 140: 219-227.
- XU, H., G. K. Gouras, J. P. Greenfield, B. Vincent, J. Naslund, L. Mazzarelli, G. Fried, J. N. Jovanovic, M. Seeger, N. R. Relkin, F. Liao, F. Checler, J. D. Buxbaum, B. T. Chait, G. Thinakaran, S. S. Sisodia, R. Wang, P. Greengard et S. Gandy. 1998. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. Nat Med 4: 447-451.
- YAHATA, T., T. Kurabayashi, A. Honda, Y. Tojo, K. Tanaka et T. Abo. 1996. Physiological dose of estrogen regulates extrathymic T cells in female mice. Cell Immunol 171: 269-276.

YANAGISAWA, J., Y. Yanagi, Y. Masuhiro, M. Suzawa, M. Watanabe, K. Kashiwagi, T. Toriyabe, M. Kawabata, K. Miyazono et S. Kato. 1999. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. Science 283: 1317-1321.

YEH, S. et C. CHANG. 1996. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 5517-5521.

YLIKOMI, T., M. T. Bocquel, M. Berry, H. Gronemeyer et P. Chambon. 1992. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. EMBO J 11: 3681-3694.

ZHANG, Q. X., A. Borg et S. A. Fuqua. 1993. An exon 5 deletion variant of the estrogen receptor frequently coexpressed with wild-type estrogen receptor in human breast cancer. Cancer Res 53: 5882-5884.

ZHANG, X., L. Wang, H. Zhang, D. Qiao et J. Quoi. 2001. Estrogen inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha release from murine macrophages. Methods Find Exp Clin Pharmacol 23: 169-173.

ZHAO, X. J., G. McKerr, Z. Dong, C. A. Higgins, J. Carson, Z. Q. Yang et B. M. Hannigan. 2001. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. Thorax 56: 205-211.

ZHOU, T., M. Fleck, U. Mueller-Ladner, P. Yang, Z. Wang, S. Gay, S. Matsumoto et J. D. Mountz. 1997. Kinetics of Fas-induced apoptosis in thymic organ culture. J Clin Immunol 17: 74-84.

ZWIJSEN, R. M., R. S. Buckle, E. M. Hijmans, C. J. Loomans et R. Bernards. 1998. Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. Genes Dev 12: 3488-3498.