

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Pharmacologie et Physico-Chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires

Institut Gilbert Laustriat – UMR CNRS 7175/LC1 – Faculté de Pharmacie

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Discipline : Sciences du Vivant – Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Pharmacologie

par **Murielle ZERR-FOUINEAU**

CARACTERISATION DE L'EFFET PROTHROMBOTIQUE DES PROGESTATIFS AU NIVEAU DE LA PAROI VASCULAIRE : ROLE DE L'ENDOTHELIUM ET INFLUENCE DES ESTROGENES

Soutenue publiquement le 25 septembre 2006 devant le jury composé de :

Docteur Jean-Jacques HELWIG

Rapporteur interne

Professeur Jean-François ARNAL

Rapporteur externe

Professeur Paul M. VANHOUTTE

Rapporteur externe

Professeur Josef PFEILSCHIFTER

Examineur

Professeur Valérie B. SCHINI-KERTH

Directeur de thèse

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Pharmacologie et Physico-Chimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires

Institut Gilbert Laustriat – UMR CNRS 7175/LC1 – Faculté de Pharmacie

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Discipline : Sciences du Vivant – Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Spécialité : Pharmacologie

par **Murielle ZERR-FOUINEAU**

CARACTERISATION DE L'EFFET PROTHROMBOTIQUE DES PROGESTATIFS AU NIVEAU DE LA PAROI VASCULAIRE : ROLE DE L'ENDOTHELIUM ET INFLUENCE DES ESTROGENES

Soutenue publiquement le 25 septembre 2006 devant le jury composé de :

Docteur Jean-Jacques HELWIG

Rapporteur interne

Professeur Jean-François ARNAL

Rapporteur externe

Professeur Paul M. VANHOUTTE

Rapporteur externe

Professeur Josef PFEILSCHIFTER

Examineur

Professeur Valérie B. SCHINI-KERTH

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Que le Docteur **Jean-Jacques HELWIG**, les Professeurs **Jean-François ARNAL** et **Paul M. VANHOUTTE** reçoivent l'expression de toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury de thèse, je vous remercie.

Un grand merci au Professeur **Josef PFEILSCHIFTER** de me faire l'honneur d'être l'examineur de ce travail et de participer à mon jury de thèse.

Je remercie très chaleureusement le Professeur **Valérie B. SCHINI-KERTH** de m'avoir initiée à la pharmacologie cardiovasculaire. Pour m'avoir soutenue et encouragée au cours des cinq dernières années, pour vos précieux conseils, votre esprit de synthèse et votre gentillesse, je tiens à vous exprimer ma plus profonde gratitude.

Merci au **personnel des salles d'accouchement** du CHU de Hautepierre et du CMCO de Schiltigheim pour nous avoir fourni les cordons ombilicaux. Merci à toutes les femmes ayant accepté que les cordons soient prélevés à des fins scientifiques.

Merci au personnel de **l'Etablissement Français du Sang** de Strasbourg et plus particulièrement aux docteurs Christian Gachet, Béatrice Hechler et Dominique Cassel pour nous avoir fourni les plaquettes lavées humaines.

A Yannick,

Pour ton amour et ton soutien inconditionnel depuis toutes ces années. Pour ta capacité à trouver les mots justes et réconfortants, pour ta patience et le bonheur que tu m'apportes jour après jour. Pour toutes ces raisons qui font que tu es mon mari. Merci. Ce travail n'aurait pu voir le jour sans ton soutien et c'est pour toutes ces raisons que je tiens à te dédier ce travail de thèse.

A mes parents,

Pour votre soutien et vos encouragements tout au long de mes études. Pour vos précieux conseils et l'éducation que vous m'avez apportée. Pour votre aide précieuse dans les moments difficiles. Merci.

A ma sœur Natacha,

Pour tous les moments de bonheur partagés. Pour m'avoir encouragée et réconfortée dans les moments de doute et soutenue dans mes projets professionnels et personnels. Merci petite sœur. Merci aussi à **Raphaël**, son mari pour son humour et ses mots toujours réconfortants.

A Marie-Fernande, Jean-Mi et Alexis,

Pour votre gentillesse et vos encouragements. Vous êtes une belle-famille exemplaire. Merci. Pour tes conseils informatiques précieux lors de la rédaction de ce travail de thèse, merci Alexis.

A l'ensemble des membres du laboratoire,

Merci à tous, je n'oublierai jamais ces années passées avec vous. Je tiens à remercier plus particulièrement la « Schini-Team », Jasser, Modou, Mamadou S., Mamadou N., Marta, Thierry, Nelly, Stéphanie, Allison et Vanesca. Un grand merci à Christa pour ses bons conseils et sa bonne humeur. Merci à MinHo et Eric, vous êtes bien plus que de simples collègues pour moi, votre amitié me touche profondément et les moments passés ensemble resteront à jamais gravés dans ma mémoire.

A tous mes amis, Carine, Marc, Gabriel, Thierry, Aneth, Nicolas, Philippe, Laurence, etc...
Merci.

PUBLICATIONS ISSUES DE CE TRAVAIL

Publications originales

M. Zerr-Fouineau, M. Jourdain, C. Boesch and V.B. Schini-Kerth. *Progestins prevent the potentiating effect of 17 β -estradiol on the NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells*. En préparation.

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, C. Blot and V.B. Schini-Kerth. *Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors*. FASEB Journal, 2006 (sous presse).

T. Chataigneau, **M. Zerr**, M. Chataigneau, F. Hudlett, C. Hirn and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats*. Menopause. 2004 May-Jun;11(3):255-63.

M. Zerr, T.Chataigneau, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Estrogen substitution restores the basal influence of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor on vascular tone in isolated mesenteric arteries from ovariectomized rats*. "EDHF 2002", édité par P.M. Vanhoutte, Taylor & Francis, (22):174-180.

Communications orales

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, C. Blot and V.B. Schini-Kerth. *Progestins reduce the anti-aggregatory effect of endothelial cells by down-regulating the expression of endothelial NO synthase through activation of the glucocorticoid receptor*. "Journées Campus Illkirch", Avril 2006, Illkirch, France.

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *Progestins decrease the expression of endothelial NO synthase and the formation of NO through activation of the glucocorticoid receptor*. Symposium on Mechanisms of Vasodilatation and EDHF, 31 Mai–4 Juin, 2005, Anvers, Belgique.

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *Medroxyprogesterone acetate potentiates surface pro-coagulant activity and decreases the expression of endothelial NO synthase and the formation of NO in human endothelial cells*. XXXV International Congress of Physiological Sciences (IUPS), 31 Mars-5 Avril, 2005, San Diego, Etats-Unis.

M. Zerr, T.Chataigneau, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Influence du 17beta-oestradiol sur la libération vasculaire de NO et EDHF chez la ratte ovariectomisée*. 2002, Forum des Jeunes Chercheurs du Club NO, Paris, France.

Communications affichées

M. Zerr-Fouineau, M. Jourdain, C. Boesch and V.B. Schini-Kerth. *Progestins prevent the potentiating effect of 17β-estradiol on the NO-mediated anti-aggregatory effect of endothelial cells by inhibiting the expression of endothelial NO synthase and the formation of NO*. “Journées Campus Illkirch”, Avril 2006, Illkirch, France.

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, C. Blot and V.B. Schini-Kerth. *Progestins reduce the anti-aggregatory effect of endothelial cells by down-regulating the expression of endothelial NO synthase through activation of the glucocorticoid receptor*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2006, 20: M-76.

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *Several progestins decrease the expression of endothelial NO synthase and the formation of NO in human endothelial cells through activation of the glucocorticoid receptor*. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, 2005, 98: 371.

M. Zerr-Fouineau, M. Chataigneau, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *Medroxyprogesterone acetate potentiates surface pro-coagulant activity and decreases the expression of endothelial NO synthase and the formation of NO in human endothelial cells*. *FASEB J*, 2005, 19: A 1596

M. Zerr, M. Chataigneau, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *Medroxyprogesterone acetate but not nomegestrol acetate decreases the expression of endothelial NO synthase and the formation of NO in human endothelial cells: potential role of the partial glucocorticoid activity*. Journée Campus Illkirch, 2004.

M. Zerr, M. Chataigneau, A. Engerer, C. Hirn, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *Medroxyprogesterone acetate but not nomegestrol acetate decreases the expression of endothelial NO synthase in human umbilical vein endothelial cells: potential role of the partial glucocorticoid activity*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2004, 18: 181

M. Zerr, M. Chataigneau, A. Engerer, C. Hirn, P. Bonnet and V.B. Schini-Kerth. *The expression of endothelial NO synthase is decreased by medroxyprogesterone acetate but not*

nomegestrol acetate in human endothelial cells: potential role of the partial glucocorticoid activity. Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 2004, 97: 407.

M. Chataigneau, **M. Zerr**, C. Hirn, T. Chataigneau and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment with progesterone and medroxyprogesterone acetate does not alter the protective effect of estrogen on the endothelial control of the mesenteric artery tone in ovariectomized rats.* Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 2003, 96, p 384.

M. Zerr, T. Chataigneau, M. Chataigneau, C. Hirn and V.B. Schini-Kerth. *Chronic estrogen treatments do not affect endothelium-dependent relaxations mediated by NO and EDHF in the isolated mesenteric artery of ovariectomized rats.* Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 2003, 96, p 386.

C. Hirn, T. Chataigneau, M. Chataigneau, **M. Zerr** and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment with progesterone but not the synthetic progestin medroxyprogesterone acetate restores endothelial control on vascular tone in isolated mesenteric artery of ovariectomized rats.* Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 2003, 96, p 386.

M. Zerr, T. Chataigneau, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment of ovariectomized rats with estrogens affects basal release of nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the isolated mesenteric artery.* Journée scientifique de l'IFR Gilbert Laustriat, Strasbourg, 30 avril 2002.

T. Chataigneau, **M. Zerr**, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment with estrogens alter red wine polyphenolic compound-induced NO- and EDHF-mediated relaxations in the isolated rat mesenteric artery.* Journée scientifique de l'IRF Gilbert Laustriat, Strasbourg, 30 avril 2002.

T. Chataigneau, **M. Zerr**, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment with estrogens alter red wine polyphenolic compound-induced NO- and EDHF-mediated relaxations in the isolated rat mesenteric artery.* Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 2002, 95, p 334.

M. Zerr, T. Chataigneau, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Female sex hormones control the basal release of NO and EDHF in isolated rat mesenteric artery.* Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux, 2002, 95, p 338.

T. Chataigneau, **M. Zerr**, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Endothelium-dependent relaxations mediated by nitric oxide (NO) and endothelium-derived*

hyperpolarizing factor (EDHF) in isolated mesenteric artery: influence of chronic treatment with estrogens in ovariectomized rats. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2002, 16: A-79

M. Zerr, T.Chataigneau, F. Hudlett, F. Pernot and V.B. Schini-Kerth. *Chronic treatment of ovariectomized rats with estrogens affects basal release of nitric oxide (NO) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the isolated mesenteric artery. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2002, 16: A-423*

RESUME

De nombreuses études épidémiologiques indiquent que l'administration d'une combinaison d'un estrogène et d'un progestatif pour la contraception ou le traitement hormonal substitutif de la ménopause, est associée à une augmentation de 2 à 4 fois du risque d'événements cardiovasculaires chez la femme. Ces complications sont principalement la conséquence d'une activation excessive de la cascade de la coagulation avec développement d'une thrombose veineuse pouvant évoluer ultérieurement vers une embolie pulmonaire ou, comme l'ont montré des études plus récentes, d'une thrombose artérielle pouvant évoluer vers un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (études HERS, WHI, MWS). Des études épidémiologiques ont montré que le risque de thrombose est 2 fois plus élevé avec les pilules microdosées contenant un progestatif de troisième génération comparé à celles contenant un progestatif de deuxième génération indiquant un rôle déterminant des progestatifs dans le développement de ces thromboses. Les progestatifs forment une classe hétérogène de molécules. Ils possèdent tous une importante affinité pour le récepteur de la progestérone. Ils sont cependant capables de se lier et d'activer d'autres récepteurs nucléaires tels que le récepteur aux glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes ont été décrits pour entraîner une diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) qui est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendantes médiées par le monoxyde d'azote (NO) ainsi qu'à une hypertension. L'objectif de mon travail de thèse a consisté à étudier l'effet des progestatifs, seuls ou en combinaison avec un estrogène, sur la formation endothéliale de NO, un puissant facteur vasoprotecteur et anti-thrombotique.

Première étude : le but de ce travail a été l'étude des effets des progestatifs sur l'expression et l'activité de la eNOS dans des cellules endothéliales de veine de cordons ombilicaux humains (HUVECs), ainsi que la caractérisation des conséquences de cet effet en s'intéressant particulièrement à l'activité glucocorticoïde partielle des progestatifs.

Nos résultats montrent que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, qui sont des progestatifs ayant une forte activité glucocorticoïde partielle, entraînent une diminution de l'expression de la eNOS au niveau des ARN messagers ainsi qu'au niveau de la protéine dans les HUVECs. Ces effets ne sont pas observés avec des progestatifs tels que l'acétate de nomégestrol ou le lévonorgestrel qui sont dépourvus d'une telle activité glucocorticoïde partielle. D'autre part, ces effets sont concentration-dépendants et sont observés à des concentrations de 1 et 10 nM, semblables à celles retrouvées dans la circulation sanguine des femmes traitées par une combinaison estro-progestative. De plus, ces effets inhibiteurs de l'acétate de médroxyprogestérone et de la progestérone sur l'expression de la eNOS sont associés à une diminution de la formation de NO induite par la thrombine. Des expériences d'immunomarquage indiquent que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, tout comme la dexaméthasone sont capables d'interagir et d'activer le récepteur aux glucocorticoïdes. De tels effets ne sont pas observés avec un traitement à l'acétate de nomégestrol ou au lévonorgestrel indiquant que ces progestatifs n'interagissent pas avec le récepteur aux glucocorticoïdes. D'autre part, la délétion du récepteur aux glucocorticoïdes par transfection des HUVECs avec des petits ARN interférents (siRNA) spécifiques, tout comme un prétraitement avec un antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes, la mifépristone, prévient les effets inhibiteurs de l'acétate de médroxyprogestérone et de la progestérone sur l'expression de la eNOS indiquant un rôle majeur de l'activité glucocorticoïde partielle. De même, un prétraitement des HUVECs avec la mifépristone prévient l'effet inhibiteur de l'acétate de médroxyprogestérone et de la progestérone sur l'expression protéique de la eNOS. La production de NO par les HUVECs s'oppose à l'agrégation plaquettaire. La diminution de la production de NO par les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde

partielle a pour conséquence de lever l'effet inhibiteur des cellules endothéliales vis-à-vis de l'agrégation plaquettaire. Un tel effet n'est pas observé avec les autres progestatifs.

Deuxième étude : La plupart des traitements hormonaux prescrits actuellement étant composée d'une association estro-progestative, nous nous sommes dans un deuxième temps intéressés aux effets des traitements combinés (17 β -estradiol en association avec un progestatif) sur l'expression de la eNOS dans les HUVECs, ainsi que sur la formation de NO et leurs conséquences sur l'agrégation plaquettaire.

Un traitement au 17 β -estradiol entraîne une augmentation de l'expression de la eNOS qui est associée à une augmentation de la formation de NO. L'augmentation de l'expression de la eNOS est inhibée lorsque les cellules sont traitées de manière concomitantes avec le 17 β -estradiol et un progestatif, quel que soit la nature du progestatif étudié (acétate de médroxyprogestérone, progestérone, acétate de nomégestrol ou lévonorgestrel). Cependant seuls l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, qui ont une importante activité glucocorticoïde partielle, inhibent la formation de NO induite par le 17 β -estradiol, alors que l'acétate de nomégestrol ou le lévonorgestrel ne vont pas l'affecter. La formation de NO induite par le 17 β -estradiol potentialise l'effet anti-agrégant plaquettaire des HUVECs. De plus, cet effet est inhibé par l'association au 17 β -estradiol, d'acétate de médroxyprogestérone ou de progestérone, alors que l'acétate de nomégestrol ou le lévonorgestrel sont sans effet. Un prétraitement des cellules endothéliales avec l'antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes prévient les effets de l'acétate de médroxyprogestérone ou de la progestérone indiquant que l'effet inhibiteur des progestatifs implique l'activation du récepteur des glucocorticoïdes plutôt que le récepteur de la progestérone, puisque des progestatifs dépourvus d'activité glucocorticoïde partielle n'ont pas cet effet.

Troisième étude : le but de ce travail a été de déterminer l'influence des hormones sexuelle femelles et plus particulièrement du 17 β -estradiol *in vivo* sur la réactivité vasculaire et la fonction endothéliale. Nous montrons que la régulation du tonus vasculaire basal par le NO persiste à deux semaines après l'ovariectomie, cependant elle est abolie après cinq semaines. La régulation du tonus vasculaire basal par l'EDHF est quant à elle abolie dès deux semaines, un effet qui est maintenue à 5 semaines après l'ovariectomie. Ainsi, il semblerait que la composante EDHF soit plus sensible aux changements hormonaux que la composante NO. De plus, les résultats de cette étude indiquent que l'administration de 17 β -estradiol est capable de restaurer la participation basale de NO et d'EDHF dans la régulation du tonus vasculaire.

Quatrième étude : le but de ce travail a été de caractériser les effets de traitements progestatifs *in vivo* sur la réactivité vasculaire et la fonction endothéliale. Nous montrons que non seulement l'administration de 17 β -estradiol, mais également celle d'un progestatif, la progestérone est capable de restaurer la libération basale de NO comme l'indique la potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine par la N^ω-nitro-L-arginine. De tels effets ne sont pas observés quant à la composante EDHF, suggérant que celle-ci n'est pas contrôlée par les progestatifs dans nos conditions expérimentales. De plus, l'administration d'acétate de médroxyprogestérone ne restaure pas la libération basale de NO, suggérant que la nature du progestatif administré va jouer un rôle majeur dans leurs effets vasculaires.

En conclusion, l'ensemble de ce travail suggère que la structure chimique des progestatifs et plus particulièrement leur activité glucocorticoïde partielle joue un rôle clef dans leurs effets vasculaires. De plus, ces résultats pourraient être à la base du développement futur de nouveaux progestatifs dépourvus d'effets secondaires prothrombotiques médiés par ces récepteurs afin de diminuer les risques d'événements vasculaires liés aux traitements estro-progestatifs à long terme.

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... 3

A. Les traitements hormonaux.....	4
1. Découverte des hormones sexuelles	6
1.1. Les estrogènes	6
1.2. La progestérone	7
2. La contraception hormonale	8
3. Le traitement hormonal substitutif.....	10
4. Les différentes hormones sexuelles	12
4.1. Les estrogènes	12
4.2. Les progestatifs.....	13
5. Mécanismes d'action des hormones sexuelles féminines.....	17
5.1. Les estrogènes	20
5.2. Les progestatifs.....	22
5.2.1. Les récepteurs à la progestérone	22
5.2.2. Les autres récepteurs stéroïdiens.....	23
B. Traitements hormonaux et pathologies cardiovasculaires.....	27
1. Contraceptifs oraux et risque thrombotique.....	27
1.1. Contraceptifs oraux et thromboses veineuses	27
1.2. Contraceptifs oraux et thromboses artérielles.....	29
2. Traitements hormonaux substitutifs et risque thrombotique.....	30
2.1. THS et thromboses veineuses	31
2.2. THS et risque coronarien.....	33
2.3. THS et risque d'accidents vasculaires cérébraux.....	34
3. Régulation de l'homéostasie vasculaire par l'endothélium.....	36
3.1. Généralités.....	36
3.2. Le monoxyde d'azote, NO.....	39
3.2.1. Biosynthèse du NO	40
3.2.2. Effets biologiques du NO.....	48
3.2.2.1. Effets du NO sur la paroi vasculaire	49
3.2.2.1.1. NO et tonus vasculaire	49
3.2.2.1.2. NO et prolifération/apoptose des cellules vasculaires	50
3.2.2.2. Effets du NO sur les éléments sanguins.....	51
3.2.2.2.1. Effets du NO au niveau des plaquettes.....	52
3.2.2.2.2. NO et facteur tissulaire.....	53
3.2.2.2.3. Autres effets du NO.....	53
3.3. La prostacycline, PGI ₂	54
3.4. Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, EDHF.....	56
3.5. Endothélium et régulation de la coagulation et de la fibrinolyse.....	59

3.5.1 Endothélium et cascade de la coagulation	59
3.5.2. Endothélium et fibrinolyse.....	63
4. Effets vasculaires des hormones stéroïdiennes.....	64
4.1. Estrogènes et protection vasculaire.....	64
4.1.1. Estrogènes et régulation du tonus vasculaire	64
4.1.2. Estrogènes et inflammation.....	67
4.1.3. Estrogènes et profil lipidique	68
4.1.4. Estrogènes et risque thrombotique.....	68
4.2. Progestatifs et protection vasculaire	70
4.2.1. Progestatifs et régulation du tonus vasculaire.....	70
4.2.2. Progestatifs et profil lipidique.....	72
4.2.3. Progestatifs et risque thrombotique.....	72
4.3. Glucocorticoïdes et effets vasculaires.....	73

OBJECTIFS 77

RESULTATS 81

PARTIE I..... 84

Article 1 85

PARTIE II 122

Article 2 123

PARTIE III..... 161

Article 3 162

PARTIE IV 173

Article 4 174

DISCUSSION GENERALE 187

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 198

INTRODUCTION

A. Les traitements hormonaux

La contraception est aussi vieille que l'humanité. De tout temps, les femmes ont essayé avec plus ou moins de succès de contrôler leur fertilité. Le papyrus Kahun, plus ancien écrit traitant de la gynécologie et de la contraception date de 1900 avant Jésus-Christ et décrit des contraceptifs à base d'excréments de crocodile et de pâte fermentée. Pour empêcher une grossesse, l'utilisation de préparations à base d'huile de cèdre ou d'encens mélangé à de l'huile d'olive ainsi que d'infusions de plantes médicinales sera très répandu dans la Grèce antique. Des préservatifs en lin, en peau de mouton, de chèvre ou de serpent furent utilisés dans diverses sociétés. Soranos, brillant gynécologue de l'Antiquité décrira l'utilisation de tampons occlusifs en laine servant à fermer le col de l'utérus. En 1924, Kiasuku Ogino, médecin japonais met au point la méthode portant son nom, qui calcule la période de fécondité entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour du cycle et pratiquant l'abstinence durant cette période. Autant de méthodes qui prouvent l'inventivité humaine dans ce domaine, mais qui se sont soldées par un nombre important de grossesses indésirées.

Ainsi la découverte des hormones, la compréhension du cycle hormonal et l'apparition de la pilule contraceptive ont joué un rôle fondamental. En effet, l'ovaire, qui est le lieu de production des gamètes femelles, les ovocytes et de deux hormones sexuelles, l'estrogène et la progestérone, présente un fonctionnement cyclique d'une durée de 28 jours. Ce cycle ovarien, appelé également cycle menstruel, se compose de deux phases, une phase folliculaire et une phase lutéale. Au cours de la phase folliculaire, il y a maturation des follicules qui est sous le contrôle des estrogènes dont la sécrétion augmente progressivement au cours de cette phase jusqu'à atteindre un pic de concentration aux alentours du 14^{ème} jour du cycle ovarien. C'est à ce moment que le follicule mature se rompt et que l'ovocyte est recueilli au niveau de la trompe, il s'agit de l'ovulation. Au cours de la phase lutéale, le follicule mature se transforme en corps jaune qui va sécréter la progestérone. La sécrétion des estrogènes et de la

progestérone se fait sous le contrôle de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Les cellules hypophysaires vont en effet libérer de manière pulsatile deux gonadostimulines, l'hormone lutéinisante, LH et l'hormone folliculostimulante, FSH. Cette libération est elle-même régulée par les neurones hypothalamiques qui vont libérer de manière pulsatile de la gonadoréline, GnRH. L'action de la FSH va dominer au cours du cycle folliculaire où elle entraîne la maturation du follicule et la production d'estrogènes. Le pic plasmatique de LH entraîne quant à lui l'ovulation et au cours de la phase lutéale, LH va contrôler le développement du corps jaune et la production de progestérone et d'estrogènes au cours de cette phase. Le progestérone ainsi que les estrogènes vont quant à eux être capable d'exercer un rétrocontrôle sur la sécrétion de LH et FSH. La contraception hormonale va empêcher la fécondation par ses effets au niveau de l'hypophyse en inhibant la production de LH et de FSH et directement au niveau de l'utérus en empêchant la transformation de la muqueuse utérine et en épaississant la glaire cervicale dans le cas d'une combinaison estro-progestative ou uniquement au niveau de l'utérus dans le cas d'un progestatif seul.

D'autre part, un autre processus physiologique qui va impliquer des variations hormonales est la ménopause. En effet, la ménopause correspond à l'arrêt de ces cycles menstruels et à l'arrêt de la production des deux types d'hormones sexuelles femelles que sont les estrogènes et la progestérone. Ceci s'accompagne de l'apparition de divers troubles tels que des bouffées de chaleur, l'ostéoporose, des troubles du sommeil, de l'humeur, des sécheresses vaginales, des modifications de la peau ainsi qu'une prise de poids. Afin de pallier à l'apparition de ces troubles, le traitement hormonal de substitution, qui consiste à amener de manière exogène les hormones sexuelles femelles a été développé.

1. Découverte des hormones sexuelles

1.1. Les estrogènes

En 1923, Edgard Allen et Edward Doisy vont confirmer une hypothèse datant du 19^{ème} siècle. Ils vont démontrer que l'injection de liquide folliculaire à une ratte ovariectomisée entraîne l'apparition de cellules kératinisées caractéristiques de l'estrus au niveau des frottis vaginaux. Ils donnent le nom d'estrogènes aux substances contenues dans le liquide folliculaire et responsable de ces changements histologiques. Dès 1927, on a découvert que les estrogènes sont présents dans des quantités importantes dans les urines de la femme enceinte ainsi que celles de jument gravide. L'isolation d'estrogènes à partir d'urines de juments gravides sera pratiquée pendant de nombreuses années. En 1929, Adolf Butenandt isole l'estrone sous la forme d'un cristal pur. D'autres chercheurs étudient l'action des estrogènes. J.B. Collip, D.L. Thomson et J.S.L. Browne étudient les hormones placentaires et ovariennes. En 1930, ils publient trois articles dans le *Canadian Medical Association Journal*, dans lesquels ils décrivent l'extraction du composé estrogénique dans sa forme pure à partir du placenta humain. Les estrogènes ainsi décrits seront capables d'inhiber la sécrétion de GnRH et donc de LH et FSH, ce qui a pour conséquence d'empêcher l'ovulation. En 1931, Guy Marrian parvient à isoler l'estriol, un dérivé de l'estrogène dont l'administration par voie orale est possible mais ayant une efficacité insatisfaisante. En 1933, deux chimistes, Schwenk et Hildebrand, parviennent par réduction de l'estrone à synthétiser l'estradiol, ce qui va marquer le début de la contraception hormonale moderne. C'est en 1938 que Hans H. Inhoffen réalise la synthèse du 17- α -éthynylestradiol, qui est le premier estrogène actif par voie orale et qui est encore aujourd'hui le principal estrogène entrant dans la composition des contraceptifs oraux.

1.2. La progestérone

Dès 1897, John Beard, embryologiste, décrit le rôle du corps jaune dans le blocage de l'ovulation et associe sa dégénération à la préparation d'une nouvelle ovulation. En 1919, Ludwig Haberlandt, professeur autrichien parvient par la transplantation d'ovaires de lapines gravides sur des lapines non gravides à freiner l'ovulation chez ces dernières (Simmer 1975). En 1932, Willard Myron Allen parvient à isoler la progestérone à partir d'ovaires de truies et c'est en 1934 qu'Adolf Butenandt parvient à réaliser la synthèse de la progestérone. Ce n'est qu'en 1937 que A.W. Makepeace montre que la progestérone est capable de bloquer l'ovulation chez la lapine. La progestérone va en effet inhiber par rétrocontrôle négatif la sécrétion de LH et FSH et empêcher le développement folliculaire. En 1940, Russel Marker parvient à synthétiser de la progestérone à partir de diosgénine, présente en très grande quantité dans les ignames sauvages, une plante mexicaine. Cette avancée donnera lieu à la création d'un laboratoire au Mexique où George Rosenkranz fera également la découverte de la testostérone à partir de laquelle Carl Djerassi aboutira à la synthèse de la norprogestérone, qui servira au développement d'un grand nombre de progestatifs. Jackie R. Bickenbach et Paulikovics parviennent, en 1944, à bloquer l'ovulation en injectant quotidiennement à une femme une dose de 20 mg de progestérone. L'administration de la progestérone par voie orale n'est alors pas possible du fait de la faible activité de la progestérone lorsqu'elle est administrée ainsi.

Afin de pallier aux faibles efficacités et biodisponibilités de la progestérone, l'équipe de Carl Djerassi et George Rosenkranz réussit en 1951, à partir des travaux de Hans H. Inhoffen, la synthèse de 19-nor-17 α -éthynyltestostérone, plus connus sous le nom de noréthistérone ou noréthindrone, la première molécule progestative active par voie orale. Depuis, un très grand nombre de progestatifs a été développé, dans le but d'augmenter l'efficacité et de minimiser les effets secondaires associés à la prise de ces molécules.

2. La contraception hormonale

L'idée de développer le premier contraceptif hormonal à partir de ces hormones résulta de la rencontre de deux femmes. Margaret Sanger, infirmière dans les maternités les plus pauvres de New York et Katherin Dexter Mc Cormick, une des premières femmes biologiste aux Etats-Unis. En 1950, le dynamisme de la première associé à la richesse de la seconde parvinrent à convaincre le Dr Gregory Pincus de mettre au point le premier contraceptif hormonal. Très rapidement la noréthistérone et un dérivé, le noréthindrel furent testés par administration orale chez l'animal et les expériences furent concluantes. En 1956, les premiers essais cliniques virent le jour et permirent à Gregory Pincus, au Dr Min Chuh Cheng en collaboration avec John Rock, gynécologue à Harvard, de montrer que l'administration de petites doses d'estrogènes et de progestérone sont capables de prévenir une grossesse (Diczfalusy 1979). En 1956, ces expériences aboutissent au développement du premier contraceptif hormonal oral, l'Enovid[®] 10 mg, contenant le noréthindrel, progestatif de synthèse en association avec le mestranol, un estrogène, qui sera testé sur 250 femmes portoricaines. Cette étude démontre une remarquable efficacité contraceptive de l'Enovid[®]. Des études ultérieures associant noréthindrone (10 mg) et mestranol (150 µg) montreront des résultats semblables. Il faudra cependant attendre 1960 pour que l'Enovid[®] 10 mg soit approuvé par la Food and Drug Administration comme contraceptif oral. En France, il faudra attendre 1967 pour voir cette première pilule commercialisée. Ces premières pilules contraceptives contenaient des doses très importantes de progestatifs et d'estrogènes, doses bien plus importantes que celles nécessaires à la suppression de l'ovulation, et les réductions successives des dosages ont été, avec le souci de développer des molécules originales, une des principale préoccupation dans le développement des contraceptifs oraux au cours des 40 dernières années. Les principaux effets secondaires de ces contraceptifs sont des troubles généraux : céphalées, tension mammaire, irritabilité, saignements irréguliers, prise de poids et

réétention hydrosodée, cependant certaines préparations sont également susceptibles d'augmenter la fréquence des accidents thrombotiques, surtout lorsque la personne traitée présente un facteur prédisposant (hyperlipidémie, tabagisme...). La nécessité de réduire les dosages hormonaux résulte à la fois de la nécessité de diminuer les effets secondaires non négligeables liés à la prise de ces contraceptifs hormonaux ainsi que de la nécessité pour les entreprises pharmaceutiques de développer de nouveaux contraceptifs hormonaux originaux de par leur composition. Un des plus récents contraceptifs oraux commercialisés en Europe est composé de 20 µg d'éthinylestradiol et de 100 µg de lévonorgestrel, ce qui représente une prise quotidienne de stéroïdes très faible par rapport à la prise quotidienne d'Enovid[®], et ce sans en diminuer l'efficacité contraceptive. Cette révolution pharmacologique que représente la pilule contraceptive s'est accompagnée d'une réelle révolution sociale et sexuelle en permettant pour la première fois aux femmes de contrôler leur fertilité et de leur permettre d'envisager des choix professionnels sur un pied d'égalité avec les hommes. Il existe aujourd'hui de très nombreux contraceptifs hormonaux différents de par leur composition et leurs dosages mais qui ont tous en commun une efficacité contraceptive avoisinant les 100 % et qui sont à l'heure actuelle utilisés par plus de 100 millions de femmes à travers le monde (WHO, 1998). Les contraceptifs hormonaux peuvent être composés d'un progestatif seul ou d'une association estro-progestative. De nombreuses modalités d'administration de ces contraceptifs hormonaux existent : ils peuvent être administrés par voie orale, par voie transdermique auquel cas on évite le premier passage hépatique responsable de la forte stimulation de synthèse de l'angiotensinogène, de facteurs procoagulants et de lipides à effet athérogène par les estrogènes, par voie injectable, par implant sous-dermique ou encore par voie locale où le progestatif est associé à un dispositif intra-utérin. Dans le cas de l'administration d'un progestatif seul, celle-ci peut se faire de manière continue ou de manière discontinue auquel cas la dose de progestatif administrée sera plus élevée que précédemment,

mais uniquement du cinquième au vingt-cinquième jour du cycle. Dans le cas d'un traitement estro-progestatif, on distingue la contraception séquentielle et la contraception combinée commune, dans les deux cas la prise du traitement s'effectue généralement du cinquième au vingt-cinquième jour du cycle à raison d'un comprimé par jour. La contraception séquentielle comporte la prise d'un estrogène seul pendant une dizaine de jours, puis d'une combinaison estro-progestative alors que la contraception combinée commune comporte toujours une association estroprogestative soit en quantités constantes, soit en quantités différentes au cours du cycle. Les contraceptifs oraux font aujourd'hui partie des 200 médicaments les plus importants en terme de prescriptions au monde ce qui traduit toute son importance (WHO, 1999). Les contraceptifs hormonaux quels qu'ils soient représentent à l'heure actuelle le contraceptif le plus fiable au monde avec une efficacité avoisinant les 100 %.

3. Le traitement hormonal substitutif

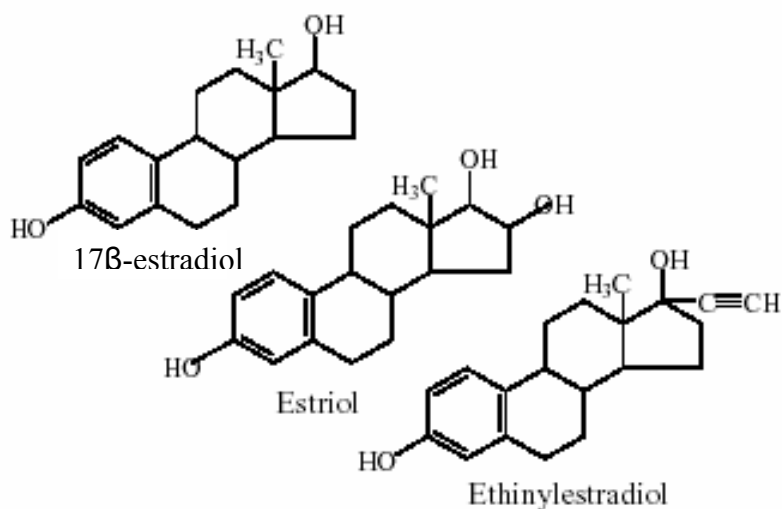
La ménopause signifie étymologiquement "arrêt des ménorhées" et désigne la période qui survient chez la femme au moment où les ovaires arrêtent de produire les hormones sexuelles, l'estrogène et la progestérone. La ménopause s'accompagne de troubles tels que les bouffées de chaleur, des troubles du sommeil, de l'humeur, des sécheresses vaginales, des modifications de la peau, une prise de poids ainsi que l'apparition d'une fragilité osseuse, l'ostéoporose. C'est en 1970 que le premier traitement hormonal substitutif a été mis en place pour tenter de réduire la progression de l'ostéoporose, maintenir une trophicité vaginale normale et pallier à la survenue des autres troubles ménopausiques. Il s'agit d'un traitement estrogénique pur : le Prémarin[®] qui est composé d'estrogènes sulfoconjugués d'origine équine et qui contient une dizaine d'estrogènes biologiquement actifs. La première indication du Prémarin[®] était l'ostéoporose. Dès 1975 de nombreuses études observationnelles pour la plupart américaines démontrent que la prise à long terme de ce traitement est associée à une augmentation du nombre de cancers de l'endomètre (British Gynaecological Cancer Group,

1981). Suite à ces observations une étude prospective est menée en 1976 : 2088 femmes reçurent un traitement estrogénique pur et 3792 une traitement combinant un estrogène et un progestatif. Les résultats de cette étude indiquent 3,8/1000 cas de cancers de l'endomètre dans le groupe traité avec l'estrogène seul alors que ce risque n'est que de 0,5/1000 dans le cas d'un traitement combiné (Gambrell et al. 1979). La découverte de l'association du risque de cancers de l'endomètre à la prise d'estrogènes seuls a été un frein à la prescription des THS au début des années 1980. Il faut attendre 1982 pour que ces prescriptions reprennent. Les estrogènes administrés seuls entraînant une hyperplasie endométriale et une augmentation du cancer de l'utérus, le traitement estrogénique pur n'est alors plus prescrit qu'aux femmes ayant subi une hystérectomie alors qu'on va leur associer un progestatif pendant au moins une partie du cycle pour les femmes ménopausées ayant un utérus intact. Ces traitements hormonaux de substitution vont pouvoir être administrés par voie orale auquel cas on va, comme pour la contraception, retrouver les inconvénients liés au premier passage hépatique, par voie transdermique ou encore par voie nasale. Dans le cadre d'un traitement estroprogestatif, les hormones peuvent bien sûr être administrées séparément, mais il existe des associations estro-progestatives comportant de l'estradiol (et non de l'éthinylestradiol comme les contraceptifs) et un progestatif. Le traitement peut être continu ou discontinu auquel cas il y a une semaine d'interruption de la prise du traitement et au cours de laquelle survient une hémorragie dite de privation. Le traitement hormonal de substitution, bien que controversé par les récentes études cliniques, reste à l'heure actuelle le moyen le plus efficace de prévenir le développement de l'ostéoporose ainsi que les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée.

4. Les différentes hormones sexuelles

4.1. Les estrogènes

Alors que les progestatifs forment une classe importante de molécules de par leur nombre et de par leur diversité, les estrogènes forment quant à eux une classe plutôt réduite de molécules. Les trois principaux estrogènes sont le 17 β -estradiol, l'estriol et l'éthinylestradiol.



Le 17 β -estradiol est l'estrogène naturel produit par les ovaires et est largement utilisé dans la composition des traitements hormonaux substitutifs utilisés en Europe et plus particulièrement en France. Il est disponible et peut être administré sous forme orale, transdermique et nasale. Les estrogènes sulfoconjugués d'origine équine, encore appelés estrogènes conjugués équins sont obtenus à partir de l'urine de juments gravides et sont largement utilisés dans le traitement des carences estrogéniques surtout dans le cadre de la ménopause. Le Prémarin[®], premier traitement estrogénique pur utilisé dans le traitement de la ménopause, contient ainsi une dizaine d'estrogènes biologiquement actifs. Ces estrogènes sulfoconjugués représentent les estrogènes de référence des traitements utilisés aux Etats-Unis, mais sont beaucoup moins utilisés en Europe.

L'éthinylestradiol est l'estrogène de référence qui compose en association avec un progestatif la grande majorité des traitements contraceptifs prescrits à l'heure actuelle. Il peut cependant également être utilisé dans le traitement d'une déficience estrogénique.

L'estriol, l'hydroxyestrone et le promestriène ont eux un pouvoir estrogénique plus faible que les estrogènes cités précédemment et sont principalement utilisés pour leur effet trophique vaginal.

Certains estrogènes de synthèse tel que le diéthylstilbestrol et le forfestrol sont eux utilisés dans le cadre du traitement de cancer de la prostate avec ou sans métastases.

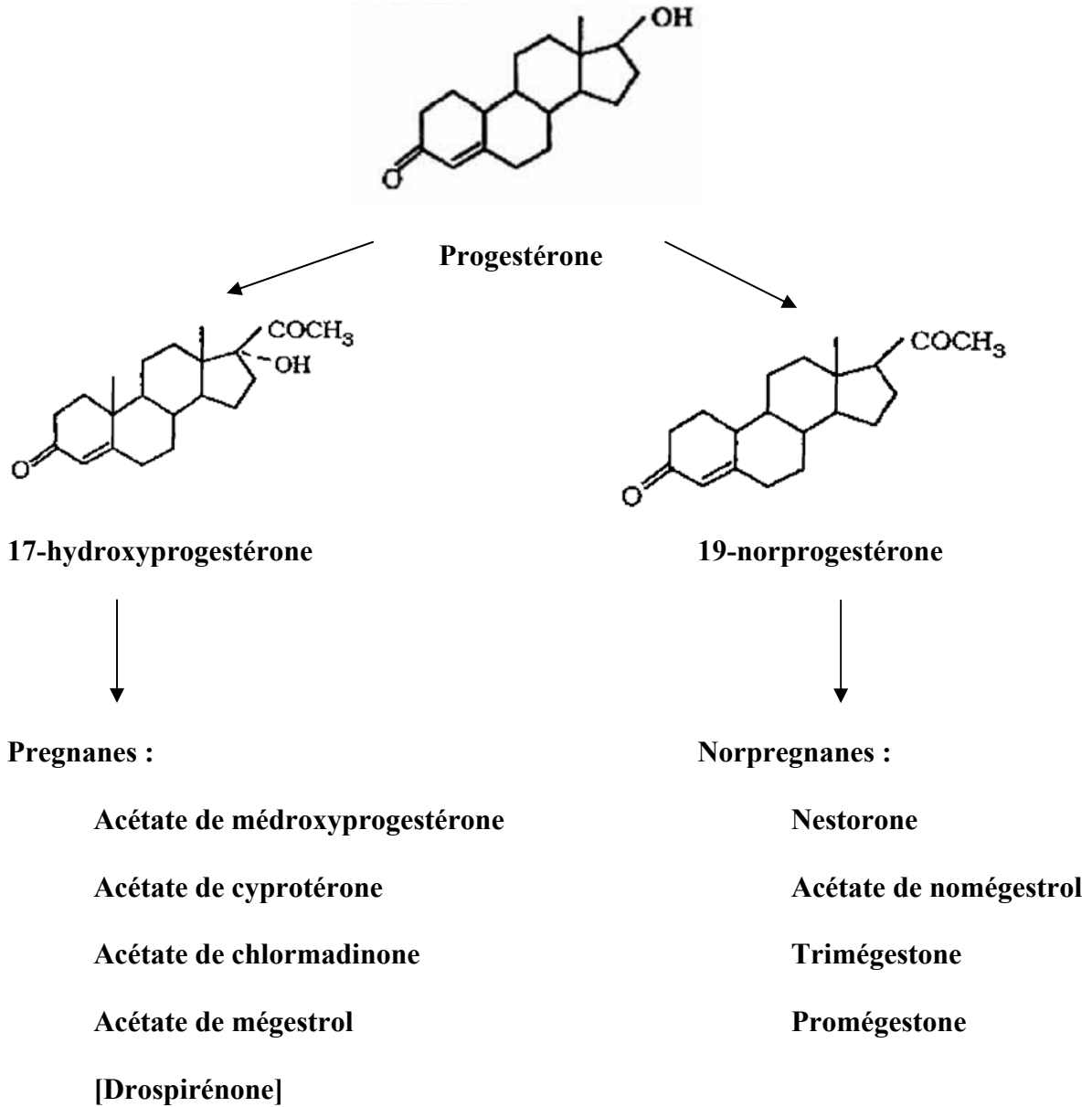
4.2. Les progestatifs

Les progestatifs forment une classe très importante de molécules, avec de très nombreuses molécules utilisées à la fois dans les contraceptifs oraux ainsi que dans les traitements substitutifs hormonaux. Les progestatifs de synthèse utilisés en clinique sont dérivés soit de la progestérone soit de la testostérone.

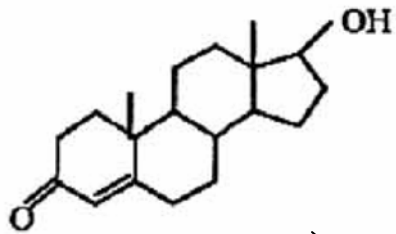
Dans le cas des dérivés de la progestérone, il s'agit de dérivés de la 17 OH- progestérone soit des dérivés de la 19-norprogestérone, ce sont les pregnanes et les norpregnanes respectivement. Dans le cas des dérivés de la 19-nortestostérone : il s'agit des estranes et des gonanes.

Classification des progestatifs

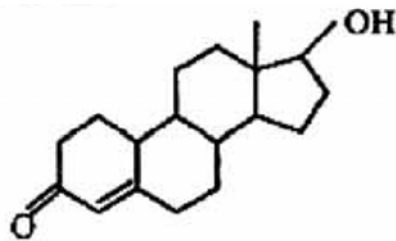
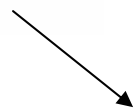
- Les progestatifs dérivés de la progestérone



- Les progestatifs dérivés de la testostérone



Testostérone



19-nortestostérone



Estranes

- **Noréthistérone**

Estrane/Pregnane

- **Dienogest**

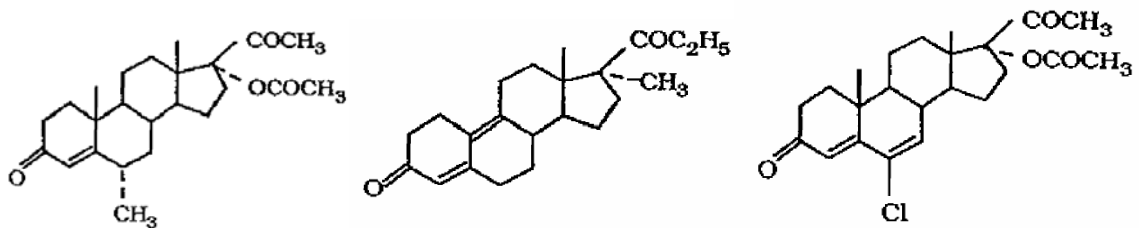
Gonanes

- **Norgestrel**
- **Désogestrel**
- **Gestodène**
- **Norgestimate**

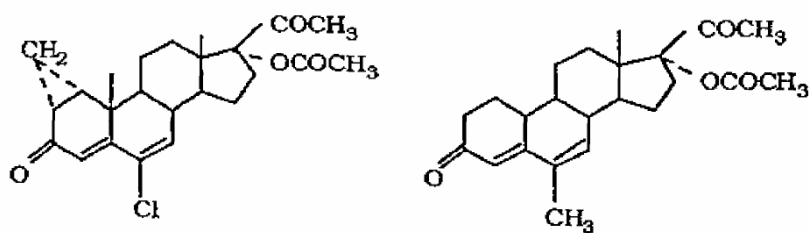
Parmi les dérivés de la 19-nortestostérone, on trouve les progestatifs dits de première génération, tel que le noréthynodrel, qui est également le premier progestatif synthétisé. Le noréthynodrel, le lynestrénol et l'acétate d'éthinodiol sont des pro-drogues qui sont converties en norethistérone pour exercer leur action. Les progestatifs dits de deuxième génération sont composés de deux catégories de progestatifs, les estranes/pregnanes parmi lesquels on trouve le dienogest ainsi que les gonanes parmi lesquels on trouve le lévonorgestrel, métabolite actif du norgestrel, et ses dérivés. Les progestatifs dits de troisième génération sont dérivés des progestatifs dits de deuxième génération et sont composés du désogestrel dont le métabolite actif est le kéto-désogestrel, le gestodène et le norgestimate et ses métabolites actifs. Ces molécules dérivées de la testostérone représentent les progestatifs les plus utilisés à l'heure actuelle dans la formulation des contraceptifs oraux (Schindler et al. 2003; Sitruk-Ware 2004; Wiegratz et Kuhl 2004).

Structure chimique de quelques progestatifs :

- Dérivés de la progestérone :



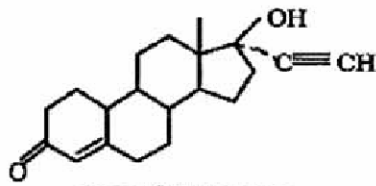
Acétate de Médroxyprogestérone Promégestone Acétate de Chlormadinone



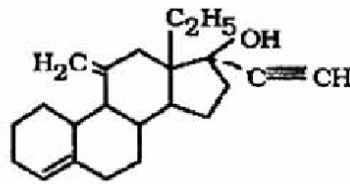
Acétate de Cyprotérone

Acétate de Nomégestrol

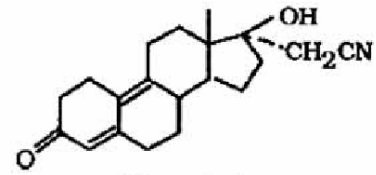
- Dérivés de la testostérone :



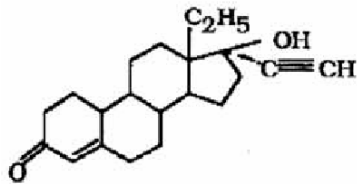
Noréthistérone



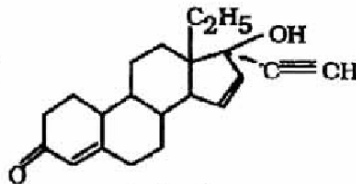
Désogestrel



Dienogest



Lévonorgestrel



Gestodène

5. Mécanismes d'action des hormones sexuelles féminines

Les progestatifs ainsi que les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes et vont de ce fait exercer leurs effets via les récepteurs des stéroïdes qui font partie de la classe III de la superfamille des récepteurs nucléaires (Laudet 1997). Ces récepteurs sont codés par un gène comportant au total 8 exons (Jeltsch et al. 1990), le premier et le dernier de ces exons comportant d'importantes séquences non-transcrites. Les récepteurs nucléaires ont tous en commun une structure basée sur 6 domaines (A-F) : les domaines N-terminaux A et B comprenant le site AF-1 (activation function-1) avec lequel se feront les interactions avec d'autres facteurs de transcription, le domaine C qui est le domaine de liaison à l'ADN ainsi que les domaines D, E et F qui forment le site de liaison du ligand ainsi que le site AF-2 capable d'interagir avec différents coactivateurs (voir Figure 1). Le domaine de liaison à l'ADN, C, contient également une structure à deux doigts de zinc permettant la dimérisation et la spécificité de liaison à l'ADN de ces récepteurs. Ces récepteurs des stéroïdes sont localisés au niveau intracellulaire : soit au niveau cytosolique, soit directement au niveau

nucléaire. Comme tous les membres de cette famille, ces récepteurs sont capables d'agir comme des facteurs de transcription particuliers. En l'absence de ligand, ces récepteurs seront associés aux protéines Hsp (Heat shock protéine) qui sont des protéines chaperonnes dont l'expression est augmentée par un choc thermique. La liaison du ligand au domaine de liaison du ligand va entraîner un changement de conformation du récepteur lui permettant ainsi de se lier à l'ADN au niveau de séquence spécifique : les éléments de réponse aux hormones (Hormone- responsive elements). Ces séquences sont localisées au niveau de région promotrice de nombreux gènes et la liaison du récepteur à cette séquence entraînera une répression ou une augmentation de la transcription de ces gènes en ARN messagers.

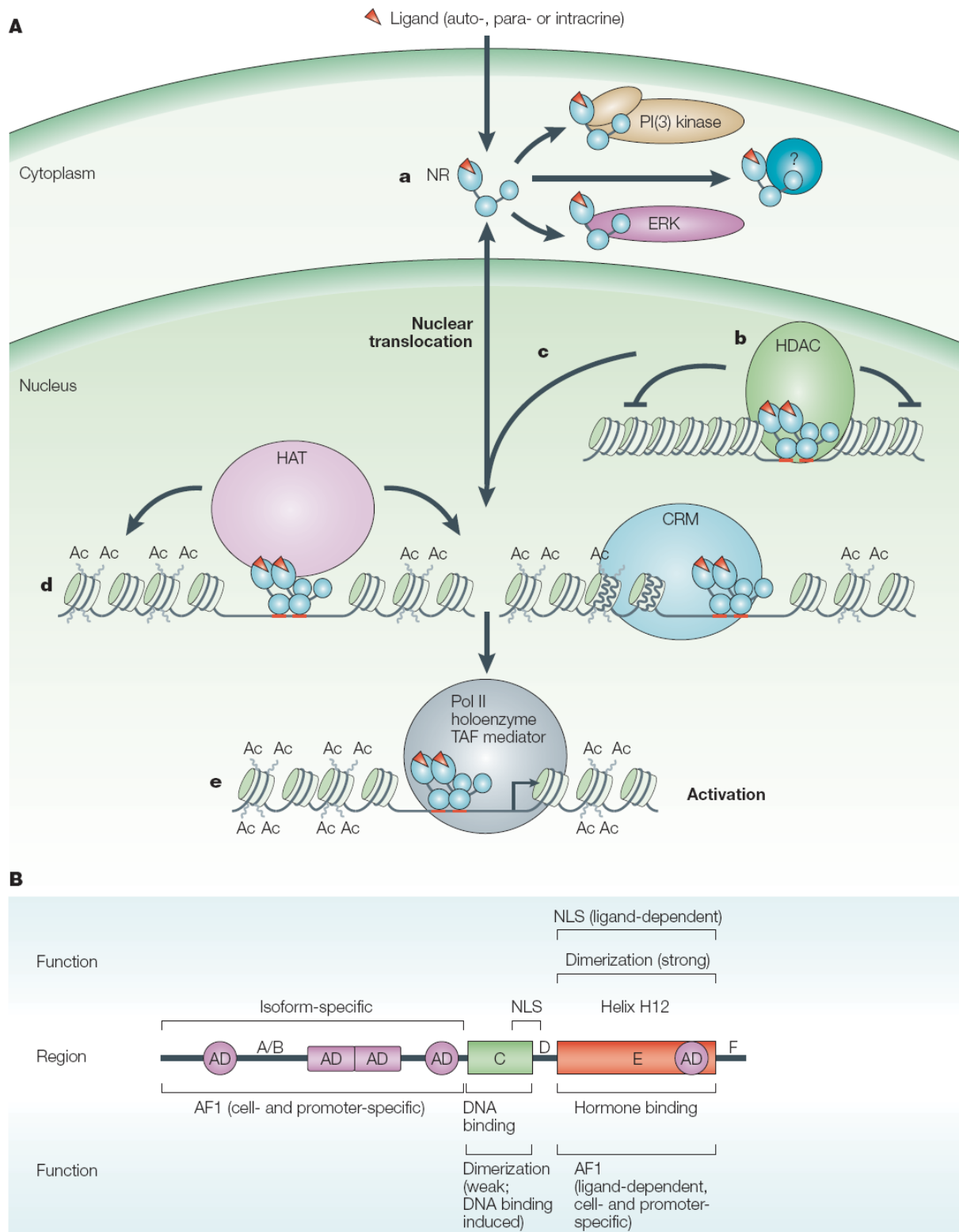


Figure 1 : A. Mode d'action d'un récepteur nucléaire. Abréviations : NR, nuclear receptor ; HDAC, histone diacetylase ; HAT, histone acetyl transférase ; CRM, chromatin-remodelling complex ; TAF, TATA-binding protein-associated factor. **B. Structure d'un récepteur nucléaire.** D'après Gronemeyer et al. 2004.

Des études plus récentes ont pu mettre en évidence que les progestatifs ainsi que les estrogènes sont également capables d'exercer des effets non génomiques caractérisés par un effet rapide et de courte durée (de l'ordre de la seconde voire de la minute) et insensible aux inhibiteurs de la transcription et de la synthèse protéique. Ces effets non génomiques sont médiés par deux types de mécanismes : une interaction avec des récepteurs membranaires spécifiques tels qu'ils ont été décrits précédemment (Blondeau et Baulieu 1984; Pappas et al. 1995) et/ou une interaction avec des protéines non spécifiques ou des lipides membranaires.

5.1. Les estrogènes

Depuis 1995, on sait que les estrogènes vont exercer leurs effets principalement via deux récepteurs stéroïdiens que sont ER- α et ER- β . Ces deux récepteurs présentent une très forte homologie de séquence et sont également très similaires au niveau de leurs structures tridimensionnelles. De ce fait, il n'est pas surprenant que la plupart des ligands vont se lier aux deux récepteurs avec une affinité très similaire (Kuiper et al. 1998).

L'activation du récepteur par la liaison du ligand entraînera une dimérisation du récepteur et le dimère réglera la transcription de divers gènes cibles en venant directement se lier aux niveaux de séquences spécifiques appelées éléments de réponse aux estrogènes (EREs). Pendant de très nombreuses années ceci a été considéré comme l'unique mécanisme par lequel les estrogènes sont capables de réguler la transcription. On sait cependant aujourd'hui que ER- α et ER- β sont également capables de moduler l'expression de divers gènes sans se lier directement à l'ADN. En effet, il a été montré qu'ER- α est capable d'interagir avec la sous-unité *c-rel* du complexe NF κ B, empêchant ainsi la liaison de celui-ci au promoteur de l'interleukine-6 (Galien and Garcia 1997). ER- α est également capable d'interagir avec le facteur de transcription Sp1 (Batistuzzo de Medeiros et al. 1997). De même, ER- α et ER- β sont

capables d'interagir avec le facteur de transcription formé par le complexe fos/jun au niveau de sites AP-1 afin de stimuler la transcription génique (Paech et al. 1997).

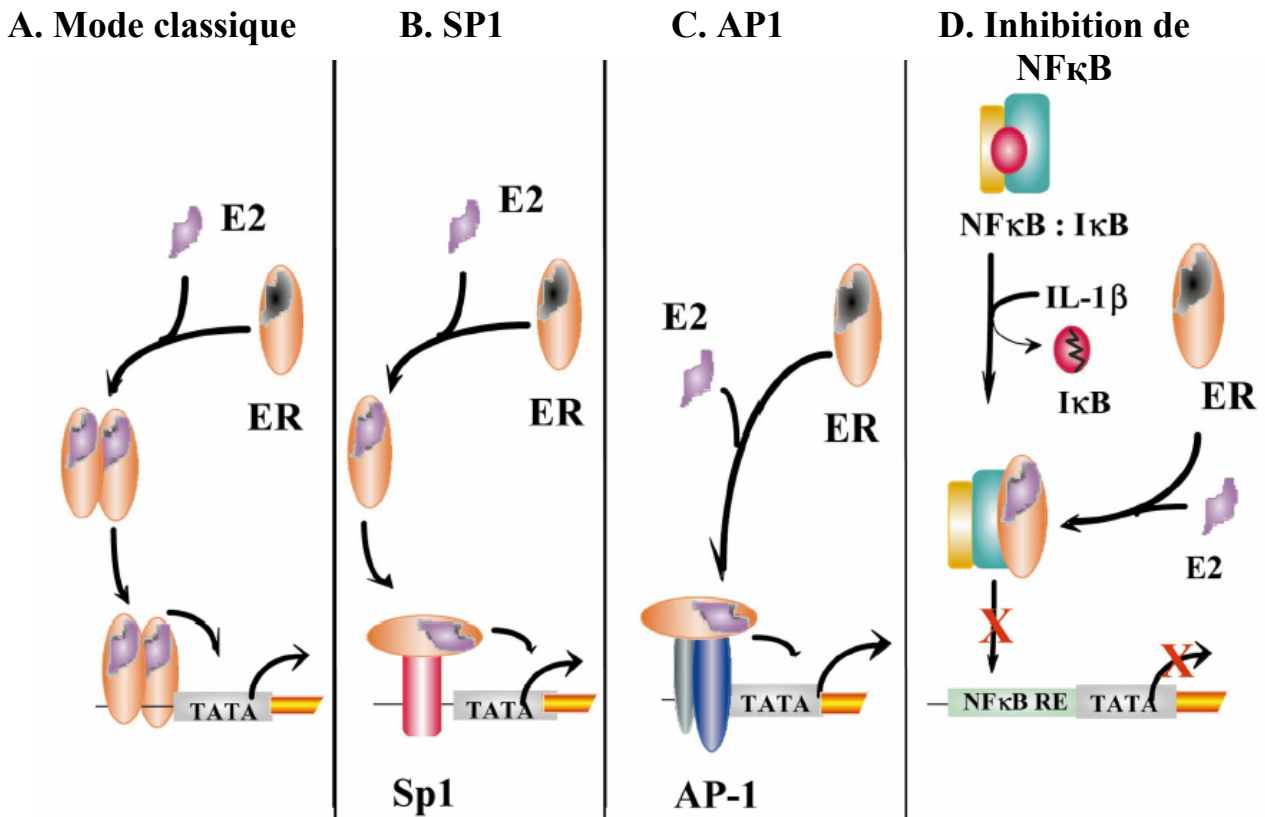


Figure 3 : Diverses voies d'activation par lesquelles les récepteurs aux estrogènes (ER), vont moduler la transcription des gènes cibles. A. Représente la voie classique d'interaction directe du dimère de ER (récepteur aux estrogènes) avec les EREs (éléments de réponses aux estrogènes). B., C., et D. représente des voies indirectes de régulation de la transcription génique nécessitant des interactions protéines-protéines. (modifié d'après Nilsson et al. 2001).

De manière similaire aux récepteurs à la progestérone, ER- α et ER- β peuvent également être activés par phosphorylation par la voie de la MAP-Kinase (mitogen-activated protein kinase). ER- α peut être phosphorylé aussi bien en présence qu'en absence d'estrogène (Le Goff et al. 1994).

Tout comme les récepteurs à la progestérone, les estrogènes peuvent exercer des effets non génomiques dont certains seront médiés par ER- α et ER- β (Monje et Boland 1999). Dans

les cellules endothéliales ces effets mèneront notamment à l'activation de la voie des MAP-kinases et sont impliqués notamment dans l'activation de la NO synthase endothéliale.

Les récepteurs ER- α et ER- β sont tous deux exprimés au niveau de la glande mammaire, de l'os, de l'utérus, du système nerveux central et du système cardiovasculaire. Les deux récepteurs pouvant réguler différemment certaines fonctions au niveau de tissus où ils sont coexprimés, la compréhension des effets des estrogènes dans ces tissus restent complexe. D'autre part, le récepteur ER- β est exprimé préférentiellement au niveau de la prostate, des ovaires et du poumon, tissus où l'expression de ER- α est quasiment nulle.

5.2. Les progestatifs

5.2.1. Les récepteurs à la progestérone

Le récepteur à la progestérone est parmi la superfamille des récepteurs nucléaires, le récepteur le mieux caractérisé et est unique de par son importante taille (933 acides aminés, Schrader et al. 1981). Il s'agit en réalité de deux récepteurs : PR-A et PR-B, qui sont codés par un même gène mais sont sous le contrôle de deux promoteurs distincts. Ces deux isoformes présentent une forte homologie structurale avec pour unique différence une séquence N-terminale plus longue de 164 acides aminés pour le récepteur PR-B (Giangrande et al. 1997). Dans la plupart des types cellulaires, le récepteur PR-A est décrit comme un répresseur de la transcription alors que le récepteur PR-B est davantage connu pour l'activer. De manière tout à fait remarquable, PR-A est capable de réprimer la transcription génique du récepteur PR-B.

Les récepteurs à la progestérone sont activés par liaison de la progestérone ou d'un autre progestatif et viennent se lier à l'ADN au niveau d'éléments de réponse à la progestérone, les PREs (Progesterone Response Elements). PR-A et PR-B vont se lier aux régions promotrice de divers gènes cibles sous forme d'homodimères PR-A/PR-A ou PR-B/PR-B ou sous forme d'hétérodimères PR-A/PR-B. Ces dimères sont associés à d'autres facteurs de transcription et

à divers coactivateurs et corépresseurs de la transcription génique. L'activation de ces récepteurs peut également se faire par phosphorylation en réponse à des signaux émanant de la membrane cytoplasmique.

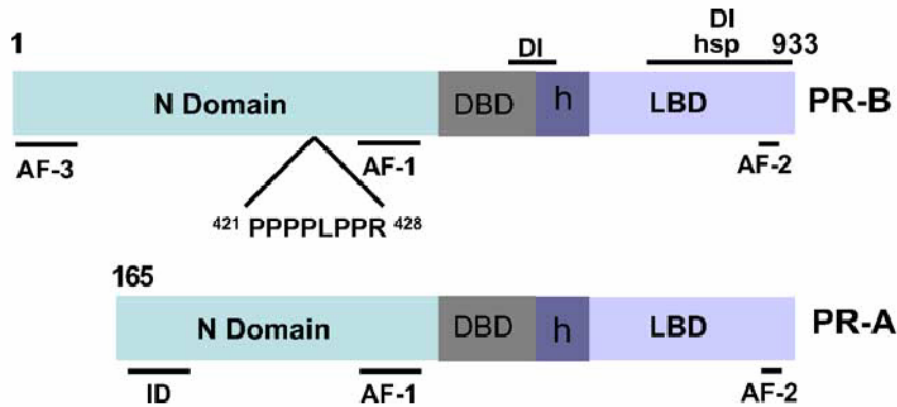


Figure 2 : Structure des récepteurs de la progestérone. N Domain : domaine N-terminal, DBD : DNA binding domain, h : region charnière (hinge) ; LBD : ligand binding domain; DI: domaine de dimérisation ; ID : domaine inhibiteur ; hsp : domaine de liaison à Hsp90 ; AF-1, AF-2 et AF-3 : domaines d'activation de la transcription. D'après Leonhardt et al. 2003.

La répartition des deux types de récepteurs dans les différents tissus est encore peu connue. PR-A et PR-B sont présents dans divers tissus humains et animaux notamment au niveau des organes reproducteurs, mais également au niveau cérébral (Kato et al. 1978; MacLusky et McEwen 1980), pulmonaire (Giannopoulos et al. 1982) et au niveau du système cardiovasculaire (Nakamura et al. 2005; Welter et al. 2003). La présence de ces récepteurs a en effet été décrite dans divers vaisseaux humains (Perrot-Applanat et al. 1995). PR-A et PR-B semblent avoir des fonctions différentes notamment de par leur répartition tissulaire qui est très différente (Conneely and Lydon 2000), cependant la fonction précise de chaque isoforme est encore mal connue.

5.2.2. Les autres récepteurs stéroïdiens

Les progestatifs ont, de par leur liaison aux récepteurs à la progestérone, tous en commun des effets anti-gonadotropiques (inhibition de l'ovulation) et anti-estrogéniques, tel que

l'inhibition de la prolifération endométriale induite par les estrogènes. Cependant, de par leur grande diversité structurale (voir paragraphe 4.2.) ils sont également capables de se lier à d'autres récepteurs stéroïdiens avec des affinités plus ou moins importantes selon le type de récepteur. En effet, dépendant de leur structure chimique, les progestatifs pourront se lier aux récepteur des androgènes, des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes (voir Tableau 1). De plus, les progestatifs sont également capables de se lier avec des affinités variables à des protéines présentes dans le sérum : les globulines liant les hormones sexuelles, SHBG (sex hormone-binding globulin) et la globuline liant les corticostéroïdes, CBG (corticosteroid-binding globulin).

Progestatif	PR	AR	ER	GR	MR	SHBG	CBG
Progesterone	50	0	0	10	100	0	36
Dydrogestérone	75	0	-	-	-	-	-
Ac. Chlormadinone	67	5	0	8	0	0	0
Ac. Cyprotérone	90	6	0	6	8	0	0
Ac. Medroxy- Progesterone	115	6	0	29	160	0	0
Ac. Megestrol	65	5	0	30	0	0	0
Nomegestrol	125	6	0	6	0	0	0
Promegestone	100	0	0	5	53	0	0
Drospironone	35	65	0	6	230	0	0
Norethisterone	75	15	0	0	0	16	0
Levonorgestrel	150	45	0	1	75	50	0
Norgestimate	15	0	0	1	0	0	0
3-keto-desogestrel	150	20	0	14	0	15	0
Gestodène	90	85	0	27	290	40	0
Dienogest	5	10	0	1	0	0	0

Tableau 1 : Affinité relative de liaison de la progestérone et de progestatifs de synthèse pour les récepteurs stéroïdiens et les protéines du sérum. PR, récepteur à la progestérone (promegestone 100%) ; AR, récepteur aux androgènes (metribolone 100%) ; ER, récepteur aux estrogènes (17- β estradiol 100%) ; GR ; récepteur aux glucocorticoïdes (dexamethasone 100%) ; MR, récepteur aux minéralocorticoïdes (aldostérone 100%) ; SHBG, globuline de

liaison des hormones sexuelles (sex hormone-binding globulin, dihydrotestostérone 100 %) ;
CBG, globuline de liaison des corticostéroïdes (cortisol 100 %).

L'affinité d'une substance pour un récepteur n'étant pas prédictive d'un effet biologique, divers essais biologiques ont été menés et on a pu caractériser des effets agonistes et antagonistes des progestatifs pour les différents récepteurs cités ci-dessus (voir Tableau 2).

Progestatifs	Progésto- génique	Anti-gonado- tropicque	Anti-estrogénique	Estro- génique	Andro- génique	Anti-andro- génique	Gluco- corticoïde	Anti-mineralo- corticoïde
Progestérone	+	+	+	-	-	±	+	+
Dydrogestérone	+	-	+	-	-	±	-	±
Médrogestone	+	+	+	-	-	±	-	-
Dérivés 17 α -OH								
Ac de Chloradinone	+	+	+	-	-	+	+	-
Ac de Cyproterone	+	+	+	-	-	++	+	-
Ac de Mègestrol	+	+	+	-	±	+	+	-
Ac de Médroxyprogestérone	+	+	+	-	±	-	+	-
Dérivés de 19-nor-progestérone								
Ac de nomègestrol	+	+	+	-	-	±	-	-
Promègestone	+	+	+	-	-	-	-	-
Trimègestone	+	+	+	-	-	±	-	±
Dérivés de la spiro lactone								
Drosprénone	+	+	+	-	-	+	-	+
Dérivés de la 19-nortestostérone								
Noréthistérone	+	+	+	+	+	-	-	-
Lynestrénol	+	+	+	+	+	-	-	-
Noréthimodrel	±	+	±	+	±	-	-	-
Lévonorgestrel	+	+	+	-	+	-	-	-
Norgestimate	+	+	+	-	+	-	-	-
3-kéto-désogestrel	+	+	+	-	+	-	-	-
Gestodène	+	+	+	-	+	-	+	+
Dienogest	+	+	±	±	-	+	-	-

Tableau 2 : Activité biologique de la progestérone naturelle et des progestatifs de synthèse

(+) activité ; (±) activité faible ; (-) pas d'activité.

(Modifié d'après Schindler et al. 2003)

De par ces liaisons, la diversité des effets exercés par les progestatifs est très importante, ils peuvent, par exemple, avoir des propriétés androgéniques entraînant une augmentation de la pilosité ainsi que de l'acné, ou encore par l'activation du récepteur aux minéralocorticoïdes entraîner une rétention hydrosodée. Cette diversité des effets rend également l'étude des effets biologiques de ces molécules très complexes. D'autre part, ce vaste spectre d'action est souvent responsable de la plus ou moins bonne tolérance des traitements contraceptifs et des traitements hormonaux de substitution par les patientes et de nombreux effets secondaires lui sont associés. Cependant, il est encore difficile à l'heure actuelle d'identifier clairement la participation d'une structure chimique précise à un effet donné.

B. Traitements hormonaux et pathologies cardiovasculaires

1. Contraceptifs oraux et risque thrombotique

Dès l'introduction des contraceptifs oraux aux Etats-Unis au début des années 1960, des cas de maladies cardiovasculaires associées à la prise de ces traitements sont décrits. Depuis de nombreuses études ont étudié l'effet des traitements contraceptifs oraux sur le système cardiovasculaire et ont très clairement démontré une augmentation des événements thromboemboliques veineux qui représente la complication cardiovasculaire majeure de la prise d'un contraceptif oral. Cependant, ces études démontrent également un effet de la prise d'un contraceptif oral sur la survenue de thromboses artérielles comme les pathologies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux.

1.1. Contraceptifs oraux et thromboses veineuses

Le premier cas de thrombose veineuse associé à la prise de contraceptif oral est rapporté dès 1961, très tôt donc après la mise sur le marché américain de ce traitement contraceptif. Il

s'agit d'une infirmière âgée de 40 ans et ayant développé une embolie pulmonaire alors qu'elle prenait une pilule contraceptive composée de 100 µg de mestranol associés à 5 mg de noréthynodrel (Jordan 1961). Ce premier cas a été à l'origine de nombreuses études ayant pour objectif l'étude de la thrombogénicité des contraceptifs oraux. Plus de 45 études ont été menées et ont pour la plupart confirmé un effet pro-thrombotique des contraceptifs oraux.

Des études menées dès les années 1960 montrent une augmentation variant de 4 à 8 fois du risque relatif de thrombose veineuse profonde localisée au niveau des membres inférieurs chez des femmes jeunes sous contraceptif oral par rapport aux femmes ne prenant pas de contraceptif oral (Inman et Vessey 1968; Sartwell et al. 1969; Vessey et Doll 1968). Deux grandes études cliniques menées dans les années 1970 et 1980 montrent elles aussi une augmentation du risque relatif de 11 (Boston Collaborative Drug surveillance Program, 1973) et de 7 (Porter et al. 1982) par rapport aux femmes ne prenant pas la pilule contraceptive. L'incidence élevée de thromboses veineuses a été initialement associée à la composante estrogénique des préparations hormonales car la réduction de 50 à 30 µg de cette composante (pilules micro-dosées) a un effet favorable (Gerstman et al. 1991; Jick et al. 1996b; Vessey et al. 1986). Cependant, des études épidémiologiques récentes ont indiqué que le risque de thrombose est 2 fois plus élevé avec les pilules microdosées contenant un progestatif de troisième génération (gestodène, désogestrel qui sont censés avoir moins d'effets secondaires métaboliques) comparé à celles contenant un progestatif de deuxième génération (levonorgestrel ; WHO 1995; Jick et al. 1995; Jick et al. 2000; Spitzer et al. 1996). Le risque absolu reste cependant faible, il est de 10 à 15 cas pour 100 000 femmes selon l'étude dans le cas de l'utilisation d'un progestatif de deuxième génération et de 25 à 30 cas pour 100 000 femmes dans le cas de l'utilisation d'un progestatif de troisième génération (WHO 1995; Jick et al. 1995; Jick et al. 2000; Spitzer et al. 1996). De plus, il apparaît que le risque de thrombose est plus élevé lors de la première année de prise du contraceptif et l'augmentation

du risque est directement liée à l'âge de la patiente (Anderson et al. 1991) ainsi qu'à la présence de facteurs de risque tel que l'hypertension, l'obésité, le tabagisme (Farley et al. 1998), le taux de LDL-cholestérol et la présence de facteurs génétiques tels que la mutation G20210A de la prothrombine ou la présence du facteur V Leiden (Middeldorp et al. 2001).

1.2. Contraceptifs oraux et thromboses artérielles

Dès la mise sur le marché des premières pilules contraceptives, une association entre la prise de ce traitement et des événements de thromboses artérielles a été décrite. Un lien entre infarctus du myocarde et prise d'un contraceptif oral a été décrit et publié pour la première fois en 1963 (Boyce et al. 1963), le lien avec les accidents vasculaires cérébraux ischémiques en 1968 (Inman et Vessey 1968) et le lien avec les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques en 1973 (Collaborative group for the study of stroke in women, 1973). De nombreuses études sont venues confirmer cette association entre contraception orale et thromboses artérielles (Jick et al. 1978a; Jick et al. 1978b; Mann et al. 1975; Rosenberg et al. 1980; Shapiro et al. 1979; Stadel 1981a; Stadel 1981b). Plus récemment, l'étude multicentrique organisée par l'Organisation Mondiale de la Santé a montré une augmentation de 5 fois du risque relatif d'infarctus du myocarde chez les femmes prenant la pilule contraceptive (WHO 1997), ainsi qu'une augmentation de 3 fois du risque d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques (WHO 1996b) et de 1,5 à 2 fois du risque d'accidents vasculaires cérébraux hémorragiques (WHO 1996a) chez ces femmes. De plus, diverses études ont montré que ce risque était accru par d'autres facteurs de risque tels que le tabagisme (Farley et al. 1998) et l'hypertension (Shapiro et al. 1979), alors qu'il est très faible voir nul chez les femmes ne présentant pas d'autre facteur de risque cardiovasculaire (Farley et al. 1999; Sidney et al. 1998). Bien qu'il y ait une augmentation de ce risque avec le traitement contraceptif, il reste très faible et est inférieur à 3 pour 1 million de femmes âgées

de moins de 35 ans et peut augmenter jusqu'à 10 pour 1 million chez des femmes associant contraception orale et tabagisme (Farley et al. 1999).

Comme il a été mentionné précédemment, la composante estrogénique des préparations hormonales actuelles a été fortement réduite et la composante progestative modifiée, ceci principalement dans le but de réduire les effets secondaires associés à la prise d'un contraceptif oral. Des contraceptifs oraux contenant notamment des progestatifs de troisième génération tels que le désogestrel ou le gestodène améliorent le profil lipidique en augmentant notamment le taux d'HDL-cholestérol. Il semblerait que l'utilisation de ces progestatifs soit associée à une augmentation moindre du risque d'infarctus du myocarde (WHO 1997; Jick et al. 1996b; Lewis et al. 1997), cependant deux études menées chez des femmes jeunes n'ont pu mettre en évidence de rôle bénéfique de ces préparations de troisième génération sur le système cardiovasculaire (Dunn et al. 1999; Tanis et al. 2001).

Les études les plus récentes seraient donc globalement en faveur d'un risque cardiovasculaire moindre avec ces nouvelles préparations, cependant il est difficile de dire si cela vient réellement de la composition de ces préparations ou si cela est dû au fait que les prescriptions sont plus sélectives et excluent les femmes présentant un facteur de risque cardiovasculaire.

2. Traitements hormonaux substitutifs et risque thrombotique

Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de morbidité et de mortalité chez la femme ménopausée dans les sociétés développées (Stampfer et al. 1990). Depuis plus de quarante ans, on sait que la ménopause, qu'elle soit naturelle ou chirurgicale, est associée à une augmentation du nombre d'événements cardiovasculaires, plus particulièrement des maladies coronariennes (Lerner and Kannel 1986). Cet effet a été rapidement attribué à l'arrêt de production par les ovaires des estrogènes. Les estrogènes sont en effet capables, avant la

ménopause, de réduire la fréquence des accidents cardiovasculaires en améliorant le profil lipidique mais aussi par une vasodilatation et la diminution de facteurs de la coagulation tels que le fibrinogène. Ainsi, le traitement substitutif hormonal, composé soit d'estrogène seul soit d'estrogène en combinaison avec un progestatif, a été envisagé comme un moyen de prévention des maladies coronariennes associées à la ménopause (American College of Physicians 1992; Rich-Edwards et al. 1995). Ceci a en un premier temps été conforté par les premières études observationnelles telle que l'étude « Nurses' Health Study » qui a montré une diminution d'environ 40 % des maladies cardiovasculaires dans le groupe des femmes sous THS en comparaison au groupe témoin. Cependant, des études plus récentes sont venues bouleverser de nombreuses idées reçues et à l'heure actuelle THS n'est pas approuvé comme moyen de traitement des maladies cardiovasculaires chez la femme ménopausée.

2.1. THS et thromboses veineuses

Alors que le risque de thromboses associées à la prise d'un traitement hormonal contraceptif a été très largement étudié dès les années 1960, les effets thrombotiques des traitements hormonaux de substitution ont été longuement négligés et sous-estimés. En effet, les premières études américaines ont été menées dans les années 1980. Ces études n'ont pas montré d'augmentation d'événements thrombo-emboliques chez les femmes ménopausées recevant le THS par rapport à celle recevant le placebo, mais présentaient cependant de nombreuses faiblesses méthodologiques et incluaient pour la plupart un nombre trop faible de patientes (Hammond et al. 1979; Nachtigall et al. 1979; Perez Gutthann et al. 1997; Petitti et al. 1979). Cependant, dès 1974 une étude avait rapporté l'augmentation du risque de thrombose veineuse chez les patientes recevant un THS à base d'estrogène seul (Boston Coll Drug Surveillance Program, 1974). Dès 1995, trois études observationnelles de plus grande envergure ont montré de manière concordante une augmentation de 2 à 3,5 fois du risque

relatif de thrombose veineuse chez les femmes sous traitement (Daly et al. 1996; Grodstein et al. 1996; Jick et al. 1996a; Perez Gutthann et al. 1997). Ces études ont été confortées par une importante étude cas-témoin menée au Royaume -Uni montrant une augmentation de 2 fois du risque relatif de thrombose veineuse chez les femmes ménopausées recevant un THS (Perez Gutthann et al. 1997). Cette étude montrait également que cette augmentation du nombre d'événements thrombo-emboliques est indépendante de la dose d'estrogène utilisée, ainsi que de son mode d'administration (orale ou transdermique). De plus, il apparaît que le risque thrombotique est accru dans les premiers mois de la prise du traitement (6 mois à 1 an) avec une normalisation de ce risque dans les années suivant la prise du traitement. Le THS dans l'ensemble de ces études est composé d'estrogènes oraux uniquement, plus précisément d'estrogènes conjugués équins. Il faudra attendre les grands essais cliniques randomisés mis en œuvre à la fin des années 1990, pour connaître l'effet d'un THS combinant estrogènes et progestatifs tel qu'il est utilisé à l'heure actuelle, sur le risque de thromboses veineuses. L'étude HERS (Heart and Estrogen-progestin Replacement Study) est la première étude de prévention secondaire qui a concerné des femmes ménopausées ayant des antécédents cardiovasculaires et le traitement hormonal utilisé est composé d'estrogènes conjugués équins (ECE) et d'acétate de médroxyprogestérone (MPA, Hulley et al. 1998). Là aussi les résultats de l'étude montre une augmentation du risque relatif de thrombose veineuse de 2,89 fois chez les femmes sous traitement. Cette augmentation de risque sera également vérifiée dans l'étude WHI (Womens' Health Initiative). Cette étude américaine de grande envergure a été démarrée en 1992 et est la seule étude clinique de prévention primaire. Elle a englobé non moins de 160 000 femmes ménopausées réparties dans deux bras d'étude distincts : un bras dont l'objectif est l'étude d'un THS estro-progestatif (ECE + MPA) administré à des femmes non hystérectomisées et un bras l'objectif est l'étude d'un THS estrogènes seuls (ECE) administré à des femmes hystérectomisées (Rossouw et al. 2002). Le bras ECE + MPA a été arrêté

prématurément après 5,2 ans en raison d'une balance bénéfice/risque en défaveur d'un tel traitement. Cette étude a notamment montré une amélioration nette des troubles du climatère, une prévention de la perte osseuse, une diminution du risque de cancer colorectal, une augmentation du risque relatif de thrombose veineuse de 2,11 fois ainsi qu'une augmentation du risque de cancer du sein (Anderson et al. 2004; Chlebowski et al. 2003; Rossouw et al. 2002). Dans le bras ECE seuls, arrêté lui aussi prématurément en février 2004, on observe une augmentation du risque de maladie veineuse thrombo-embolique (risque relatif = 1,33) qui n'est cependant pas significatif. En conclusion, l'ensemble des études montre une nette augmentation du risque de maladie veineuse thrombo-embolique chez les femmes sous THS. Cependant, de par l'incidence annuelle faible de ces événements thrombo-emboliques chez la femme ménopausée sous THS (de l'ordre de 0,36 % par an), le risque absolu demeure faible.

2.2. THS et risque coronarien

Comme je l'ai initialement discuté dans l'introduction, l'une des indications de prescription d'un THS était la prévention des pathologies cardiovasculaires et notamment du risque coronarien chez les femmes ménopausées. Cependant cette hypothèse n'a pas été confirmée par les récentes études, que ce soit en prévention primaire ou en prévention secondaire.

Les résultats de l'étude WHI (Anderson et al. 2004; Rossouw et al. 2002), qui est la seule étude de prévention primaire, sont eux aussi en faveur d'une augmentation du risque coronarien avec une augmentation de 24 % des infarctus du myocarde après 5,2 ans de suivi. Cette augmentation est plus importante chez les femmes présentant un taux de LDL-cholestérol élevé mais n'est pas modifié par les autres facteurs de risque tels que le diabète, l'obésité, l'hypertension ou le tabagisme. D'autre part, cette augmentation du risque est

également plus importante lors de la première année de prise du traitement où le risque relatif passe à 1,81.

Les études de prévention secondaire sont quant à elle plus nombreuses : HERS, (Hulley et al. 1998), ESPRIT (Estrogen for Prevention of Reinfarction, Cherry et al. 2002) et PHASE (Papworth HRT Atherosclerosis, Clarke et al. 2002). Ces études ont toutes démontré que la prise d'un THS a à long terme aucun effet bénéfique sur le risque coronarien et on observe même plutôt une tendance à une augmentation de ce risque dans la première année de prise du traitement. Alors que l'étude ESPRIT, incluant 1017 femmes d'âge moyen = 62,6 ans, ne montre aucune différence de risque coronarien associée à la prise d'un THS, l'étude HERS I, incluant 2763 femmes d'âge moyen 66,7 ans, montre une augmentation du risque relatif à 1,52 la première année, mais pas d'augmentation du risque relatif sur 4 ans. L'étude PHASE, incluant 255 femmes âgées de 67 ans en moyenne, montre quant à elle un risque relatif d'événements coronariens de 1,49 après 30 mois de suivi.

L'ensemble de ces études montre que la prise d'un THS est associée à aucun bénéfice sur le plan coronarien, voir même une augmentation du risque coronarien aussi bien en prévention primaire qu'en prévention secondaire. Cet effet semble être plus important dans le cas d'un traitement estro-progestatif et l'augmentation semble accrue lors de la première année de prise du traitement.

2.3. THS et risque d'accidents vasculaires cérébraux

Du fait de ces conséquences souvent tragiques, l'accident vasculaire cérébral représente l'une des complications cardiovasculaires les plus redoutées. Là aussi, les diverses études cliniques montrent que la prise d'un THS n'apporte aucune protection vis-à-vis des accidents vasculaires cérébraux.

L'étude WHI, qui la seule étude de prévention primaire disponible indique elle aussi une augmentation du risque d'accidents vasculaires cérébraux avec la prise du THS. En effet quel que soit le bras d'étude, ECE + MPA ou ECE seul, les résultats montrent une augmentation similaire de ce risque dans les 2 groupes avec un risque relatif de 1,31 et 1,39 respectivement. Cette augmentation de risque n'est pas modifiée avec la durée de traitement et est indépendante de l'âge et des autres facteurs de risque cardiovasculaires.

L'étude ESPRIT montre une nette augmentation du risque d'accidents vasculaires cérébraux avec la prise d'un traitement estrogénique (estrogène valérate) avec un risque relatif de 1,64 dans le groupe de femmes ménopausées prenant ce traitement. L'étude HERS quant à elle indique une augmentation non significative (risque relatif = 1,13) du risque d'accidents vasculaires cérébraux chez les femmes ménopausées recevant un THS composé d'ECE et de MPA.

Ainsi, sur le plan des accidents vasculaires cérébraux les THS semblent apporter aucun effet bénéfique et favorisent même la survenue de ces événements. Il semble que cet effet soit indépendant de la nature du THS, estro-progestatif ou estrogènes seuls.

En conclusion, les récentes études cliniques et épidémiologiques montrent que les THS préalablement considérés comme cardio- et vasculo-protecteurs, ne présentent aucun effet bénéfique au niveau du système cardiovasculaire. Au contraire, on observe une augmentation significative du risque relatif de maladie veineuse thrombo-embolique, une augmentation du risque coronarien ainsi qu'une augmentation du risque d'accidents vasculaires cérébraux.

Ainsi, les traitements hormonaux qu'ils soient prescrits dans le cadre d'un contraceptif oral ou d'un traitement hormonal de substitution, sont associés à une augmentation du risque de thromboses veineuses et artérielles. La thrombose est induite par trois principaux facteurs qui sont résumés dans la triade de Virchow (voir figure ci-dessous). Ainsi, ces trois facteurs

que sont la paroi vasculaire, les éléments du sang et le flux sanguin jouent un rôle clef dans le développement d'une thrombose. Dans la suite de cet exposé nous nous intéresserons plus particulièrement à l'implication de la paroi vasculaire dans l'apparition des événements thrombotiques.

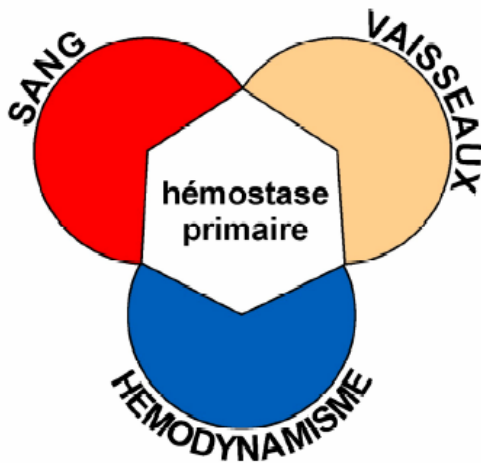


Figure 4 : La triade de Virchow

3. Régulation de l'homéostasie vasculaire par l'endothélium

3.1. Généralités

A l'exception des capillaires sanguins, l'ensemble des vaisseaux sanguins est composé d'une paroi vasculaire organisée en trois couches distinctes avec de l'intérieur vers l'extérieur :

- l'intima (couche la plus interne) qui est formée d'une monocouche de cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales sont directement en contact avec le sang et ses éléments plasmatiques et figurés (plaquettes, globules rouges et blancs etc...).

- la média (couche intermédiaire) qui est formée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire. Cette couche, de par son épaisseur représente la majeure partie des artères et des artérioles.

- l'adventice (couche la plus externe) qui est composée de fibres de collagène, de fibroblastes et de tissu conjonctif essentiellement. On y trouvera également des terminaisons nerveuses et des vasa vasorum. Cette couche fait fonction d'interface entre les vaisseaux et les tissus environnants.

C'est sur cette structure en trois couches que reposent de nombreuses fonctions physiologiques dont la principale qui est d'assurer l'irrigation sanguine des différents organes. Il existe également de nombreuses interactions entre les différentes couches, plus particulièrement entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, mais également avec les éléments plasmatiques et figurés du sang.

L'endothélium vasculaire constitué d'une monocouche de cellules endothéliales tapisse la surface interne de l'ensemble des vaisseaux et il joue un rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire.

Les diverses fonctions de l'endothélium comprennent le contrôle du tonus vasculaire, de la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, la prolifération des cellules musculaires lisses et la régulation de divers paramètres plasmatiques et de la fibrinolyse (Busse et Fleming 1995; Moncada et al. 1991; Schini-Kerth et al. 1994; Vanhoutte 1982; Vanhoutte et Rimele 1982). Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux (Figure 5). Les facteurs vasoconstricteurs sont principalement composés du thromboxane A₂, des anions superoxydes, de l'endothéline-1 et de la prostaglandine H₂ (Furchgott et Vanhoutte 1989).

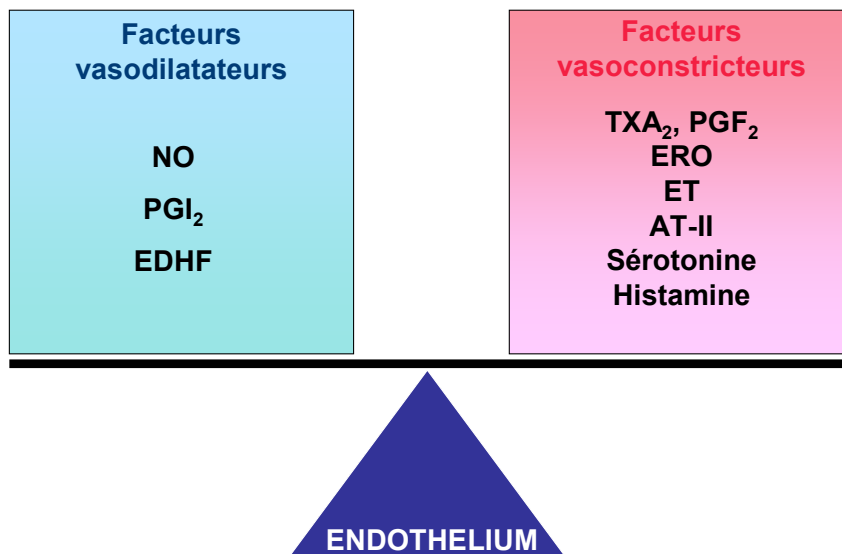


Figure 5 : Régulation du tonus vasculaire par divers facteurs

Abréviations : NO, monoxyde d'azote ; PGI₂, prostacycline ; EDHF, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ; TXA₂, thromboxane A₂ ; PGF₂, prostaglandine F₂; ERO, espèces réactives de l'oxygène ; ET, endothéline ; AT-II, angiotensine-2.

Les trois principaux facteurs vasorelaxants sont le monoxyde d'azote ou NO, la prostacycline ou PGI₂ et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou EDHF. Ainsi, l'endothélium joue un rôle crucial en maintenant un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation, en régulant la prolifération des cellules musculaires lisses et en maintenant un équilibre entre des activités anti- et pro-fibrinolytique et anti- et pro-thrombotique.

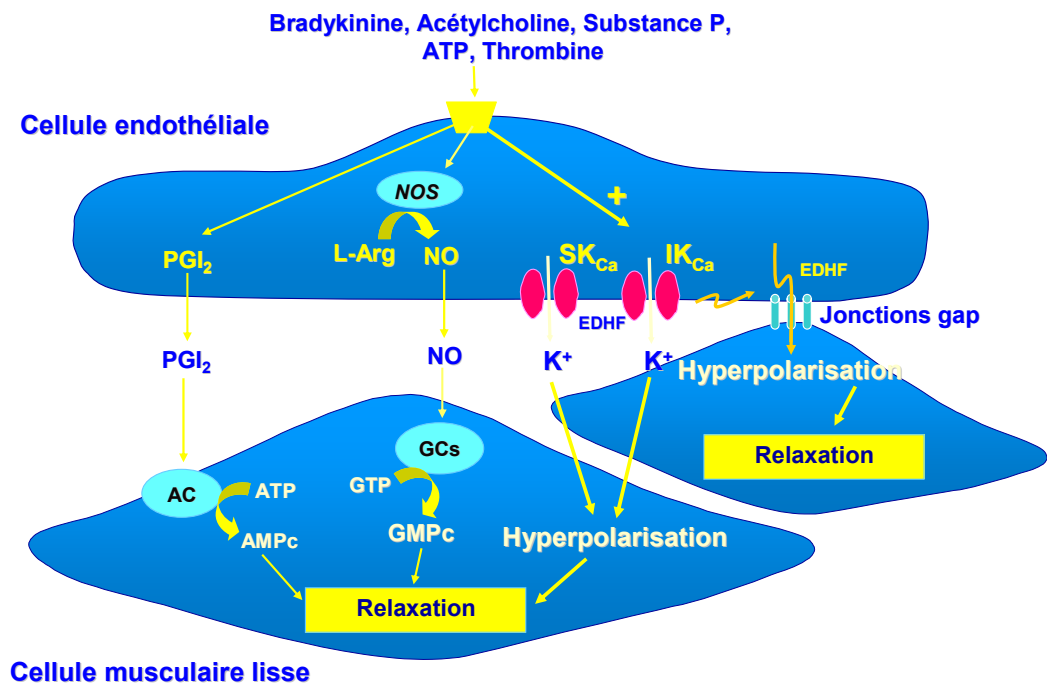


Figure 6 : Principaux facteurs endothéliaux impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire

3.2. Le monoxyde d'azote, NO

En 1980, Furchgott et Zawadzki ont montré l'existence d'un facteur diffusible, non prostanoïdien, libéré en réponse à l'acétylcholine par les cellules endothéliales et qui est capable d'entraîner la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Furchgott et Zawadzki 1980). Les propriétés vasorelaxantes de ce facteur, appelé EDRF (Endothelium-Derived Relaxing Factor), sont accompagnées d'une production de GMP cyclique (Furchgott and Martin 1985) et sont inhibées en présence d'hémoglobine, un scavenger de NO, ainsi qu'en présence de bleu de méthylène, un inhibiteur de la guanylyl cyclase soluble (Martin et

al. 1985). La caractérisation de la nature chimique de l'EDRF a été plus tardive en raison de la très grande instabilité de ce facteur dont la demi-vie est de l'ordre de 5 à 30 secondes (Ignarro et Wood 1987; Palmer et al. 1987). Le groupe de Moncada (Moncada et al. 1991) et celui d'Ignarro (Ignarro et al. 1988) ont cependant pu identifier l'EDRF comme étant le monoxyde d'azote, NO, un gaz diffusible impliqué dans de nombreux processus biologiques, tant au niveau cardiovasculaire, immunitaire que nerveux.

3.2.1. Biosynthèse du NO

Le NO est synthétisé par une enzyme, la NO synthase (NOS) qui catalyse l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline, formant ainsi du NO. On connaît actuellement trois isoformes de NOS codées par trois gènes distincts : la NO synthase endothéliale ou eNOS, la NO synthase neuronale ou nNOS et la forme inductible ou iNOS.

Ces trois isoformes ont en commun une même organisation de leur domaines catalytiques : une activité oxygénase dans la partie N-terminale, une partie réductase dans la partie C-terminale et entre les deux domaines un site de liaison de la calmoduline (CaM, Alderton et al. 2001; Griffith et Stuehr 1995). Le domaine d'activité oxygénase contient les sites de liaison de l'hème, de la L-arginine et de la tétrahydrobioptérine (BH₄), un cofacteur. Le domaine d'activité réductase va contenir les sites de liaison de la nicotinamide adénine diphosphate sous forme réduite (NADPH) et de cofacteurs flaviniques : la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN).

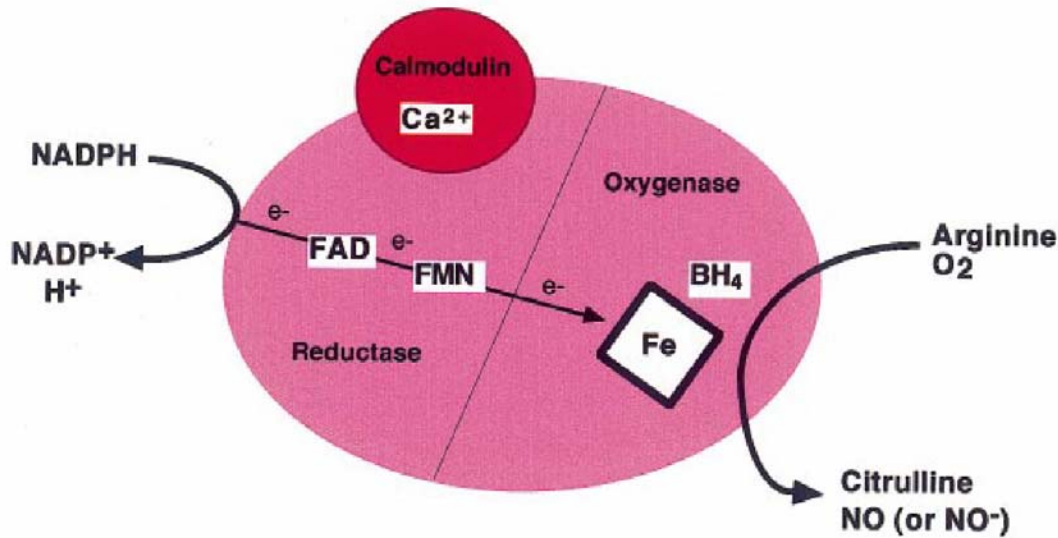


Figure 7 : Structure et activité catalytique des NO-synthases. Les électrons sont fournis par le NADPH au niveau du domaine réductase. La protéine comporte plusieurs sites de liaison : du substrat, de l'arginine, l'hème, de la calmoduline, et des cofacteurs : NADPH, BH₄, FAD et FMN. D'après Alderton et al. 2001.

A l'état natif, les NOS sont des protéines hémiques monomériques. La forme monomérique n'est pas liée à l'hème et ne produit pas de NO mais possède une activité cytochrome P-450 réductase. La liaison d'une molécule d'hème au niveau du domaine oxygénase provoque la dimérisation qui va permettre l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline. Cette réaction nécessite la présence du cofacteur BH₄.

- La NO synthase endothéliale :

La NOS endothéliale, eNOS ou NOS III, est une protéine de masse moléculaire 134 kDa. Elle est exprimée constitutivement au niveau des cellules endothéliales des artères et des veines, mais également au niveau des myocytes cardiaques, des plaquettes, des cellules épithéliales tubulaires rénales et de certains neurones (Shaul 2002). Cette isoforme présente une régulation de son activité catalytique par le complexe Ca²⁺/CaM ainsi que par son état de phosphorylation/déphosphorylation (Fleming et Busse 1999).

- Modes d'activation de la NO synthase endothéliale :

L'activation de la NO synthase endothéliale implique plusieurs voies de signalisation et une translocation vers l'appareil de Golgi (Fleming et Busse 2003). Dans la cellule endothéliale au repos, la eNOS est liée à la cavéoline, une protéine structurale des caveolae, microdomaines membranaires impliqués dans la transduction des signaux. A basse concentration cytosolique de Ca^{2+} , la NO synthase endothéliale est liée à la protéine Hsp 90 (Heat Shock Protein-90) ce qui a pour conséquence une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le complexe Ca^{2+}/CaM et favorise donc la dissociation de la cavéoline (Takabashi et al, 2003). La liaison de la NO synthase endothéliale à Hsp 90 permet également l'interaction entre l'enzyme et les kinases impliquées dans la phosphorylation de l'enzyme par la voie de la protéine kinase Akt (Fleming et Busse 2003). Lorsque les cellules endothéliales sont activées par un stimulus externe, l'augmentation consécutive de la concentration cytosolique de Ca^{2+} va entraîner de par la liaison du Ca^{2+} au complexe Ca^{2+}/CaM , la dissociation de la NO synthase endothéliale de la cavéoline. L'association avec Hsp 90 permettant ensuite une phosphorylation de la NO synthase endothéliale par des kinases dont la nature va varier en fonction de la nature du stimulus (Fleming et Busse 2003; Shaul 2002). L'enzyme ainsi activée se localiserait ensuite au niveau de l'appareil de Golgi (Sowa et al. 1999) où elle est capable de produire du NO (Fulton et al. 2002).

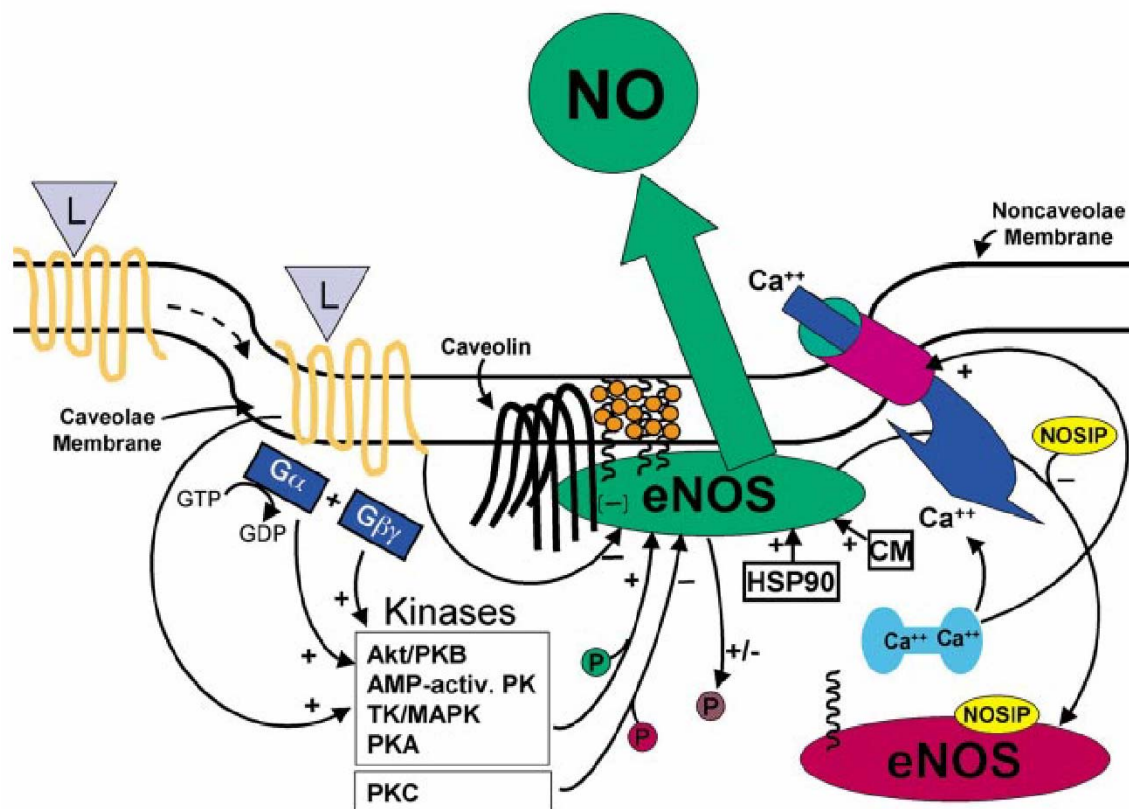


Figure 8 : Mécanismes hypothétiques de la régulation de l'activité de la NO synthase endothéliale dans les caveolae.

Abréviations : L, ligand ; PKB, protéine kinase B ; PKA, protéine kinase A ; TK, tyrosine kinase ; MAPK, mitogen-activated protein kinase ; PKC, protéine kinase C ; Hsp90 , heat-shock protein 90 KDa ; CM, calmoduline. D'après Shaul et al. 2002.

Son activité est alors indépendante de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire mais sera modulée par l'état de phosphorylation de l'enzyme. Les eNOS peuvent en effet être phosphorylées au niveau des résidus sérine 114, 615, 633 et 1177 et thréonine 495. L'état de phosphorylation de ces divers sites varie en fonction de la nature du stimulus et permet une régulation de l'activité de la NO synthase endothéliale.

Le NO est continuellement synthétisé par la NO synthase endothéliale afin de contrôler le tonus vasculaire basal. La synthèse de NO peut également être induite par de nombreux stimuli physiques et chimiques. Parmi les stimuli physiques, les forces de cisaillement constituent l'un des principaux facteurs régulant la libération locale du NO

(Busse et Fleming 2003; Rubanyi et al. 1986). Les mécanismes d'activation de la NO synthase endothéliale par les forces de cisaillement sont complexes et vont impliquer une activation très rapide faisant intervenir des canaux ioniques, ainsi que des événements relatifs à l'activation de diverses voies de signalisation menant à la phosphorylation de la NO synthase endothéliale et/ou à une augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale (Busse et Fleming 2003; Rubanyi et al. 1986). Les canaux ioniques impliqués dans les effets rapides des forces de cisaillement, ont été identifiés comme étant perméables au calcium, au potassium et au chlore. Ainsi, en modifiant la balance anions/cations, cela entraînera une modification du potentiel membranaire global ayant pour conséquence une modification de la concentration intracellulaire en calcium pouvant activer la NO synthase endothéliale. Les forces de cisaillement vont également activer la NO synthase endothéliale de manière indépendante de la concentration en calcium en activant la voie PI3-kinase/ Akt qui va activer la NO synthase endothéliale par phosphorylation au niveau de la sérine 1177. De plus, les forces de cisaillement seront également capables au long cours d'entraîner l'augmentation de l'expression des ARN messagers et de la protéine NO synthase endothéliale.

La libération basale de NO joue un rôle majeur dans le contrôle du tonus vasculaire de base et a été mis en évidence dans l'aorte de rat où cette libération représente 20 à 40 % de la libération de NO induite par l'acétylcholine dans ce type de vaisseau (Miller et al. 1984). Cette libération basale de NO a aussi été mise en évidence chez l'homme suite à l'injection d'un inhibiteur de la NO synthase, la N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) au niveau de l'artère brachiale, cette injection ayant pour conséquence une augmentation de la vasoconstriction et donc une diminution d'environ 50 % du flux sanguin au niveau de l'avant-bras (Vallance et al. 1989a). Cette libération basale de NO semble donc jouer un rôle important dans le maintien d'une vasodilatation périphérique chez l'Homme. D'autre part,

elle a pu être mise en évidence dans de très nombreux lits vasculaires artériels humains et animaux, cependant elle ne semble pas jouer de rôle dans le contrôle du tonus vasculaire veineux (Vallance et al. 1989b).

La libération de NO par les cellules endothéliales peut également être augmentée rapidement et localement par divers agonistes physiologiques tels que les autacoïdes, les neurotransmetteurs, des facteurs libérés lors de la coagulation ou dérivés des plaquettes. Ces agonistes physiologiques vont se lier à des récepteurs spécifiques, entraînant ainsi une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et en conséquence une activation de la NO synthase endothéliale. Parmi les stimuli physiologiques les plus importants, on va trouver les substances libérées par les plaquettes qui sont en train de s'agréger, tels que la sérotonine et l'adénosine diphosphate. Ces substances sont libérées par les granules denses des plaquettes et sont capables de relâcher des artères isolées (Cocks et Angus 1983; Cohen et al. 1983; De Mey et Vanhoutte 1981). La thrombine, libérée lors de l'activation de la cascade de la coagulation est également un puissant activateur de la NO synthase endothéliale. Parmi les activateurs physiologiques de la NO synthase endothéliale on trouvera également la bradykinine (Chand et Altura 1981), les neuropeptides, l'histamine, la noradrénaline ou encore des hormones circulantes telles que les catécholamines et la vasopressine.

L'ensemble de ces substances va être capable de stimuler la production de NO par la NO synthase endothéliale par le biais de diverses cascades de signalisation (Gryglewski et al. 1998; Moncada et al. 1991; Pearson 1993; Vallance 2001; Vanhoutte 2000). Ces substances vont toutes interagir avec des récepteurs spécifiques localisés au niveau des cellules endothéliales. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (G protein coupled receptor : GPCR).

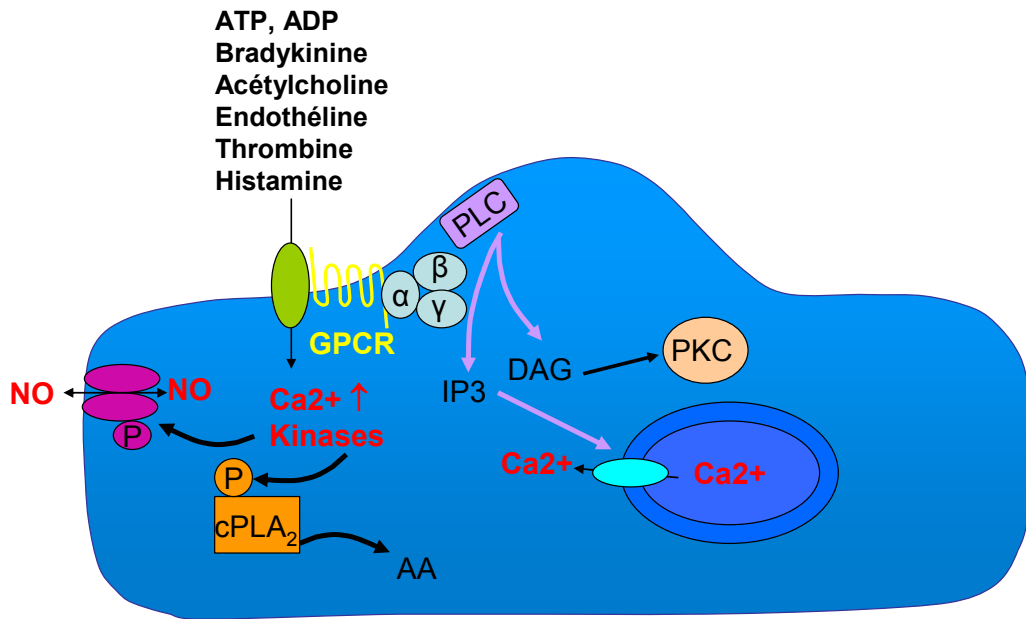


Figure 9 : Voies d'activation de la synthèse de NO par les récepteurs couplés aux protéines G

AA : Acide arachidonique ; DAG : Diacylglycérol ; GPCR : récepteurs couplés aux protéines G ; IP3 : Inositol triphosphate ; PKC : Protéine Kinase C ; PLC : Phospholipase C ; cPLA₂ : Phospholipase A₂

Les protéines G sont des hétérotrimères composés de trois sous-unités (α , β et γ) fortement associées les unes aux autres lorsque la protéine est dans sa conformation inactive. La liaison de l'agoniste à son récepteur va entraîner un changement conformationnel et va permettre la libération de la guanosine diphosphate (GDP) lié à la sous-unité α , et la formation consécutive de guanosine triphosphate (GTP) qui entraînera la dissociation de la protéine α -GTP du reste du complexe β - γ qui vont chacun réguler l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques (Christopoulos et El-Fakahany 1999 ; Marinissen and Gutkind 2001). La protéine G activée va activer une phospholipase C (PLC), une enzyme capable

d'hydrolyser les phosphatidylinositols (PIP_2) membranaires en inositol triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG), deux seconds messagers. Le DAG va à son tour entraîner l'activation de la protéine kinase C (PKC) alors que l' IP_3 , par liaison à des récepteurs spécifiques situés au niveau du réticulum endoplasmique, va activer la libération de calcium par les stocks intracellulaires et de ce fait augmenter la concentration cytosolique de calcium (Marinissen et Gutkind 2001; Selbie et Hill 1998). L'activation des protéines G va également activer des cascades de phosphorylation par diverses kinases dont la nature sera variable et spécifique des agonistes et de leurs récepteurs. L'augmentation du calcium cytosolique ainsi que l'activation des diverses kinases va mener à l'activation de la NO synthase endothéliale et à la libération de NO. Parmi les divers agonistes, la thrombine de par son activité protéolytique va présenter un mode d'activation original de son récepteur PAR (Protease Activated Receptor). En effet, la thrombine va hydrolyser l'extrémité N-terminale du récepteur et la nouvelle extrémité N-terminale ainsi générée va se replier et va activer le récepteur tel un agoniste (Coughlin 1999; Hollenberg 2003).

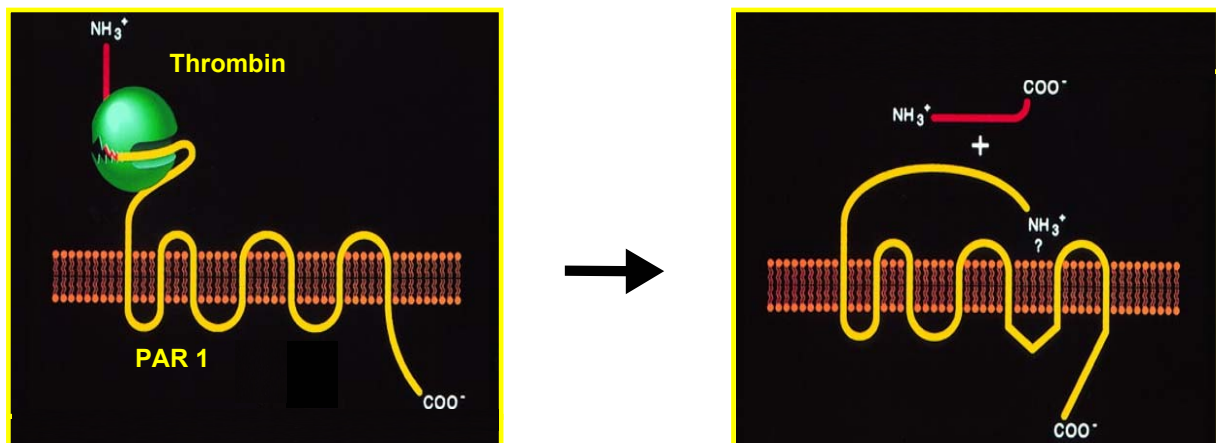


Figure 10 : Schéma d'activation du récepteur PAR-1 par la thrombine

3.2.2. Effets biologiques du NO

Le NO va jouer un rôle majeur dans le contrôle du tonus vasculaire, de la thrombose et de l'hémostase. Une fois synthétisé au niveau des cellules endothéliales, le NO va de par sa nature gazeuse pouvoir diffuser librement à travers les membranes cellulaires et agir au niveau de différentes cibles : les cellules constituant la paroi vasculaire d'une part et les constituants du sang d'autre part.

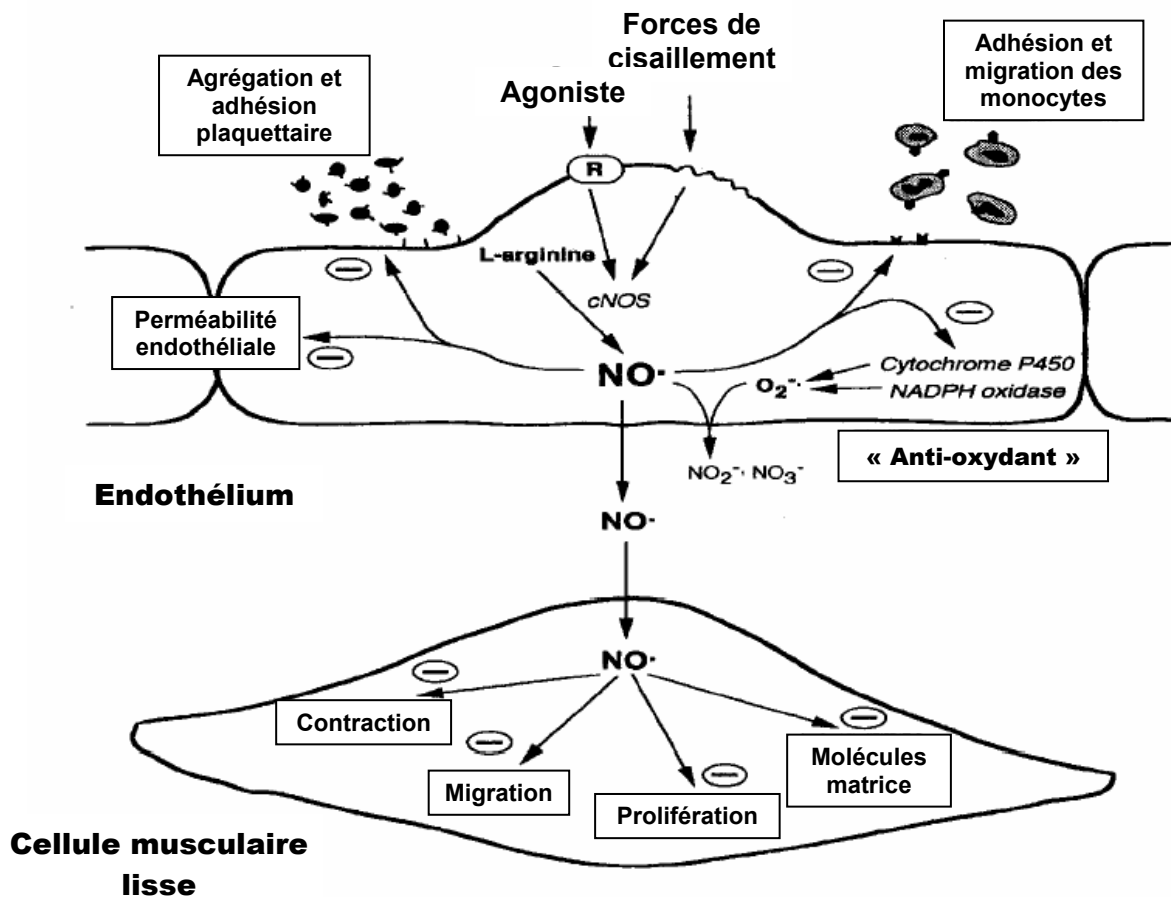


Figure 11: NO et contrôle de l'homéostasie vasculaire (modifié d'après Schini-Kerth 2000)

3.2.2.1. Effets du NO sur la paroi vasculaire

3.2.2.1.1. NO et tonus vasculaire

La régulation du tonus vasculaire va jouer un rôle majeur dans les premières phases de développement d'un thrombus. En effet, une vasodilatation à ce stade peut entraîner la migration du thrombus en formation vers une région plus distale et ainsi permettre son élimination ou limiter l'étendue des régions ischémiques et des lésions.

Le NO libéré par les cellules endothéliales va diffuser et va venir agir au niveau de sa cible principale, la cellule musculaire lisse vasculaire. Il est actuellement largement admis que le NO joue un rôle majeur dans le contrôle du tonus vasculaire et de la pression artérielle. En effet, l'inhibition de la libération de NO soit par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la NO synthase endothéliale ou de piègeurs de NO tels que l'oxyhémoglobine va potentialiser les réponses contracturantes de vaisseaux isolés tels que les artères, les veines et les microvaisseaux de diverses espèces animales, également d'origine humaine. Cette inhibition de la libération de NO va également abolir ou inhiber la relaxation endothélium-dépendante induite par de nombreux agonistes. Il ne s'agit en effet pas toujours d'une abolition complète de la relaxation en raison de l'existence dans de nombreux lits vasculaires d'autres facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium tels que la prostacycline et l'EDHF (voir ci-après). Cependant, il semble que le NO joue un rôle prépondérant dans la régulation du tonus vasculaire comme l'indique les effets hypertenseurs d'une perfusion d'un inhibiteur de NO synthase endothéliale. De plus, les souris déficientes en NO synthase endothéliale présentent une hypertension artérielle (Huang et al. 1995). Les effets du NO sur le tonus vasculaire sont majoritairement médiés par la guanylyl cyclase soluble qui une fois activée va produire du GMP cyclique. Cette augmentation de GMP cyclique va entraîner une diminution de la concentration cytosolique de calcium et causer la dissociation du complexe Ca^{2+}/CaM de la

kinase qui phosphoryle les deux chaînes légères de myosine dans les cellules musculaires lisses inhibant ainsi son activité. Ceci entraîne la déphosphorylation des chaînes régulatrices de la myosine par une phosphatase spécifique de la relaxation (Horowitz et al. 1996). Le NO pourrait également induire la relaxation des cellules musculaires lisses en agissant directement sur les canaux ioniques potassiques dépendants du calcium (Bolotina et al. 1994). Il s'agit d'un mécanisme indépendant des guanylyl cyclase soluble menant également à une diminution des concentrations cytosoliques de calcium et à la relaxation par déphosphorylation des chaînes légères de myosine (Michelakis et al. 1997). Ainsi, par ses effets vasorelaxants le NO va pouvoir jouer un rôle crucial dans le développement d'un thrombus.

3.2.2.1.2. NO et prolifération/apoptose des cellules vasculaires

Les effets du NO sur la prolifération des cellules vasculaires vont dépendre de la nature de la cellule vasculaire. Ainsi au niveau endothélial, le NO va principalement contrôler les processus d'angiogénèse en activant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Zachary 2001). Il a été montré que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), un puissant facteur de croissance est capable d'activer et d'augmenter l'expression de la eNOS. Le NO ainsi libéré va pouvoir agir comme un médiateur de la prolifération cellulaire. A de très fortes concentrations, le NO peut lui-même réguler l'expression du VEGF (Dulak et al. 2000).

Au niveau des cellules musculaires lisse vasculaires, le NO endothélial a un effet anti-prolifératif. En effet, des donneurs de NO sont capables d'inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires en culture (Garg et Hassid 1989). De même la coculture de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses entraîne une inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses, inhibition qui est réversée par l'ajout d'un

inhibiteur de eNOS (Scott-Burden et Vanhoutte 1994). Le NO va en effet diminuer l'expression des cyclines A et D1, ce qui va entraîner un blocage de ces cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, ces cyclines étant nécessaires au passage des cellules de la phase G0 en G1 (Kronemann et al. 1999). Un autre mécanisme par lequel le NO aura des effets anti-prolifératifs l'activation par le GMP cyclique des systèmes de transport du calcium dont la résultante est une diminution de la concentration cytosolique de calcium. D'autre part, le NO intervient dans la régulation de l'expression de différents gènes parmi lesquels on trouve des gènes codant pour des facteurs de croissance, des protéines chimioattractives, et des molécules d'adhésion. Ainsi, par ces divers effets, le NO va participer au maintien de la cellule musculaire dans un état quiescent non prolifératif, ce qui contribue au maintien de l'intégrité vasculaire.

Le NO joue également un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose des cellules vasculaires, mais là encore son effet est dépendant du type cellulaire. L'apoptose est caractérisée par des changements structuraux des constituants cellulaires et un changement morphologique des cellules. Les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur la paroi vasculaire vont activer la synthèse de NO endothélial qui va protéger ces cellules endothéliales de l'apoptose (Choy et al. 2001), par l'inhibition des caspases qui vont être nitrosylée. Au niveau des cellules musculaires lisses, les effets anti-prolifératifs du NO sont davantage en faveur de l'apoptose (Walford et Loscalzo 2003) et de fortes concentrations de NO sont capables d'activer les caspases et la fragmentation de l'ADN (Wedgwood et Black 2003).

3.2.2.2. Effets du NO sur les éléments sanguins

Le NO va également pouvoir diffuser vers la lumière du vaisseau sanguin où il va contribuer au maintien de la fluidité du sang qui est un élément majeur dans la prévention d'événements thrombotiques.

3.2.2.2.1. Effets du NO au niveau des plaquettes

Les effets anti-thrombotiques du NO s'expliquent en partie par sa capacité à réguler la fonction plaquettaire. En effet, le NO inhibe l'adhésion et l'agrégation plaquettaires (Ignarro 1989). Des études *in vitro* ont en effet montré que l'adhésion de plaquettes qu'elles soient ou non stimulées par la thrombine est inhibée par des activateurs de la libération de NO endothélial et qu'au contraire cette adhésion est potentialisée par l'utilisation d'inhibiteurs de NO synthase endothéliale (Radomski et al. 1987; Sneddon et Vane 1988). Des effets inhibiteurs du NO sur l'adhésion plaquettaire ont également été observés au niveau de sang circulant (de Graaf et al. 1992). D'autre part, le NO endothélial est également capable d'inhiber l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique ou la thrombine (Azuma et al. 1986; Busse et al. 1987). Cet effet est renforcé par la capacité du NO à désagréger des petits agrégats de plaquettes (Stamler et al. 1989). Les plaquettes étant elles aussi capables de libérer du NO, cela suggère une auto-régulation de l'état d'activation des plaquettes (Vallance 2001). Le NO va exercer cet effet inhibiteur de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires par la même voie de signalisation impliquée au niveau des cellules musculaires lisses, c'est-à-dire par la formation de GMP cyclique. En effet, l'augmentation de GMP cyclique au niveau des plaquettes va entraîner une diminution de la concentration en calcium cytosolique (Clementi 1998) et ceci va empêcher l'activation des plaquettes qui est à la base de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires (Heemskerk et al. 2002). De plus, le NO a la capacité d'inhiber la sécrétion par les plaquettes de divers facteurs (Broekman et al. 1991), parmi lesquels on va trouver un puissant facteur vasoconstricteur, la sérotonine, mais également des facteurs de croissance (PDGF, TGF et EGF) et des facteurs de la coagulation parmi lesquels le facteur V et le facteur VIII.

3.2.2.2.2. NO et facteur tissulaire

Alors que les effets plaquettaires du NO sont largement décrits, ses effets sur la coagulation plasmatique le sont beaucoup moins. Il a cependant été démontré que SIN-1, un composé capable de libérer du NO et des anions superoxydes est capable d'inhiber l'expression du facteur tissulaire ainsi que l'augmentation de son activité par les lipopolysaccharides dans les monocytes humains (Gerlach et al. 1998). Cet effet serait majoritairement dû à un effet post-transcriptionnel, le niveau d'expression de l'ARN messager du facteur tissulaire n'étant pas affecté (Gerlach et al. 1998).

D'autre part, le NO va également pouvoir agir sur la coagulation en modulant la fibrinolyse. En effet, l'activité plasmatique du PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) est réduite après la prise de molsidomine, un donneur de NO (Grodzinska et al. 1990).

3.2.2.2.3. Autres effets du NO

Par ces effets sur l'oxydation lipidique ainsi que sur les mécanismes inflammatoires, le NO va également exercer un rôle dans le contrôle du développement de nombreuses pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension et le diabète.

- NO et oxydation lipidique

Des études réalisées *in vitro* ont montré que le NO est capable d'inhiber l'oxydation des LDL dans des conditions où il est en excès par rapport aux radicaux oxydants, conditions que l'on retrouve dans un vaisseau sain (Hogg et al. 1993). Cependant, en présence d'anions superoxydes ou d'oxygène, conditions que l'on retrouve dans le cas de lésions athérosclérotiques le NO et ses métabolites, les peroxynitrites seront capables d'oxyder les LDL. Ces effets du NO sont indépendants du GMP cyclique et dépendent du statut rédox de la cellule.

- NO et processus inflammatoires

Le NO lorsqu'il est produit en quantité importante par la NO synthase inducible est décrit pour avoir des effets pro-inflammatoires (Rubio et Morales-Segura 2004). Cependant, de faibles quantités de NO telles qu'elles peuvent être libérées par la NO synthase endothéliale sont décrites dans de nombreuses études pour avoir des effets anti-inflammatoires (Cirino et al. 2003). Le NO exerce cet effet anti-inflammatoire principalement par une inhibition du facteur de transcription NF- κ B (Cirino et al. 2003). Cette inhibition de NF- κ B a pour conséquence une diminution de l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires. Ainsi, le NO synthétisé par la eNOS va inhiber l'expression de nombreuses molécules d'adhésion telles que la molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 (VCAM-1), la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), la molécule d'adhésion des leukocytes à l'endothélium (ELAM-1) et la protéine chemoattractive des monocytes-1 (MCP-1, Cines et al. 1998; Rubio et Morales-Segura 2004; Walford et Loscalzo 2003). Ceci entraîne une diminution de la migration des monocytes et des neutrophiles vers l'endothélium. D'autre part, le NO est capable de réguler l'activité de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase et de ce fait va pouvoir moduler la synthèse des eicosanoïdes inflammatoires (Bloodsworth et al. 2000; Wink et Mitchell 1998).

Parmi les facteurs endothéliaux vasorelaxants on distingue trois voies : celle du NO décrite précédemment qui est la voie majoritaire, cependant deux autres facteurs vont intervenir, la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, l'EDHF.

3.3. La prostacycline, PGI₂

La prostacycline, PGI₂ appartient à la famille des eicosanoïdes, qui sont des dérivés de l'acide arachidonique. Elle est synthétisée au niveau des cellules endothéliales mais également au niveau d'autres types cellulaires. Les eicosanoïdes sont synthétisés par l'enzyme cyclooxygénase COX-1 exprimée constitutivement par ces cellules. La synthèse de PGI₂ se faisant à partir de l'acide arachidonique, la disponibilité de cet acide arachidonique représente un facteur limitant de la synthèse de PGI₂. L'acide arachidonique est libéré par la phospholipase A₂ (PLA₂) à partir des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique sera alors transformé par la COX-1 en PGG₂, un endoperoxyde cyclique instable. A son tour, PGG₂ est alors converti en PGH₂ par une réaction peroxidase (Hecker et Ullrich 1989). PGH₂ est lui aussi instable et va subir une isomérisation catalysée par la PGI₂ synthase, aboutissant ainsi à la formation de PGI₂. Dans des conditions de pH physiologiques, la demi-vie de PGI₂ sera d'environ 3 minutes. A son tour, PGI₂ sera hydrolysée en 6-kéto-PGF_{1α} qui est stable mais inactif. Au niveau endothélial on trouvera également d'autres prostaglandines telles que PGE₂, PGF_{2α} et PGD₂ (Lamontagne et al. 1992).

La production de PGI₂ est stimulée par divers stimuli tels que l'hypoxie, les forces de cisaillement, en réponse à l'activation de récepteurs par des agonistes tels que l'ATP, l'ADP, la bradykinine, l'histamine et la thrombine et en réponse à des stimuli indépendants de récepteurs tels que l'ionophore calcique A23187 et divers cations (Newby et Henderson 1990; Quadt et al. 1982). La synthèse de PGI₂ est dépendante de la concentration en calcium cytosolique qui est nécessaire à l'activité de la PLA₂ responsable de la libération de l'acide arachidonique (White et Martin 1989).

Tout comme le NO, la PGI₂ est un puissant vasodilatateur et un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales mais également aux cellules musculaires lisses (Higgs et al. 1978; Lamontagne et al. 1992; Moncada et al. 1976). On lui attribue également des effets anti-prolifératifs au niveau des

cellules musculaires lisses vasculaires (Peiro et al. 1995; Shirovani et al. 1991). De plus, le NO et la PGI₂ vont pouvoir exercer des effets synergiques sur ces différentes cibles.

Une fois synthétisée, PGI₂ va diffuser librement et venir se lier au niveau de récepteurs à la prostacycline, des récepteurs à sept domaines transmembranaires que l'on trouvera au niveau des cellules cibles (Smyth et FitzGerald 2002). Ces récepteurs vont activer l'adénylyl cyclase localisée au niveau membranaire, ce qui résulte en une augmentation de la formation d'AMP cyclique. L'AMP cyclique ainsi produit active la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, la PKA capable d'induire notamment la relaxation des cellules musculaires lisses (Adelstein et Hathaway 1979). D'autre part, la PGI₂ est également capable d'activer différents canaux dépendants de l'ATP tels que les canaux potassiques dépendants de l'ATP, les canaux potassiques dépendants du calcium à large conductance, les canaux potassiques à rectification entrante et les canaux potassiques voltage-dépendants participant tous à la relaxation du muscle lisse vasculaire (Feletou et Vanhoutte 2006).

De par ces nombreux effets sur les plaquettes et sur le tonus vasculaire, la PGI₂ est un puissant facteur anti-thrombotique. Ainsi, le transfert du gène codant pour la cyclooxygénase de type 1, à l'origine de la synthèse de PGI₂, a un effet anti-thrombotique et anti-hyperplasique dans des modèles animaux d'angioplastie (Wu 1996).

3.4. Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, EDHF

Le troisième facteur intervenant dans le contrôle du tonus vasculaire est le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, EDHF. La formation d'EDHF comme celle du NO et de la PGI₂ a été décrite comme étant dépendante du calcium et pouvant être induite soit par l'activation de récepteurs spécifiques par des agonistes tels que l'acétylcholine, la bradykinine et la substance P, soit par des stimuli indépendants de l'activation de récepteurs tels que l'ionophore calcique A 23187 (Chen et Suzuki 1990; Cowan et Cohen 1991). Il est admis que,

quelle que soit sa nature, le phénomène EDHF prend naissance avec une hyperpolarisation résultant de l'activation de canaux potassiques calcium-dépendants de faible et moyenne conductance localisés au niveau des cellules endothéliales. Ces canaux sont activés par une augmentation du calcium intracellulaire stimulée par les agonistes vasculaires (Crane et al. 2003; Fulton et al. 1994; Ghisdal et Morel 2001; Ohashi et al. 1999; Popp et al. 1996; Ungvari et al. 2002) .

La nature chimique de l'EDHF suscite actuellement encore de nombreuses interrogations et semble être variable d'un lit vasculaire à l'autre. Dans pratiquement tous les vaisseaux les réponses médiées par EDHF sont supprimées par une combinaison de deux toxines, la charybdotoxine et l'apamine, inhibant les canaux potassiques calcium-dépendants de moyenne et faible conductance, respectivement (Chataigneau et al. 1998; Corriu et al. 1996).

Il apparaît ainsi que l'EDHF peut être assimilé à des acides epoxyeicosatriénoïques, les EETs, dans certains lits vasculaires. Ces EETs sont des dérivés de l'acide arachidonique qui sont synthétisés par les cytochrome P450 monooxygénases. C'est notamment le cas dans les artères coronaires de porc où l'inhibition de la synthèse des 11,12-EET entraîne une inhibition des hyperpolarisations et relaxations induites par EDHF (Fisslthaler et al. 1999). D'autres études sont venues confortées cette hypothèse en démontrant l'importance des EETs comme EDHF dans les artères coronaires et les artères carotides bovines, où l'inhibition des cytochrome P450 monooxygénases bloque les relaxations médiées par EDHF (Bauersachs et al. 1996; Campbell et al. 1996; Feletou et Vanhoutte 2006; Hecker et al. 1994; Rubanyl et al. 1987). Il semble cependant que l'inhibition des enzymes dépendantes du cytochrome P450 n'affecte pas les relaxations médiées par l'EDHF dans l'artère mésentérique et l'artère hépatique de rat (Zygmunt et al. 1995). Ceci conforte l'idée que la nature de l'EDHF est variable d'une espèce à l'autre et d'un lit vasculaire à l'autre.

Dans une deuxième hypothèse quant à la nature d'EDHF, l'hyperpolarisation membranaire peut être transmise aux cellules musculaires lisses par l'intermédiaire des jonctions gap myoendothéliales. Il semble que le nombre de ces jonctions gap myoendothéliales soit inversement proportionnel au calibre des vaisseaux, ce qui contribue en partie à expliquer l'importance de ce type d'EDHF dans les vaisseaux de faible calibre (Sandow et Hill 2000).

Une troisième hypothèse est l'assimilation d'EDHF à des ions potassium. En effet, à faible concentration dans l'espace intercellulaire, les ions potassium provenant des courants K^+ par les canaux potassiques calcium-dépendants endothéliaux vont activer à la fois la Na^+/K^+ ATPase et les canaux potassiques rectifiants dans le sens entrant des cellules musculaires lisses, entraînant ainsi une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses (Edwards et al. 1998).

Une quatrième hypothèse quant à la nature d'EDHF est le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 (Matoba et al. 2000) comme cela a notamment été décrit dans les artères mésentériques de souris, mais également humaines (Matoba et al. 2002).

Dans tous les cas, l'hyperpolarisation résultante des cellules musculaires lisses s'oppose à l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel ce qui va diminuer voir bloquer l'entrée de calcium dans ces cellules et donc entraîner leur relâchement (Cohen et Vanhoutte 1995; Garland et al. 1995). L'importance de l'EDHF dans le contrôle du tonus vasculaire suscite encore de nombreuses interrogations. Il semble jouer un rôle tout à fait mineur dans les vaisseaux de gros calibre tels que les aortes, cependant il semble jouer un rôle plus important dans les vaisseaux de faible calibre, tels que les artères coronariennes et mésentériques (Garland et al. 1995; Shimokawa et al. 1996).

3.5. Endothélium et régulation de la coagulation et de la fibrinolyse

L'endothélium possède de nombreuses propriétés anti-coagulantes et anti-thrombotiques, de par la sécrétion et l'expression à sa surface de facteurs intervenant dans la régulation de la coagulation du sang et de la fonction plaquettaire, l'endothélium joue un rôle majeur dans le contrôle de l'hémostase.

3.5.1 Endothélium et cascade de la coagulation

En cas de lésion ou d'une altération de la paroi vasculaire, différents mécanismes qui constituent l'hémostase entraînent la formation d'un caillot ou thrombus dont le but est d'arrêter le saignement, cependant ce processus doit rester localisé aux abords de la lésion pour ne pas obstruer les vaisseaux importants à l'irrigation des tissus. On distingue deux voies d'activation de cette coagulation : - une voie exogène ou extrinsèque dont l'activation est initiée par le facteur tissulaire et se fait très rapidement (délai de quelques secondes)

- une voie endogène ou intrinsèque dont l'activation fait intervenir de nombreux facteurs et de nombreuses étapes et de ce fait nécessite un délai plus long.

La voie extrinsèque est initiée par le facteur tissulaire et de ce fait, la lésion de la paroi vasculaire va activer l'expression et le recrutement à la surface membranaire des cellules vasculaires de ce facteur (facteur III, Nemerson 1988; Rapaport et Rao 1995). La forme active du facteur tissulaire est transmembranaire et va permettre l'activation du facteur VII et avec lequel il va former un complexe capable d'activer le facteur X en Xa (Konigsberg et Nemerson 1988; Martin et al. 1995).

La voie intrinsèque va être initiée par l'activation du facteur XII en XIIa, celui-ci va entraîner l'activation du facteur XI en XIa et du facteur IX en IXa. Les facteurs XIa et IXa seront en présence de calcium, de phospholipides et du facteur VIIa, capables d'entraîner l'activation du facteur X en Xa.

C'est donc au niveau de l'activation du facteur X en Xa, que les deux voies d'activation de la cascade de la coagulation vont se rejoindre. Le facteur Xa, en présence de calcium, de phospholipides et du facteur Va va catalyser la formation de thrombine à partir de son précurseur, la prothrombine (facteur II), synthétisée au niveau hépatique sous l'influence de la vitamine K. La thrombine ainsi formée est à son tour capable d'activer les facteurs V, VIII et XIII, d'activer les plaquettes ainsi que de catalyser la formation d'un réseau de fibrine insoluble à partir du fibrinogène également synthétisé au niveau hépatique et dont elle va cliver les fibrinopeptides A et B de par son activité protéolytique. Il en résulte la formation d'un réseau de fibrine instable, qui sous l'action du facteur XIIIa, une transglutaminase va se stabiliser par formation des ponts entre les monomères de fibrine.

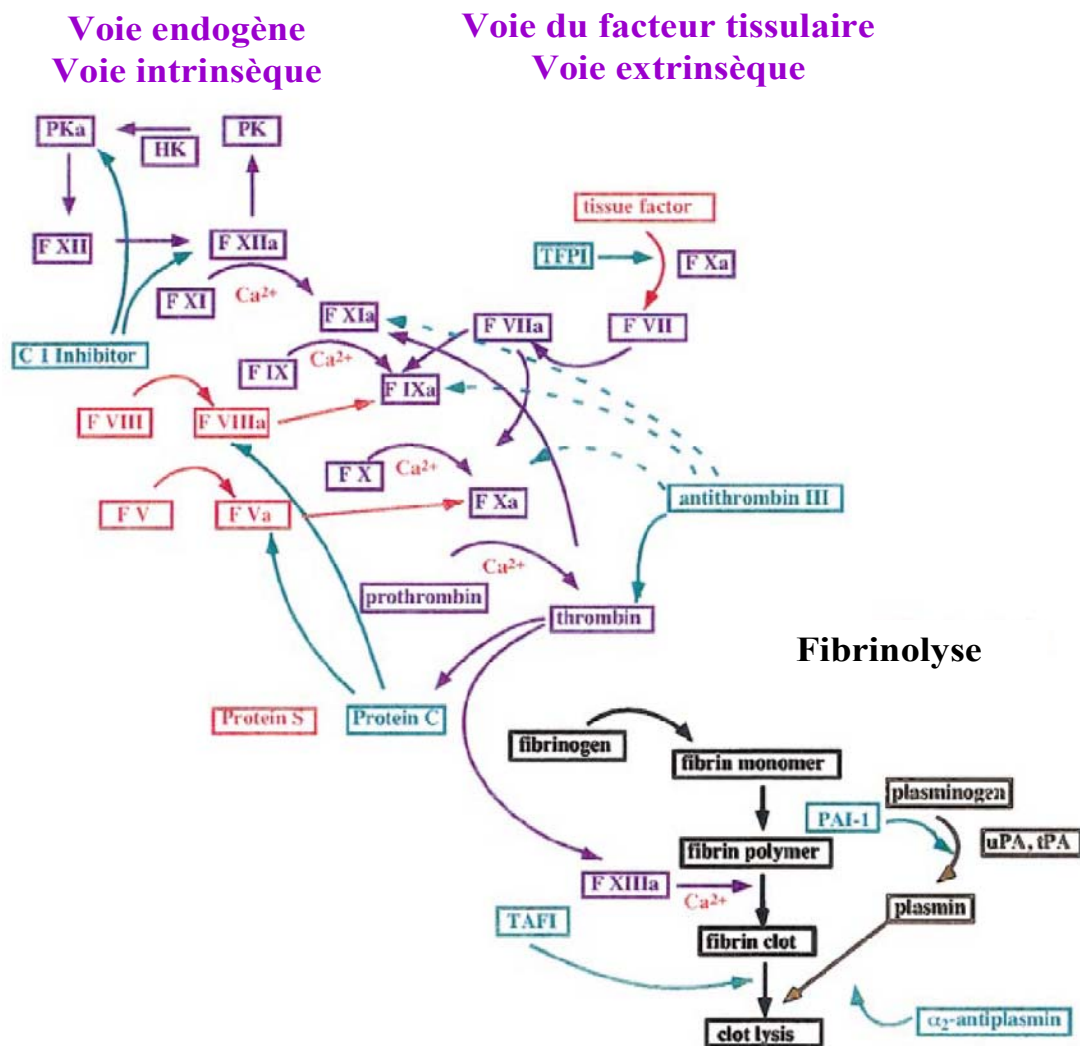


Figure 12 : La cascade de la coagulation. Les cofacteurs apparaissent en rouge, les inhibiteurs de la coagulation en bleu turquoise. Les abréviations sont les suivantes : F, facteur ; HK, kininogène de haut poids moléculaire ; PAI-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène ; PK, kallikréine plasmatique ; TAFI, inhibiteur de la fibrinolyse activable par la thrombine ; TFPI, inhibiteur de la voie du facteur tissulaire ; tPA, activateur tissulaire du plasminogène et uPA, activateur du plasminogène de type urokinase. Figure modifiée d'après Tapper et Herwald 2000.

La cascade de la coagulation, comme elle a été décrite précédemment est sous le contrôle de divers systèmes permettant l'amplification ou l'inhibition de ce système. Un des systèmes menant à l'amplification de la coagulation est directement lié à l'initiation de la voie intrinsèque par le facteur XIIa. Le facteur XIIa situé au niveau du site de lésion est en effet capable d'induire la transformation de prékalicréine (PK) en kalicréine (K) sous l'action du kininogène de haut poids moléculaire (KHPM). La kalicréine ainsi formée participe à une boucle d'autoactivation en activant à son tour le facteur XII.

A côté de mécanismes amplificateurs, il existe également des mécanismes inhibiteurs de la cascade de la coagulation dont les principaux acteurs sont des protéines exprimées à la membrane des cellules endothéliales telles que les protéoglycanes (Shworak et al. 1994) et des protéines endothéliales sécrétées au niveau de la lumière du vaisseau. Ainsi les principaux mécanismes inhibiteurs sont constitués de l'antithrombine, de la protéine C (Thompson and Howard 1986) et de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor, Broze et al. 1990; Dennis et al. 2000).

L'endothélium est capable par la production de différents facteurs de s'opposer à la cascade de la coagulation. En effet, il va exprimer à sa surface des protéoglycanes héparanes-sulfates qui vont lier l'antithrombine, un inhibiteur capable de neutraliser la thrombine (Bauer et al. 1996). De plus, l'endothélium est capable d'exprimer la thrombomoduline, un récepteur cellulaire capable de catalyser l'activation de la protéine C par la thrombine (Esmon et Esmon 1988). La protéine C ainsi activée va s'opposer à la cascade de la coagulation en inhibant deux facteurs de la coagulation, les facteurs Va et VIIIa. L'endothélium va également s'opposer par la libération de NO, d'une part, et par la production de TFPI, d'autre part, à l'activation du facteur tissulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, le NO va par des mécanismes post-transcriptionnels inhiber l'expression et l'activation du facteur tissulaire (Gerlach et al. 1998). De plus, il va libérer du TFPI capable de lier les facteurs VIIa et Xa,

formant ainsi un complexe capable d'inhiber l'activité du facteur tissulaire et empêchant l'initiation de la voie extrinsèque de la coagulation (Rapaport et Rao 1995). Les cellules endothéliales sont également capables de produire la protéine S qui est un cofacteur de la protéine C activée.

3.5.2. Endothélium et fibrinolyse

La cascade de la coagulation est contrebalancée par la fibrinolyse et il s'établit donc un équilibre continu entre activation de la cascade de la coagulation et la fibrinolyse. La fibrinolyse correspond à la lyse des caillots de fibrine, ce qui permet l'élimination des dépôts fibreux des trajets vasculaires empêchant ainsi la formation de thrombi et maintenant une bonne irrigation des tissus. Cette fibrinolyse se fait grâce à une enzyme protéolytique, la plasmine. Celle-ci est formée à partir de son précurseur, le plasminogène qui sera activé soit par des activateurs d'origine tissulaire, soit par des activateurs présents dans le sang. Dans le cas de l'activateur tissulaire il s'agit soit du tPA (Tissue-type Plasminogen Activator), qui est libéré par les cellules endothéliales au niveau des zones thrombogènes et soit de l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator). Ces deux activateurs vont convertir le plasminogène en plasmine, alors que les activateurs circulants tels que le facteur XIIa nécessitent des cofacteurs tels que les lysokinasés libérés par les leucocytes.

Ces différentes voies d'activation sont sous le contrôle de l'endothélium. En effet, l'endothélium va réduire le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) et libérer du tPA (Drummer et al. 1991; Lidbury et al. 1990). Le tPA est stocké dans des vésicules endothéliales d'où il va pouvoir être rapidement relargué en réponse à un agent vasoactif tel que la thrombine. Ce système de stockage va permettre une libération très rapide d'une concentration importante de tPA au niveau du thrombus en formation, ce qui va permettre sa

dissolution. Là aussi le NO va jouer un rôle important en augmentant la libération de tPA et en réduisant le PAI-1 (Drummer et al. 1991; Lidbury et al. 1990).

4. Effets vasculaires des hormones stéroïdiennes

4.1. Estrogènes et protection vasculaire

Les complications cardiovasculaires, parmi lesquelles on compte l'athérosclérose est la principale cause de mortalité dans les sociétés industrialisées (Tunstall-Pedoe et al. 1994) et la capacité des estrogènes à inhiber l'évolution de l'athérosclérose est connue depuis longtemps (Mendelsohn 2000).

4.1.1. Estrogènes et régulation du tonus vasculaire

Il y a plus d'un siècle que Mackenzie (1884) a montré que les hormones ovariennes sont capables d'exercer une dilatation vasculaire. Depuis, de nombreuses études ont montré que les estrogènes sont capables d'induire la vasodilatation de nombreux vaisseaux (Collins et Rosano 1998; Mendelsohn et Karas 1999). Les estrogènes sont capables de réguler le tonus vasculaire en agissant au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires via les récepteurs estrogéniques ER- α et ER- β .

Dans des conditions physiologiques, les estrogènes vont entraîner la relaxation du muscle lisse vasculaire en activant la libération de substances endothéliales vasodilatatrices, cependant les estrogènes sont également capables de traverser les membranes et d'agir directement au niveau des cellules musculaires lisses. Ainsi il a été montré que les estrogènes sont capables de faciliter les réponses endothélium-dépendantes à divers agents vasorelaxants au niveau de l'artère fémorale de lapin (Gisclard et al. 1988), des artères coronaires de singe (Williams et al. 1990) et des artères cérébrales de souris (Geary et al. 2000) et d'induire des

relaxations endothélium-indépendantes dans des artères coronaires humaines et de lapin (Jiang et al. 1992; Mugge et al. 1993).

La majorité des études montrent que les vasodilatations induites par les estrogènes sont médiées par le NO (Geary et al. 2000; Mendelsohn and Karas 1999; Node et al. 1997b; Rosenfeld et al. 1996; Van Buren et al. 1992). Les mécanismes par lesquels les estrogènes vont augmenter la formation de NO endothélial sont de deux types : génomiques (Binko et al. 1998; Weiner et al. 1994) et non génomiques (Caulin-Glaser et al. 1997; Lantin-Hermoso et al. 1997).

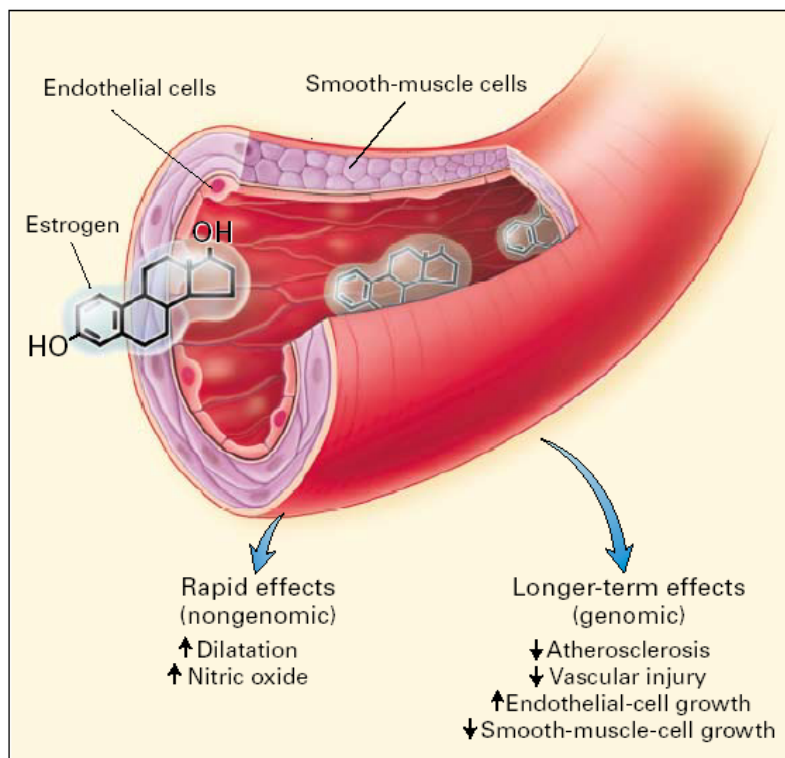


Figure 13 : Effets vasculaires des estrogènes.

D'après Mendelsohn et Karas, 1999

D'une part, les estrogènes vont augmenter rapidement l'activité de la NO synthase endothéliale (Hishikawa et al. 1995). Ces effets non génomiques vont être médiés par des récepteurs classiques mais localisés au niveau de la membrane plasmique (Pappas et al. 1995) comme le suggère les inhibitions de la libération de NO en présence d'antagonistes de ces

récepteurs (Caulin-Glaser et al. 1997; Chen et al. 1999; Lantin-Hermoso et al. 1997). Ces récepteurs une fois activés vont activer la voie des tyrosines kinases ou des MAP-kinase (Mitogen Activated protein kinase) qui vont activer la NO synthase endothéliale par phosphorylation (Caulin-Glaser et al. 1997; Chen et al. 1999; Lantin-Hermoso et al. 1997; Wehling 1997). Ces effets non génomiques peuvent également être la conséquence d'une interaction des récepteurs aux estrogènes avec la protéine chaperone Hsp 90 (Heat Shock Protein 90) qui est capable de se lier à et d'activer la NO synthase endothéliale.

Les estrogènes vont également exercer des effets génomiques ayant lieu à plus long terme. Ainsi, ils vont augmenter l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des facteurs vasodilatateurs, telles que la NO synthase endothéliale et la prostacycline synthase (Binko et al. 1998; Weiner et al. 1994). Cependant, les estrogènes peuvent également augmenter la formation de NO en augmentant l'expression génique de la forme inductible de la NOS (Binko et al. 1998).

Les deux récepteurs estrogéniques, ER- α et ER- β semblent être impliqués dans les effets vasculaires des estrogènes. En effet, ces deux récepteurs sont exprimés au niveau des cellules endothéliales vasculaires et des cellules musculaires lisses (Mendelsohn et Karas 1999). Des études récentes ont permis de mieux comprendre le rôle respectif de chacun de ces récepteurs. L'utilisation de souris déficientes pour le récepteur ER- β a permis d'identifier une implication de celui-ci dans la régulation de la fonction vasculaire et de la pression sanguine par les estrogènes (Zhu et al. 2002). En effet, les souris déficientes pour le récepteur ER- β présentent une augmentation de la vasoconstriction associée à une hypertension (Zhu et al. 2002). D'autre part, des études menées là aussi avec des souris déficientes pour l'un ou l'autre de ces récepteurs ont montré que les effets des estrogènes sur la formation endothéliale de NO sont quant à eux médiés uniquement par le récepteur ER- α , le récepteur ER- β semblant ne pas être impliqué dans ces effets (Darblade et al. 2002). De plus, il semble que le récepteur ER- β

est davantage impliqué dans les effets génomiques des estrogènes (Hodges et al. 2000), alors que le récepteur ER- α est quant à lui impliqué dans l'activation non génomique de la NO synthase endothéliale par les estrogènes (Chen et al. 1999).

Que ce soit par des effets rapides et non-génomiques ou par des effets à long terme génomique, les estrogènes vont donc augmenter la synthèse de facteurs vasodilatateurs et augmenter la relaxation vasculaire.

4.1.2. Estrogènes et inflammation

Les estrogènes sont également capables d'inhiber l'adhésion des monocytes à la surface endothéliale ainsi que la migration des monocytes au niveau sous-endothélial, deux processus inflammatoires qui sont caractéristiques de l'athérosclérose (Nathan et al. 1999). Ces effets résultent de l'inhibition par les estrogènes de l'expression de la molécule d'adhésion des cellules vasculaires, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule), de la sélectine E, et/ou de l'augmentation de la molécule d'adhésion intercellulaire, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) au niveau de la surface endothéliale (Caulin-Glaser et al. 1996). Les estrogènes vont également inhiber l'expression des cytokines proinflammatoires et mitogéniques impliqués dans l'athérogénèse (Hu et al. 1988; Shanker et al. 1994). Alors qu'*in vitro* les estrogènes présentent majoritairement des effets anti-inflammatoires, des études réalisées *in vivo* montrent un effet pro-inflammatoire pouvant contribuer à la déstabilisation des plaques d'athérosclérose. Ainsi, les estrogènes sont capables *in vivo* d'augmenter la sécrétion de la cytokine CD4⁺ (Maret et al. 2003) et la production d'interféron- γ par les cellules NK T (Nature Killer T)(Gourdy et al. 2005).

4.1.3. Estrogènes et profil lipidique

De nombreuses études ont en effet montré que les estrogènes sont capables d'améliorer le profil lipidique, un effet qui va jouer un rôle clef dans la prévention du développement de pathologies cardiovasculaires, un taux élevé de lipoprotéines de faible densité, LDL (low-density lipoprotein) représentant un facteur de risque cardiovasculaire. Plus précisément, les estrogènes vont réduire le taux sérique de cholestérol total et des LDL, alors qu'ils vont augmenter le taux de lipoprotéines de haute densité, HDL (high-density lipoprotein) et de triglycérides en modifiant l'expression des apoprotéines hépatiques (Mendelsohn and Karas 1999). Diverses études ont montré que des concentrations pharmacologiques d'estrogènes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique des LDL *in vitro*, et des études plus récentes ont montré que ces mécanismes antioxydant ont également lieu *in vivo* (Kuohung et al. 2001; Wilcox et al. 1997). De plus, certaines études montrent que les estrogènes sont capables de se lier directement aux HDL, où ils seront estérifiés et pouvant consécutivement inhiber l'oxydation des LDL (Abplanalp et al. 2000; Banka 1998). Ces mécanismes sont tout à fait en accord avec les observations faites chez la femme ménopausée et indiquant qu'un traitement à base d'estrogènes est capable de diminuer l'oxydation du LDL-cholestérol (Sack et al. 1994).

4.1.4. Estrogènes et risque thrombotique

Les estrogènes sont décrits pour avoir de nombreux effets au niveau des systèmes impliqués dans la coagulation sanguine (Meade et al. 1977; Olivieri et al. 1995; Quehenberger et al. 1996; Scarabin et al. 1995). Ces effets pourront affecter soit la paroi vasculaire, soit le sang.

Ainsi, les estrogènes vont augmenter l'expression de divers facteurs pro-coagulants tels que les facteurs VII, X, XII et XIII et vont diminuer l'expression de facteurs

anticoagulants tels que la protéine S et l'antithrombine. Ces effets convergent donc vers un état vasculaire procoagulant. D'autre part, les estrogènes vont avoir des effets au niveau plaquettaire. En effet, dans des conditions normales ou le vaisseau est sain celui-ci va libérer des facteurs vasoprotecteurs tels que NO et PGI₂ qui vont inhiber l'agrégation et l'adhésion des plaquettes à la surface du vaisseau (Durante et al. 1992). Lorsque le vaisseau va subir une altération de sa paroi, on aura une augmentation de l'expression de diverses molécules d'adhésion ce qui va favoriser l'agrégation et l'adhésion plaquettaire. D'autre part, les plaquettes activées dans ces conditions vont sécréter le thromboxane A₂ et la sérotonine, deux puissants vasoconstricteurs qui en réduisant la lumière vasculaire vont favoriser à leur tour la formation d'agrégats plaquettaires (Houston et al. 1985; Houston et Vanhoutte 1986). De plus, l'administration en aigu de 17β-estradiol diminue la concentration intracellulaire de calcium ce qui aura pour conséquence là aussi d'augmenter l'agrégation des plaquettes (Bar et al. 2000; Bar et al. 1993; Boudoulas et al. 2001; Nakano et al. 2002).

Les estrogènes vont également avoir des effets procoagulants par l'intermédiaire d'effets exercés au niveau des leukocytes. Les leukocytes sont présents dans le sang et sont en effet capables de synthétiser et de libérer des cytokines et divers autres facteurs pro-inflammatoires capables d'activer les plaquettes (Klinger et Jelkmann 2002). Parmi ces facteurs, le facteur tissulaire, qui est l'initiateur de la cascade de la coagulation et dont l'expression leukocytaire est augmenté chez des patients avec une thrombose veineuse (Kamikura et al. 2005). Le facteur tissulaire présent à la surface membranaire des leukocytes va favoriser l'activation du facteur Xa et de ce fait avoir un effet procoagulant (Myers et al. 2003). Le facteur tissulaire est également présent au niveau des plaquettes et un traitement estrogénique va en augmenter sa quantité (Jayachandran et al. 2005). Cependant comme les plaquettes ne possèdent pas les ARN messagers codant pour le facteur tissulaire, celui-ci va

probablement provenir des leukocytes et être transféré au niveau des plaquettes par l'intermédiaire de particules ou être endocyté à partir du plasma.

Ainsi, les estrogènes vont avoir des effets qui vont s'opposer et d'autres qui au contraire vont favoriser le développement d'un thrombus. De plus, l'ensemble des mécanismes moléculaires n'est pas encore bien connu et la complexité n'en est que plus importante du fait que la thrombose est la conséquence d'une combinaison d'événements ayant lieu à la fois au niveau de la paroi vasculaire, des éléments sanguins et du flux sanguin.

4.2. Progestatifs et protection vasculaire

De par la très grande hétérogénéité structurale des progestatifs, les effets biologiques de ces molécules sont souvent directement associés à une structure chimique particulière. Cependant, certains effets seront également communs à l'ensemble des progestatifs.

4.2.1. Progestatifs et régulation du tonus vasculaire

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des progestatifs sur le tonus vasculaire. Les progestatifs vont réguler le tonus vasculaire en agissant au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires via les récepteurs à la progestérone PR-A et PR-B.

Des études des relaxations endothélium-dépendantes des artères coronaires de chiennes ovariectomisées et supplémentées en estrogène et/ou progestérone montrent que la progestérone seule ne va pas modifier les relaxations endothélium-dépendantes, cependant elle va inhiber la potentialisation par les estrogènes des réponses vasorelaxantes induites par l'acétylcholine ou l'agoniste alpha-2 adrénergique, BHT 920 (Miller et Vanhoutte 1991). D'autres études montrent que l'acétate de médroxyprogestérone va inhiber les réponses vasorelaxantes du 17β -estradiol dans un modèle d'artère coronaire de singes *Cynomolgus* ovariectomisés, alors que dans ce même modèle, la progestérone ne modifie pas les effets

bénéfiques des estrogènes (Williams et al. 1990; Williams et al. 1995). De plus, un progestatif synthétique tel que l'acétate de nomégestrol, quant à lui n'altère pas les effets bénéfiques du 17 β -estradiol dans le même modèle animal (Williams et al. 1998). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études montrant que la co-administration de progestérone et de 17 β -estradiol protège des vasospasmes au niveau de l'artère coronaire, alors que la co-administration de médroxyprogestérone acétate et d'estradiol n'a pas ces effets bénéfiques (Miyagawa et al. 1997). Ainsi, ces études montrent que les progestatifs auront là aussi des effets différents en fonction de la nature du progestatif.

Ces effets sont médiés, comme mentionné précédemment, par les récepteurs PR-A et PR-B. Comme les estrogènes, les progestatifs vont exercer des effets non génomiques et rapides ainsi que des effets génomiques à plus long terme.

-Effets non génomiques :

Comme pour les effets non génomiques des estrogènes, ces effets ont lieu très rapidement et ne font pas intervenir la machinerie transcriptionnelle classiquement associée aux récepteurs stéroïdiens. Ainsi, il a été montré qu'un bolus de progestérone administré à un rat entraîne rapidement une diminution de la réponse hypertensive à la noradrénaline. Cet effet est associé à une réponse vasorelaxante liée à l'administration de progestérone et à une diminution des courants calciques au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. (Barbagallo et al. 2001).

-Effets génomiques :

Ces effets sont classiquement médiés par les récepteurs nucléaires. La liaison de la progestérone ou d'un progestatif de synthèse aux récepteurs PR-A et/ou PR-B au niveau du domaine de liaison du ligand va entraîner un changement conformationnel du récepteur suivi de la séparation du récepteur des diverses protéines chaperones telles que les protéines HSP90. Le récepteur va alors être transloqué au niveau nucléaire où il va jouer le rôle de

facteur de transcription, se lie à des éléments de réponses à la progestérone (PRE) et va induire ou réprimer l'expression de divers gènes (Truss et Beato 1993).

4.2.2. Progestatifs et profil lipidique

Les estrogènes, comme nous l'avons vu précédemment vont améliorer le profil lipidique en diminuant le taux de LDL-cholestérol et en augmentant le taux de HDL-cholestérol. La co-administration d'un progestatif semble quant à elle contrecarrer cet effet protecteur des estrogènes (Sitruk-Ware 2000), cependant les effets sont variables en fonction de la nature du progestatif administré. Ainsi, les progestatifs ayant des effets androgéniques vont réverser l'effet positif des estrogènes sur le taux de HDL-cholestérol (The Writing Group for the PEPI Trial, 1995; Crook et al. 1992) ceci sera notamment le cas pour l'acétate de médroxyprogestérone qui va également inhiber l'effet des estrogènes sur le taux de LDL-cholestérol, alors que la progestérone naturelle et les dérivés de la 19-norprogestérone, tels que l'acétate de nomégestrol, ne vont pas affecter le taux de HDL augmenté par les estrogènes (The Writing Group for the PEPI Trial, 1995; Crook et al. 1992; Dorangeon et al. 1993).

Ainsi, les effets des progestatifs sur le profil lipidique vont différer en fonction de la structure chimique des progestatifs, ce qui renforce l'importance du choix du progestatif utilisé en thérapeutique.

4.2.3. Progestatifs et risque thrombotique

Le rôle des progestatifs dans les phénomènes de thromboses est complexe et de nombreuses questions subsistent à l'heure actuelle. Cependant, les études dont nous disposons montrent que les progestatifs vont inhiber certains effets protecteurs exercés par les estrogènes, parmi lesquels on compte les modifications du taux de fibrinogène et du facteur

VII (13). Ces effets semblent différer d'un progestatif à l'autre cependant aucune relation entre les effets et la structure chimique n'a pu être mise en évidence.

De plus, les progestatifs tels que la progestérone, le 3-kéto-désogestrel, le gestodène et l'acétate de médroxyprogestérone vont augmenter l'expression du récepteur à la thrombine, le récepteur PAR-1 (Proteolytically Activatable Receptor 1), au niveau des cellules musculaires lisses entraînant l'augmentation de l'expression du facteur tissulaire induite par la thrombine et de l'activité procoagulante de surface (Herkert et al. 2001). Des progestatifs tels que le levonorgestrel, la norethisterone et le norgestimate, quant à eux n'auront pas de tels effets. De plus, l'administration de progestérone, de 3-kéto-désogestrel et d'acétate de médroxyprogestérone à des rattes ovariectomisées va également augmenter l'expression de PAR-1 et va entraîner une augmentation des réponses vasculaires à la thrombine (Herkert et al. 2001). Ainsi, les progestatifs vont avoir des effets différents selon leur structure chimique et vont dans certains cas affecter l'hémostase vasculaire.

4.3. Glucocorticoïdes et effets vasculaires

Les progestatifs étudiés pour ce travail de thèse peuvent être classés en deux groupes distincts, ceux qui sont pourvus d'une activité glucocorticoïde partielle et ceux qui en sont dépourvus. L'intérêt pour cette activité glucocorticoïde partielle repose sur de nombreuses études ayant montré les effets vasculaires des glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes sont impliqués dans de très nombreuses fonctions. En effet, ils vont intervenir dans la régulation du métabolisme du glucose, dans la régulation de phénomènes inflammatoires, la suppression de la fonction immune et l'augmentation du catabolisme protéique. De par leur très nombreux effets bénéfiques, les glucocorticoïdes de synthèse comptent parmi les substances les plus prescrites par les praticiens. Les indications des glucocorticoïdes sont nombreuses et comprennent l'asthme, l'arthrose rhumatoïde, la

septicémie gram-négative, les syndromes néphrotiques, les dermatoses, etc.... L'administration à court terme des glucocorticoïdes va avoir de nombreux effets bénéfiques et est associée à des effets rapides et non génomiques des glucocorticoïdes. De tels effets non transcriptionnels sont effectivement décrits dans le système vasculaire et sont médiés par le récepteur des glucocorticoïdes. Son activation entraîne l'activation très rapide de protéines kinases, telles que la PI3-Kinase et Akt, qui à leur tour vont activer la NO synthase endothéliale par phosphorylation. Ainsi, les glucocorticoïdes sont capables d'augmenter à court terme la formation de NO ce qui leur confère une action protectrice vis-à-vis de l'ischémie en augmentant le flux sanguin et en diminuant l'inflammation vasculaire (Limboung and Liao 2003).

Cependant, un usage prolongé et des fortes doses de glucocorticoïdes peuvent entraîner de nombreux effets secondaires tels que le diabète, les glaucomes, la myopathie, l'ostéoporose et l'hypertension. La toxicité des glucocorticoïdes peut également conduire à un syndrome de Cushing iatrogène. Ce syndrome de Cushing est caractérisé par certains symptômes physiques, neurologiques, métaboliques et cardiovasculaires. Les patients présentant un syndrome de Cushing vont en effet développer une hypertension dans 75 % des cas (Newell-Price et al. 2006).

La corrélation entre un excès de glucocorticoïdes et l'augmentation de la pression artérielle a été observée à plusieurs reprises, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (Grunfeld 1990; Krakoff 1988; Mantero and Boscaro 1992; Saruta 1996; Whitworth 1994; Yin et al. 1992). De nombreuses études supportent l'hypothèse d'un rôle des glucocorticoïdes dans la régulation de la biodisponibilité du NO. En effet, les réponses vasorelaxantes endothélium-dépendantes, à l'acétylcholine et à la bradykinine sont inhibées chez l'Homme et chez les animaux présentant un excès de glucocorticoïdes (Saruta 1996). De plus une étude a montré que la dexaméthasone est capable de diminuer l'expression de la NO synthase

endothéliale aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Cette étude montre que les glucocorticoïdes diminuent la stabilité des ARN messagers codant pour la NO synthase endothéliale ainsi que la transcription du gène codant pour celle-ci (Wallerath et al. 1999). L'inhibition de la transcription ne pouvant pas se faire directement car le promoteur du gène codant pour la NO synthase endothéliale ne possède pas d'élément de réponse aux glucocorticoïdes, les auteurs ont pu mettre en évidence que les glucocorticoïdes vont diminuer l'interaction du facteur de transcription GATA avec le promoteur du gène. D'autre part des études plus récentes ont montré que la diminution de la biodisponibilité du NO pouvait également s'expliquer par la diminution de l'activité enzymatique de la NO synthase endothéliale laquelle nécessite la présence de divers cofacteurs parmi lesquels on va trouver la tétrahydrobioptérine (BH₄, Ignarro and Murad 1995). Celle-ci est synthétisée à partir du GTP et l'enzyme-clef dans cette synthèse est la GTP cyclohydrolase 1 (Ignarro and Murad 1995). Il semblerait que les glucocorticoïdes soient capables de diminuer la biodisponibilité de ce cofacteur en inhibant l'expression de la GTP cyclohydrolase 1. En effet, des études montrent que la dexaméthasone est capable de diminuer l'expression de la GTP cyclohydrolase 1 dans des anneaux aortiques de rat. Cette diminution de l'expression de la GTP cyclohydrolase 1 est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendantes de ces anneaux, lesquelles sont restaurées par l'ajout de sépiaptérine, un précurseur de BH₄ (Johns et al. 2001). De plus, une étude plus récente montre que ces effets sont médiés par l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes (Mitchell et al. 2004). Ces résultats sont également en accord avec des données antérieures qui montrent que la dexaméthasone est capable de diminuer l'expression de la GTP cyclohydrolase 1 dans des cellules en culture (Pluss et al. 1997; Simmons et al. 1996). Cependant, la présence ou non d'un élément de réponse aux glucocorticoïdes au niveau du promoteur du gène codant pour la GTP cyclohydrolase 1 reste encore à être montré.

D'autre part les glucocorticoïdes vont entraîner une augmentation de certains facteurs procoagulants. En effet, l'administration de dexaméthasone à des volontaires sains va entraîner une augmentation des taux circulants des facteurs VII, VIII et XI ainsi que du fibrinogène (Brotman et al. 2006). De plus, des études réalisées sur des cellules en culture d'origine humaine et animale montrent que les glucocorticoïdes augmentent la production du facteur von Willebrand, du PAI-1 (Fukumoto et al. 1992; Graf et al. 1990; Huang et al. 1995) ainsi que celle du récepteur à la thrombine, PAR-1 (Herkert et al. 2001). Des altérations similaires des facteurs de la coagulation sont également observées chez les patients présentant un syndrome de Cushing (Patrassi et al. 1985).

Ainsi l'administration de glucocorticoïdes va entraîner une augmentation de la pression artérielle d'une part et favoriser un état procoagulant responsable des complications associées à la prise de glucocorticoïdes à long terme ou à des dosages élevés.

Certains progestatifs ayant, comme nous l'avons vu précédemment la capacité d'activer le récepteur aux glucocorticoïdes, on peut donc s'attendre à ce qu'ils aient les mêmes effets que les glucocorticoïdes lorsqu'ils sont administrés au long terme.

OBJECTIFS

De nombreuses études épidémiologiques indiquent que l'administration d'une combinaison d'un estrogène et d'un progestatif pour la contraception ou le traitement hormonal substitutif de la ménopause, est associée à une augmentation de 2 à 4 fois du risque d'événements cardiovasculaires chez la femme. Ces complications sont principalement la conséquence d'une activation excessive de la cascade de la coagulation avec développement d'une thrombose veineuse pouvant évoluer ultérieurement vers une embolie pulmonaire ou, comme l'ont montré des études plus récentes, d'une thrombose artérielle pouvant évoluer vers un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral (études HERS, WHI, MWS, Beral 2003; Hulley et al. 1998; Rossouw et al. 2002). De plus, le risque de thrombose est environ 2 fois plus élevé avec les pilules contraceptives microdosées contenant un progestatif de troisième génération comparé à celles contenant un progestatif de deuxième génération indiquant un rôle déterminant du progestatif dans le développement de ces thromboses (Jick et al. 1995; Jick et al. 2000; Spitzer et al. 1996).

Le développement d'une thrombose est associé à trois principaux facteurs qui sont résumés dans la triade de Virchow et qui sont la paroi vasculaire, les éléments du sang et le flux sanguin. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'un de ces facteurs, la paroi vasculaire. En effet, l'endothélium est à l'origine de la formation de facteurs vasoprotecteurs tels que le NO, l'EDHF et la PGI₂, qui vont jouer un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire (Moncada et al. 1991; Cohen et Vanhoutte 1995; Garland et al. 1995; Adelstein et Hathaway 1979). De plus, le NO est également un puissant facteur anti-thrombotique : il est capable d'inhiber l'agrégation et l'adhésion des plaquettes (Ignarro 1989), d'inhiber la cascade de la coagulation notamment par ces effets inhibiteurs sur le facteur tissulaire (Gerlach et al. 1998) et d'agir au niveau de la fibrinolyse en réduisant le PAI-1 (Plasminogen

Activator Inhibitor-1) et en stimulant la libération du tPA (Drummer et al. 1991; Lidbury et al. 1990).

Les progestatifs forment une classe hétérogène de molécules. Ils possèdent tous une importante affinité pour le récepteur de la progestérone. Ils sont cependant aussi capables de se lier et d'activer d'autres récepteurs nucléaires tels que le récepteur aux glucocorticoïdes (Schindler et al. 2003; Wiegratz et Kuhl 2004). Les glucocorticoïdes ont été décrits pour entraîner une diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale qui est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendantes médiées par le NO ainsi qu'à une hypertension (Wallerath et al. 1999).

Dans ce contexte, mon travail de recherche a eu pour objectif principal de déterminer si les traitements hormonaux induisent des réponses prothrombotiques au niveau des vaisseaux. De ce fait, nous avons en un premier étudié l'effet de deux catégories de progestatifs, ceux ayant une activité glucocorticoïde partielle et ceux qui en sont dépourvus sur l'expression de la NO synthase endothéliale, la formation de NO au niveau de cellules endothéliales en culture et les conséquences d'une altération de cette formation de NO au niveau de l'agrégation plaquettaire. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux effets de ces progestatifs sur l'effet bénéfique des estrogènes en étudiant là aussi l'expression de la NO synthase endothéliale, la formation de NO et les conséquences au niveau de l'agrégation plaquettaire. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une administration chronique de progestatifs à des rattes ovariectomisées en étudiant ses effets sur la régulation du tonus vasculaire par le NO et l'EDHF dans l'artère mésentérique.

Plus particulièrement, ce travail a eu pour objectifs spécifiques :

- En un premier temps de caractériser l'effet de progestatifs seuls sur l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation de NO dans des cellules endothéliales de veine de cordons ombilicaux humains (HUVECs),

- D'étudier la conséquence de la diminution de formation de NO induite par certains progestatifs sur l'agrégation plaquettaire,
- De déterminer le rôle de l'activité glucocorticoïde partielle dans les effets prothrombotiques des progestatifs,
- De caractériser, en un deuxième temps, l'effet de traitements estro-progestatifs sur l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation de NO dans des HUVECs,
- D'étudier les effets de traitements estro-progestatifs sur l'expression de la GTP cyclohydrolase I à l'origine de la tétrahydrobioptérine, BH₄, un cofacteur essentiel de la NO synthase endothéliale,
- D'étudier l'effet d'une administration chronique de progestatifs à des rattes ovariectomisées en étudiant plus particulièrement le tonus vasculaire au niveau de l'artère mésentérique et le rôle du NO et d'EDHF dans la régulation de ce tonus.

RESULTATS

Les études expérimentales menées dans ce travail de thèse sont présentées ici sous la forme de trois articles scientifiques originaux et d'un chapitre de livre.

PARTIE I :

Article 1

Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors

Murielle Zerr-Fouineau, MS; Marta Chataigneau, PhD; Christian Blot, PhD; Valérie B. Schini-Kerth, PhD

The FASEB Journal, 2006. Article sous presse.

PARTIE II :

Article 2

Progestins prevent the potentiating effect of 17 β -estradiol on the NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells

Murielle Zerr-Fouineau, MS; Marie Jourdain, MS; Caroline Boesch; Valérie B. Schini-Kerth, PhD

Article en préparation.

PARTIE III :

Article 3

Estrogen substitution restores the basal influence of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor on vascular tone in isolated mesenteric arteries from ovariectomized rats.

Murielle Zerr ; Thierry Chataigneau, PhD ; Frédéric Hudlett ; Fanny Pernot, PhD and Valérie B. Schini-Kerth.

“EDHF 2002”, edited by P.M. Vanhoutte, Taylor & Francis, (22):174-180.

PARTIE IV:

Article 4

Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats.

Thierry Chataigneau, PhD ; Murielle Zerr ; Marta Chataigneau, PhD ; Frédéric Hudlett, Carole Hirn and Valérie B. Schini-Kerth.

Menopause. 2004 May-Jun;11(3):255-63.

PARTIE I

Article 1

Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors

Murielle Zerr-Fouineau, MS; Marta Chataigneau, PhD; Christian Blot, PhD; Valérie B. Schini-Kerth, PhD

The FASEB Journal, 2006. Article sous presse.

Les glucocorticoïdes ont été décrits pour entraîner une diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale. De plus, celle-ci est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendantes médiées par le NO ainsi qu'à une hypertension (Wallerath et al. 1999). Les progestatifs forment cependant une classe hétérogène de molécules : ils ont tous la capacité d'activer le récepteur de la progestérone, mais sont également capables de se lier et d'activer d'autres récepteurs nucléaires tels que le récepteur aux glucocorticoïdes (Schindler et al. 2003; Wiegratz et Kuhl 2004). On distingue ainsi les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde partielle de ceux qui en sont dépourvus.

Ainsi, le but de cette étude a été d'étudier l'effet de deux catégories de progestatifs : l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone qui sont pourvus d'une importante activité glucocorticoïde partielle et le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol qui en sont dépourvus. Plus précisément, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation de NO, les conséquences de la diminution de formation de NO par certains progestatifs sur l'agrégation plaquettaire, et à la détermination du rôle de l'activité glucocorticoïde partielle de ces progestatifs.

Pour réaliser les études à l'origine de cet article, nous avons travaillé avec des cultures de cellules endothéliales issues de veines de cordons ombilicaux (HUVEC) utilisées au premier passage et des approches expérimentales diversifiées :

- Etude de l'expression protéique de la NO synthase endothéliale et du récepteur aux glucocorticoïdes par Western Blot,
- Etude de l'expression des ARN messagers de la NO synthase endothéliale par RT-PCR quantitative,
- Mesure de NO par résonance paramagnétique électronique,
- Mesures d'agrégations plaquettaires,
- Détermination du rôle du récepteur aux glucocorticoïdes en utilisant des immunomarquages et la microscopie à fluorescence, la délétion du récepteur aux glucocorticoïdes par transfection des HUVECs avec des petits ARN interférences (siRNA) spécifiques, tout comme un prétraitement avec un antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes et de la progestérone, la mifépristone.

Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors

Zerr-Fouineau et al Progestins, eNOS and platelet aggregation

Murielle Zerr-Fouineau, MS; Marta Chataigneau, PhD; Christian Blot, PhD;* Valérie B. SCHINI-KERTH, PhD

From Département de Pharmacologie et Physico-Chimie, UMR 7175-LC1 (M. Z.-F., M.C., V.B.S.-K.), Université Louis Pasteur de Strasbourg, France and *Théramex (C.B.), Monaco.

Address for correspondence:

Valérie B. Schini-Kerth, PhD

UMR CNRS 7175-LC1, Université Louis Pasteur de Strasbourg

Faculté de Pharmacie

74, route du Rhin, B.P. 60024

F-67401 Illkirch, France

Tel. +33 3 90 24 41 27

Fax. +33 3 90 24 43 13

email: valerie.schini-kerth@pharma.u-strasbg.fr

Abstract

Hormone replacement therapy with estro-progestin preparations, is associated with an increased risk of venous and arterial thromboembolic events in post-menopausal women. This study examined whether progestins affect the formation of nitric oxide (NO) in endothelial cells, and, if so, to determine the underlying mechanism.

Experiments were performed with human umbilical vein endothelial cells. Endothelial NO synthase (eNOS) expression was assessed by real-time PCR and Western blotting, NO formation by electron spin resonance spectroscopy, nuclear translocation of the glucocorticoid receptor by immunofluorescence microscopy, and platelet aggregation by an aggregometer. Medroxyprogesterone acetate (MPA) and progesterone markedly decreased the eNOS mRNA and protein levels whereas levonorgestrel and noregestrol acetate had only small effects. This effect was associated with a decreased NO formation leading to a reduced ability of endothelial cells to prevent platelet aggregation, and was prevented by knockdown of the glucocorticoid receptor using siRNA. MPA and progesterone but not levonorgestrel and noregestrol acetate caused nuclear translocation of the glucocorticoid receptor.

The present findings indicate that certain progestins including MPA, reduce the anti-aggregatory effect of endothelial cells by decreasing the expression of eNOS and the formation of NO in endothelial cells, an effect that is mediated via activation of glucocorticoid receptors.

Key Words: nitric oxide synthase - progestin – thrombosis

Introduction

Estrogens have been shown to have a beneficial effect on the cardiovascular system. Indeed, they can inhibit the vascular response to balloon injury (1) and the development of atherosclerosis (2). Potential mechanisms involved in the beneficial effect include an improvement of the lipid profile by reducing the level of low density lipoprotein and by increasing the level of high density lipoprotein (3), an acceleration of the functional endothelial recovery after balloon injury through an increased expression of VEGF (1), and the prevention of the expression of pro-atherosclerotic factors such as VCAM-1 and MCP-1 (4, 5). Alternatively, the beneficial effect may also be due to the direct action of estrogens on endothelial cells (6-8). Indeed, estrogens can rapidly increase the endothelial formation of nitric oxide (NO) as a consequence of the PI3 kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO synthase (eNOS) at Ser1177 (9-11). In addition, estrogens can also stimulate the expression of eNOS by increasing gene transcription and mRNA stability (12).

Progestins are often associated to estrogens in both oral contraception and hormonal replacement therapy, to counteract the hyperplastic effect of estrogens on the endometrium. Numerous clinical studies have indicated that estrogen-progestin combinations used for oral contraception and postmenopausal replacement therapy increase the relative risk of thromboembolic events (13-16). The higher incidence of thromboembolic events was attributed initially to the estrogen component of oral contraception, because reduction from 50 to 30 µg of estrogen (low-dose estrogen in newer preparations) per tablet had a favorable outcome (17). Several recent independent studies, however, have shown a 2-fold increased relative risk of thromboembolic events with combined oral contraceptives containing a third generation progestin such as gestodene or desogestrel, in combination with low dose estrogen compared with those containing levonorgestrel and similar low-dose estrogen (18-20). Moreover, the Women's Health Initiative study has indicated that the risk of thromboembolic

events is higher among postmenopausal users of combined estrogen-progestin treatments than users of only estrogen replacement therapy (21). These findings highlight a potential determinant role also of the progestin component of estrogen-progestin treatments for the development of thromboembolic events.

The vascular effect of progestins, a heterogeneous group of compounds has been only poorly investigated. All progestins have potent progestogenic and anti-estrogenic effects on the endometrium but depending on their chemical structure they can also interact with other nuclear receptors including the glucocorticoid receptor and the mineralocorticoid receptor to induce biological responses (22, 23). In particular, medroxyprogesterone acetate has a high relative binding affinity for the glucocorticoid receptor and it is also able to induce glucocorticoid-like effects in target cells whereas no such effects were observed with levonorgestrel and norgestrel acetate (22, 23). Glucocorticoids have been shown to down-regulate eNOS mRNA and protein expression in endothelial cells resulting in a decreased endothelium-dependent NO-mediated relaxation and hypertension (24). Therefore, the aim of the present study was to examine whether progestins affect the expression of eNOS and the formation of NO, a potent vasoprotective and anti-thrombotic factor, in human endothelial cells and, if so, to determine the role of their partial glucocorticoid activity.

Methods

Cell Culture

Endothelial cells (HUVECs) were isolated from human umbilical veins as described previously (25). Cells were cultured in MCDB 131 containing 2 mmol/L ultraglutamine, 10^5 U/L penicillin, 100 mg/L streptomycin supplemented with 10% FCS. Cells were used at first passage.

Hormonal treatments

At confluence, HUVECs were serum deprived for a 6-hour period before being exposed to either solvent (0.01% DMSO) or a test compound. Two categories of progestins have been studied, those with partial glucocorticoid activity such as progesterone, medroxyprogesterone acetate (MPA) and megestrol acetate (MEG), and those without partial glucocorticoid activity such as levonorgestrel (LNG) and norgestrel acetate (NOMAC). In addition, experiments were also performed with the glucocorticoid compounds hydrocortisone (HYDRO) and dexamethasone (DEXA). Most experiments were performed with progestins used at concentrations up to 0.1 $\mu\text{mol/L}$, which can be reached in the plasma of postmenopausal women using hormonal replacement therapy (26, 27).

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated from HUVECs using RNeasy Micro kit (QIAGEN, France). cDNA was synthesized from total RNA using iScript cDNA Synthesis kit (BIORAD, France), and PCR amplification was performed using IQ SYBR Green Supermix (BIORAD, France). The specific primers were as follows : eNOS sense, 5'-GGC ATC ACC AGG AAG ACC-3'; eNOS antisense, 5'-TCA CTC GCT TCG CCA TCA C-3'. The control housekeeping gene was human GAPDH. Relative quantitation was determined by standard $2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$ calculations.

Western Blot Analysis

Total proteins (20 μg) were subjected to SDS-PAGE (10%) and blotted on PVDF membranes. Immunodetection was carried out using an antibody directed against eNOS (BD Biosciences, France) or the glucocorticoid receptor (Alexis biochemicals, France) and enhanced chemiluminescence (Amersham, France).

Small Inhibitory RNA (siRNA) studies

HUVECs were transfected with four pooled siRNA duplexes (50 nmol/L) directed against separate glucocorticoid receptor mRNA target sequences (SMART-Pool; Dharmacon, France) for 24 hours before hormonal treatments. Transfections were conducted using DharmaFECT transfection reagent according to the manufacturer's instructions.

Determination of NO Formation by Electron Spin Resonance Spectroscopy

Determination of NO formation was assessed by electron spin resonance spectroscopy (ESR) after formation of $[\text{Fe(II)NO(DETC)}_2]$, a paramagnetic diethyldithiocarbamate iron complex with NO, in endothelial cells. The ESR methodology was used as reported previously with minor modifications (28, 29). HUVECs were washed twice with Hanks balanced salt solution (HBSS) buffered with 10 mmol/L HEPES, and then they were incubated in a HBSS-HEPES solution in the presence of bovin serum albumin (20.5 mg/mL), 1.5 mmol/L CaCl_2 , 0.3 mmol/L L-arginine for 15 minutes at 37°C. Spin trap chemicals FeSO_4 (0.8 mmol/L) and DETC (1.6 mmol/L) were rapidly mixed to obtain a colloid form $[\text{Fe(II)(DETC)}_2]$, which was added to HUVECs at a final concentration of 0.2 mmol/L. After 5 minutes, the endothelial formation of NO was induced by addition of thrombin (1 U/mL) for 30 minutes. Thereafter, dishes were placed on ice, and the incubation medium was removed before addition of 0.2 mL of the HBSS-HEPES buffer. Cells were then scraped and the cell suspension was collected in a calibrated tube. Tubes were rapidly frozen at 77K for ESR measurements. ESR measurements were performed on an MS100 spectrometer (Magnettech Ltd., Berlin, Germany) under the following conditions: temperature 77K, microwave frequency 9.34 GHz, microwave power 20 mW, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 1 mT. The third component of the ESR signal was used for relative comparison of the concentration of NO trapped in each sample.

Immunofluorescence Detection of Intracellular Glucocorticoid Receptor Distribution

HUVECs were seeded on Lab-Tek culture chambers (Nunk, NY) coated with collagen. After treatment, cells were fixed in 4% formaldehyde in PBS at room temperature for 1 hour. Cells were exposed to 5% goat serum for 1 hour before exposure to an antibody directed against the human glucocorticoid receptor (dilution 1:200). Immunodetection was carried out with FITC-labeled secondary goat antibody (dilution 1:500). Nuclei were stained with 4'6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma).

Platelet Aggregation Studies

Blood was obtained from healthy volunteers, who did not take any medication for at least 10 days. Washed platelet suspensions were kindly provided and prepared by Etablissement Français du Sang (Strasbourg, France), as previously described (30). Suspensions of platelets (450 μ L, 3.10^8 platelets/mL) were incubated for 2 minutes in a Chronolog 490 aggregometer (Havertown, PA) with continuous stirring at 1000 rpm before addition of a submaximal concentration of thrombin (0.07 U/mL). HUVECs were cultured on cytodex-3 beads and exposed to either solvent or a compound for 24 hours. In some experiments, HUVECs were treated with mifepristone (10 μ mol/L) for 30 minutes before addition of a progestin for 24 hours. Thereafter, they were added to platelet suspensions 1 minute before addition of thrombin. In some experiments, HUVECs were preincubated with N^o-nitro-L-arginine (L-NA, 300 μ mol/L) for 30 minutes before addition to platelets.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis of the data was performed using Student's *t*-test or a multi-way analysis of variance followed by Fisher's protected least significant different test where appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Sex Steroids Down-regulate eNOS Expression

Exposure of HUVECs to MPA (0.1 $\mu\text{mol/L}$) markedly decreased the eNOS mRNA level in a time-dependent manner and this effect reached 48% after a 6-hour treatment period (Figure 1A). In contrast, the solvent (0.01 % DMSO) was without effect (eNOS mRNA level was $110 \pm 13.7\%$, $n = 3$). Similarly to MPA, progesterone and the glucocorticoid dexamethasone also significantly decreased eNOS mRNA level by 43 and 51%, respectively whereas levonorgestrel caused only a slight but significant reduction (23%) and nomegestrol acetate did not have such an effect (Figure 1B). MPA and progesterone also significantly decreased eNOS protein level in a concentration-dependent manner after a 24-hour treatment period with a significant effect observed at concentrations as low as 1 nmol/L and 10 nmol/L, respectively (Figures 2A and 3). The inhibitory effect was mimicked by the glucocorticoid compounds hydrocortisone and dexamethasone but not by levonorgestrel, nomegestrol acetate and megestrol acetate (Figure 2).

Effect of Progestins on Thrombin-induced NO Formation

Treatment of HUVECs with thrombin caused about a 170 % increase in the formation of NO as assessed by ESR (Figure 4). The stimulatory effect of thrombin was abolished by N^{o} -nitro-L-arginine (100 $\mu\text{mol/L}$; from $166 \pm 4\%$ to $78 \pm 8\%$, respectively, $n = 3$) indicating that it is due to an increased eNOS activity. Pretreatment of HUVECs with either MPA, progesterone or dexamethasone for 24 hours markedly reduced the stimulatory effect of thrombin whereas nomegestrol acetate did not have such an effect (Figure 4).

Role of the Glucocorticoid Receptor

Progestins, which inhibit eNOS expression and activity such as MPA and progesterone, have been shown to bind not only to the progesterone receptor but also to the glucocorticoid receptor with relatively high affinity and to induce glucocorticoid-like effects in several experimental cell systems (22, 23). In contrast, the inactive progestins such as levonorgestrel and norgestrel acetate, bind almost exclusively to the progesterone receptor and they do not bind to the glucocorticoid receptor (22, 23). Therefore, experiments were planned to determine whether progestins can activate the glucocorticoid receptor resulting in its nuclear translocation and also whether the inhibitory effect of progestins on eNOS expression is prevented by knockdown of the glucocorticoid receptor and by the progesterone and glucocorticoid receptor antagonist mifepristone. In control HUVECs, the glucocorticoid receptor is localized predominantly in the cytosol and also to some extent in the nucleus (Figure 5). Levonorgestrel and norgestrel acetate did not affect glucocorticoid receptor localization whereas MPA, progesterone and dexamethasone caused its translocation from the cytosol into the nucleus (Figure 5). We next examined the effect of inhibition of the glucocorticoid receptor expression on the MPA- and progesterone-induced down-regulation of eNOS expression. To address this, HUVECs were transfected with siRNA (50 nmol/L) specific to the glucocorticoid receptor resulting in a $54.3 \pm 8.9\%$ reduction of the glucocorticoid receptor protein level (Figure 6A, n = 3). Knockdown of the glucocorticoid receptor expression prevented the MPA- and progesterone- induced down-regulation of eNOS mRNA expression (Figure 6B). In addition, exposure of endothelial cells to mifepristone also prevented the down-regulation of eNOS protein levels by MPA, progesterone and dexamethasone whereas the antagonist alone had only minor effects (Figure 7).

Progestins decrease the HUVECs-induced inhibition of platelet aggregation

Thrombin (0.07 U/mL) caused submaximal and irreversible aggregation of washed human platelet suspensions within 4 to 5 minutes. The stimulatory effect of thrombin was markedly reduced by addition of HUVECs (10^3 cells) to platelet suspensions one minute before their activation with thrombin whereas only a small inhibitory effect was observed with conditioned culture medium without HUVECs (Figure 8). In contrast, addition of HUVECs, which have been treated with N° -nitro-L-arginine (300 μ mol/L) for 30 minutes, to platelet suspensions did not affect thrombin-induced platelet aggregation (Figure 8A). Similarly, treatment of HUVECs with either MPA, progesterone or dexamethasone for 24 hours decreased the inhibitory effect of HUVECs on platelet aggregation whereas levonorgestrel and norgestrol acetate were without effect (Figures 8B-F). Pretreatment of HUVECs with mifepristone prevented the MPA-, progesterone- and dexamethasone-induced reduction of the inhibitory effect of HUVECs on platelet aggregation (Figures 8B, E and F). Addition of conditioned medium alone from either N° -nitro-L-arginine-, MPA-, progesterone- or dexamethasone-treated HUVECs did not affect platelet aggregation (data not shown).

Discussion

The major novel finding of the present study indicates that certain progestins substantially down-regulate the expression of eNOS, resulting in a subsequent depressed agonist-induced formation of NO in human endothelial cells. As an important consequence of these progestin-induced changes, the ability of endothelial cells to prevent platelet aggregation is reduced leading to an amplification of pro-thrombotic responses.

Interestingly, the down-regulation of eNOS expression is not induced by all members of the progestin family but occurs specifically with MPA and progesterone but not with

levonorgestrel and norgestrel acetate. The inhibitory effect of MPA on eNOS mRNA level occurred after a delay of one hour and reached about 50% after 6 hours. This effect is associated with a decreased eNOS protein level by about 70% at 24 hours, and results in a dramatic reduction of the endothelial formation of NO. Moreover, the progestin-induced down-regulation of eNOS expression is observed at concentrations as low as 1 nmol/L MPA and 10 nmol/L progesterone. In contrast, both levonorgestrel and norgestrel acetate did not affect eNOS expression even at concentrations up to 1 μ mol/L. During hormonal replacement therapy, peak serum concentrations of MPA are about 5 nmol/L after intake of 2 mg 17 β -estradiol and 5 mg MPA (26), and mean serum concentrations of progesterone are about 10 nmol/L after use of a vaginal ring delivering estradiol 160 μ g/day and progesterone 20 mg/day (27). Thus, the inhibitory effect of progestins on eNOS expression is observed at concentrations that are likely to be of clinical significance. In addition, such an effect might also explain the impaired endothelium-dependent flow-mediated brachial artery dilatation in chronic users of contraceptive depot MPA (31).

Progestins are a heterogeneous family of steroids that, in addition to their interaction with the cytosolic progesterone receptor, might also bind strongly to other steroid receptors, such as those for androgens, mineralocorticoids, and glucocorticoids to induce biological responses (22, 23). The down-regulation of eNOS expression and NO release occurred selectively with MPA and progesterone whereas levonorgestrel and norgestrel acetate, despite their similar progestin potency, had no effect. Such a differential effect is not consistent with a major role for the progesterone receptor in the down-regulation of eNOS. Interestingly, all stimulatory progestins have distinct intrinsic glucocorticoid activity as opposed to the inactive ones (22, 23). Moreover, dexamethasone is a potent inhibitor of eNOS expression both at the mRNA and protein levels in endothelial cells (24, 32). In addition, chronic intake of dexamethasone caused down-regulation of eNOS in the aorta and several

other tissues of glucocorticoid-treated rats, and was associated with a pronounced attenuation of acetylcholine-induced vasodilatation in resistance arteries (24). Therefore, the role of the glucocorticoid receptor in the progestin-induced down-regulation of eNOS was investigated. The present findings indicate that, similarly to dexamethasone, MPA and progesterone caused major translocation of the glucocorticoid receptor from the cytosol to the nucleus whereas no such effect was observed with norgestrel acetate and levonorgestrel. Moreover, the progestin-induced down-regulation of eNOS was abolished by knockdown of the glucocorticoid receptor using siRNA and also by mifepristone, a potent progesterone and glucocorticoid receptor antagonist. Taken altogether, the present findings indicate that activation of the glucocorticoid receptor rather than the progesterone receptor appears to be the key event in the progestin-induced down-regulation of eNOS. Activation of the glucocorticoid receptor might decrease eNOS expression by reducing both the stability of eNOS mRNA and the activity of the endothelial promoter by decreasing the binding activity of the essential transcription factor GATA (24). In addition, glucocorticoid receptor activation might also decrease the bioavailability of NO by causing an overproduction of reactive oxygen species in endothelial cells, which subsequently scavenge NO (32).

Endothelial cells play a major role in the maintenance of blood fluidity and in the prevention of pro-thrombotic responses, in part, by releasing NO. The anti-thrombotic properties of NO include its ability to inhibit platelet adhesion and aggregation, and to prevent the recruitment of platelets and the endothelial expression of tissue factor, the physiological activator of the coagulation cascade (33-39). The present findings indicate that although endothelial cells effectively inhibit platelet aggregation, they were no longer able to do so after their treatment with either MPA, progesterone or dexamethasone. Similarly, the inhibitory effect of endothelial cells was also not observed following treatment of endothelial cells with the competitive eNOS inhibitor, N^ω-nitro L-arginine, indicating a major role of NO.

In contrast, norgestrel acetate and levonorgestrel did not impair the anti-aggregatory effect of endothelial cells. Altogether, the present findings indicate that progestins can reduce the protective effect of endothelial cells on platelet aggregation and that this effect is most likely due to their ability to activate the glucocorticoid receptor leading to the subsequent down-regulation of the endothelial formation of NO. They also suggest that the reduced ability of endothelial cells to appropriately oppose platelet activation may be a key event in promoting initiation and progression of venous and arterial thromboembolic events following hormonal replacement therapy or oral contraception including a progestin with partial glucocorticoid activity. In addition, progestins with partial glucocorticoid activity but not those without have also been shown to markedly potentiate the tissue factor-dependent vascular procoagulant effects of thrombin by increasing the availability of thrombin receptors at the smooth muscle (40). The potential role of glucocorticoid receptor activation in promoting thromboembolic events is also supported by the fact that a 2-fold increased relative risk of venous thromboembolism and fatal pulmonary embolism is observed in women taking combined low-dose oral contraceptives containing a progestin with partial glucocorticoid activity, such as gestodene and desogestrel, compared to those taking levonorgestrel and estrogen at a similar dose (18-20). It is also consistent with the increased risk of thromboembolism observed in patients under long-term glucocorticoid therapy or with an endogenous hypercortisolism (Cushing's syndrome) (41).

In conclusion, the present findings indicate that certain progestins currently used in hormonal replacement therapy, such as MPA, reduce the anti-aggregatory effect of endothelial cells by down-regulating the expression of eNOS. They further suggest that activation of the glucocorticoid receptor is responsible for this action and thus might be a key determinant in the induction of a thrombotic state.

Acknowledgments

This study was supported, in part, by Fondation de France (France) and Theramex (Monaco). The authors thank Drs. C. Gachet, B. Hechler and D. Cassel (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) for kindly providing washed human platelets.

References

1. Krasinski, K., Spyridopoulos, I., Asahara, T., van der Zee, R., Isner, J. M., and Losordo, D. W. (1997) Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95, 1768-1772
2. Bourassa, P. A., Milos, P. M., Gaynor, B. J., Breslow, J. L., and Aiello, R. J. (1996) Estrogen reduces atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10022-10027
3. (1995) Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama* 273, 199-208
4. Caulin-Glaser, T., Watson, C. A., Pardi, R., and Bender, J. R. (1996) Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 98, 36-42
5. Pervin, S., Singh, R., Rosenfeld, M. E., Navab, M., Chaudhuri, G., and Nathan, L. (1998) Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1575-1582
6. Van Buren, G. A., Yang, D. S., and Clark, K. E. (1992) Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 167, 828-833

7. Node, K., Kitakaze, M., Kosaka, H., Minamino, T., Funaya, H., and Hori, M. (1997) Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation* 96, 1953-1963
8. Rosenfeld, C. R., Cox, B. E., Roy, T., and Magness, R. R. (1996) Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation. *J Clin Invest* 98, 2158-2166
9. Chen, Z., Yuhanna, I. S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R. H., Mendelsohn, M. E., and Shaul, P. W. (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103, 401-406
10. Chambliss, K. L., Yuhanna, I. S., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T. S., Mendelsohn, M. E., Anderson, R. G., and Shaul, P. W. (2000) Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 87, E44-52
11. Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N., and Murata, Y. (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 3459-3467
12. Weiner, C. P., Lizasoain, I., Baylis, S. A., Knowles, R. G., Charles, I. G., and Moncada, S. (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5212-5216
13. Daly, E., Vessey, M. P., Hawkins, M. M., Carson, J. L., Gough, P., and Marsh, S. (1996) Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet* 348, 977-980

14. Jick, H., Derby, L. E., Myers, M. W., Vasilakis, C., and Newton, K. M. (1996) Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet* 348, 981-983
15. Perez Gutthann, S., Garcia Rodriguez, L. A., Castellsague, J., and Duque Oliart, A. (1997) Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism: population based case-control study. *BMJ* 314, 796-800
16. Rosendaal, F. R., Helmerhorst, F. M., and Vandenbroucke, J. P. (2001) Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 86, 112-123
17. Gerstman, B. B., Piper, J. M., Tomita, D. K., Ferguson, W. J., Stadel, B. V., and Lundin, F. E. (1991) Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J Epidemiol* 133, 32-37
18. Jick, H., Kaye, J. A., Vasilakis-Scaramozza, C., and Jick, S. S. (2000) Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with users of oral contraceptives with levonorgestrel before and after 1995: cohort and case-control analysis. *BMJ* 321, 1190-1195
19. Bloemenkamp, K. W., Rosendaal, F. R., Helmerhorst, F. M., Buller, H. R., and Vandenbroucke, J. P. (1995) Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 346, 1593-1596
20. (1995) Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet* 346, 1582-1588
21. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C.,

- Kotchen, J. M., and Ockene, J. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288, 321-333
22. Schindler, A. E., Campagnoli, C., Druckmann, R., Huber, J., Pasqualini, J. R., Schweppe, K. W., and Thijssen, J. H. (2003) Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 46 Suppl 1, S7-S16
23. Wiegratz, I., and Kuhl, H. (2004) Progestogen therapies: differences in clinical effects? *Trends Endocrinol Metab* 15, 277-285
24. Wallerath, T., Witte, K., Schafer, S. C., Schwarz, P. M., Prellwitz, W., Wohlfart, P., Kleinert, H., Lehr, H. A., Lemmer, B., and Forstermann, U. (1999) Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13357-13362
25. Klein-Soyer, C., Beretz, A., Millon-Collard, R., Abecassis, J., and Cazenave, J. P. (1986) A simple in vitro model of mechanical injury of confluent cultured endothelial cells to study quantitatively the repair process. *Thromb Haemost* 56, 232-235
26. Svensson, L. O., Johnson, S. H., and Olsson, S. E. (1994) Plasma concentrations of medroxyprogesterone acetate, estradiol and estrone following oral administration of Klimaxil, Trisequence/Provera and Divina. A randomized, single-blind, triple cross-over bioavailability study in menopausal women. *Maturitas* 18, 229-238
27. Hamada, A. L., Maruo, T., Samoto, T., Yoshida, S., Nash, H., Spitz, I. M., and Johansson, E. (2003) Estradiol/progesterone-releasing vaginal rings for hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 17, 247-254
28. Vanin, A. F. (1999) Iron diethyldithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection. *Methods Enzymol* 301, 269-279

29. Kleschyov, A. L., and Munzel, T. (2002) Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol* 359, 42-51
30. Cazenave, J. P., Ohlmann, P., Cassel, D., Eckly, A., Hechler, B., and Gachet, C. (2004) Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol* 272, 13-28
31. Sorensen, M. B., Collins, P., Ong, P. J., Webb, C. M., Hayward, C. S., Asbury, E. A., Gatehouse, P. D., Elkington, A. G., Yang, G. Z., Kubba, A., and Pennell, D. J. (2002) Long-term use of contraceptive depot medroxyprogesterone acetate in young women impairs arterial endothelial function assessed by cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 106, 1646-1651
32. Iuchi, T., Akaike, M., Mitsui, T., Ohshima, Y., Shintani, Y., Azuma, H., and Matsumoto, T. (2003) Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92, 81-87
33. Furlong, B., Henderson, A. H., Lewis, M. J., and Smith, J. A. (1987) Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 90, 687-692
34. Azuma, H., Ishikawa, M., and Sekizaki, S. (1986) Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88, 411-415
35. Radomski, M. W., Palmer, R. M., and Moncada, S. (1987) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148, 1482-1489
36. de Graaf, J. C., Banga, J. D., Moncada, S., Palmer, R. M., de Groot, P. G., and Sixma, J. J. (1992) Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85, 2284-2290

37. Freedman, J. E., Loscalzo, J., Barnard, M. R., Alpert, C., Keaney, J. F., and Michelson, A. D. (1997) Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 100, 350-356
38. Sneddon, J. M., and Vane, J. R. (1988) Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2800-2804
39. Yang, Y., and Loscalzo, J. (2000) Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation* 101, 2144-2148
40. Herkert, O., Kuhl, H., Sandow, J., Busse, R., and Schini-Kerth, V. B. (2001) Sex steroids used in hormonal treatment increase vascular procoagulant activity by inducing thrombin receptor (PAR-1) expression: role of the glucocorticoid receptor. *Circulation* 104, 2826-2831
41. Sjoberg, H. E., Blomback, M., and Granberg, P. O. (1976) Thromboembolic complications, heparin treatment in increase in coagulation factors in Cushing's syndrome. *Acta Med Scand* 199, 95-98

Figure Legends

Figure 1

Effect of progestins on eNOS mRNA level in HUVECs. A, Time-dependent down-regulation of eNOS mRNA expression by medroxyprogesterone acetate (MPA). B, Cells were exposed to either solvent (0.01% DMSO), a progestin (LNG, levonorgestrel; NOMAC, nomegestrol acetate; PROG, progesterone; MPA) or the synthetic glucocorticoid dexamethasone (DEXA) for 6 hours before eNOS mRNA level was determined. Data are shown as mean \pm SEM of 3-5 (A) and 7 (B) different experiments. * $P \leq 0.05$ vs control.

Figure 2

Effect of different progestins (A) and glucocorticoid compounds (B) on eNOS protein level in HUVECs. HUVECs were exposed to either solvent (0.01% DMSO) or a compound before determination of the level of eNOS protein. A and B, top: representative Western blot of eNOS protein level and corresponding β -tubulin protein level, bottom: corresponding cumulative data. Data are shown as mean \pm SEM of 7-8 different experiments. * $P \leq 0.05$ vs control.

Figure 3

Effect of different concentrations of progestins on eNOS protein level in HUVECs. Cells were exposed to either solvent (0.01 % DMSO) or a progestin for 24 hours before determination of the level of eNOS protein. Top: representative Western blot of eNOS protein level and corresponding β -tubulin protein level, bottom: corresponding cumulative data. Data are shown as mean \pm SEM of 7-8 different experiments. * $P \leq 0.05$ vs control.

Figure 4

Effect of progestins on thrombin-induced formation of NO in HUVECs. HUVECs were exposed to either solvent (0.01 % DMSO) or a compound (0.1 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours before addition of thrombin. NO formation in HUVECs was assessed by ESR spectroscopy. Results are shown as mean \pm SEM of 5 to 7 different experiments. *, # $P \leq 0.05$ vs control and thrombin, respectively.

Figure 5

Effect of progestins on nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in HUVECs. HUVECs were exposed to either solvent (0.01 % DMSO) or a compound for 30 minutes before the localization of the glucocorticoid receptor (GR) was assessed by immunocytochemistry. Top photos represent GR staining and bottom photos the corresponding nuclear staining with DAPI. Similar observations were made in 3 additional experiments.

Figure 6

Glucocorticoid receptor (GR) activation mediates the progestin-induced down-regulation of eNOS mRNA expression in endothelial cells. HUVECs were transfected with siRNA (50 nmol/L, 24 hours) specific for the GR before exposure to MPA or PROG for 6 hours. A GR expression was assessed by Western blot. Top: representative Western blot of GR and corresponding β -tubulin protein level. Similar observations were made in two additional experiments. B, eNOS mRNA expression was assessed by RT-PCR. Data are shown as mean \pm SEM of 4 different experiments. * $P \leq 0.05$ vs control.

Figure 7

Glucocorticoid receptor activation mediates the progestin-induced down-regulation of eNOS protein expression in HUVECs. Cells were exposed either to solvent or mifepristone, a glucocorticoid and progesterone receptor antagonist for 30 minutes before addition of either MPA, PROG or DEXA for 24 hours. Thereafter, eNOS protein level was assessed by Western blot. Top: representative Western blot of eNOS and corresponding β -tubulin protein level and bottom: cumulative data. Data are shown as mean \pm SEM of 3 to 4 different experiments. * $P \leq 0.05$ vs control.

Figure 8

Effect of progestins on the NO-mediated inhibitory effect of HUVECs on platelet aggregation. HUVECs (ECs) were exposed to either solvent, a progestin (LNG, levonorgestrel; NOMAC, nomegestrol acetate; PROG, progesterone; MPA), all tested at 0.1 $\mu\text{mol/L}$, or dexamethasone (DEXA, 0.1 $\mu\text{mol/L}$) for 24 hours before they were added to washed platelets. In some experiments, HUVECs were pretreated with mifepristone (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 minutes before addition of a progestin. After 1 minute, platelet aggregation was initiated by thrombin (0.07 U/mL). As indicated, the effect of conditioned culture medium alone and HUVECs, which were incubated with N^{O} -nitro-L-arginine (NLA, 300 $\mu\text{mol/L}$) for 30 minutes, on platelet aggregation is also shown. Similar findings were made in 2-4 additional experiments.

Figure 1

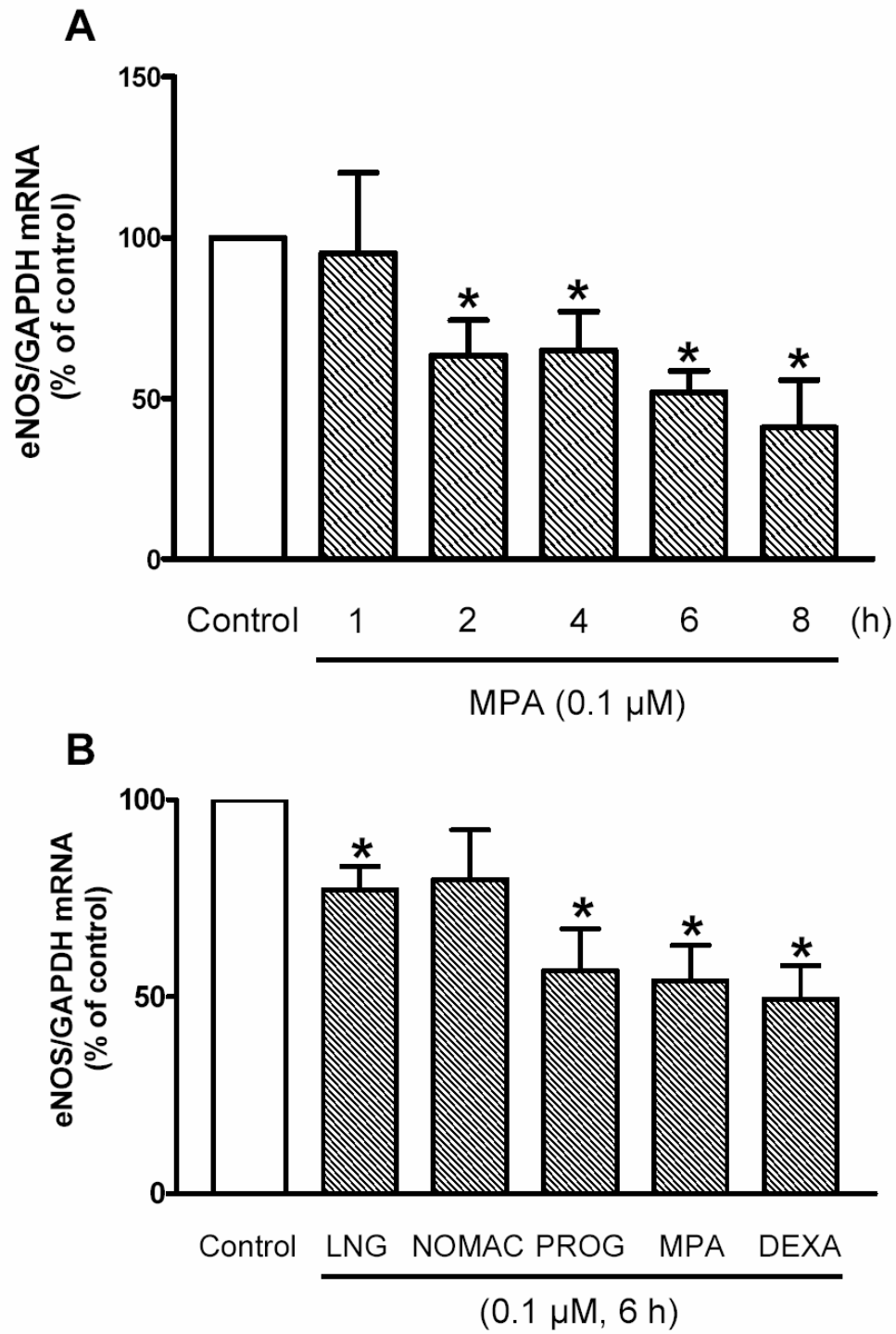


Figure 2

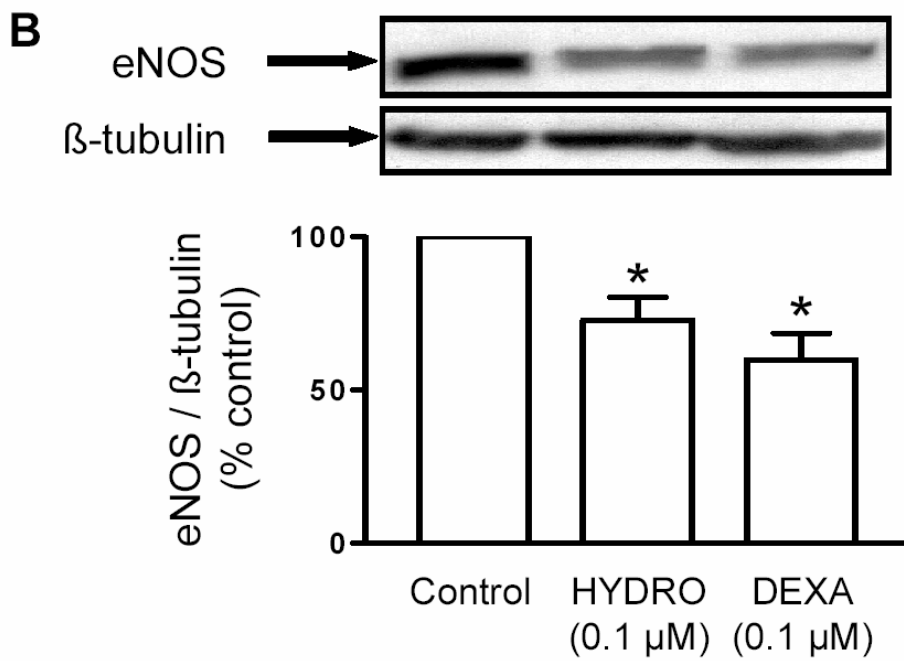
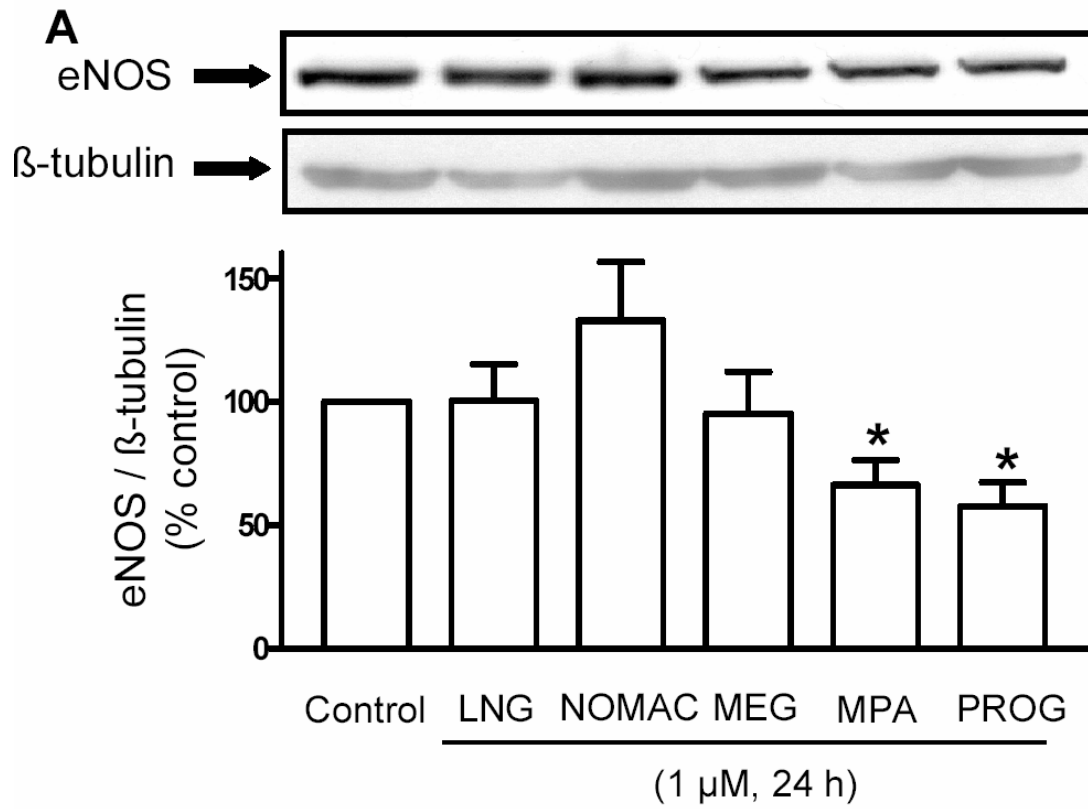


Figure 3

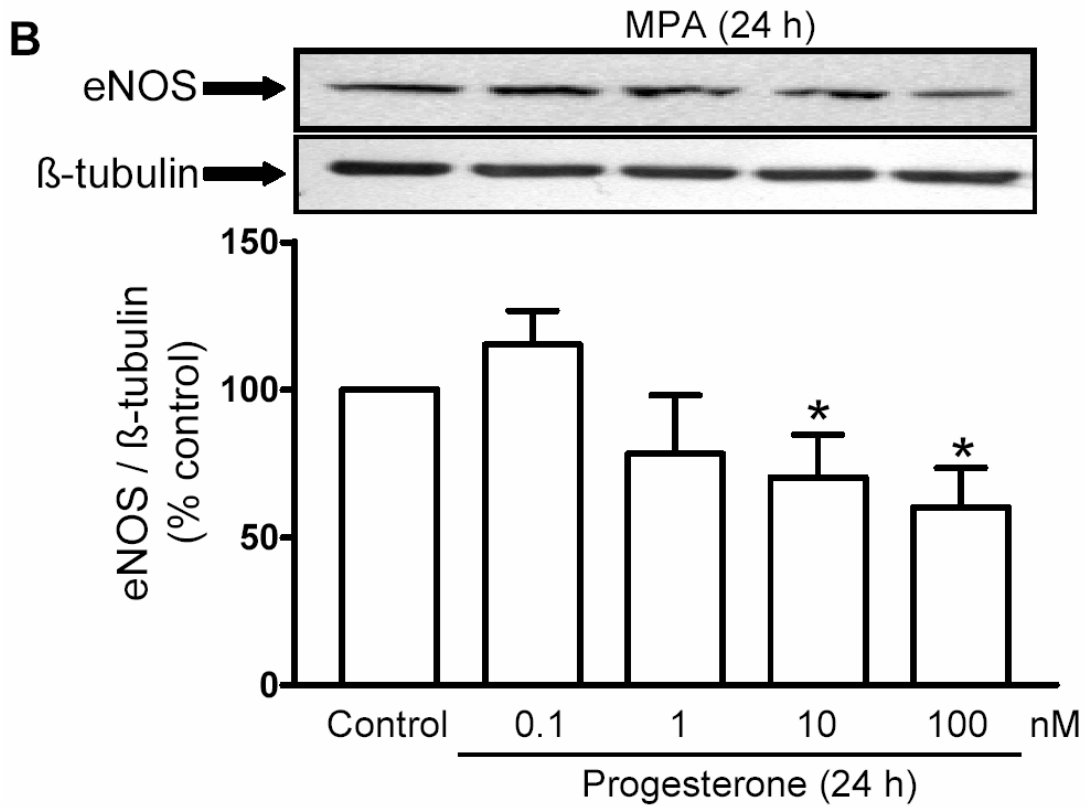
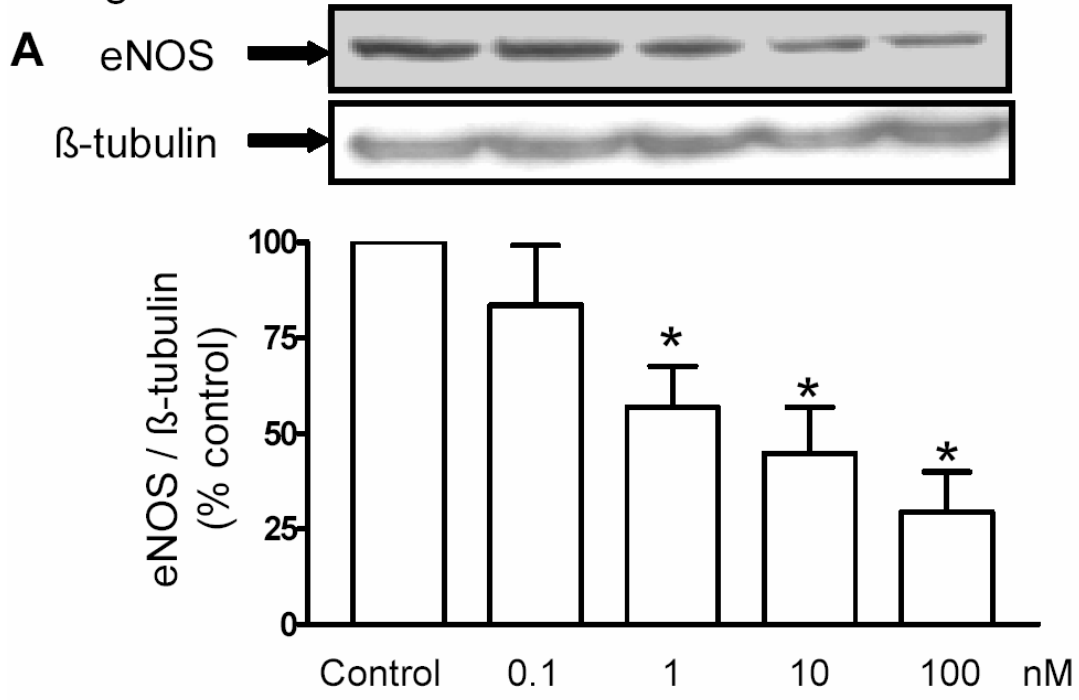


Figure 4

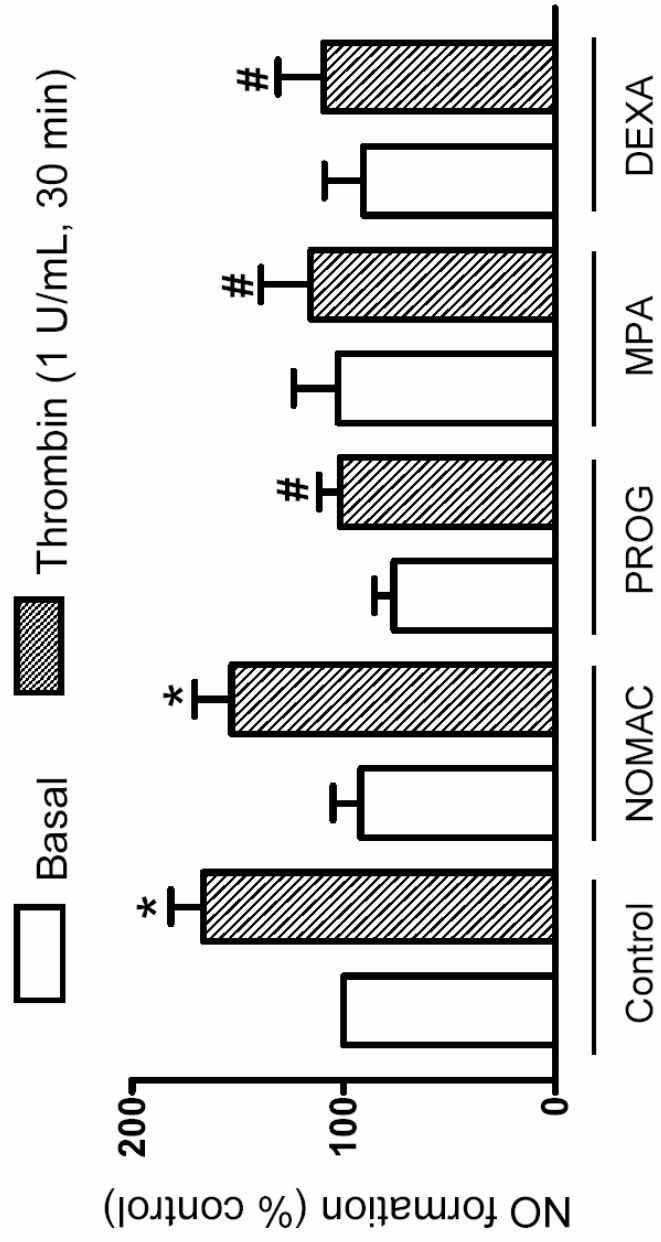


Figure 5

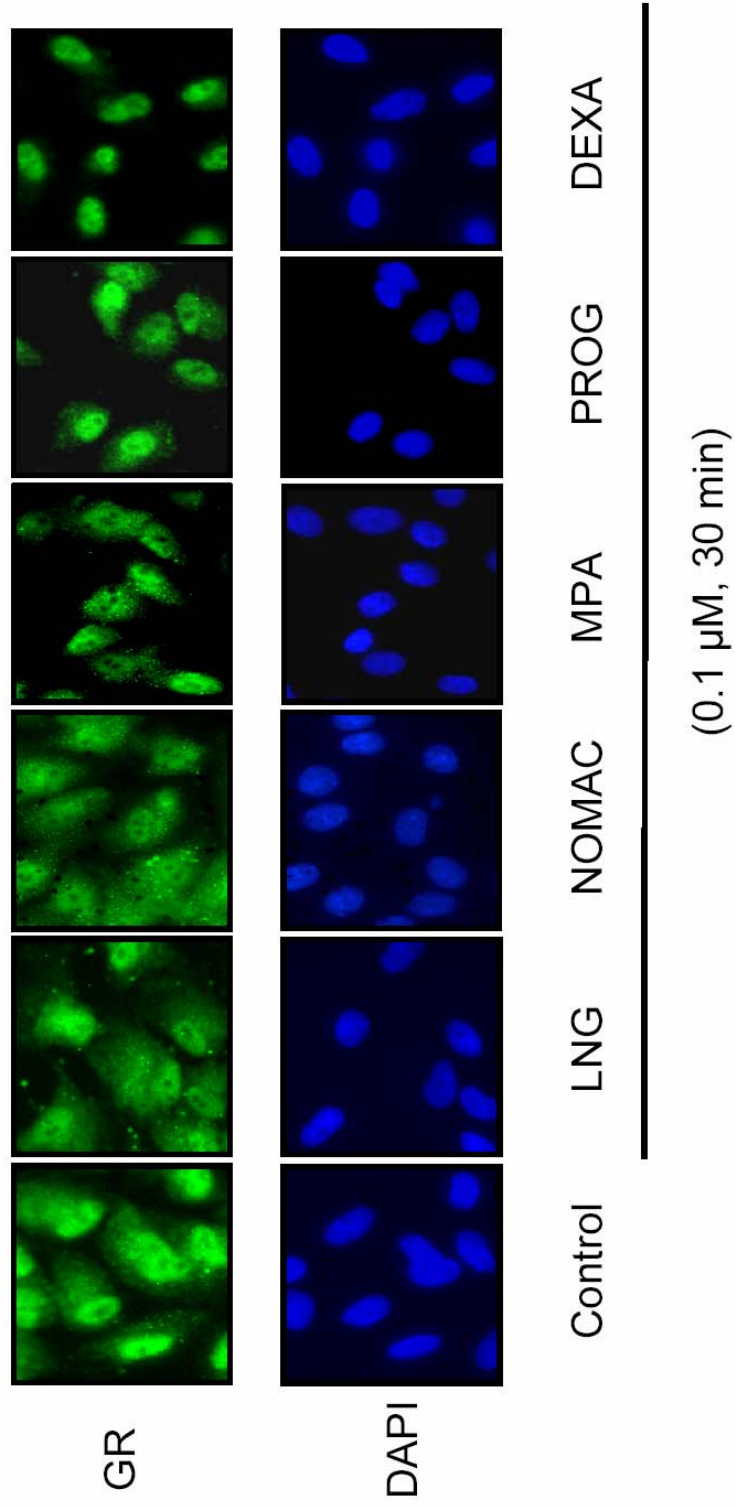


Figure 6

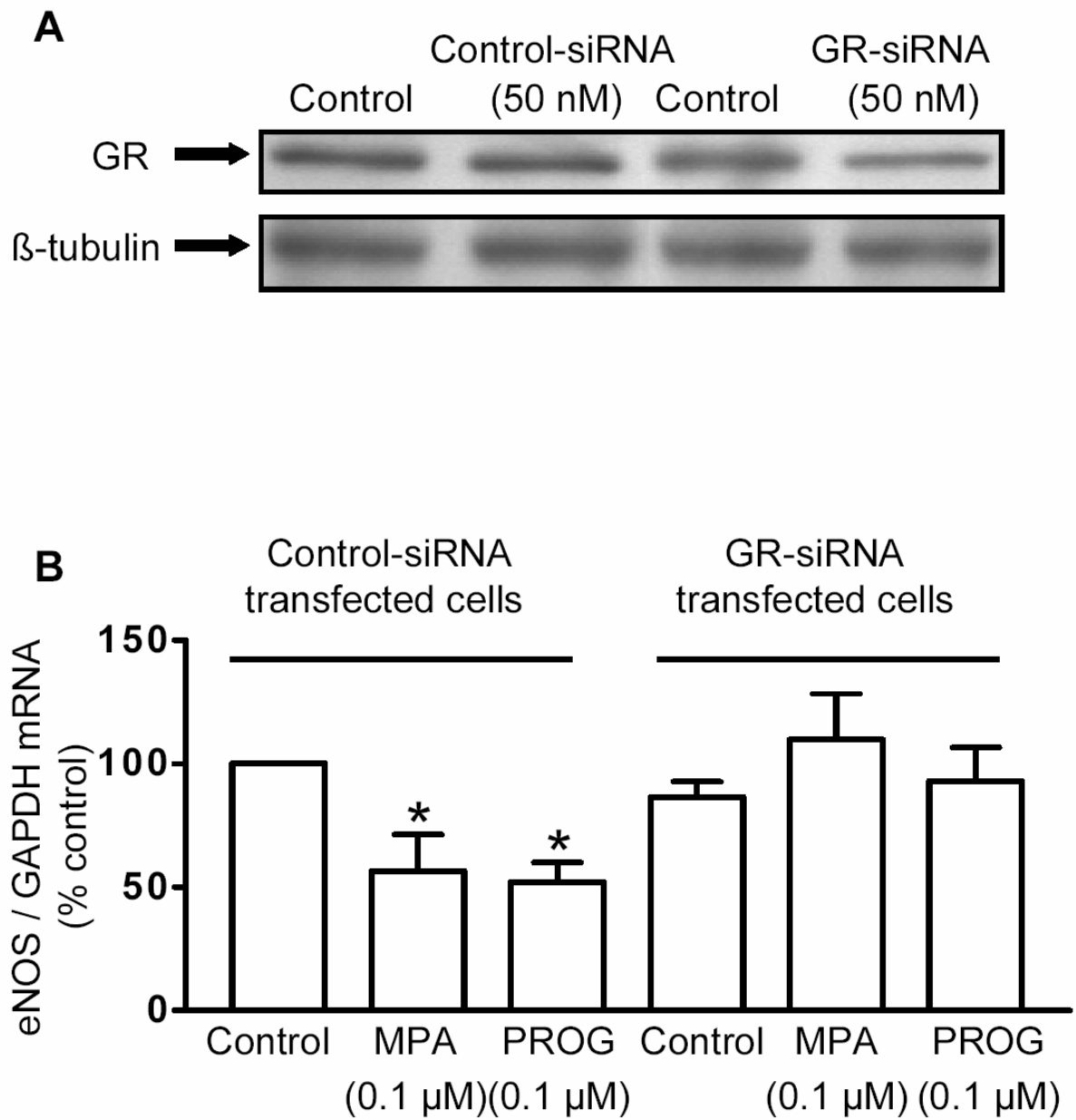


Figure 7

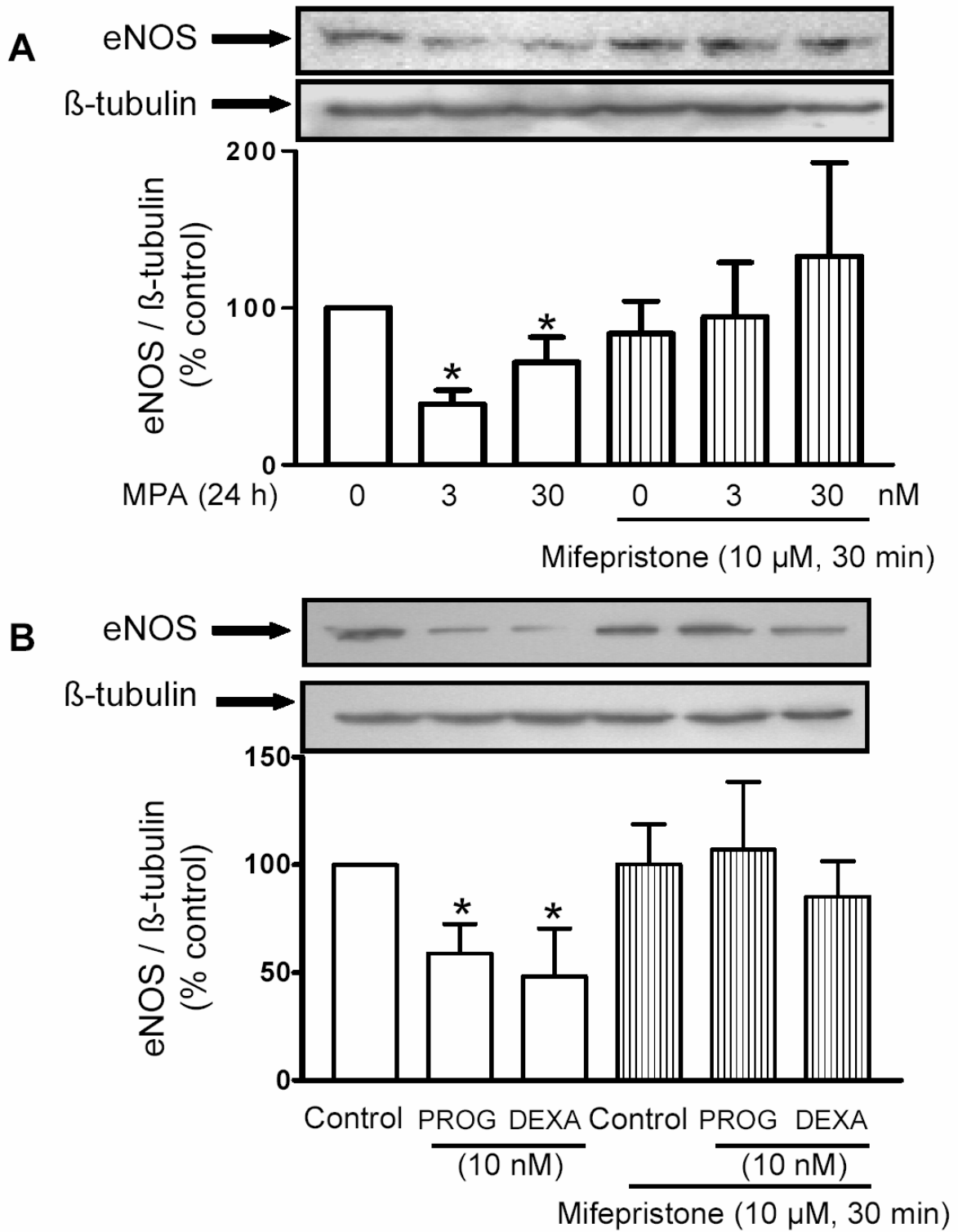
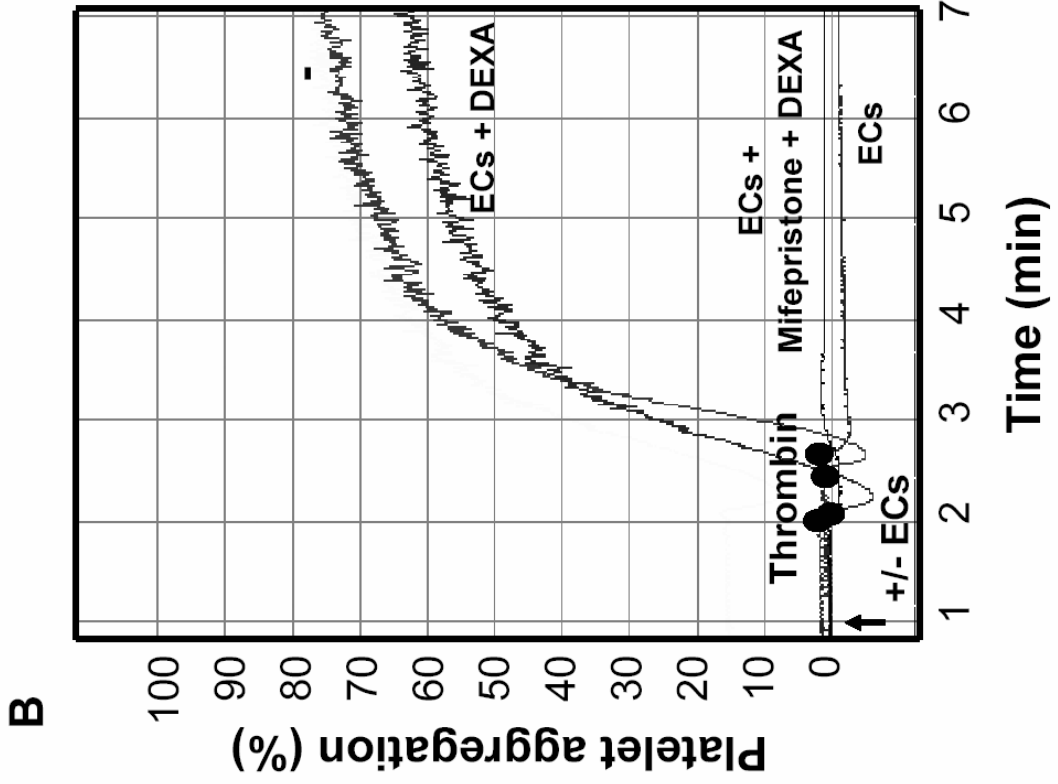
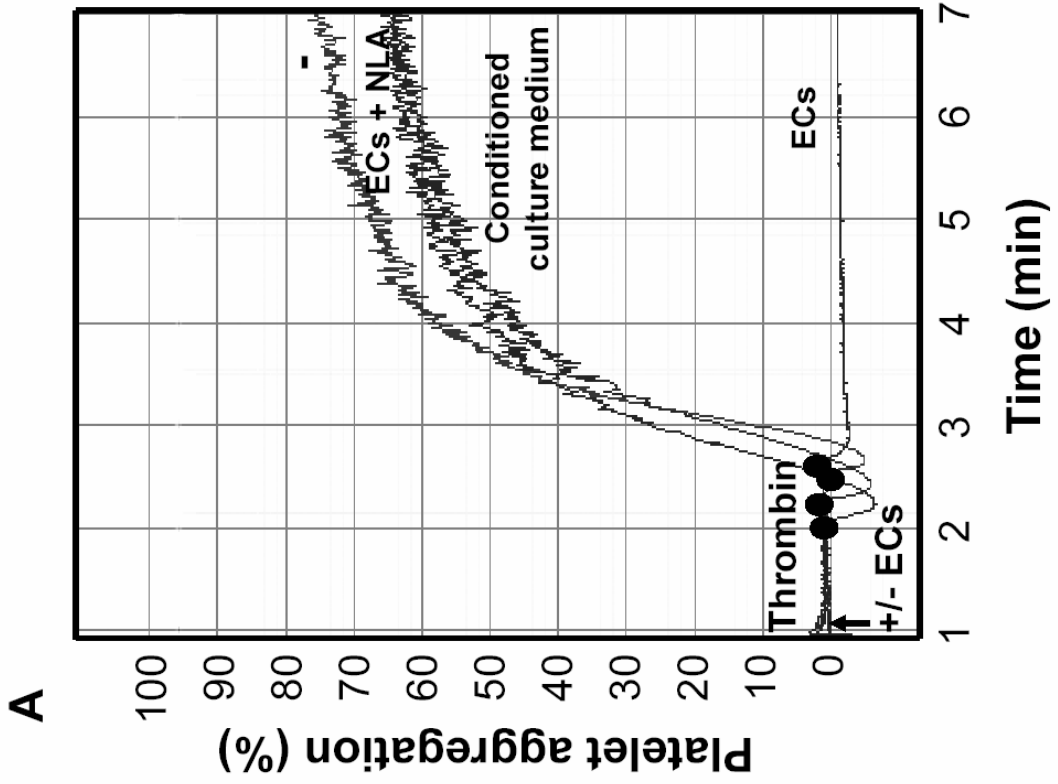
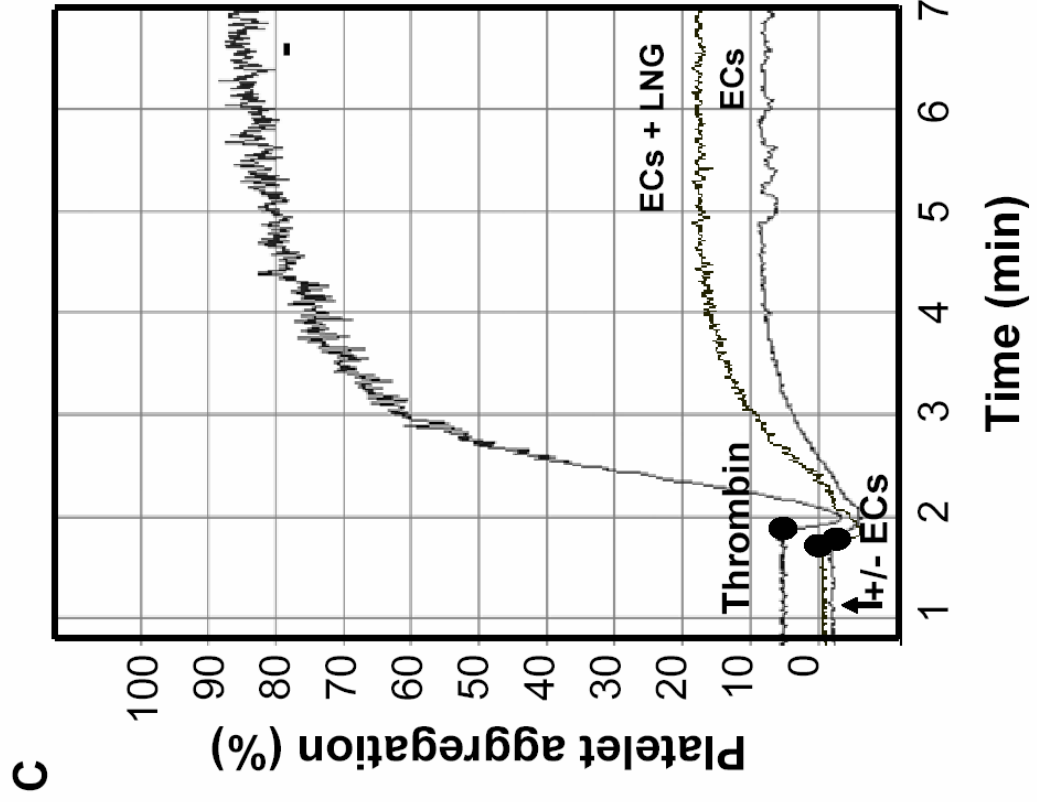
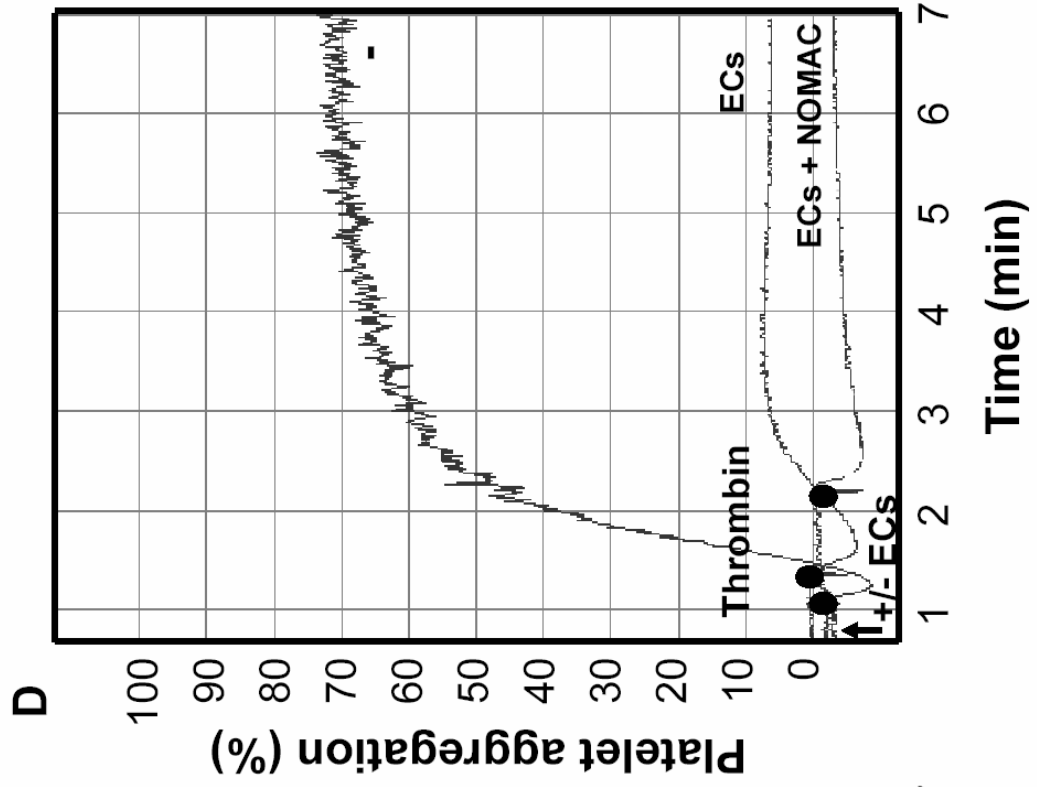
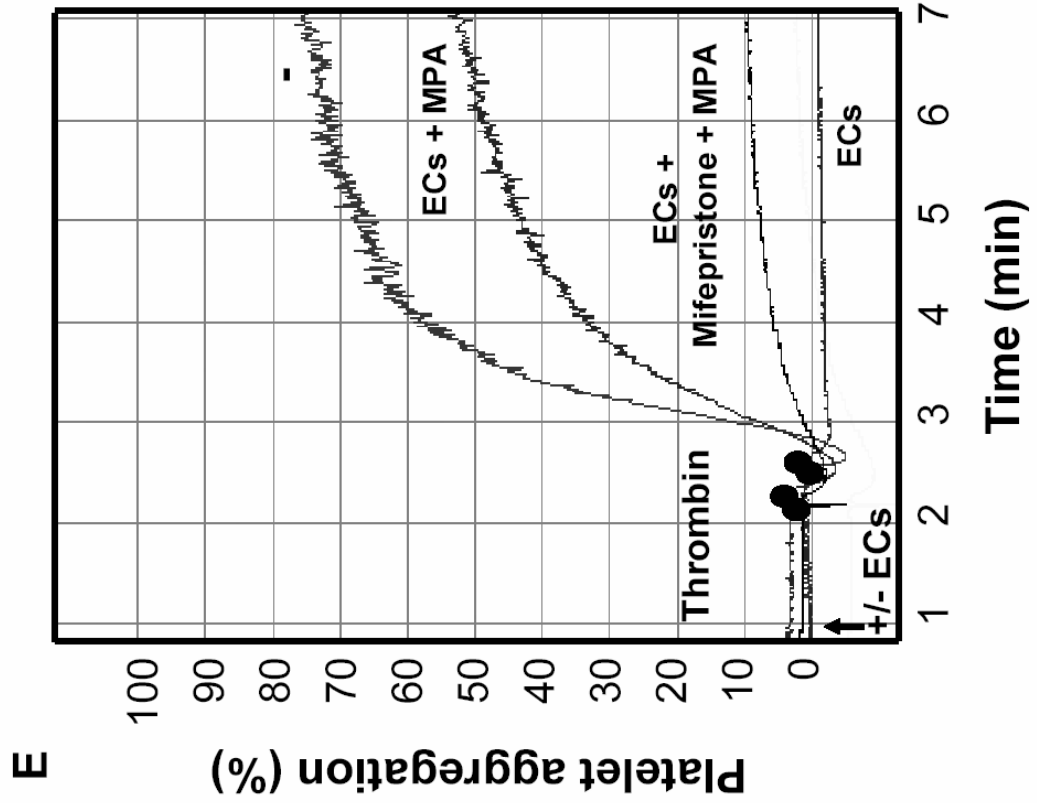
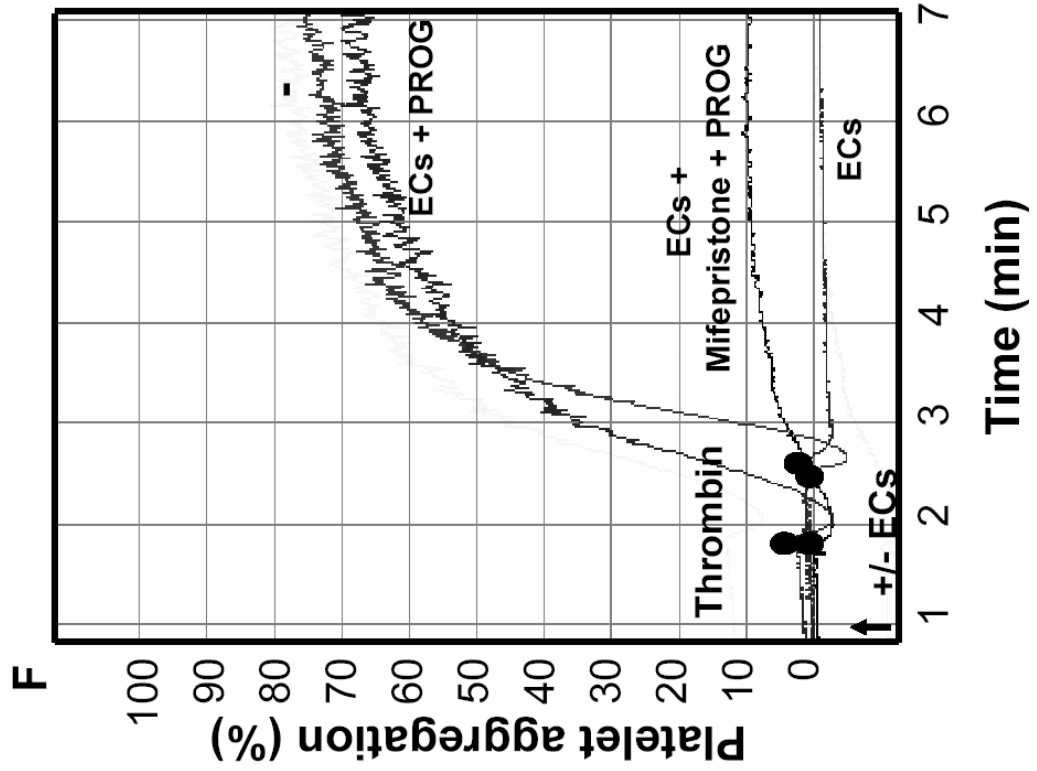


Figure 8







Dans cette publication nous démontrons que certains progestatifs tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, de par leur activité glucocorticoïde partielle vont inhiber l'effet anti-agrégant plaquettaire des cellules endothéliales en diminuant l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation de NO dans ces cellules. Un tel mécanisme pourrait contribuer à expliquer l'effet prothrombotique de certains traitements hormonaux et pourrait contribuer au développement de nouveaux traitements hormonaux dépourvus de tels effets néfastes.

Les résultats indiquent que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone sont capables, tout comme les glucocorticoïdes (dexaméthasone et hydrocortisone), d'inhiber l'expression de la NO synthase endothéliale au niveau des ARN messagers ainsi qu'au niveau protéique dans les HUVECs. Cette diminution de l'expression de NO synthase endothéliale est concentration-dépendante et est observée à des concentrations de 1 et 10 nM, pour l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, respectivement. Ces concentrations sont similaires à celles que l'on retrouve dans le plasma des femmes prenant de tels traitements hormonaux (Hamada et al. 2003; Svensson et al. 1994). De tels effets ne sont pas observés avec des progestatifs dépourvus d'activité glucocorticoïde partielle tels que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol, quelle que soit la concentration utilisée.

L'inhibition de l'expression protéique de la NO synthase endothéliale observée après 24 heures de traitement avec l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone est associée à une diminution de la formation de NO induite par la thrombine. Un tel effet n'est pas observé avec le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol. Cette diminution de la formation de NO aura pour conséquence directe de réduire fortement l'effet anti-agrégant plaquettaire des HUVECs comme l'indique nos expériences d'agrégation plaquettaire.

Dans notre étude nous avons également démontré que ces effets sont directement liés à l'activation du récepteur des glucocorticoïdes. En effet, les études d'immunomarquage

montrent que seuls les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde partielle, tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone sont capables, tout comme les glucocorticoïdes de se lier au récepteur des glucocorticoïdes et d'entraîner sa translocation nucléaire. D'autre part, lorsque les HUVECs sont transfectées avec un siRNA spécifique du récepteur aux glucocorticoïdes, les effets inhibiteurs des progestatifs sur l'expression de la NO synthase endothéliale ne sont plus observés, indiquant que ces effets sont médiés par le récepteur des glucocorticoïdes plutôt que par le récepteur de la progestérone. Ces résultats sont confortés par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de la progestérone et du récepteur des glucocorticoïdes, la mifépristone, qui va empêcher la diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale ainsi que la réduction de l'effet anti-agrégant plaquettaire des HUVECs par l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone.

Ainsi, certains progestatifs, tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone sont capables d'activer le récepteur des glucocorticoïdes, ce qui entraîne une diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale au niveau des ARN messagers et de la protéine. Cette diminution de l'expression est associée à une réduction de la formation de NO et de l'effet anti-agrégant plaquettaire des HUVECs. De tels effets ne sont pas observés avec des progestatifs tels que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol.

Ce mécanisme d'action des progestatifs pourrait contribuer à expliquer le risque accru d'événements thrombo-emboliques lors de l'administration de ces produits *in vivo* chez la femme.

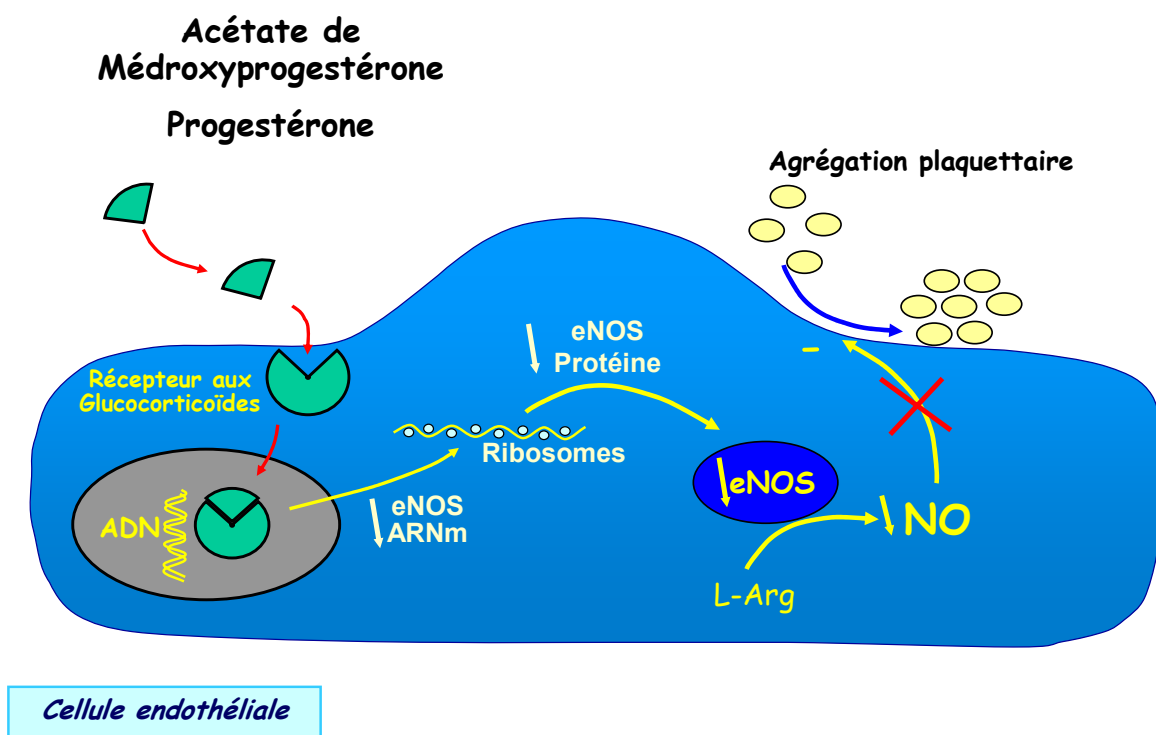


Figure 14 : Effets de progestatifs tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone sur la formation endothéliale de NO

Abbréviations : NO, monoxyde d'azote ; eNOS, NO synthase endothéliale ; ARNm, ARN messagers ; L-Arg, L-arginine.

PARTIE II

Article 2

Progestins prevent the potentiating effect of 17 β -estradiol on the NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells

Murielle Zerr-Fouineau, MS; Marie Jourdain, MS; Caroline Boesch; Valérie B. Schini-Kerth, PhD

Article en préparation.

Depuis la fin des années 1980, les traitements hormonaux proposés aux femmes contiennent le plus souvent une combinaison estro-progestative, l'ajout du progestatif ayant pour but d'inhiber l'effet hyperplasique des estrogènes au niveau de l'endomètre. D'autre part, de nombreuses études ont montré que les estrogènes sont capables d'agir directement au niveau des cellules endothéliales (Node et al. 1997a; Rosenfeld et al. 1996; Van Buren et al. 1992). En effet, ils sont capables d'activer rapidement la NO synthase endothéliale par activation de la voie PI3-kinase/Akt (Chambliss et al. 2000; Chen et al. 1999; Hisamoto et al. 2001), et à plus long terme d'augmenter l'expression de la NO synthase endothéliale (Weiner et al. 1994).

De plus, dans l'étude précédente (article 1), nous avons montré que certains progestatifs sont capables de diminuer l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation de NO via l'activation du récepteur des glucocorticoïdes, entraînant ainsi une réduction de l'effet anti-agrégant plaquettaire des cellules endothéliales. De ce fait, nous nous sommes intéressés dans ce travail de recherche aux effets de traitement combinant un estrogène, le 17 β -estradiol, à un progestatif. Les progestatifs utilisés sont les mêmes que dans l'étude précédente, c'est-à-dire deux progestatifs n'ayant pas d'activité glucocorticoïde partielle, le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol ainsi que deux progestatifs présentant une forte activité glucocorticoïde partielle, l'acétate de médroxyprogestérone, MPA et la progestérone. L'objectif principal de

cette étude a été de déterminer si les progestatifs empêche l'effet stimulateur des estrogènes sur l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation de NO ainsi que de caractériser les mécanismes impliqués.

Les expériences ont été faites avec des cultures de cellules endothéliales issues de veines de cordons ombilicaux (HUVEC) utilisées au premier passage et des approches expérimentales diversifiées :

- Etude de l'expression protéique de la NO synthase endothéliale par Western Blot,
- Etude de l'expression des ARN messagers de la NO synthase endothéliale et de GTP cyclohydrolase I par RT-PCR quantitative,
- Mesure de NO par résonance paramagnétique électronique,
- Tests d'agrégation plaquettaire,
- Détermination du rôle du récepteur aux glucocorticoïdes en utilisant un prétraitement avec un antagoniste du récepteur aux glucocorticoïdes et à la progestérone, la mifépristone.

Progestins prevent the potentiating effect of 17 β -estradiol on the NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells

Zerr-Fouineau et al. Estradiol, Progestins, eNOS and platelet aggregation

Murielle Zerr-Fouineau, MS; Marie Jourdain, MS; Caroline Boesch; Valérie B. Schini-Kerth, PhD

From Département de Pharmacologie et Physico-Chimie, UMR CNRS 7175-LC1, Université Louis Pasteur de Strasbourg, France.

Address for correspondence:

Valérie B. Schini-Kerth, PhD

UMR CNRS 7175-LC1, Université Louis Pasteur de Strasbourg

Faculté de Pharmacie

74, route du Rhin, B.P. 60024

F-67401 Illkirch, France

Tel. +33 3 90 24 41 27

Fax. +33 3 90 24 43 13

email: valerie.schini-kerth@pharma.u-strasbg.fr

Abstract

Objectives: Epidemiological studies have indicated that estro-progestin treatments are associated with an increased risk of venous and arterial thromboembolic events in postmenopausal women. This study examined whether progestins affect the beneficial effect of estrogens on the endothelial formation of NO, a potent anti-thrombotic factor.

Methods and Results: Experiments were performed with human umbilical vein endothelial cells. Endothelial NO synthase (eNOS) and GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) mRNA expression was assessed by real-time PCR, eNOS protein by Western blotting, NO formation by electron spin resonance spectroscopy, and platelet aggregation by an aggregometer.

Medroxyprogesterone acetate (MPA), progesterone, levonorgestrel and nomegestrol acetate markedly inhibited the 17 β -estradiol- (17 β -E) induced expression of eNOS mRNA and protein. This effect was associated with a reduced 17 β -E-induced formation of NO and potentiation of the inhibitory effect of endothelial cells on platelet aggregation in the case of MPA and progesterone whereas levonorgestrel and nomegestrol acetate did not have such effects. MPA and progesterone also prevented the 17 β -E-induced expression of GTPCH I mRNA. Mifepristone, a glucocorticoid and progesterone receptor antagonist, and L-sepiapterin prevented the inhibitory effect of MPA and progesterone on platelet aggregation.

Conclusions: Progestins, including MPA, overcome the ability of 17 β -E to enhance the NO-mediated inhibitory effect of endothelial cells on platelet aggregation, at least in part, by preventing the stimulatory effect of 17 β -E on eNOS and GTPCH I expression most likely via activation of the glucocorticoid receptor.

Key Words : Estradiol, Progestins, nitric oxide synthase, GTP cyclohydrolase I, thrombosis.

Condensed abstract

This study examined whether progestins affect the beneficial effect of 17 β -estradiol on endothelial NO formation. The present findings indicate that certain progestins overcome the 17 β -E-induced, NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells, in part by preventing the stimulatory effect of 17 β -E on eNOS and GTPCH I expression,

Introduction

Several epidemiological studies have indicated that hormone replacement therapy with estrogen-progestin preparations, is associated with an increased risk of cardiovascular diseases in postmenopausal women. Initially clinical studies have indicated that estrogen-progestin treatments increase the risk of venous thromboembolic events¹⁻³. However, more recent ones such as the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study⁴, the Women's Health Initiative⁵ and the Million Women Study⁶ revealed that estrogen-progestin treatments also increase the risk of arterial thromboembolic events such as stroke and myocardial infarction.

Estrogens have a beneficial influence on the cardiovascular system. These protective effects include an improvement of lipid profiles⁷ and an inhibition of the expression of pro-atherosclerotic molecules such as vascular cell adhesion molecule-1⁸, monocyte chemoattractant protein-1⁹, endothelin-1¹⁰, and NADPH oxidase¹¹. They also include acute relaxations of blood vessels through non-genomic mechanisms partly mediated by an acute activation of endothelial NO synthase and a rapid release of NO¹²⁻¹⁴. Furthermore, chronic treatment with 17 β -estradiol (17 β -E) increases endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in the rabbit femoral artery¹⁵ and in the coronary circulation of guinea pigs¹⁶. In addition, long-lasting treatments of endothelial cells with 17 β -estradiol increase NO formation following an upregulation of the expression of eNOS by increasing gene transcription and mRNA stability¹⁷⁻¹⁹.

In the Women's Health Initiative, an increased relative risk of cardiovascular diseases was observed with postmenopausal women receiving conjugated equine estrogen (CEE) and MPA, whereas no such effect was observed with women receiving only CEE, suggesting that the progestin might contribute to the adverse effects on the cardiovascular system.

Moreover, MPA has been shown to reduce the inhibitory effect of endothelial cells on platelet aggregation by down-regulating the expression of eNOS via activation of the glucocorticoid

receptor²⁰. In addition, levonorgestrel and norgestrel acetate which are devoid of partial glucocorticoid activity did not have such an effect²⁰.

Therefore, the aim of the present study was to examine whether progestins alter the beneficial effect of estrogens on the expression of eNOS and the formation of NO, a potent vasoprotective and anti-thrombotic factor, in human endothelial cells and, if so, to determine the underlying mechanisms.

Methods

Cell Culture

Endothelial cells (HUVECs) were isolated from human umbilical veins as described previously²¹. Cells were cultured in MCDB 131 without phenol red containing 2 mmol/L ultraglutamine, 10⁵ U/L penicillin, 100 mg/L streptomycin supplemented with 10% FCS. Confluent cells were used at first passage and were serum-deprived for 24 hours before experiments.

Hormonal treatments

At confluence, HUVECs were serum deprived for a 24-hour period before being exposed to either solvent (0.01% DMSO) or a progestin alone or in combination with 17 β -E. Two categories of progestins have been studied, those with partial glucocorticoid activity such as progesterone, medroxyprogesterone acetate (MPA), and those without partial glucocorticoid activity such as levonorgestrel (LNG) and norgestrel acetate (NOMAC). Most experiments were performed with progestins used at concentrations up to 0.1 μ mol/L, which can be reached in the plasma of postmenopausal women using hormonal replacement therapy^{22, 23}.

Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated from HUVECs using RNeasy Micro kit (QIAGEN, France). cDNA was synthesized from total RNA using iScript cDNA Synthesis kit (BIORAD, France), and

PCR amplification was performed using IQ SYBR Green Supermix (BIORAD, France). The specific primers were as follows : eNOS sense, 5'-GGC ATC ACC AGG AAG ACC-3'; eNOS antisense, 5'-TCA CTC GCT TCG CCA TCA C-3'; GTPCH I sense, 5'-GCC ATG CAG TTC TTC ACC AA-3'; GTPCH I antisense, 5'-AGG CTT CCG TGA TTG CTA CA-3'. The control housekeeping gene was human GAPDH. Relative quantitation was determined by standard $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ calculations.

Western Blot Analysis

Total proteins (15-20 μ g) were subjected to SDS-PAGE (8 %) and blotted on PVDF membranes. Immunodetection was carried out using an antibody directed against eNOS (BD Biosciences, France) or β -tubulin (Sigma, France) and enhanced chemiluminescence (Amersham, France).

Determination of NO Formation by Electron Spin Resonance Spectroscopy

Determination of NO formation was assessed by electron spin resonance spectroscopy (ESR) after formation of $[\text{Fe(II)NO(DETC)}_2]$, a paramagnetic diethyldithiocarbamate iron complex with NO, in endothelial cells. The ESR methodology was used as reported previously with minor modifications^{24,25}. HUVECs were washed twice with Hanks balanced salt solution (HBSS) buffered with 10 mmol/L HEPES, and then they were incubated in a HBSS-HEPES solution in the presence of bovin serum albumin (20.5 mg/mL), 1.5 mmol/L CaCl_2 , 0.3 mmol/L L-arginine for 15 minutes at 37°C. Spin trap chemicals FeSO_4 (0.8 mmol/L) and DETC (1.6 mmol/L) were rapidly mixed to obtain a colloid form $[\text{Fe(II)(DETC)}_2]$, which was added to HUVECs at a final concentration of 0.2 mmol/L. After 5 minutes, the endothelial formation of NO was induced by addition of thrombin (1 U/mL) for 30 minutes. Thereafter, dishes were placed on ice, and the incubation medium was removed before addition of 0.2 mL of the HBSS-HEPES buffer. Cells were then scraped and the cell suspension was

collected in a calibrated tube. Tubes were rapidly frozen at 77K for ESR measurements. ESR measurements were performed on an MS100 spectrometer (Magnettech Ltd., Berlin, Germany) under the following conditions: temperature 77K, microwave frequency 9.34 GHz, microwave power 20 mW, modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 1 mT. The third component of the ESR signal was used for relative comparison of the concentration of NO trapped in each sample.

Platelet Aggregation Studies

Washed platelet suspensions were prepared as previously described²⁶. Suspensions of platelets (450 μ L, 3.10^8 platelets/mL) were incubated for 2 minutes in a Chronolog 490 aggregometer (Havertown, PA) with continuous stirring at 1000 rpm before addition of a submaximal concentration of thrombin (0.07 U/mL). HUVECs were cultured on cytodex-3 beads and exposed to either solvent or a compound for 24 hours. In some experiments, HUVECs were treated with mifepristone (10 μ mol/L) for 30 minutes before addition of a progestin for 24 hours or with L-sepiapterin (30 μ mol/L) for the last 6 hours of the 24-hour treatment period. HUVECs were added to platelet suspensions 1 minute before addition of thrombin.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis of the data was performed using Student's *t*-test or a multi-way analysis of variance followed by Fisher's protected least significant different test where appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Progestins impair the 17 β -estradiol-induced eNOS expression

Exposure of HUVECs to 17 β -E (10 nmol/L) markedly increased the eNOS mRNA level and this effect reached 182 % after a 6-hour treatment period (Figure 1). In contrast, the solvent (0.01 % DMSO) was without effect (eNOS mRNA level was 110 \pm 13.7%, n = 3). Whereas levonorgestrel, progesterone, norgestrel acetate and MPA (all tested at 0.1 μ mol/L) didn't affect eNOS mRNA level when administered alone, they all prevented the 17 β -E-induced increase in the eNOS mRNA level. Similarly, levonorgestrel progesterone, norgestrel acetate and MPA also impaired the 17 β -E-induced stimulation of eNOS protein expression after a 24-hour treatment period (Figure 2). In addition, the inhibitory effect of progestins was concentration-dependent with a significant effect observed at concentrations as low as 0.1 nmol/L and 1 nmol/L for progesterone and MPA, respectively (Figure 3B and D), and 1 nmol/L and 10 nmol/L for levonorgestrel and norgestrel acetate, respectively (Figure 3A and C).

Effect of progestins on 17 β -estradiol-induced NO formation

Treatment of HUVECs with 17 β -E (10 nmol/L) for 24 hours caused about a 154% increase in the formation of NO as assessed by ESR (Figure 4). A 24 hour co-treatment of HUVECs with progesterone or MPA significantly decreased the stimulatory effect of 17 β -E by 61 and 76%, respectively. In contrast, norgestrel acetate caused only a slight but not significant reduction (29%) of the 17 β -E-induced NO formation and levonorgestrel did not have such an effect. Additionally, progestins alone did not affect the basal formation of NO in HUVECs (Figure 4).

Progestins impair the 17 β -estradiol-induced potentiation of the inhibition of platelet aggregation by endothelial cells

Thrombin (0.07 U/mL) caused submaximal and irreversible aggregation of washed human platelet suspensions within 4 to 5 minutes. The stimulatory effect of thrombin was markedly reduced by 30% by addition of HUVECs (about 500 cells) to platelet suspensions one minute before their activation with thrombin (Figure 5) whereas only a small inhibitory effect was observed with conditioned culture medium without HUVECs (data not shown). In contrast, addition of HUVECs, which have been treated with N^o-nitro-L-arginine (300 μ mol/L) for 30 minutes, to platelet suspensions did not affect thrombin-induced platelet aggregation (data not shown). Treatment of HUVECs with 17 β -E (10 nmol/L) for 24 hours potentiated the inhibitory effect of endothelial cells (Figure 5A). This positive effect of 17 β -E was inhibited by progesterone and MPA, whereas levonorgestrel and norgestrol acetate did not have such an effect (Figure 5B). The inhibitory effect of progesterone and MPA was prevented by treatment of HUVECs with L-sepiapterin and by mifepristone, an antagonist of the progesterone and glucocorticoid receptor (Figure 5C, D, E and F). Addition of conditioned medium alone from either 17 β -E -, MPA-, progesterone-, L-sepiapterin- or mifepristone-treated HUVECs did not affect platelet aggregation (data not shown).

Role of GTP cyclohydrolase

Exposure of HUVECs to 17 β -E (10 nmol/L) markedly increased the GTPCH I mRNA level and this effect reached 184% after a 6-hour treatment period (Figure 6). In addition, a small but significant increase was also observed when HUVECs were treated for 6 hours with levonorgestrel (135%) or norgestrol acetate (142%) alone, whereas progesterone and MPA did not have such an effect. Moreover, progesterone and MPA blunted significantly the 17 β -E

-induced increase of GTPCH I mRNA expression whereas levonorgestrel and nomegestrol acetate did not have such an effect.

Discussion

The present findings indicate that, although all progestins tested substantially decreased the 17β -E-enhanced expression of eNOS mRNA and protein, this effect is associated with a decreased 17β -E-induced formation of NO in endothelial cells only for progestins which also decreased 17β -E-induced GTPCH I expression. As an important consequence these progestins abolish the potentiating effect of 17β -E on the NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells. In addition, the inhibitory effect of progestins is most likely mediated by activation of the glucocorticoid receptor.

Interestingly, 17β -E induced an important increase of eNOS expression and this effect is inhibited by all members of the progestin family that have been tested. The stimulatory effect of 17β -E on eNOS mRNA level reached about 180 % after 6 hours. This effect of 17β -E is associated with an increased eNOS protein level by about 150 % at 24 hours, and results in a significant increase of the endothelial formation of NO. The stimulatory effect of 17β -E on eNOS mRNA and protein expression is inhibited by the co-administration of levonorgestrel, progesterone, nomegestrol acetate or MPA, whereas the administration of a progestin alone in these conditions did not affect eNOS expression. Moreover, the progestin-induced inhibition of the 17β -E-induced eNOS expression is observed at concentrations as low as 0.1 nmol/L progesterone, 1 nmol/l MPA or levonorgestrel and 10 nmol/L nomegestrol acetate. During hormonal replacement therapy or hormonal contraception, peak serum concentrations of MPA are about 5 nmol/L after intake of 2 mg 17β -estradiol and 5 mg MPA²², mean serum concentrations of progesterone are about 10 nmol/L after use of a vaginal ring delivering estradiol 160 μ g/day and progesterone 20 mg/day²³ and mean peak plasma

concentration of levonorgestrel are about 40 nmol/L after intake of a 0.75 mg levonorgestrel tablet²⁷. Thus, the inhibitory effect of progestins on 17 β -E-enhanced eNOS expression is observed at concentrations that are likely to be of clinical significance.

Despite the fact that all progestins are able to inhibit the potentiating effect of 17 β -E on eNOS mRNA and protein expression, only progesterone and MPA impaired the 17 β -E-induced formation of NO. In contrast, levonorgestrel and norgestrol acetate did not affect the 17 β -E-induced endothelial formation of NO. These findings suggest that levonorgestrel and norgestrol acetate are able to enhance the activity of eNOS and/or to decrease the degradation of NO thereby preserving the formation of NO despite a reduced expression of eNOS. NOS activity is dependent on several cofactors, such as Heat Shock Protein (Hsp) 90, calmodulin and tetrahydrobiopterin (BH₄)²⁸⁻³⁰. Intracellular BH₄ levels are regulated by the activity of the *de novo* biosynthetic pathway: GTPCH I catalyses GTP to dihydroneopterin triphosphate which is transformed by 6-pyruvyltetrahydropterin synthase (PTPS) and sepiapterin reductase into BH₄³¹. In most cells including endothelial cells, the first and the rate-limiting enzyme in the *de novo* pathway is GTPCH I³². The present findings indicate that 17 β -E increased GTPCH I mRNA level in HUVECs by about 180 % after 6 hours treatment. These data are in agreement with previous studies indicating that long-term administration of estradiol benzoate (25 μ g/kg) by injections to ovariectomized female rats increased GTPCH I mRNA levels in several catecholaminergic brain locations³³ and that 17 β -E upregulates GTPCH I gene expression by increasing GTPCH promoter activity in PC12 cells³⁴. In addition, the administration of estrogen to ovariectomized rats increases the availability of vascular BH₄³⁵. The present findings indicate that progesterone and MPA prevented the 17 β -E-induced increase of GTPCH I mRNA level, whereas levonorgestrel and norgestrol acetate did not have such an effect. In addition, although progesterone and MPA alone did not affect the GTPCH I mRNA level, levonorgestrel and norgestrol acetate

increased to a small but significant extent the mRNA expression of GTPCH I. The decreased 17β -E-induced formation of NO by MPA and progesterone might also be due to an increased formation of reactive oxygen species which subsequently scavenge NO since glucocorticoid receptor activation has been shown to be associated with an excessive formation of reactive oxygen species³⁶.

Progestins are a heterogeneous family of steroids that, in addition to their interaction with the cytosolic progesterone receptor, might also bind strongly to other steroid receptors, such as those for androgens, mineralocorticoids, and glucocorticoids to induce biological responses^{37,38}. The inhibition of the potentiating effect of 17β -E on NO release and GTPCH I expression occurred selectively with progesterone and MPA whereas levonorgestrel and norgestrel acetate, despite their similar progestin potency, had no effect. Such a differential effect is not consistent with a major role for the progesterone receptor in this inhibitory effect. Interestingly, all inhibitory progestins have distinct intrinsic glucocorticoid activity as opposed to the active ones^{37,38}. In addition, several studies have shown that glucocorticoids such as dexamethasone decreased GTPCH I expression, thus leading to an inhibition of BH_4 -dependent endothelium-mediated vasorelaxation³⁹, an effect that is possibly mediated by the activation of the glucocorticoid receptor⁴⁰. Moreover, chronic intake of dexamethasone caused down-regulation of NO formation in the aorta and several other tissues of glucocorticoid-treated rats, and was associated with a pronounced attenuation of acetylcholine-induced vasodilatation in resistance arteries⁴¹. Therefore, the glucocorticoid receptor rather than the progesterone receptor might be involved in the progestin-induced inhibition of the potentiating effects of 17β -E on NO release and GTPCH I expression. Endothelial cells play a major role in the control of homeostasis and prevent pro-thrombotic responses mostly by the release of NO. NO is a potent anti-thrombotic factor due to its ability to inhibit platelet recruitment, adhesion and aggregation, and to prevent the endothelial

expression of tissue factor, the initiator of the coagulation cascade⁴²⁻⁴⁸. The present findings indicate that 17 β -E is able to increase the ability of endothelial cells to inhibit platelet aggregation, an effect that might be mediated in major part by the increased formation of NO. This potentiating effect of 17 β -E is no longer observed when endothelial cells have been treated for 24 hours with a combination of 17 β -E and progesterone or MPA. In contrast, such an effect is not observed with either levonorgestrel or norgestrel acetate. Moreover, the addition of L-sepiapterin, in order to restore the level of BH₄ was able to prevent the inhibitory effect of progesterone and MPA on 17 β -E-induced inhibition of platelet aggregation by endothelial cells. Altogether, the present findings indicate that progestins are able to impair the protective effect of 17 β -E on endothelial cells on platelet aggregation. They also suggest that the ability of progestins to inhibit the beneficial effect of 17 β -E is most likely due to the activation of the glucocorticoid receptor as indicated by the inhibitory effect of mifepristone, an antagonist of the progesterone and the glucocorticoid receptor. In addition, progestins with partial glucocorticoid activity have been shown to markedly potentiate the tissue factor-dependent vascular procoagulant effects of thrombin by increasing the availability of thrombin receptors at the smooth muscle⁴⁹. The increased prothrombotic response to thrombin⁴⁹ and the decreased formation of NO²⁰ might contribute to explain the 2-fold increased relative risk of venous thromboembolism and fatal pulmonary embolism in women taking combined low-dose oral contraceptives containing a progestin with partial glucocorticoid activity, such as gestodene and desogestrel, compared to those taking levonorgestrel and estrogen at a similar dose⁵⁰⁻⁵².

The present findings indicate that certain progestins, including MPA, blunt the ability of 17 β -E to enhance the NO-mediated inhibitory effect of endothelial cells on platelet aggregation. The inhibitory effect of progestins is due, at least in part, to the prevention of the

stimulatory effect of 17 β -E on eNOS and GTPCH I expression most likely via activation of the glucocorticoid receptor.

Acknowledgments

The authors thank Drs. C. Gachet, B. Hechler and D. Cassel (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France) for kindly providing washed human platelets.

References

1. Daly E, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S. Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet*. 1996;348:977-980.
2. Jick H, Derby LE, Myers MW, Vasilakis C, Newton KM. Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet*. 1996;348:981-983.
3. Perez Gutthann S, Garcia Rodriguez LA, Castellsague J, Duque Oliart A. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism: population based case-control study. *BMJ*. 1997;314:796-800.
4. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *Jama*. 2002;288:49-57.
5. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal

- results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288:321-333.
6. Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003;362:419-427.
 7. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *Jama*. 1995;273:199-208.
 8. Simoncini T, Maffei S, Basta G, Barsacchi G, Genazzani AR, Liao JK, De Caterina R. Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res*. 2000;87:19-25.
 9. Pervin S, Singh R, Rosenfeld ME, Navab M, Chaudhuri G, Nathan L. Estradiol suppresses MCP-1 expression In vivo : implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1575-1582.
 10. Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Orimo A, Kozaki K, Eto M, Ishikawa M, Kim S, Toba K, Orimo H. Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis*. 1996;125:27-38.
 11. Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M. 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J*. 2001;15:2121-2130.
 12. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, Clerisme E, Bender JR. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:5930-5935.
 13. Salhab WA, Shaul PW, Cox BE, Rosenfeld CR. Regulation of types I and III NOS in ovine uterine arteries by daily and acute estrogen exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H2134-2142.

14. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Cadet P, Fimiani C, Welters I, Fricchione GL, Breton C, Lassalle P, Salzet M, Bilfinger TV. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation*. 2000;101:1594-1597.
15. Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244:19-22.
16. Thompson LP, Pinkas G, Weiner CP. Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation. *Circulation*. 2000;102:445-451.
17. Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett*. 1995;360:291-293.
18. MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res*. 1997;81:355-362.
19. Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:5212-5216.
20. Zerr-Fouineau M, Chataigneau M, Blot C, Schini-Kerth VB. Progestins overcome inhibition of platelet aggregation by endothelial cells by down-regulating endothelial NO synthase via glucocorticoid receptors. *FASEB J*. 2006, In press.
21. Klein-Soyer C, Beretz A, Millon-Collard R, Abecassis J, Cazenave JP. A simple in vitro model of mechanical injury of confluent cultured endothelial cells to study quantitatively the repair process. *Thromb Haemost*. 1986;56:232-235.

22. Svensson LO, Johnson SH, Olsson SE. Plasma concentrations of medroxyprogesterone acetate, estradiol and estrone following oral administration of Klimaxil, Trisequence/Provera and Divina. A randomized, single-blind, triple cross-over bioavailability study in menopausal women. *Maturitas*. 1994;18:229-238.
23. Hamada AL, Maruo T, Samoto T, Yoshida S, Nash H, Spitz IM, Johansson E. Estradiol/progesterone-releasing vaginal rings for hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*. 2003;17:247-254.
24. Vanin AF. Iron diethyldithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection. *Methods Enzymol*. 1999;301:269-279.
25. Kleschyov AL, Munzel T. Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol*. 2002;359:42-51.
26. Cazenave JP, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Methods Mol Biol*. 2004;272:13-28.
27. Kook K, Gabelnick H, Duncan G. Pharmacokinetics of levonorgestrel 0.75 mg tablets. *Contraception*. 2002;66:73-76.
28. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615.
29. Cosentino F, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res*. 1999;43:274-278.
30. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:217-230.
31. Thony B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*. 2000;347 Pt 1:1-16.

32. Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G. Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys*. 2004;41:415-434.
33. Serova LI, Maharjan S, Huang A, Sun D, Kaley G, Sabban EL. Response of tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase I gene expression to estrogen in brain catecholaminergic regions varies with mode of administration. *Brain Res*. 2004;1015:1-8.
34. Serova LI, Filipenko M, Schilt N, Veerasirikul M, Sabban EL. Estrogen-triggered activation of GTP cyclohydrolase 1 gene expression: role of estrogen receptor subtypes and interaction with cyclic AMP. *Neuroscience*. 2006;140:1253-1263.
35. Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH. Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause*. 2006;13:294-302.
36. Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T. Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2003;92:81-87.
37. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*. 2003;46 Suppl 1:S7-S16.
38. Wiegratz I, Kuhl H. Progestogen therapies: differences in clinical effects? *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15:277-285.
39. Johns DG, Dorrance AM, Tramontini NL, Webb RC. Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226:27-31.

40. Mitchell BM, Dorrance AM, Mack EA, Webb RC. Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:8-13.
41. Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:13357-13362.
42. Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 1987;90:687-692.
43. Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol.* 1986;88:411-415.
44. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148:1482-1489.
45. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992;85:2284-2290.
46. Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest.* 1997;100:350-356.
47. Sneddon JM, Vane JR. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:2800-2804.
48. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation.* 2000;101:2144-2148.

49. Herkert O, Kuhl H, Sandow J, Busse R, Schini-Kerth VB. Sex steroids used in hormonal treatment increase vascular procoagulant activity by inducing thrombin receptor (PAR-1) expression: role of the glucocorticoid receptor. *Circulation*. 2001;104:2826-2831.
50. Jick H, Kaye JA, Vasilakis-Scaramozza C, Jick SS. Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with users of oral contraceptives with levonorgestrel before and after 1995: cohort and case-control analysis. *BMJ*. 2000;321:1190-1195.
51. Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP. Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet*. 1995;346:1593-1596.
52. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet*. 1995;346:1582-1588.

Figure Legends

Figure 1

Effect of progestins alone or in combination with 17β -estradiol (17β -E) on eNOS mRNA level in HUVECs. Cells were exposed to either solvent (0.01% DMSO); A, levonorgestrel (LNG) and progesterone (PROG) alone or in combination with 17β -E; B, norgestrel acetate (NOMAC) and medroxyprogesterone acetate (MPA) alone or in combination with 17β -E for 6 hours before eNOS mRNA level was determined. Data are shown as mean \pm SEM of 5(A) and 7 (B) different experiments. *, # $P \leq 0.05$ vs control and 17β -E, respectively.

Figure 2

Effect of progestins alone or in combination with 17β -estradiol (17β -E) on eNOS protein level in HUVECs. HUVECs were exposed to either solvent (0.01% DMSO); A, levonorgestrel (LNG) and progesterone (PROG) alone or in combination with 17β -E; B, norgestrel acetate (NOMAC) and medroxyprogesterone acetate (MPA) alone or in combination with 17β -E for 24 hours before determination of the level of eNOS protein. A and B, top: representative Western blot of eNOS protein level and corresponding β -tubulin protein level, bottom: corresponding cumulative data. Data are shown as mean \pm SEM of 7-8 different experiments. *, # $P \leq 0.05$ vs control and 17β -E, respectively.

Figure 3

Effect of different concentrations of progestins in combination with 17β -E on eNOS protein level in HUVECs. Cells were exposed to either solvent (0.01 % DMSO), 17β -E alone or in combination with a progestin for 24 hours before determination of the level of eNOS protein. Top: representative Western blot of eNOS protein level and corresponding β -tubulin protein level, bottom: corresponding cumulative data. Data are shown as mean \pm SEM of 5-7 different experiments. *, # $P \leq 0.05$ vs control and 17β -E, respectively.

Figure 4

Effect of progestins on 17β -E-induced formation of NO in HUVECs. HUVECs were exposed to either solvent (0.01 % DMSO) or a progestin alone or in combination with 17β -E for 24 hours. NO formation in HUVECs was assessed by ESR spectroscopy. Results are shown as mean \pm SEM of 6 to 8 different experiments. *, # $P \leq 0.05$ vs control and 17β -E, respectively.

Figure 5

Effect of progestins on the 17β -E-induced potentiation of the NO-mediated inhibitory effect of HUVECs on platelet aggregation. HUVECs were exposed to either solvent, 17β -E (10 nmol/L) alone or in combination with a progestin (0.1 μ mol/L) for 24 hours before they were added to washed platelets. In some experiments, HUVECs were treated with L-sepiapterin (30 μ mol/L) for the last 6 hours prior to addition to the platelets or treated with mifepristone (10 μ mol/L) for 30 minutes before addition of hormones. After 1 minute, platelet aggregation was initiated by thrombin (0.07 U/mL). Similar findings were made in 3-5 additional experiments.

Figure 6

Effect of progestins alone or in combination with 17β -estradiol (17β -E) on GTPCH I mRNA level in HUVECs. Cells were exposed to either solvent (0.01% DMSO); A, levonorgestrel (LNG) and progesterone (PROG) alone or in combination with 17β -E; B, nomegestrol acetate (NOMAC) and medroxyprogesterone acetate (MPA) alone or in combination with 17β -E for 6 hours before GTPCH I mRNA level was determined. Data are shown as mean \pm SEM of 8(A) and 9 (B) different experiments. *, # $P \leq 0.05$ vs control and 17β -E, respectively.

Figure 1

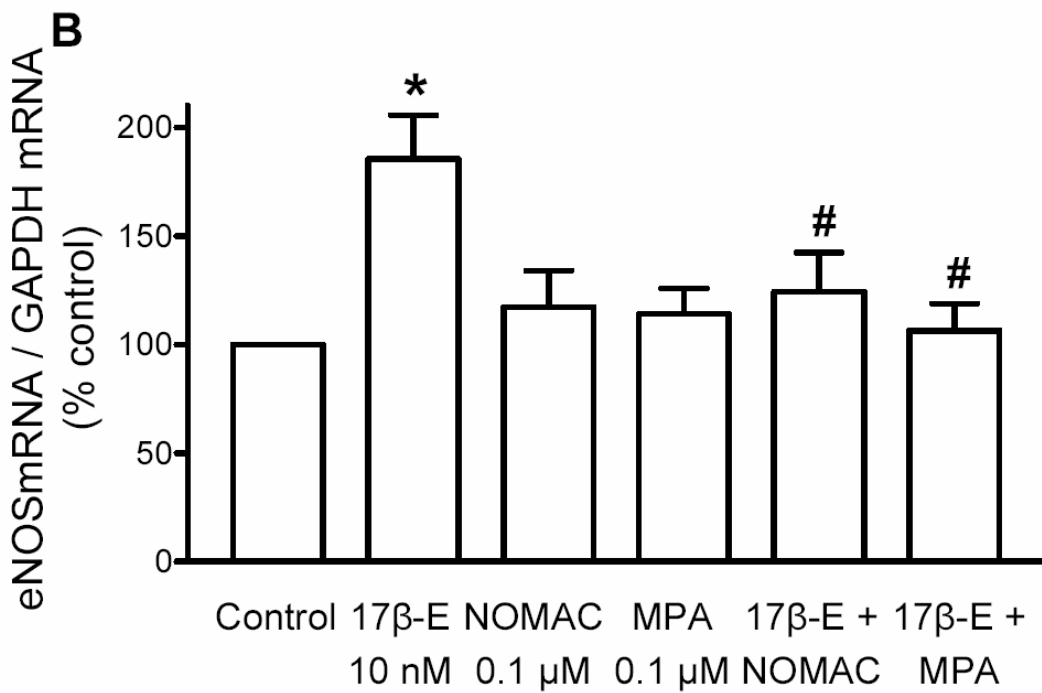
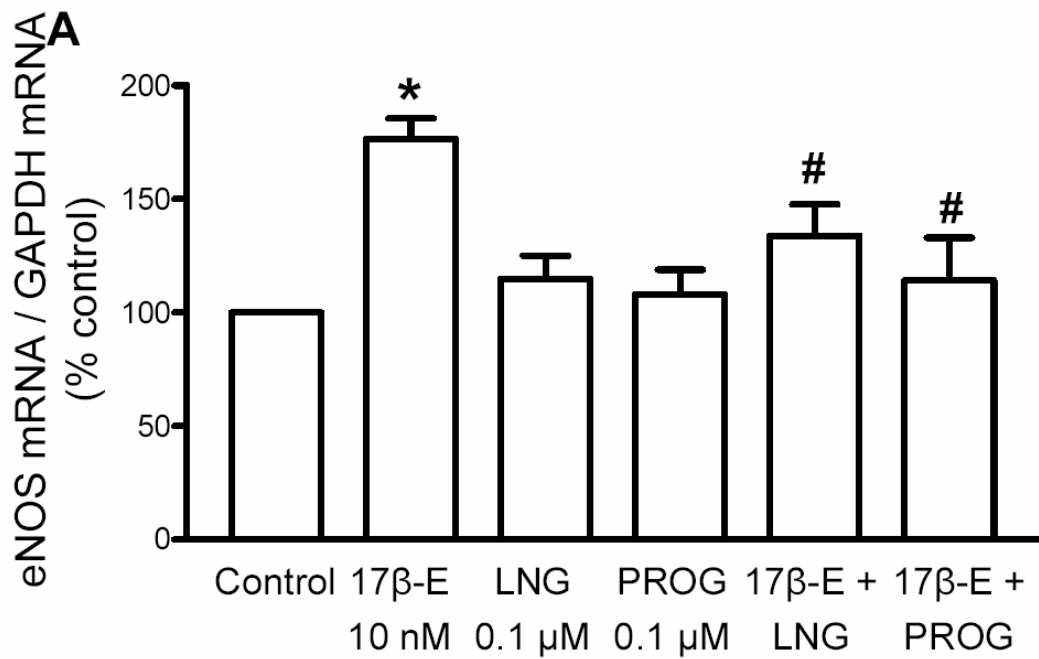


Figure 2

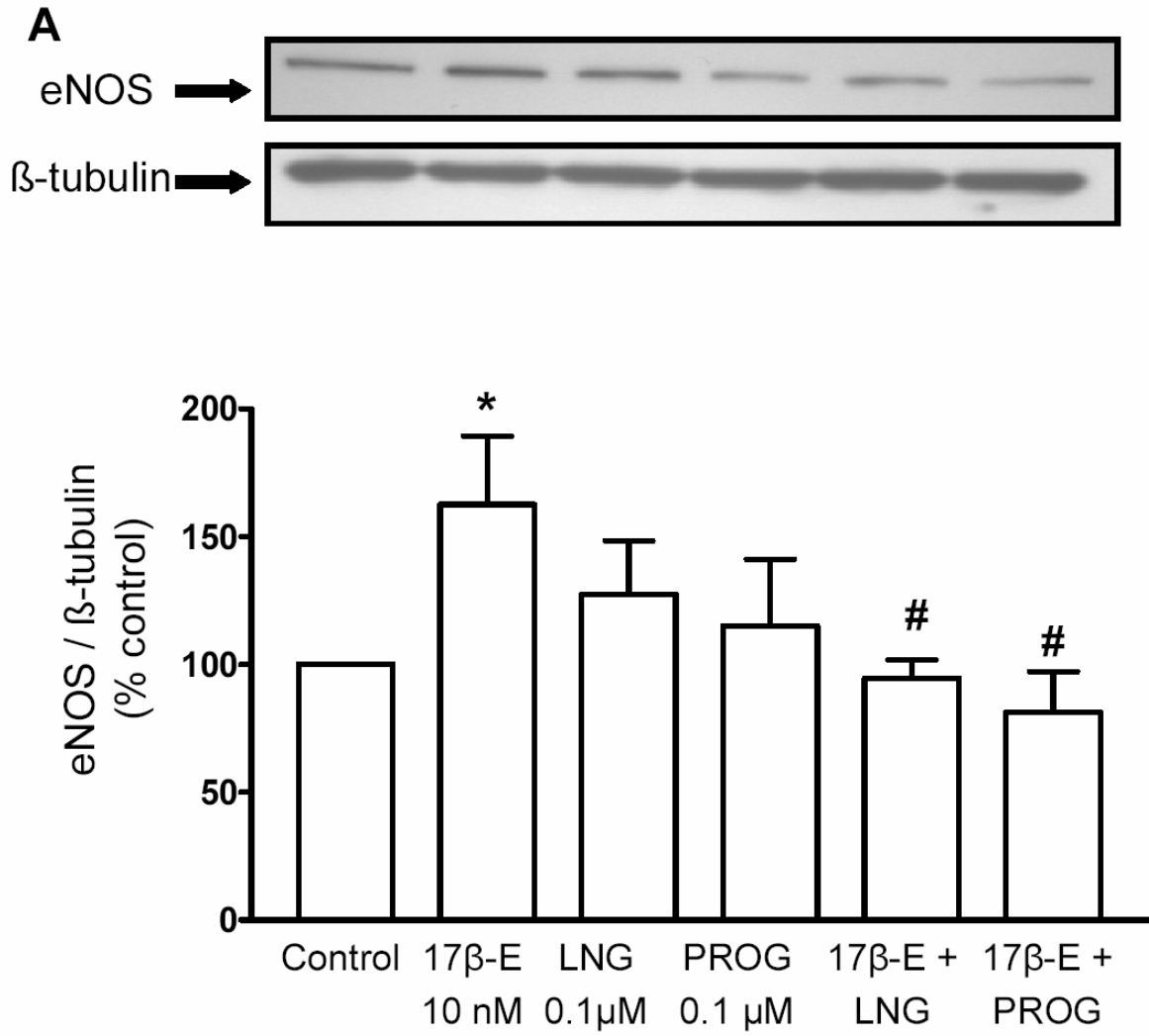


Figure 2

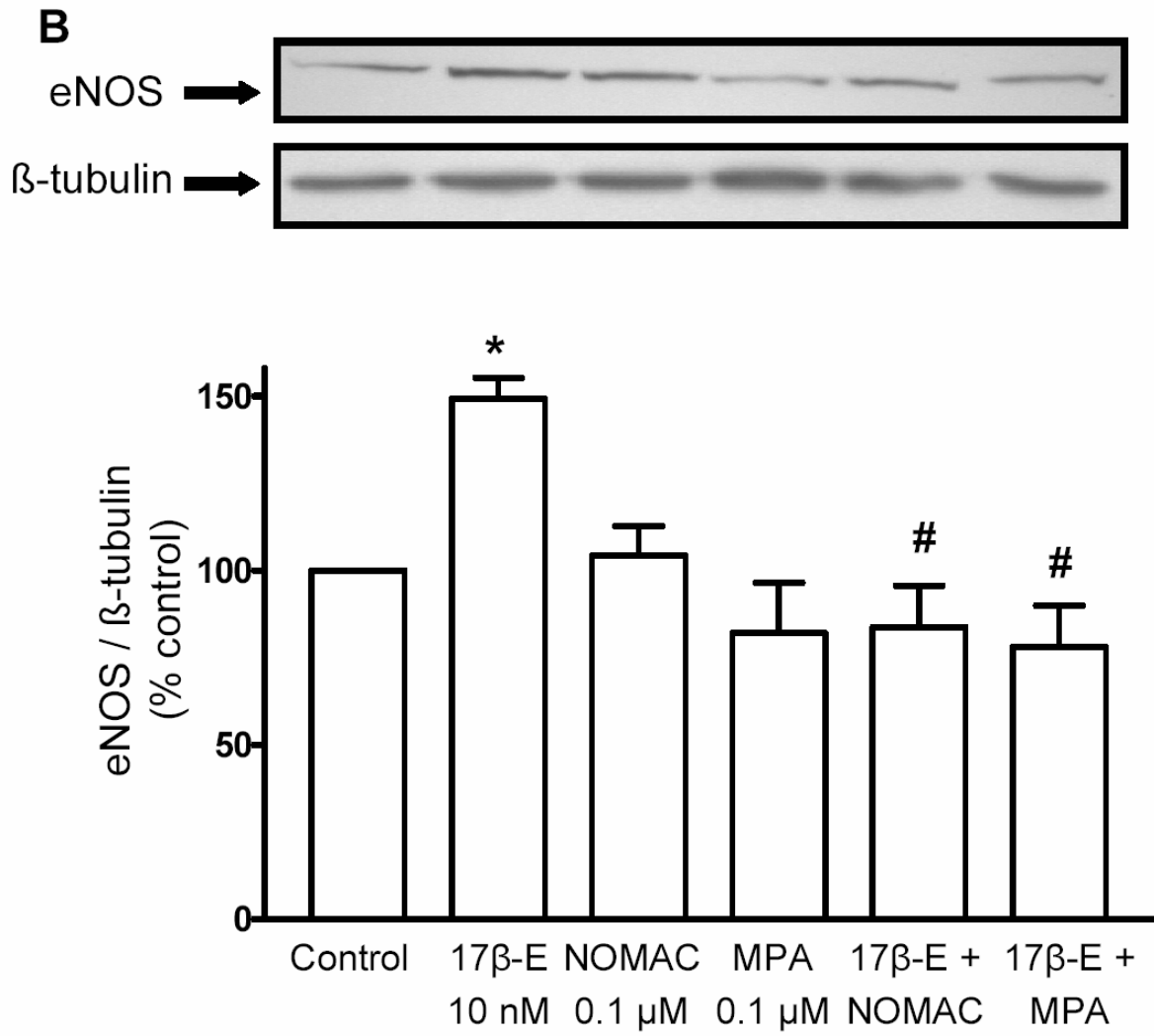


Figure 3

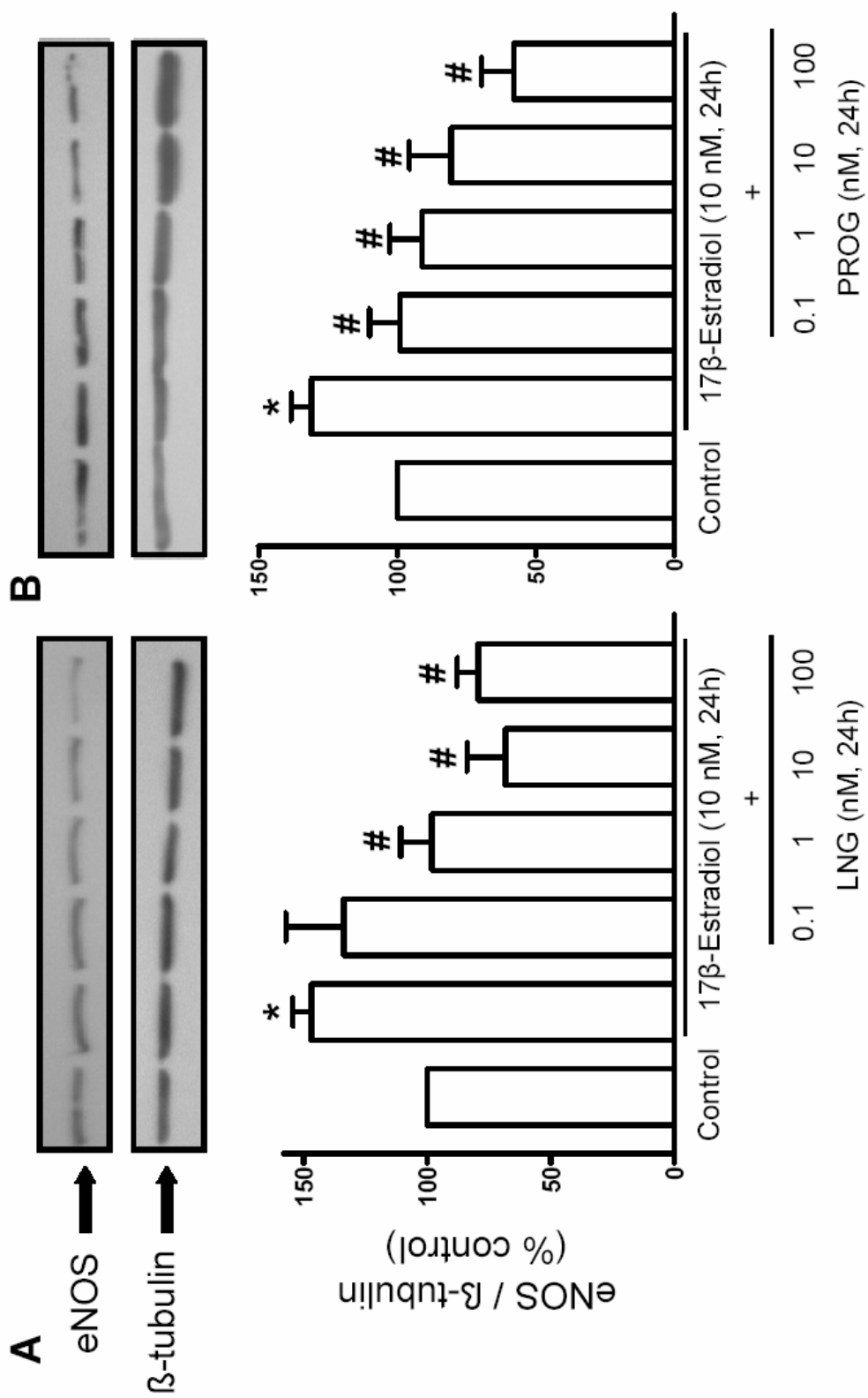


Figure 3

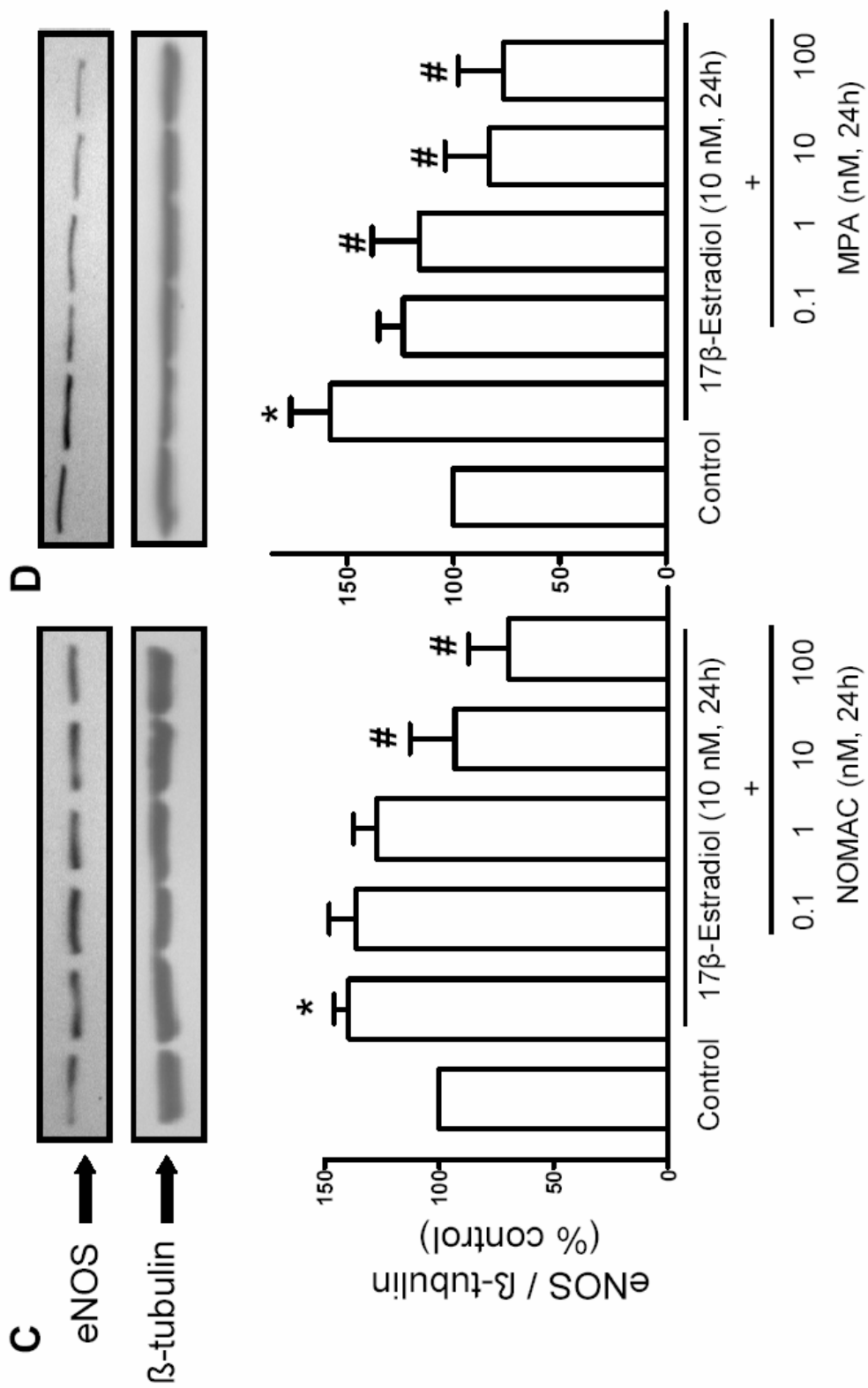


Figure 4

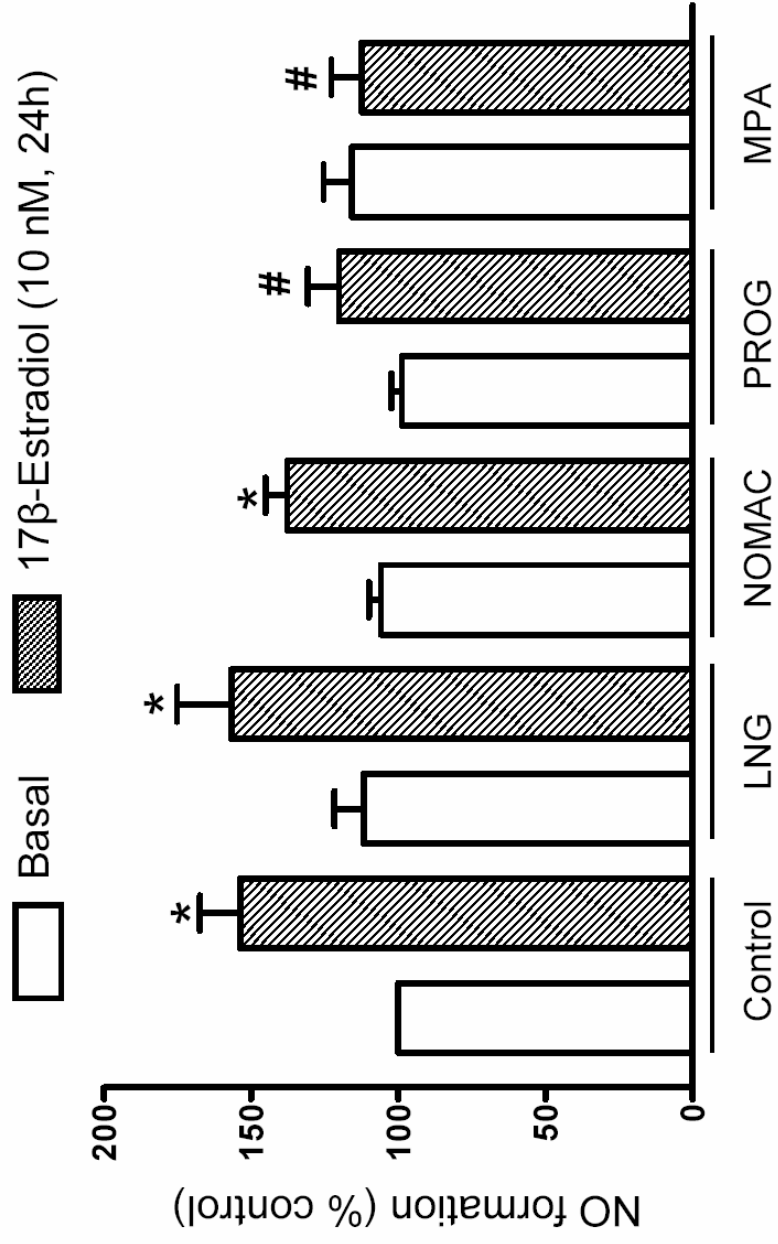
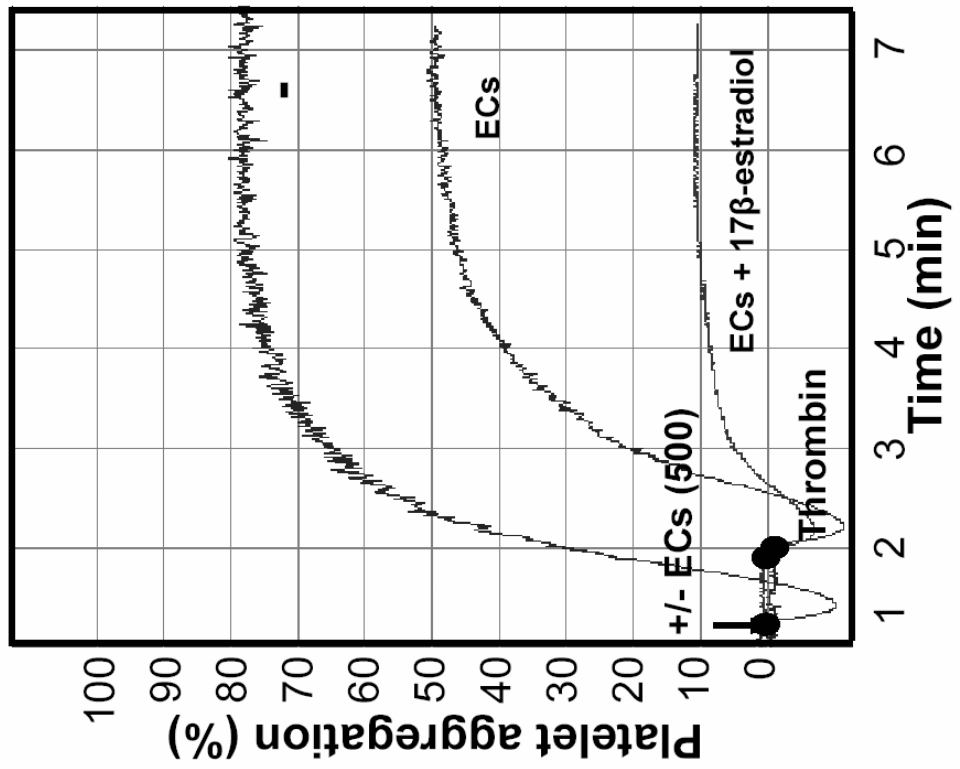


Figure 5

A



B

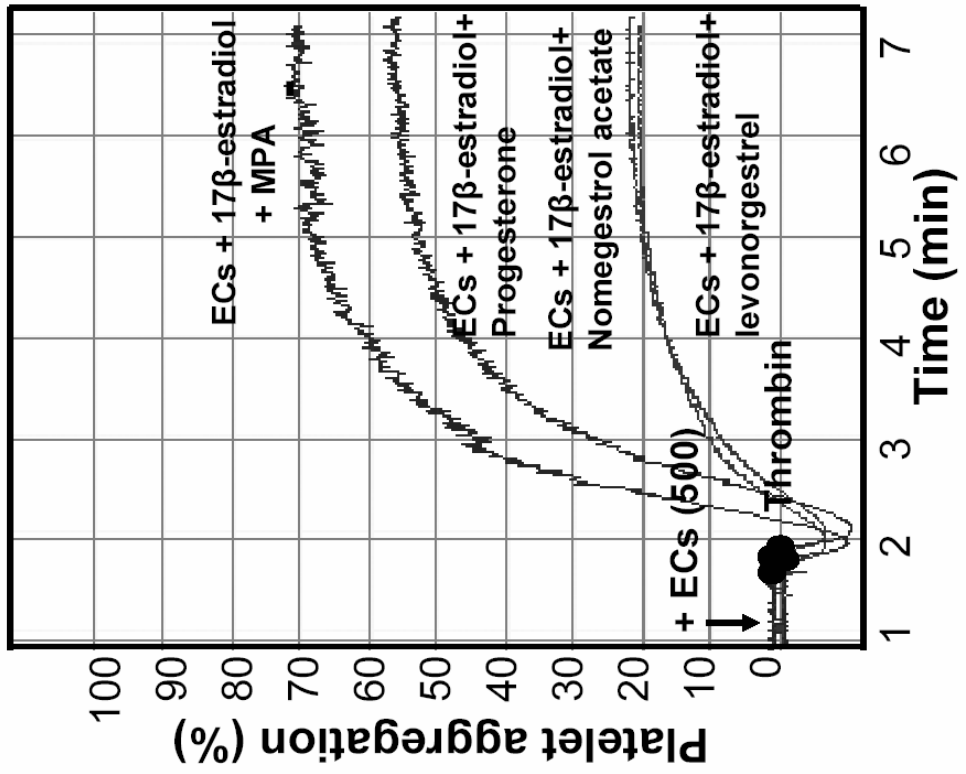


Figure 5

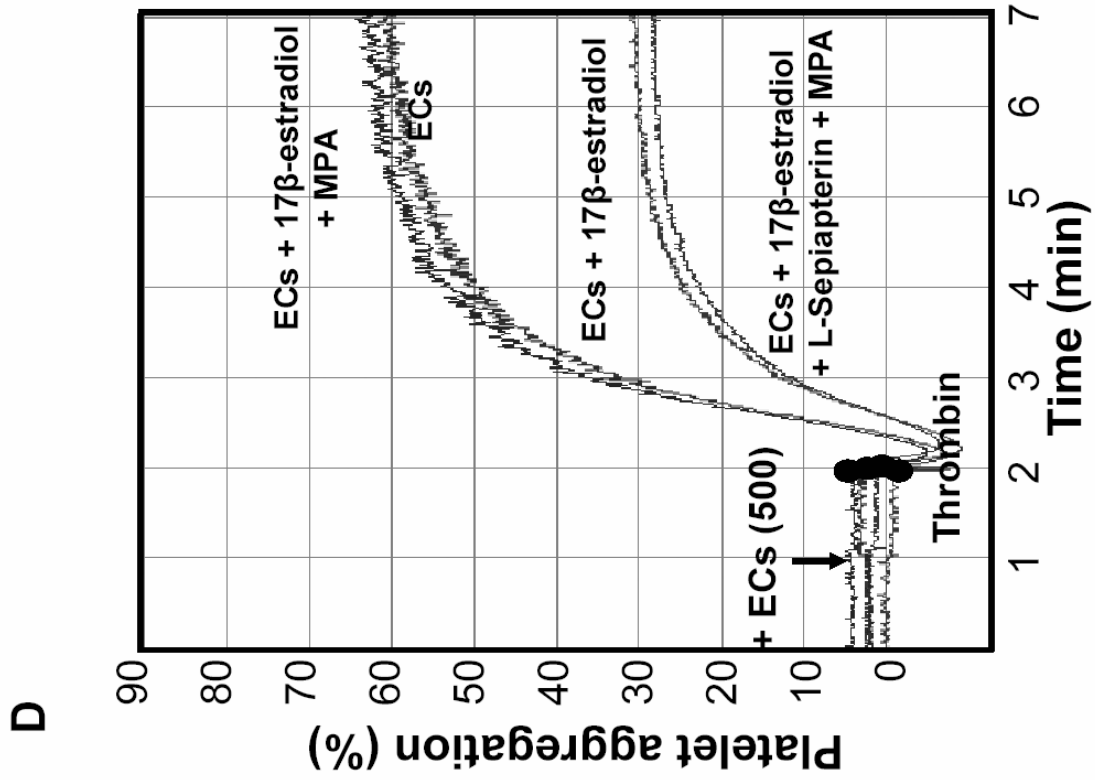
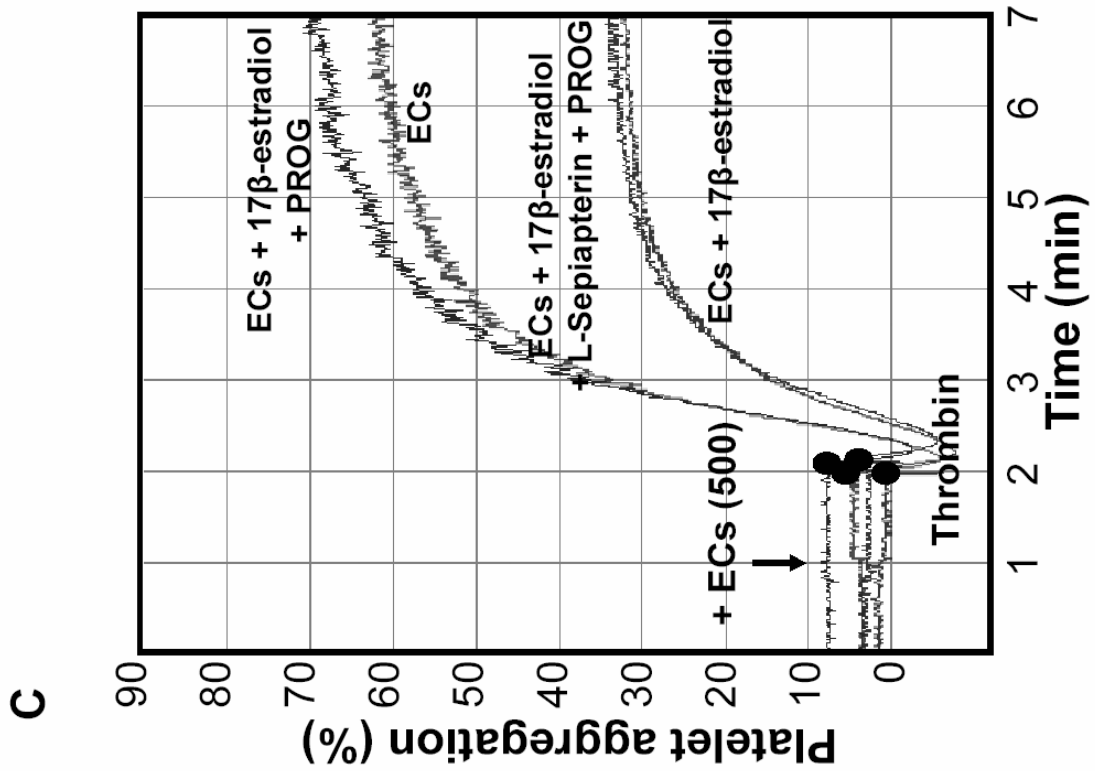


Figure 5

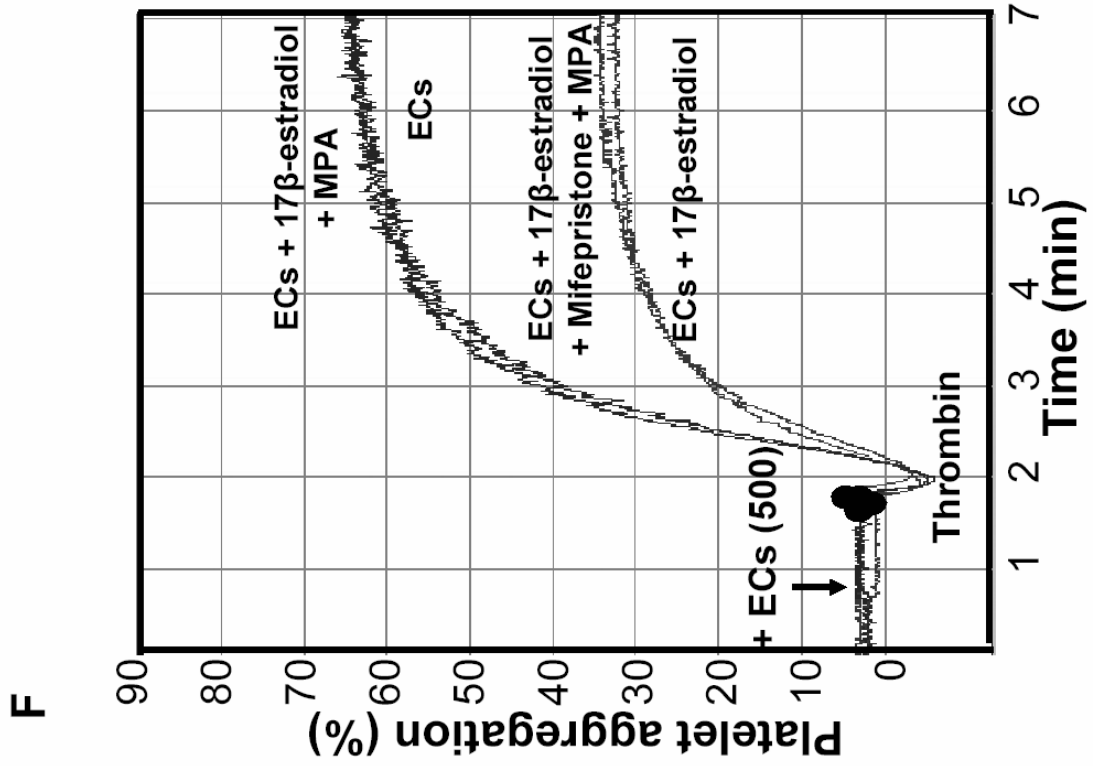
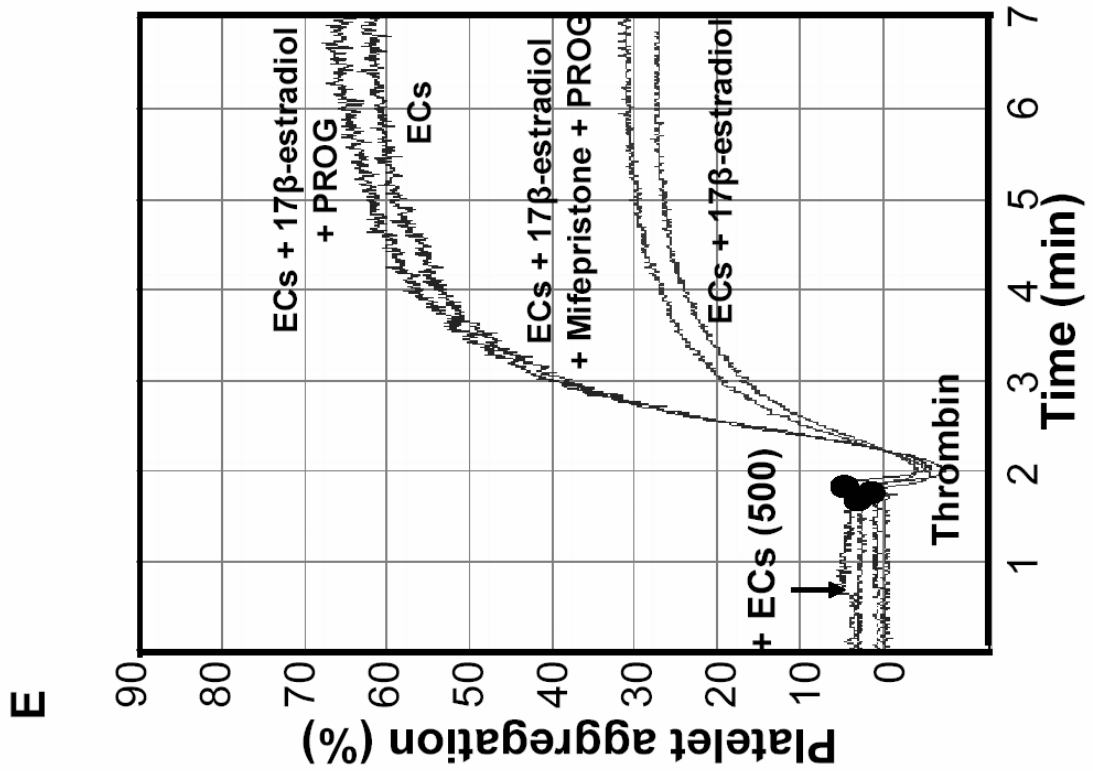
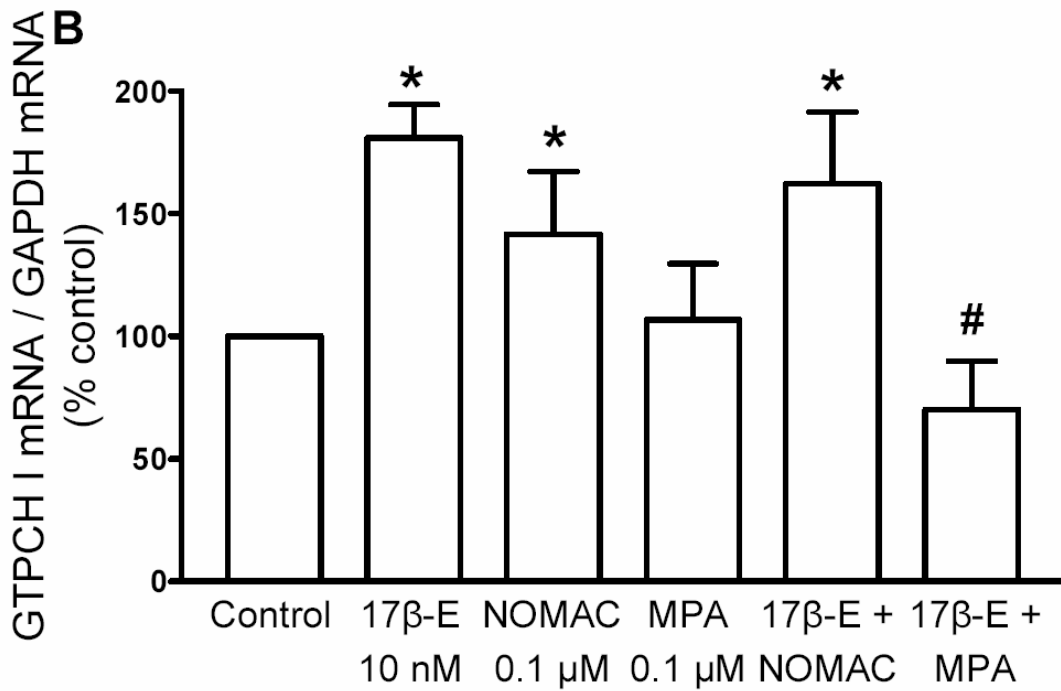
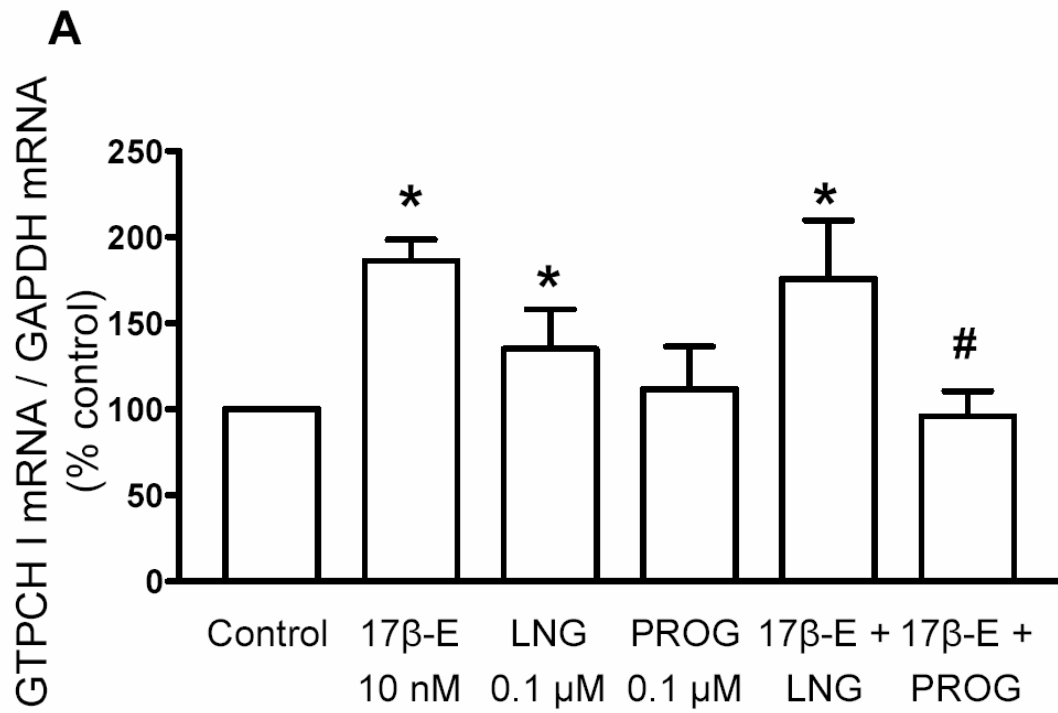


Figure 6



Nos résultats confirment que le 17 β -estradiol est capable d'augmenter l'expression de la NO synthase endothéliale au niveau des ARN messagers atteignant environ 180 % après 6 heures de traitement et au niveau protéique atteignant environ 150 % après 24 heures de traitement (Weiner et al. 1994). De plus, l'effet stimulateur est associé à une augmentation de la formation de NO entraînant une meilleure inhibition de l'agrégation plaquettaire par les cellules endothéliales.

Les progestatifs qui possèdent une forte activité glucocorticoïde partielle, tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone ou ceux qui en sont dépourvus, tels que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol qui en sont dépourvus, inhibent l'augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale induite par le 17 β -estradiol aussi bien au niveau des ARN messagers qu'au niveau de la protéine. Dans ces conditions de traitement (milieu sans rouge de phénol et incubation en milieu dépourvu en sérum pendant 24 heures avant l'ajout des hormones), les progestatifs seuls n'ont pas d'effet sur l'expression de la NO synthase endothéliale, contrairement aux résultats observés dans l'article 1. Ceci peut s'expliquer par le fait que le niveau basal d'expression de la NO synthase endothéliale dans ces conditions est très faible et qu'une diminution de l'expression ne peut vraisemblablement pas être détectée.

Bien que tous les progestatifs étudiés soient capables de diminuer l'expression de la NO synthase endothéliale, seuls l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone inhibent la formation endothéliale de NO induite par le 17 β -estradiol. Cette diminution de formation de NO entraîne une moindre inhibition de l'agrégation plaquettaire par les cellules endothéliales. Le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol qui sont dépourvus d'activité glucocorticoïde partielle affectent ni la formation endothéliale de NO induite par le 17 β -estradiol, ni la potentialisation par le 17 β -estradiol de l'effet anti-agrégant plaquettaire des cellules

endothéliales et ce malgré une diminution du niveau d'expression de la protéine NO synthase endothéliale.

Ces données suggèrent que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol augmente l'activité de la NO synthase endothéliale et/ou protège le NO vis-à-vis de la dégradation. L'activation de la NO synthase endothéliale est tributaire de divers cofacteurs parmi lesquels on va trouver la tétrahydrobioptérine (BH₄), la protéine Hsp 90 et la calmoduline. Des résultats préliminaires indiquent que les effets que nous observons ne sont pas dûs à un changement du niveau d'expression de la protéine Hsp 90 par les progestatifs. Nos résultats montrent cependant que le 17 β -estradiol est capable d'augmenter l'expression des ARN messagers de la GTP cyclohydrolase I. Des études précédentes ont aussi montré que les estrogènes augmentent l'expression de GTP cyclohydrolase I dans les régions cérébrales catecholaminergiques (Serova et al. 2004) ainsi que dans les cellules PC12 (Serova et al. 2006). De plus des études récentes indiquent que les estrogènes permettent par l'augmentation de la biodisponibilité de la tétrahydrobioptérine (BH₄) la potentialisation des réponses vasorelaxantes à l'acétylcholine dans l'aorte de ratte ovariectomisée (Lam et al. 2006). Nos résultats indiquent que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone inhibent l'effet potentialisateur du 17 β -estradiol sur l'expression de la GTP cyclohydrolase I tandis que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol sont sans effet. Cette différence d'effet est en faveur d'un rôle du récepteur des glucocorticoïdes plutôt que du récepteur de la progestérone. De plus, il a été montré que les glucocorticoïdes sont capables de diminuer l'expression de la GTP cyclohydrolase I, inhibant ainsi la formation de BH₄ et les relaxations endothélium-dépendantes dans l'aorte de rat (Johns et al. 2001; Mitchell et al. 2004). Nos résultats indiquent également que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol, qui sont dépourvus d'activité glucocorticoïde partielle, sont capables d'augmenter faiblement mais significativement l'expression des ARN messagers codant pour la GTP cyclohydrolase I,

lorsqu'ils sont administrés seuls alors que la progestérone et MPA n'ont pas cet effet. Cependant, il s'agit d'un effet faible qui n'est pas associé à une augmentation de la formation endothéliale de NO et ne potentialise pas les effets anti-agrégant plaquettaire des cellules endothéliales. D'autre part, nos résultats montrent que l'administration de L-sepiaptérine à des cellules endothéliales ayant été préalablement exposées à un traitement combinant le 17 β -estradiol à l'acétate de médroxyprogestérone ou à la progestérone, permet de restaurer les effets potentialisateurs du 17 β -estradiol sur l'effet anti-agrégant plaquettaire de ces cellules. Ainsi, ces données suggèrent que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone vont vraisemblablement diminuer la biodisponibilité de BH₄. L'apport de BH₄ de manière exogène par la L-sépiaptérine parvient à restaurer les effets bénéfiques du 17 β -estradiol.

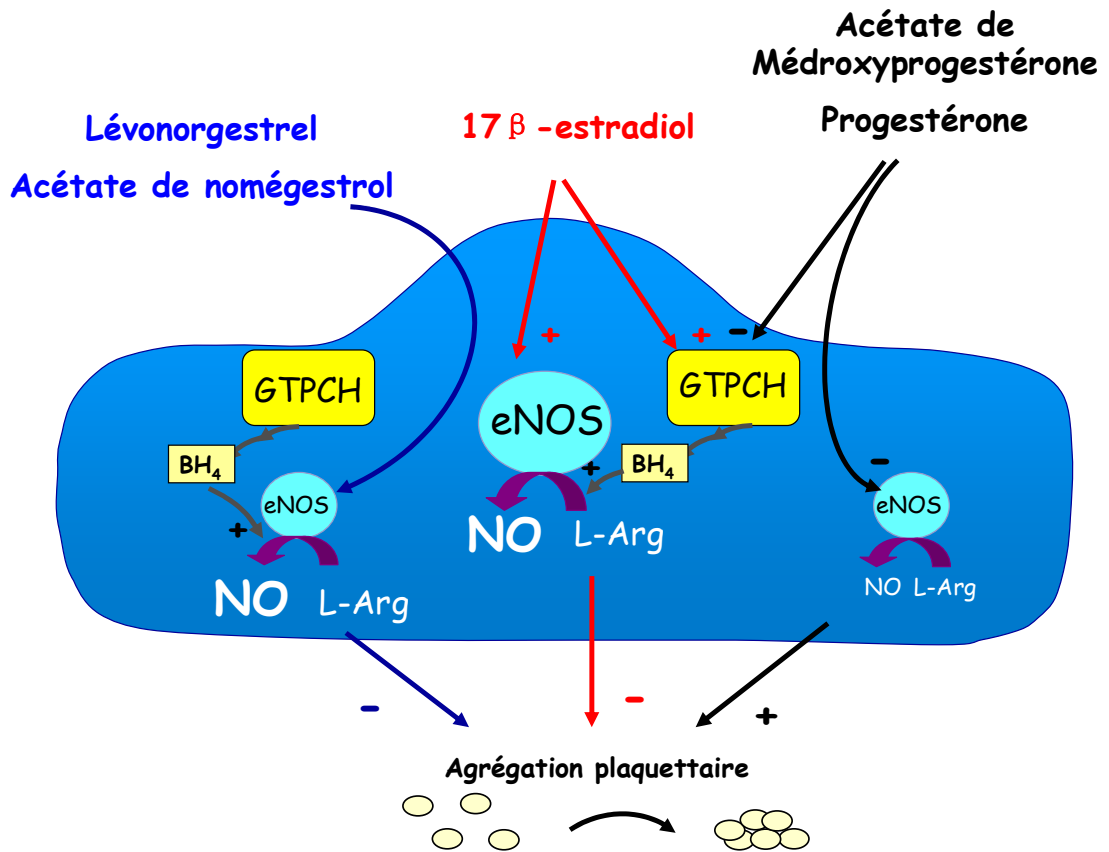


Figure 15 : Effets de traitement estro-progestatifs sur la voie du NO.

Abréviations : GTPCH, GTP cyclohydrolase ; BH₄, tétrahydrobioptérine ; L-Arg, L-arginine ; eNOS, NO synthase endothéliale ; NO, monoxyde d'azote.

PARTIE III

Article 3

Estrogen substitution restores the basal influence of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor on vascular tone in isolated mesenteric arteries from ovariectomized rats.

Murielle Zerr ; Thierry Chataigneau, PhD ; Frédéric Hudlett ; Fanny Pernot, PhD and Valérie B. Schini-Kerth.

“EDHF 2002”, edited by P.M. Vanhoutte, Taylor & Francis, (22):174-180.

Les estrogènes ont été décrits pour réduire la vasoconstriction en modulant les réponses du muscle lisse aux variations de concentrations en calcium intracellulaire (Murphy et Khalil 2000), en réduisant la libération de facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (Bilsel et al. 2000) et en potentialisant la libération de facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium (Kausser et al. 1997). De plus, une augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale par les estrogènes jouent un rôle majeur dans leurs effets vasoprotecteurs (Rubanyi et al. 1997). Ainsi, la NO synthase endothéliale apparaît actuellement comme la cible principale des estrogènes au niveau vasculaire. C'est dans ce contexte, que nous avons voulu déterminer si les estrogènes peuvent également agir sur un autre facteur vasorelaxant qui va jouer un rôle important dans dans la régulation du tonus vasculaire dans les artères coronaires et mésentériques, l'EDHF. Le but de cette étude a donc été de déterminer si l'administration chronique de 17 β -estradiol est capable de moduler l'influence basale d'EDHF sur le tonus vasculaire au niveau de l'artère mésentérique de rattes ovariectomisées.

Les résultats expérimentaux publiés dans ce troisième article ont été obtenus à partir d'études de la réactivité vasculaire d'anneaux d'artères mésentériques placées dans des

chambres à organes isolées. Les rattes femelles adultes vont être ovariectomisées ou vont subir une opération témoin. Les rattes ovariectomisées recevront des injections sous-cutanées quotidiennes de solvant ou de 17β -estradiol pendant une durée de 1 ou 4 semaines, après quoi les artères mésentériques seront prélevées et étudiées.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Estrogen substitution restores the basal influence of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor on vascular tone in isolated mesenteric arteries from ovariectomized rats.

Murielle Zerr, Thierry Chataigneau, Frédéric Hudlett, Fanny Pernot et Valérie B. Schini-Kerth.

“EDHF 2002”, edited by P.M. Vanhoutte, Taylor & Francis, Vol. 22, Pages 174-180

Pages 174 à 180 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Nos résultats montrent une potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine en présence de N^{ω} -nitro-L-arginine, un inhibiteur de la NO synthase endothéliale, au niveau de l'artère mésentérique des rattes témoins opérées, indiquant que le NO participe à la régulation du tonus vasculaire basal. Cette potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine par la N^{ω} -nitro-L-arginine est maintenue après 2 semaines d'ovariectomie, par contre elle disparaît après 5 semaines d'ovariectomie. Ainsi, après 5 semaines d'ovariectomie, la libération basale de NO par l'endothélium est réduite indiquant que celle-ci est sous le contrôle des hormones sexuelles femelles. L'administration chronique de 17β -estradiol pendant 4 semaines va permettre la restauration de cette participation de NO dans la régulation du tonus vasculaire basal, comme l'indique les potentialisations par la N^{ω} -nitro-L-arginine des réponses contractiles à la phényléphrine.

D'autre part, les réponses à la phényléphrine sont partiellement potentialisées par l'ajout de deux toxines, la charybdotoxine et l'apamine, connues pour inhiber l'EDHF. Cet effet bien que faible indique une participation d'EDHF dans la régulation du tonus vasculaire basal au niveau de l'artère mésentérique de ratte. De plus, la composante EDHF ne sera pas ou peu modifiée par l'ovariectomie à 2 semaines, par contre elle est inhibée à 5 semaines et l'administration chronique de 17β -estradiol pendant 4 semaines est capable de la restaurer partiellement.

Cette étude indique que l'imprégnation hormonale va jouer un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire par deux facteurs endothéliaux, NO et EDHF au niveau de l'artère mésentérique de ratte. De plus, une administration chronique de 17β -estradiol est capable de restaurer cette libération basale de NO et EDHF.

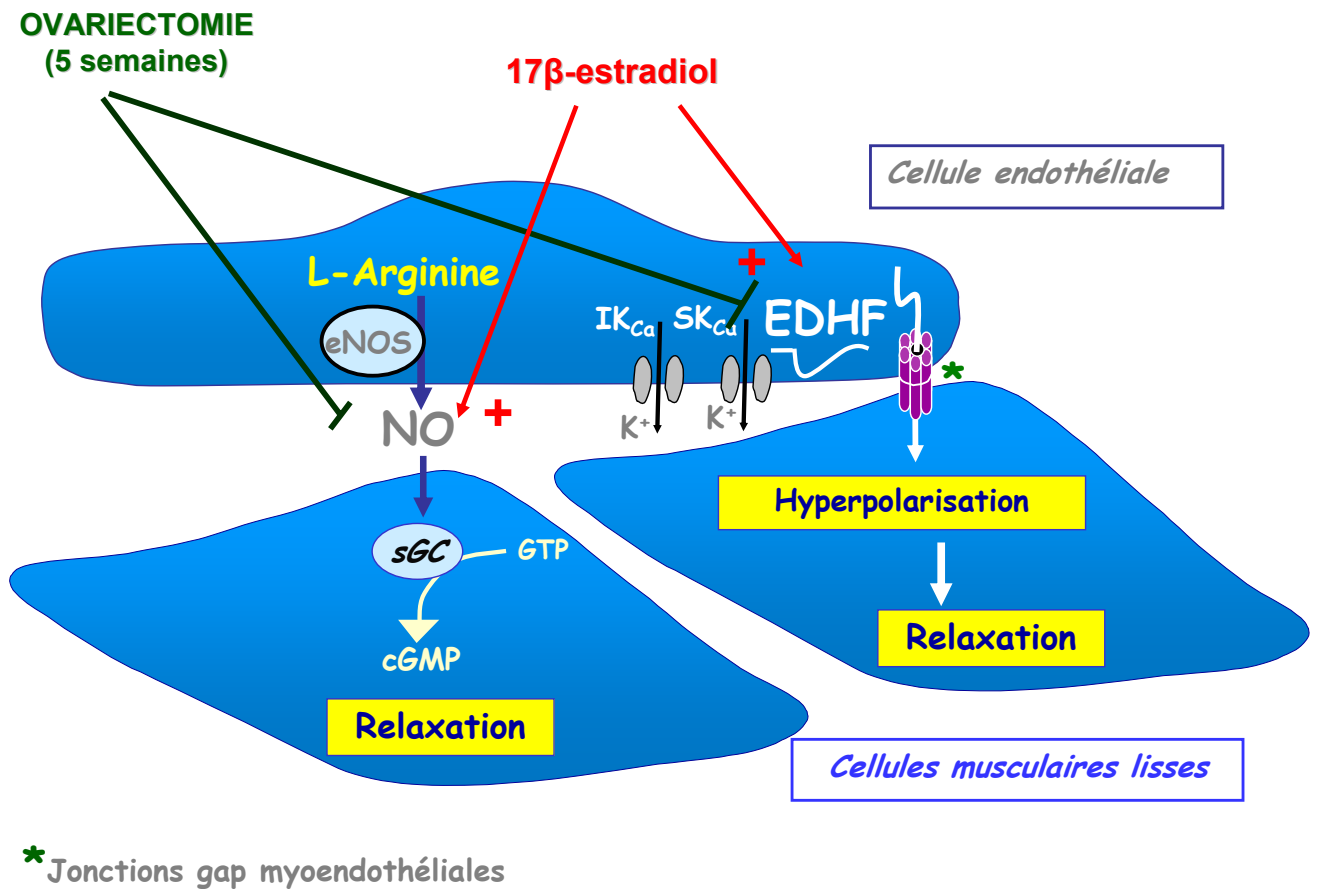


Figure 17 : Effet de l'administration de 17β-estradiol sur les libérations basales de NO et d'EDHF dans l'artère mésentérique de rattes ovariectomisées.

Abréviations : eNOS, NO synthase endothéliale ; NO, monoxyde d'azote ; GCs, guanylyl cyclase soluble ; GMPc, GMP cyclique ; EDHF, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ; K⁺, ions potassiums ; IK_{Ca}, canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne conductance ; SK_{Ca}, canaux potassiques dépendants du calcium de faible conductance.

PARTIE IV

Article 4

Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats.

Thierry Chataigneau, PhD ; Murielle Zerr ; Marta Chataigneau, PhD ; Frédéric Hudlett, Carole Hirn and Valérie B. Schini-Kerth.

Menopause. 2004 May-Jun;11(3):255-63.

Le but de cette étude est de déterminer et de caractériser l'influence d'une administration chronique d'un progestatif naturel, la progestérone, ou de MPA, un progestatif synthétique à des rattes ovariectomisées sur la fonction endothéliale. En particulier, il s'agit d'évaluer les effets de ces progestatifs sur la vasorelaxation impliquant NO et EDHF dans l'artère mésentérique. Ce vaisseau sanguin est caractérisé par une libération importante de ces deux facteurs et est soumis à une influence mineure de la prostacycline (Liu et al. 2001).

Les résultats expérimentaux publiés dans ce quatrième article ont été obtenus à partir d'études de réactivité vasculaire réalisée dans des chambres à organes isolés ainsi que de mesures de potentiel membranaire par microélectrode au niveau d'artères mésentériques de ratte ovariectomisées et traitées pendant quatre semaines avec soit la progestérone, soit un progestatif de synthèse, l'acétate de médroxyprogestérone.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Chronic treatment with progesterone but not medroxyprogesterone acetate restores the endothelial control of vascular tone in the mesenteric artery of ovariectomized rats

Thierry Chataigneau, **Murielle Zerr**, Marta Chataigneau, Frédéric Hudlett, Carole Hirn, Fanny Pernot et Valérie Barbara Schini-Kerth

Menopause : The Journal of the North American Menopause Society, 2004, Vol.11, Pages 255-263

Pages 255 à 263 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Nos résultats montrent qu'au niveau de l'artère mésentérique des rattes, on a une régulation du tonus vasculaire basal par l'endothélium et que cette régulation se fera principalement par le NO, comme l'indique les potentialisations de la contraction à la phényléphrine lorsque l'on supprime l'endothélium par abrasion mécanique ou en présence de N^ω-nitro-L-arginine, un inhibiteur de la NO synthase endothéliale. Cette potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine par la N^ω-nitro-L-arginine n'est pas observée chez les rattes ovariectomisées indiquant que la régulation du tonus vasculaire basal est sous le contrôle des hormones sexuelles femelles. L'administration chronique de progestérone, mais non d'acétate de médroxyprogestérone permet de restaurer cette potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine, indiquant que la progestérone est capable de restaurer la libération basale de NO. Les réponses à la phényléphrine ne sont pas potentialisées par l'ajout de deux toxines, la charybdotoxine et l'apamine, connues pour inhiber l'EDHF indiquant que, contrairement à la composante NO, l'EDHF ne joue pas un rôle majeur dans le contrôle du tonus vasculaire des artères mésentériques de ratte. Ceci est conforté par l'absence de variation du potentiel de membrane de repos d'un groupe de ratte à l'autre.

Cette étude est la première à révéler que non seulement les estrogènes comme cela a été décrit dans l'article 3, mais aussi un progestatif, la progestérone permet la restauration de la libération basale de NO. La différence des effets observés avec les deux progestatifs pourrait s'expliquer par le fait que l'acétate de médroxyprogestérone possède une activité glucocorticoïde partielle plus importante que la progestérone, ce qui est vérifiée par nos résultats qui indiquent très peu de variations du poids des organes cibles des glucocorticoïdes avec l'administration de progestérone.

Notre étude montre également que les relaxations endothélium-dépendantes induites par l'acétylcholine sont significativement inhibées en présence de N^ω-nitro-L-arginine ou de

charybdotoxine et d'apamine, et totalement inhibées en présence de l'association des trois inhibiteurs indiquant que ces relaxations sont médiées par NO et EDHF. Cependant, l'ovariectomie n'affecte pas les réponses à l'acétylcholine indiquant que celles-ci ne sont pas sous le contrôle des hormones sexuelles femelles. De même, nos résultats indiquent que les hyperpolarisations induites par l'acétylcholine sont similaires quel que soit le groupe de ratte.

Ainsi, nos résultats indiquent que la libération basale de NO est abolie par l'ovariectomie et peut être restaurée par l'administration chronique de progestérone, mais non d'acétyl de médroxyprogestérone. De plus, les libérations de NO et d'EDHF en réponse à l'acétylcholine ne sont pas sous le contrôle des hormones sexuelles femelles.

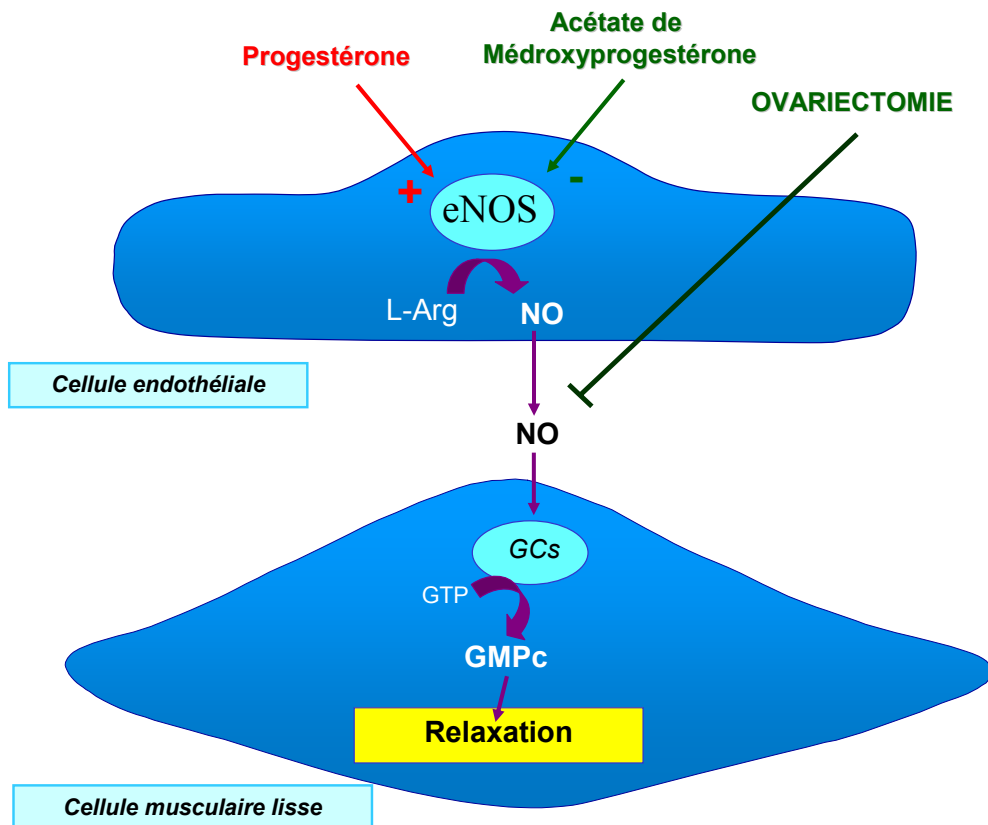


Figure 17 : Effet de l'administration chronique d'acétate de médroxyprogesterone ou de progestérone à des rattes ovariectomisées.

Abbreviations : L-Arg, L-arginine ; eNOS, NO synthase endothéliale ; NO, monoxyde d'azote ; GCs, guanylyl cyclase soluble ; GMPc, GMP cyclique.

DISCUSSION GENERALE

Les deux premières parties de ce travail ont permis de mettre en évidence i) que certains progestatifs, tel que l'acétate de médroxyprogestérone sont, de par leur capacité à activer le récepteur des glucocorticoïdes, capables de réduire l'effet bénéfique des cellules endothéliales vis-à-vis de l'agrégation plaquettaire en diminuant l'expression basale de la NO synthase endothéliale ainsi que la formation endothéliale de NO ; ii) que ces mêmes progestatifs sont également capables d'empêcher l'effet stimulateur du 17 β -estradiol sur l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation endothéliale de NO.

Dans cette étude nous avons étudié deux groupes de progestatifs, des progestatifs ayant une forte activité glucocorticoïde partielle, l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, ainsi que des progestatifs qui sont dépourvus d'une telle activité, le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol. Les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde partielle, inhibent l'expression basale de la NO synthase endothéliale et la formation endothéliale de NO. Ces effets se font via l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes comme l'indique leur inhibition par transfection des cellules endothéliales avec des siRNA spécifiques de ces récepteurs, les translocations nucléaires des récepteurs et les inhibitions de ces effets par l'utilisation de la mifépristone, un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes et à la progestérone. Ces effets sont concentration-dépendants et observés à des concentrations de 1 et 10 nM, pour l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, respectivement, qui sont des concentrations similaires à celles que l'on retrouve dans le plasma des femmes prenant de tels traitements hormonaux (Hamada et al. 2003; Svensson et al. 1994).

L'activation du récepteur des glucocorticoïdes va vraisemblablement diminuer l'expression de la NO synthase endothéliale en réduisant la stabilité des ARN messagers et en réduisant l'activité du promoteur en diminuant notamment la liaison du facteur de

transcription GATA à celui-ci, comme cela a été décrit pour les glucocorticoïdes (Wallerath et al. 1999). D'autre part, les glucocorticoïdes sont capables d'augmenter la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Iuchi et al. 2003). Ainsi en activant le récepteur aux glucocorticoïdes, les progestatifs pourraient également diminuer la biodisponibilité du NO en augmentant la formation de ces espèces réactives de l'oxygène capables de dégrader le NO. L'effet inhibiteur de l'acétate de médroxyprogestérone sur l'expression basale de la NO synthase endothéliale pourrait contribuer à expliquer la vasodilatation réduite de l'artère brachiale induite par le flux et médiée par l'endothélium chez des femmes ayant un implant contenant ce progestatif comme moyen de contraception (Sorensen et al. 2002).

Le NO va jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire en régulant la cascade de la coagulation, la fibrinolyse et l'agrégation plaquettaire. Il va jouer un rôle majeur dans le contrôle de l'initiation et du développement d'événements thrombotiques. Ainsi, en diminuant la biodisponibilité du NO, les progestatifs pourraient favoriser la formation et le développement d'un thrombus. De plus, ces résultats sont tout à fait en accord avec les données obtenues précédemment qui montrent que les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde partielle augmentent l'activité vasculaire procoagulante médiée par le facteur tissulaire, qui est l'initiateur physiologique de la cascade de la coagulation (Rapaport et Rao 1995). Cet effet est la résultante d'une augmentation de l'expression du récepteur à la thrombine, PAR-1 au niveau de la surface des cellules musculaires lisses vasculaires (Herkert et al. 2001). L'implication du récepteur des glucocorticoïdes dans les effets prothrombotiques de certains progestatifs est quant à elle supportée par le fait que les patients traités pendant de longues périodes avec un glucocorticoïde présentent un risque fortement accru de développer une thrombose veineuse ou artérielle (Sartori et al. 1999). Une telle augmentation du risque thrombotique est également observée chez des personnes atteintes du syndrome de Cushing

qui présentent une hyperproduction de corticoïdes liées à une tumeur de la glande surrénale (Sjoberg et al. 1976).

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons pu confirmer que les estrogènes sont capables d'augmenter l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation endothéliale de NO au niveau des cellules endothéliales. Les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde partielle, tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone et ceux qui en sont dépourvus, tels que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol inhibent l'expression de la NO synthase endothéliale induite par le 17β -estradiol et ce dès les concentrations de 0,1 à 10 nM qui sont des concentrations similaires à celles que l'on trouve dans le plasma des femmes prenant de tels traitements hormonaux (Hamada et al. 2003; Kook et al. 2002; Svensson et al. 1994). Alors que les progestatifs vont tous inhiber l'expression de la NO synthase endothéliale induite par le 17β -estradiol, seuls l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone vont réduire la formation endothéliale de NO, suggérant une implication du récepteur aux glucocorticoïdes dans cet effet. Les progestatifs dépourvus d'activité glucocorticoïde partielle n'affectent pas cette formation de NO. Ces résultats présentent une explication de l'effet inhibiteur de la progestérone vis-à-vis de la potentialisation des réponses vasorelaxantes par les estrogènes comme cela a été décrit au niveau d'artères coronaires de chiennes ovariectomisées (Miller et Vanhoutte 1991). Ces résultats pourraient également contribuer à expliquer partiellement certaines observations cliniques telles que celles de l'étude WHI montrant que la prise d'un traitement estro-progestatif entraîne une augmentation du risque cardiovasculaire alors que cela n'est pas le cas avec la prise d'un traitement estrogénique. Ces données cliniques suggèrent en effet, que certains progestatifs, tels que l'acétate de médroxyprogestérone pourraient être responsables des effets prothrombotiques de certaines combinaisons estro-progestatives (Rossouw et al.

2002). De plus, nos résultats pourraient également contribuer à expliquer que la prise d'un progestatif de troisième génération entraîne une augmentation du risque thrombotique plus importante que celle d'un progestatif de deuxième génération (Bloemenkamp et al. 1995; Gerstman et al. 1991; Jick et al. 2000).

Nos résultats indiquent que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol vont diminuer l'expression de la NO synthase endothéliale, mais ne vont pas réduire la formation endothéliale de NO. Ainsi, ces progestatifs ne vont pas réduire l'augmentation de la biodisponibilité de NO induite par le 17 β -estradiol. Cette augmentation de la biodisponibilité du NO peut être la conséquence soit d'une augmentation de sa formation, soit d'une diminution de sa dégradation. L'activation de la NO synthase endothéliale nécessite divers cofacteurs, parmi lesquels on compte la calmoduline, Hsp 90 et BH₄ (Alderton et al. 2001). Des résultats préliminaires n'ont pas montré d'effet des progestatifs sur l'augmentation de l'expression de Hsp 90 par le 17 β -estradiol. Nos résultats indiquent que le 17 β -estradiol est capable d'augmenter l'expression des ARN messagers de la GTP cyclohydrolase I, qui est une enzyme clef dans la synthèse du cofacteur BH₄ (Shi et al. 2004). De plus, ils montrent que le lévonorgestrel et l'acétate de nomégestrol n'affectent pas cette augmentation, suggérant que l'augmentation de la biodisponibilité de ce cofacteur va jouer un rôle crucial dans le maintien de la formation endothéliale de NO induite par le 17 β -estradiol. D'autre part, l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone vont en réduisant la biodisponibilité de BH₄ accentuer leur effet inhibiteur sur la formation de NO induite par le 17 β -estradiol.

En plus d'un effet inhibiteur sur l'expression de la GTP cyclohydrolase I, ces progestatifs pourraient également augmenter la formation d'espèces réactives de l'oxygène, un effet qui contribuerait là aussi à diminuer la biodisponibilité du NO. Cette hypothèse est supportée par des études ayant montré que la dexaméthasone est capable d'augmenter la formation de ces espèces réactives de l'oxygène en augmentant l'activité enzymatique de la

NADPH oxydase ainsi que de la xanthine oxydase (Iuchi et al. 2003). De plus, il a été montré que le 17 β -estradiol est quant à lui capable de diminuer cette formation d'espèces réactives de l'oxygène en diminuant l'expression de la NADPH oxydase qui est une enzyme essentielle à la formation de ces espèces réactives de l'oxygène (Wagner et al. 2001). Ainsi, cette diminution par le 17 β -estradiol de la formation d'espèces réactives de l'oxygène pourrait contribuer à expliquer l'augmentation de la formation de NO. D'autre part, les progestatifs ayant une activité glucocorticoïde partielle, tels que l'acétate de médroxyprogestérone et la progestérone, pourraient via l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes augmenter la formation d'espèces réactives de l'oxygène et inhiber les effets bénéfiques du 17 β -estradiol.

Nous avons pu observer également que les progestatifs ont des effets différents en fonction de l'état basal des cellules. En effet, lorsque les cellules endothéliales sont privées en sérum pendant une durée de 6 heures avant l'ajout des progestatifs (article 1), ceux-ci ont un effet inhibiteur sur l'expression de la NO synthase endothéliale alors qu'une privation en sérum d'une durée de 24 heures avant l'ajout des progestatifs (article 2) n'est pas associée à un effet inhibiteur des progestatifs. Ceci suggère que le niveau d'expression basale de NO synthase endothéliale joue un rôle primordial dans les réponses cellulaires aux progestatifs. Il est possible qu'après 24 heures de privation en sérum l'expression de la NO synthase endothéliale est trop faible pour être davantage réprimée et que l'on se heurte à une limite technique ne nous permettant pas d'observer une inhibition de l'expression de la NO synthase endothéliale par les progestatifs dans ces conditions là. Ces observations suggèrent que le niveau d'expression basal de la NO synthase endothéliale va jouer un rôle primordial dans les effets vasculaires des traitements hormonaux et peut contribuer à expliquer le risque de thromboses accru chez des patientes présentant d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'obésité, le tabagisme (Farley et al. 1998), des facteurs génétiques aggravant (Middeldorp et al. 2001) et l'âge (Anderson et al. 1991).

Les deux dernières parties de ce travail ont permis de mettre en évidence i) que le 17β -estradiol est capable d'exercer des effets bénéfiques sur la régulation du tonus vasculaire en entraînant la formation de NO et, dans une moindre mesure, d'EDHF dans les artères mésentériques de rattes ovariectomisées; ii) qu'une augmentation de la formation de NO peut aussi être observée avec la progestérone mais pas avec l'acétate de médroxyprogestérone.

Dans les deux dernières parties de ce travail nous montrons que la présence d'un endothélium fonctionnel est capable d'inhiber les réponses contractiles aux agents vasoconstricteurs. Cet effet des cellules endothéliales est dû majoritairement à la formation de NO comme l'indique la potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine en présence de N^{ω} -nitro-L-arginine. Cet effet va également impliquer la libération d'EDHF, cependant dans une moindre mesure comme l'indique les potentialisations partielles des réponses contractiles à la phényléphrine en présence de charybdotoxine et d'apamine.

Dans le troisième article nous montrons que la régulation du tonus vasculaire basal par le NO persiste à deux semaines après l'ovariectomie, cependant elle est abolie après cinq semaines. La régulation du tonus vasculaire basal par l'EDHF est quant à elle abolie dès deux semaines, un effet qui est maintenue à 5 semaines après l'ovariectomie. Ainsi, il semblerait que la composante EDHF soit plus sensible aux changements hormonaux que la composante NO. Ces résultats viennent s'ajouter aux données de la littérature qui indiquent que les vasorelaxations induites par l'acétylcholine médiées par EDHF sont abolies suite à l'ovariectomie et restaurée par l'administration de 17β -estradiol dans les artères mésentériques de ratte (Sakuma et al. 2002), suggérant que dans ce lit vasculaire l'EDHF joue un rôle important et est sous le contrôle des estrogènes.

De plus, les résultats de l'article 3 indiquent que l'administration de 17β -estradiol est capable de restaurer la participation basale de NO dans la régulation du tonus vasculaire, ce

qui est en accord avec les très nombreuses données de la littérature indiquant que les effets vasculaires des estrogènes sont médiées par le NO dans divers lits vasculaires tels que les artères utérines (Rosenfeld et al. 1996) et les artères coronaires canines (Miller et Vanhoutte 1991; Node et al. 1997b). Nos résultats montrent qu'un autre facteur vasorelaxant, l'EDHF est lui aussi sous le contrôle des hormones sexuelles femelles et que l'administration de 17 β -estradiol est capable de restaurer la libération de ce facteur. Ainsi, non seulement les vasorelaxations induites par l'acétylcholine et médiées par EDHF sont sous le contrôle des estrogènes (Sakuma et al. 2002), mais également la libération basale. Nos résultats peuvent s'expliquer par une modulation de l'expression de la connexine 43, protéine jouant un rôle important dans la formation des jonctions gap myoendothéliales comme cela a été décrit pour les effets des estrogènes sur la formation d'EDHF en réponse à l'acétylcholine (Liu et al. 2002).

Dans le quatrième article de ce travail, nous montrons que non seulement l'administration de 17 β -estradiol, mais également celle d'un progestatif, la progestérone est capable de restaurer la libération basale de NO comme l'indique la potentialisation des réponses contractiles à la phényléphrine par la N^w-nitro-L-arginine. De tels effets ne sont pas observés quant à la composante EDHF, suggérant que celle-ci n'est pas contrôlée par les progestatifs dans nos conditions expérimentales. De plus, l'administration d'acétate de médroxyprogestérone ne restaure pas la libération basale de NO, suggérant que la nature du progestatif administré va jouer un rôle majeur dans leurs effets vasculaires.

Nos observations faites au niveau cellulaire (article 1 et 2) montrent un effet inhibiteur de la progestérone et de l'acétate de médroxyprogestérone, sur l'expression de la NO synthase endothéliale et la formation endothéliale de NO, qui est très similaire. Cependant, l'étude que nous avons réalisé *in vivo* en administrant de manière chronique l'un ou l'autre de ces progestatifs à des rattes ovariectomisées (article 4) montre que la progestérone est capable

de restaurer la libération basale de NO ce qui n'est pas le cas de l'acétate de médroxyprogestérone. Cette différence d'effet pourrait s'expliquer par une différence d'affinité pour le récepteur aux glucocorticoïdes en faveur de l'acétate de médroxyprogestérone. La progestérone, comme le confirme la variation du poids des tissus cibles, a un effet glucocorticoïde partiel plus faible que l'acétate de médroxyprogestérone (Schindler et al. 2003; Wiegatz et Kuhl 2004). Ainsi, une hypothèse est qu'*in vivo* l'activation du récepteur à la progestérone domine probablement celle du récepteur aux glucocorticoïdes dans le cas de la progestérone et que dans ces conditions, la progestérone serait donc capable via l'activation du récepteur à la progestérone de restaurer la libération basale de NO en augmentant l'expression de la NO synthase endothéliale, dont le gène est une cible du récepteur à la progestérone (Truss et Beato 1993). Cependant, là aussi il s'agit d'hypothèses qui restent à être vérifiées expérimentalement. De plus, il a été montré que l'administration aigue de ces deux progestatifs entraînait également des effets différents : la progestérone par l'activation de la voie PI3-kinase et la phosphorylation de la NO synthase endothéliale étant capable d'activer la libération de NO alors que l'acétate de médroxyprogestérone n'a pas cet effet au niveau de l'aorte de rat (Simoncini et al. 2004).

L'ensemble de ce travail suggère que la structure chimique des progestatifs et plus particulièrement leur activité glucocorticoïde partielle joue un rôle clef dans leurs effets vasculaires. Ainsi, il serait intéressant d'élargir cette étude à un plus grand nombre de progestatifs et plus particulièrement à ceux qui sont le plus prescrits à l'heure actuelle, tels que le gestodène, le kétodésogestrel qui présentent tous deux une forte activité glucocorticoïde partielle (voir tableau 3).

D'autre part, il serait également intéressant de tester les SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators), ces molécules dont les chefs de file sont le tamoxifène et le raloxifène,

sont capables de se lier au récepteur des estrogènes et d'avoir des effets agonistes ou antagonistes en fonction du tissu cible. Ainsi, ces molécules pourraient avoir un effet bénéfique sur le plan cardiovasculaire, sans présenter les effets néfastes des estrogènes classiques au niveau du sein et de l'endomètre. De ce fait, les SERMs représentent à l'heure actuelle une réelle alternative au traitement hormonal de substitution classique. Cependant, leurs effets cardiovasculaires sont encore mal connus et les résultats des récentes études MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) et CORE (Continuing Outcomes Relevant to Evista) ne montrent ni effet bénéfique, ni effet néfaste du raloxifène sur le système cardiovasculaire existant (Ensrud et al. 2006). Une diminution des événements cardiovasculaires chez les femmes présentant des facteurs de risque cardiovasculaire avait été observée dans le groupe de femmes recevant le raloxifène lors des quatre premières années de l'étude MORE. Cependant, une telle diminution n'a pas été observée dans la suite de l'étude et cet effet a finalement été expliqué par l'incidence élevée des événements cardiovasculaires au sein du groupe de femmes recevant le placebo (Barrett-Connor et al. 2002).

Il serait également intéressant à plus long terme d'étudier l'effet des progestatifs, seuls ou en combinaison avec un estrogène, *in vivo*, en s'intéressant plus particulièrement à la formation de NO et au développement de thromboses chez l'animal sain. De plus, la survenue d'événements thrombotiques liés aux traitements hormonaux étant souvent associé à la présence d'un facteur de risque (athérosclérose, dysfonction endothéliale, hypertension, obésité, etc...), il serait également intéressant d'étudier l'effet des progestatifs, seuls ou en combinaison avec un estrogène, chez des animaux présentant une dysfonction endothéliale ou d'autres facteurs de risque tels que l'hypertension ou l'obésité.

La prise en compte des effets secondaires des progestatifs composant les traitements hormonaux a joué un rôle crucial dans le développement de nouvelles molécules. En effet, certains progestatifs sont capables d'activer les récepteurs aux androgènes et d'avoir des

effets androgéniques tels que la prise de poids, l'acné et l'hirsutisme. De même, la prise de progestatifs capable d'activer le récepteur aux minéralocorticoïdes entraîne une rétention hydrosodée. En tenant compte de la capacité des progestatifs à activer les récepteur aux androgènes et minéralocorticoïdes, des progestatifs dépourvus de ces effets secondaires ont été développés. Ainsi, la prise en compte des effets glucocorticoïdes partiels de certains progestatifs pourrait elle aussi contribuer à l'amélioration des traitements hormonaux et au développement de progestatifs dépourvus de ces effets.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abplanalp W, Scheiber MD, Moon K, Kessel B, Liu JH, Subbiah MT (2000) Evidence for the role of high density lipoproteins in mediating the antioxidant effect of estrogens. *Eur J Endocrinol* 142:79-83

Adelstein RS, Hathaway DR (1979) Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. *Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. Am J Cardiol* 44:783-7

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615

American College of Physicians (1992) Guidelines for counseling postmenopausal women about preventive hormone therapy. American College of Physicians. *Ann Intern Med* 117:1038-41

Anderson FA, Jr., Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE (1991) A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med* 151:933-8

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S (2004) Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 291:1701-12

Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S (1986) Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88:411-5

Banka M (1998) What works. Practice discovers new revenue stream using EMR (electronic medical records). *Health Manag Technol* 19:43

Bar J, Lahav J, Hod M, Ben-Rafael Z, Weinberger I, Brosens J (2000) Regulation of platelet aggregation and adenosine triphosphate release in vitro by 17beta-estradiol and medroxyprogesterone acetate in postmenopausal women. *Thromb Haemost* 84:695-700

Bar J, Tepper R, Fuchs J, Pardo Y, Goldberger S, Ovadia J (1993) The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate release in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 81:261-4

Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, Pang PK, Resnick LM (2001) Vascular Effects of Progesterone : Role of Cellular Calcium Regulation. *Hypertension* 37:142-147

Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hozowski K, Rautaharju P, Harper KD (2002) Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *Jama* 287:847-57

Batistuzzo de Medeiros SR, Krey G, Hiji AK, Wahli W (1997) Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem* 272:18250-60

Bauer KA, Eichinger S, Mannucci PM, Rosenberg RD (1996) Determinants of coagulation activation in humans. *Haemostasis* 26 Suppl 1:72-5

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R (1996) Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 94:3341-7

Beral V (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-27

Bilsel AS, Moini H, Tetik E, Aksungar F, Kaynak B, Ozer A (2000) 17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 46:579-84

Binko J, Murphy TV, Majewski H (1998) 17Beta-oestradiol enhances nitric oxide synthase activity in endothelium-denuded rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:120-7

Bloemenkamp KW, Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Buller HR, Vandenbroucke JP (1995) Enhancement by factor V Leiden mutation of risk of deep-vein thrombosis associated with oral contraceptives containing a third-generation progestagen. *Lancet* 346:1593-6

Blondeau JP, Baulieu EE (1984) Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 219:785-92

Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA (2000) Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1707-15

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368:850-3

Boston Collaborative Drug Surveillance Programme. (1973b) Oral contraceptives and venous thromboembolic disease, surgically confirmed gallbladder disease, and breast tumours. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Programme. *Lancet* 1:1399-404

Boston Collaborative Drug Surveillance Programme. (1974) Surgically confirmed gallbladder disease, venous thromboembolism, and breast tumors in relation to postmenopausal estrogen therapy. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. *N Engl J Med* 290:15-9

Boudoulas KD, Cooke GE, Roos CM, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ (2001) The PLA polymorphism of glycoprotein IIIa functions as a modifier for the effect of estrogen on platelet aggregation. *Arch Pathol Lab Med* 125:112-5

Boyce J, Fawcett JW, Noall EW (1963) Coronary thrombosis and Conovide. *Lancet* 1:111

British Gynaecological Cancer Group (1981) Oestrogen replacement and endometrial cancer. A statement by the British Gynaecological Cancer Group. *Lancet* 1:1359-60

Broekman MJ, Eiroa AM, Marcus AJ (1991) Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism. *Blood* 78:1033-40

Brotman DJ, Girod JP, Posch A, Jani JT, Patel JV, Gupta M, Lip GY, Reddy S, and Kickler TS (2006) Effects of short-term glucocorticoids on hemostatic factors in healthy volunteers. *Thromb Res* 118 (2): 247-52

Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF (1990) Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* 29:7539-46

Busse R, Fleming I (1995) Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 27:331-40

Busse R, Fleming I (2003) Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* 24:24-9

Busse R, Luckhoff A, Bassenge E (1987) Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:566-71

Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 78:415-23

Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR (1997) 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res* 81:885-92

Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR (1996) Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 98:36-42

Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW (2000) Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 87:E44-52

Chand N, Altura BM (1981) Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: role in lung vascular diseases. *Science* 213:1376-9

Chataigneau T, Feletou M, Duhault J, Vanhoutte PM (1998) Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br J Pharmacol* 123:574-80

Chen GF, Suzuki H (1990) Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol* 421:521-34

Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103:401-6

Cherry N, Gilmour K, Hannaford P, Heagerty A, Khan MA, Kitchener H, McNamee R, Elstein M, Kay C, Seif M, Buckley H (2002) Oestrogen therapy for prevention of reinfarction in postmenopausal women: a randomised placebo controlled trial. *Lancet* 360:2001-8

Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ, Gilligan MA, Cyr MG, Thomson CA, Khandekar J, Petrovitch H, McTiernan A (2003) Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *Jama* 289:3243-53

Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM (2001) Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 33:1673-90

Christopoulos A, El-Fakahany EE (1999) The generation of nitric oxide by G protein-coupled receptors. *Life Sci* 64:1-15

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527-61

Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC (2003) Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 24:91-5

Clarke SC, Kelleher J, Lloyd-Jones H, Slack M, Schofield PM (2002) A study of hormone replacement therapy in postmenopausal women with ischaemic heart disease: the Papworth HRT atherosclerosis study. *BJOG* 109:1056-62

Clementi E (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Pharmacol* 55:713-8

Cocks TM, Angus JA (1983) Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin. *Nature* 305:627-30

Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1983) Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 221:273-4

Cohen RA, Vanhoutte PM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92:3337-49

Collaborative group for the study of stroke in young women. (1973a) Oral contraception and increased risk of cerebral ischemia or thrombosis. *N Engl J Med* 288:871-8

Collins P, Rosano G (1998) Estrogen replacement therapy and exercise performance in postmenopausal women with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 81:259-60

Conneely OM, Lydon JP (2000) Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 65:571-7

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM (1996) Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 119:959-64

Coughlin SR (1999) Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 82:353-6

Cowan CL, Cohen RA (1991) Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am J Physiol* 261:H830-5

Crane GJ, Gallagher N, Dora KA, Garland CJ (2003) Small- and intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *J Physiol* 553:183-9

Crook D, Cust MP, Gangar KF, Worthington M, Hillard TC, Stevenson JC, Whitehead MI, Wynn V (1992) Comparison of transdermal and oral estrogen-progestin replacement therapy: effects on serum lipids and lipoproteins. *Am J Obstet Gynecol* 166:950-5

Daly E, Vessey MP, Hawkins MM, Carson JL, Gough P, Marsh S (1996) Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet* 348:977-80

Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, Chambon P, Bayard F and Arnal JF (2002) Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 90:413-9

de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ (1992) Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 85:2284-90

De Mey JG, Vanhoutte PM (1981) Contribution of the endothelium to the response to anoxia in the canine femoral artery. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 253:325-6

Dennis MS, Eigenbrot C, Skelton NJ, Ultsch MH, Santell L, Dwyer MA, O'Connell MP, Lazarus RA (2000) Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature* 404:465-70

Diczfalusy E (1979) Gregory Pincus and steroidal contraception: a new departure in the history of mankind. *J Steroid Biochem* 11:3-11

Dorangeon P, Thomas JL, Choisy H, Lumbroso M, Hazard MC (1993) Effects of norgestrel acetate on carbohydrate metabolism. *Diabete Metab* 19:441-5

Drummer C, Ludke S, Spannagl M, Schramm W, Gerzer R (1991) The nitric oxide donor SIN-1 is a potent inhibitor of plasminogen activator inhibitor release from stimulated platelets. *Thromb Res* 63:553-6

Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:659-66

Dunn N, Thorogood M, Faragher B, de Caestecker L, MacDonald TM, McCollum C, Thomas S, Mann R (1999) Oral contraceptives and myocardial infarction: results of the MICA case-control study. *Bmj* 318:1579-83

Durante W, Kroll MH, Vanhoutte PM, Schafer AI (1992) Endothelium-derived relaxing factor inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting platelet phospholipase C. *Blood* 79:110-6

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH (1998) K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396:269-72

Ensrud K, Genazzani AR, Geiger MJ, McNabb M, Dowsett SA, Cox DA, Barrett-Connor E (2006) Effect of raloxifene on cardiovascular adverse events in postmenopausal women with osteoporosis. *Am J Cardiol* 97:520-7

Esmon NL, Esmon CT (1988) Protein C and the endothelium. *Semin Thromb Hemost* 14:210-5

Farley TM, Meirik O, Chang CL, Poulter NR (1998) Combined oral contraceptives, smoking, and cardiovascular risk. *J Epidemiol Community Health* 52:775-85

Farley TM, Meirik O, Collins J (1999) Cardiovascular disease and combined oral contraceptives: reviewing the evidence and balancing the risks. *Hum Reprod Update* 5:721-35

Feletou M, Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1215-25

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R (1999) Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401:493-7

Fleming I, Busse R (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43:532-41

Fleming I, Busse R (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1-12

Fukumoto S, Allan EH, Zeheb R, Gelehrter TD and Martin TJ (1992) Glucocorticoid regulation of plasminogen activator inhibitor-1 messenger ribonucleic acid and protein in normal and malignant rat osteoblasts. *Endocrinology* 130: 797-804

Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC (2002) Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 277:4277-84

Fulton D, McGiff JC, Quilley J (1994) Role of K⁺ channels in the vasodilator response to bradykinin in the rat heart. *Br J Pharmacol* 113:954-8

Furchgott RF, Martin W (1985) Interactions of endothelial cells and smooth muscle cells of arteries. *Chest* 88:210S-213S

Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3:2007-18

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-6

Galien R, Garcia T (1997) Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res* 25:2424-9

Gambrell RD, Jr., Massey FM, Castaneda TA, Ugenas AJ, Ricci CA (1979) Reduced incidence of endometrial cancer among postmenopausal women treated with progestogens. *J Am Geriatr Soc* 27:389-94

Garg UC, Hassid A (1989) Inhibition of rat mesangial cell mitogenesis by nitric oxide-generating vasodilators. *Am J Physiol* 257:F60-6

Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 16:23-30

Geary GG, Krause DN, Duckles SP (2000) Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H511-9

Gerlach M, Keh D, Bezold G, Spielmann S, Kurer I, Peter RU, Falke KJ, Gerlach H (1998) Nitric oxide inhibits tissue factor synthesis, expression and activity in human monocytes by prior formation of peroxynitrite. *Intensive Care Med* 24:1199-208

Gerstman BB, Piper JM, Tomita DK, Ferguson WJ, Stadel BV, Lundin FE (1991) Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J Epidemiol* 133:32-7

Ghisdal P, Morel N (2001) Cellular target of voltage and calcium-dependent K(+) channel blockers involved in EDHF-mediated responses in rat superior mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 134:1021-8

Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP (1997) Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272:32889-900

Giannopoulos G, Phelps DS, Munowitz P (1982) Heterogeneity and ontogenesis of progestin receptors in rabbit lung. *J Steroid Biochem* 17:503-10

Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM (1988) Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 244:19-22

Gourdy P, Araujo LM, Zhu R, Garmy-Susini B, Diem S, Laurell H, Leite-de-Moraes M, Dy M, Arnal JF, Bayard F, Herbelin A (2005) Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood* 105: 2415-20

Graf R, Gossrau R, Frank HG (1990) Enhancement of immunoreactivity of von Willebrand factor in vascular endothelial cells of rat organs after glucocorticoid administration. *Acta Histochem Suppl* 38: 219-26

Griffith OW, Stuehr DJ (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-36

Grodstein F, Stampfer MJ, Goldhaber SZ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH (1996) Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. *Lancet* 348:983-7

Grodzinska L, Hafner G, Darius H (1990) Effect of molsidomine on t-PA and PAI activity in man: a double blind, placebo controlled study. *Thromb Haemost* 64:485

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3:950-64

Grunfeld JP (1990) Glucocorticoids in blood pressure regulation. *Horm Res* 34:111-3

Gryglewski RJ, Wolkow PP, Uracz W, Janowska E, Bartus JB, Balbatun O, Patton S, Brovkovich V, Malinski T (1998) Protective role of pulmonary nitric oxide in the acute phase of endotoxemia in rats. *Circ Res* 82:819-27

Hamada AL, Maruo T, Samoto T, Yoshida S, Nash H, Spitz IM, Johansson E (2003) Estradiol/progesterone-releasing vaginal rings for hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 17:247-54

Hammond CB, Jelovsek FR, Lee KL, Creasman WT, Parker RT (1979) Effects of long-term estrogen replacement therapy. I. Metabolic effects. *Am J Obstet Gynecol* 133:525-36

Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol* 481 (Pt 2):407-14

Hecker M, Ullrich V (1989) On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *J Biol Chem* 264:141-50

Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T (2002) Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost* 88:186-93

Herkert O, Kuhl H, Sandow J, Busse R, Schini-Kerth VB (2001) Sex steroids used in hormonal treatment increase vascular procoagulant activity by inducing thrombin receptor (PAR-1) expression: role of the glucocorticoid receptor. *Circulation* 104:2826-31

Higgs EA, Moncada S, Vane JR, Caen JP, Michel H, Tobelem G (1978) Effect of prostacyclin (PGI₂) on platelet adhesion to rabbit arterial subendothelium. *Prostaglandins* 16:17-22

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276:3459-67

Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T (1995) Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 360:291-3

Hodges YK, Tung L, Yan XD, Graham JD, Horwitz KB, Horwitz LD (2000) Estrogen receptors alpha and beta: prevalence of estrogen receptor beta mRNA in human vascular smooth muscle and transcriptional effects. *Circulation* 101:1792-8

Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S (1993) Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 334:170-4

Hollenberg MD (2003) Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci* 74:237-46

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 76:967-1003

Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1985) Adenine nucleotides, serotonin, and endothelium-dependent relaxations to platelets. *Am J Physiol* 248:H389-95

Houston DS, Vanhoutte PM (1986) Serotonin and the vascular system. Role in health and disease, and implications for therapy. *Drugs* 31:149-63

Hu SK, Mitcho YL, Rath NC (1988) Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol* 10:247-52

Huang LQ, Whitworth JA, Chesterman, C N (1995) Effects of cyclosporin A and dexamethasone on haemostatic and vasoactive functions of vascular endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6:438-45

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-42

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Jama* 280:605-13

Ignarro LJ (1989) Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 65:1-21

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G (1988) Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 244:181-9

Ignarro LJ, Wood KS (1987) Activation of purified soluble guanylate cyclase by arachidonic acid requires absence of enzyme-bound heme. *Biochim Biophys Acta* 928:160-70

Inman WH, Vessey MP (1968) Investigation of deaths from pulmonary, coronary, and cerebral thrombosis and embolism in women of child-bearing age. *Br Med J* 2:193-9

Iuchi T, Akaike M, Mitsui T, Ohshima Y, Shintani Y, Azuma H, Matsumoto T (2003) Glucocorticoid excess induces superoxide production in vascular endothelial cells and elicits vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 92:81-7

Jayachandran M, Sanzo A, Owen WG, Miller VM (2005) Estrogenic regulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in platelets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1908-16

Jeltsch JM, Turcotte B, Garnier JM, Lerouge T, Krozowski Z, Gronemeyer H, Chambon P (1990) Characterization of multiple mRNAs originating from the chicken progesterone receptor gene. Evidence for a specific transcript encoding form A. *J Biol Chem* 265:3967-74

Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P (1992) Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *Am J Physiol* 263:H271-5

Jick H, Derby LE, Myers MW, Vasilakis C, Newton KM (1996a) Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet* 348:981-3

Jick H, Dinan B, Herman R, Rothman KJ (1978a) Myocardial infarction and other vascular diseases in young women. Role of estrogens and other factors. *Jama* 240:2548-52

Jick H, Dinan B, Rothman KJ (1978b) Oral contraceptives and nonfatal myocardial infarction. *Jama* 239:1403-6

Jick H, Jick S, Myers MW, Vasilakis C (1996b) Risk of acute myocardial infarction and low-dose combined oral contraceptives. *Lancet* 347:627-8

Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW, Vasilakis C (1995) Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* 346:1589-93

Jick H, Kaye JA, Vasilakis-Scaramozza C, Jick SS (2000) Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with users of oral contraceptives with levonorgestrel before and after 1995: cohort and case-control analysis. *Bmj* 321:1190-5

Jordan WM (1961) Pulmonary embolism. *Lancet*:1146-47

Johns DG, Dorrance AM, Tramontini NL, Webb RC (2001) Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:27-31

Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Kobayashi T, Sase T, Nishikawa M, Ishikura K, Yamada N, Abe Y, Nishioka J, Nakano T, Shiku H (2005) Elevated levels of leukocyte tissue factor mRNA in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res* 116:307-12

Kato J, Onouchi T, Okinaga S (1978) Hypothalamic and hypophysial progesterone receptors: estrogen-priming effect, differential localization, 5 α -dihydroprogesterone binding, and nuclear receptors. *J Steroid Biochem* 9:419-27

Kauser K, Sonnenberg D, Tse J, Rubanyi GM (1997) 17 beta-Estradiol attenuates endotoxin-induced excessive nitric oxide production in ovariectomized rats in vivo. *Am J Physiol* 273:H506-9

Klinger MH, Jelkmann W (2002) Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 22:913-22

Konigsberg WH, Nemerson Y (1988) Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor. *Cell* 52:639-40

Kook K, Gabelnick H, Duncan G (2002) Pharmacokinetics of levonorgestrel 0.75 mg tablets. *Contraception* 66:73-6

Krakoff LR (1988) Glucocorticoid excess syndromes causing hypertension. *Cardiol Clin* 6:537-45

Kronemann N, Nockher WA, Busse R, Schini-Kerth VB (1999) Growth-inhibitory effect of cyclic GMP- and cyclic AMP-dependent vasodilators on rat vascular smooth muscle cells: effect on cell cycle and cyclin expression. *Br J Pharmacol* 126:349-57

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-63

Kuohung W, Shwaery GT, Keaney JF, Jr. (2001) Tamoxifen, esterified estradiol, and physiologic concentrations of estradiol inhibit oxidation of low-density lipoprotein by endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 184:1060-3

Lam KK, Lee YM, Hsiao G, Chen SY, Yen MH (2006) Estrogen therapy replenishes vascular tetrahydrobiopterin and reduces oxidative stress in ovariectomized rats. *Menopause* 13:294-302

Lamontagne D, Konig A, Bassenge E, Busse R (1992) Prostacyclin and nitric oxide contribute to the vasodilator action of acetylcholine and bradykinin in the intact rabbit coronary bed. *J Cardiovasc Pharmacol* 20:652-7

Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW (1997) Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273:L119-26

Laudet V (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19:207-26

Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 269:4458-66

Leonhardt SA, Boonyaratanakornkit V, Edwards DP (2003) Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* 68:761-70

Lerner DJ, Kannel WB (1986) Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 111:383-90

Lewis MA, Heinemann LA, Spitzer WO, MacRae KD, Bruppacher R (1997) The use of oral contraceptives and the occurrence of acute myocardial infarction in young women. Results from the Transnational Study on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *Contraception* 56:129-40

Lidbury PS, Thiernemann C, Korbut R, Vane JR (1990) Endothelins release tissue plasminogen activator and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 186:205-12

Limbourg FP, Liao JK (2003) Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J Mol Med* 81:168-74

Liu MY, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Sakuma I, Kanno M (2001) Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 132:1035-46

Liu MY, Hattori Y, Sato A, Ichikawa R, Zhang XH, Sakuma I (2002) Ovariectomy attenuates hyperpolarization and relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor in female rat mesenteric artery: a concomitant decrease in connexin-43 expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:938-48

MacLusky NJ, McEwen BS (1980) Progesterin receptors in the developing rat brain and pituitary. *Brain Res* 189:262-8

Mann JJ, Vessey MP, Thorogood M, Doll SR (1975) Myocardial infarction in young women with special reference to oral contraceptive practice. *Br Med J* 2:241-5

Mantero F, Boscaro M (1992) Glucocorticoid-dependent hypertension. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:409-13

Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC (2003) Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 33 (2):512-21

Marinissen MJ, Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22:368-76

Martin DM, Boys CW, Ruf W (1995) Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *Faseb J* 9:852-9

Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF (1985) Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 232:708-16

Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A (2002) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 290:909-13

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106:1521-30

Meade TW, Haines AP, North WR, Chakrabarti R, Howarth DJ, Stirling Y (1977) Haemostatic, lipid, and blood-pressure profiles of women on oral contraceptives containing 50 microgram or 30 microgram oestrogen. *Lancet* 2:948-51

Mendelsohn ME (2000) Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:337-43

Mendelsohn ME, Karas RH (1999) The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340:1801-11

Michelakis ED, Reeve HL, Huang JM, Tolarova S, Nelson DP, Weir EK, Archer SL (1997) Potassium channel diversity in vascular smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 75:889-97

Middeldorp S, Meinardi JR, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, van Der Meer J, Prins MH, Buller HR (2001) A prospective study of asymptomatic carriers of the factor V Leiden mutation to determine the incidence of venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 135:322-7

Miller RC, Mony M, Schini V, Schoeffter P, Stoclet JC (1984) Endothelial mediated inhibition of contraction and increase in cyclic GMP levels evoked by the alpha-adrenoceptor agonist B-HT 920 in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 83:903-8

Miller VM, Vanhoutte PM (1991) Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *Am J Physiol* 261:R1022-7

Mitchell BM, Dorrance AM, Mack EA, Webb RC (2004) Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:8-13

Miyagawa K, Rosch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K (1997) Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 3:324-7

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-5

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-42

Monje P, Boland R (1999) Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus. *Mol Cell Endocrinol* 147:75-84

Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR (1993) Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-oestradiol in vitro. *Cardiovasc Res* 27:1939-42

Murphy JG, Khalil RA (2000) Gender-specific reduction in contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells of female rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C834-44

Myers DD, Hawley AE, Farris DM, Wroblewski SK, Thanaporn P, Schaub RG, Wagner DD, Kumar A, Wakefield TW (2003) P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc Surg* 38:1075-89

Nachtigall LE, Nachtigall RH, Nachtigall RD, Beckman EM (1979) Estrogen replacement therapy II: a prospective study in the relationship to carcinoma and cardiovascular and metabolic problems. *Obstet Gynecol* 54:74-9

Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Ono K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H (2005) Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. *Endocr J* 52:245-52

Nakano Y, Oshima T, Ozono R, Ueda A, Oue Y, Matsuura H, Sanada M, Ohama K, Chayama K, Kambe M (2002) Estrogen replacement suppresses function of thrombin stimulated platelets by inhibiting Ca²⁺ influx and raising cyclic adenosine monophosphate. *Cardiovasc Res* 53:634-41

Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G (1999) Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits in vivo : possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circ Res* 85:377-85

Nemerson Y (1988) Tissue factor and hemostasis. *Blood* 71:1-8

Newby AC, Henderson AH (1990) Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 52:661-74

Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK (2006) Cushing's syndrome. *Lancet* 367:1605-17

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-65

Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H, Hori M (1997a) Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels. *Circulation* 96:1953-63

Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Sato H, Kuzuya T, Hori M (1997b) Roles of NO and Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in ischemic heart failure. *Faseb J* 11:793-9

Ohashi M, Satoh K, Itoh T (1999) Acetylcholine-induced membrane potential changes in endothelial cells of rabbit aortic valve. *Br J Pharmacol* 126:19-26

Olivieri O, Friso S, Manzato F, Guella A, Bernardi F, Lunghi B, Girelli D, Azzini M, Brocco G, Russo C, et al. (1995) Resistance to activated protein C in healthy women taking oral contraceptives. *Br J Haematol* 91:465-70

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-10

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-6

Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* 9:404-10

Patrassi GM, Dal Bo Zanon R, Boscaro M, Martinelli S, Girolami A (1985) Further studies on the hypercoagulable state of patients with Cushing's syndrome. *Thromb Haemost* 54:518-20

Pearson JD (1993) The control of production and release of haemostatic factors in the endothelial cell. *Baillieres Clin Haematol* 6:629-51

Peiro C, Redondo J, Rodriguez-Martinez MA, Angulo J, Marin J, Sanchez-Ferrer CF (1995) Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 25:748-51

Perez Gutthann S, Garcia Rodriguez LA, Castellsague J, Duque Oliart A (1997) Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism: population based case-control study. *Bmj* 314:796-800

Perrot-Applanat M, Cohen-Solal K, Milgrom E, Finet M (1995) Progesterone receptor expression in human saphenous veins. *Circulation* 92:2975-83

Petitti DB, Wingerd J, Pellegrin F, Ramcharan S (1979) Risk of vascular disease in women. Smoking, oral contraceptives, noncontraceptive estrogens, and other factors. *Jama* 242:1150-4

Pluss C, Werner ER, Wachter H, Pfeilschifter J (1997) Differential effect of dexamethasone on interleukin 1beta- and cyclic AMP-triggered expression of GTP cyclohydrolase I in rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol* 122:534-8

Popp R, Bauersachs J, Hecker M, Fleming I, Busse R (1996) A transferable, beta-naphthoflavone-inducible, hyperpolarizing factor is synthesized by native and cultured porcine coronary endothelial cells. *J Physiol* 497 (Pt 3):699-709

Porter JB, Hunter JR, Danielson DA, Jick H, Stergachis A (1982) Oral contraceptives and nonfatal vascular disease--recent experience. *Obstet Gynecol* 59:299-302

Quadt JF, Voss R, ten Hoor F (1982) Prostacyclin production of the isolated pulsatingly perfused rat aorta. *J Pharmacol Methods* 7:263-70

Quehenberger P, Loner U, Kapiotis S, Handler S, Schneider B, Huber J, Speiser W (1996) Increased levels of activated factor VII and decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thromb Haemost* 76:729-34

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-9

Rapaport SI, Rao LV (1995) The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 74:7-17

Rich-Edwards JW, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE (1995) The primary prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 332:1758-66

Rosenberg L, Hennekens CH, Rosner B, Belanger C, Rothman KJ, Speizer FE (1980) Oral contraceptive use in relation to nonfatal myocardial infarction. *Am J Epidemiol* 111:59-66

Rosenfeld CR, Cox BE, Roy T, Magness RR (1996) Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation. *J Clin Invest* 98:2158-66

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* 288:321-33

Rubanyi GM, Freay AD, Kauser K, Sukovich D, Burton G, Lubahn DB, Couse JF, Curtis SW, Korach KS (1997) Vascular estrogen receptors and endothelium-derived nitric oxide production in the mouse aorta. Gender difference and effect of estrogen receptor gene disruption. *J Clin Invest* 99:2429-37

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250:H1145-9

Rubanyl GM, Frye RL, Holmes DR, Jr., Vanhoutte PM (1987) Vasoconstrictor activity of coronary sinus plasma from patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 9:1243-9

Rubio AR, Morales-Segura MA (2004) Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Arch Med Res* 35:1-11

Sack MN, Rader DJ, Cannon RO, 3rd (1994) Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoproteins in postmenopausal women. *Lancet* 343:269-70

Sakuma I, Liu MY, Sato A, Hayashi T, Iguchi A, Kitabatake A, Hattori Y (2002) Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *Br J Pharmacol* 135:48-54

Sandow SL, Hill CE (2000) Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res* 86:341-6

Sartori TM, Maurizio PG, Sara P, Ugolino L, Annalisa A, Panagiotis T, Massimo F, Antonio G (1999) Relation between long-term steroid treatment after heart transplantation, hypofibrinolysis and myocardial microthrombi generation. *J Heart Lung Transplant* 18:693-700

Sartwell PE, Masi AT, Arthes FG, Greene GR, Smith HE (1969) Thromboembolism and oral contraceptives: an epidemiologic case-control study. *Am J Epidemiol* 90:365-80

Saruta T (1996) Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res* 19:1-8

Scarabin PY, Plu-Bureau G, Zitoun D, Bara L, Guize L, Samama MM (1995) Changes in haemostatic variables induced by oral contraceptives containing 50 micrograms or 30 micrograms oestrogen: absence of dose-dependent effect on PAI-1 activity. *Thromb Haemost* 74:928-32

Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JH (2003) Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 46 Suppl 1:S7-S16

Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R (1994) CGRP enhances induction of NO synthase in vascular smooth muscle cells via a cAMP-dependent mechanism. *Am J Physiol* 267:H2483-90

Schrader WT, Birnbaumer ME, Hughes MR, Weigel NL, Grody WW, O'Malley BW (1981) Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Recent Prog Horm Res* 37:583-633

Scott-Burden T, Vanhoutte PM (1994) Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex Heart Inst J* 21:91-7

Selbie LA, Hill SJ (1998) G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci* 19:87-93

Serova LI, Filipenko M, Schilt N, Veerasirikul M, Sabban EL (2006) Estrogen-triggered activation of GTP cyclohydrolase 1 gene expression: role of estrogen receptor subtypes and interaction with cyclic AMP. *Neuroscience* 140:1253-63

Serova LI, Maharjan S, Huang A, Sun D, Kaley G, Sabban EL (2004) Response of tyrosine hydroxylase and GTP cyclohydrolase I gene expression to estrogen in brain catecholaminergic regions varies with mode of administration. *Brain Res* 1015:1-8

Shanker G, Sorci-Thomas M, Adams MR (1994) Estrogen modulates the expression of tumor necrosis factor alpha mRNA in phorbol ester-stimulated human monocytic THP-1 cells. *Lymphokine Cytokine Res* 13:377-82

Shapiro S, Slone D, Rosenberg L, Kaufman DW, Stolley PD, Miettinen OS (1979) Oral-contraceptive use in relation to myocardial infarction. *Lancet* 1:743-7

Shaul PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749-74

Shi W, Meininger CJ, Haynes TE, Hatakeyama K, Wu G (2004) Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis and bioavailability in endothelial cells. *Cell Biochem Biophys* 41:415-34

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28:703-11

Shirotani M, Yui Y, Hattori R, Kawai C (1991) U-61,431F, a stable prostacyclin analogue, inhibits the proliferation of bovine vascular smooth muscle cells with little antiproliferative effect on endothelial cells. *Prostaglandins* 41:97-110

Shworak NW, Shirakawa M, Collic-Jouault S, Liu J, Mulligan RC, Birinyi LK, Rosenberg RD (1994) Pathway-specific regulation of the synthesis of anticoagulant active heparan sulfate. *J Biol Chem* 269:24941-52

Sidney S, Siscovick DS, Petitti DB, Schwartz SM, Quesenberry CP, Psaty BM, Raghunathan TE, Kelaghan J, Koepsell TD (1998) Myocardial infarction and use of low-dose oral contraceptives: a pooled analysis of 2 US studies. *Circulation* 98:1058-63

Simmer HH (1975) [On the beginnings of hormonal contraception (author's transl)]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 35:688-96

Simmons WW, Ungureanu-Longrois D, Smith GK, Smith TW, Kelly RA (1996) Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. *J Biol Chem* 271:23928-37

Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, Baldacci C, Genazzani AR (2004) Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology* 145:5745-56

Sitruk-Ware R (2000) Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids* 65:651-8

Sitruk-Ware R (2004) Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* 47:277-83

Sjoberg HE, Blomback M, Granberg PO (1976) Thromboembolic complications, heparin treatment in increase in coagulation factors in Cushing's syndrome. *Acta Med Scand* 199:95-8

Smyth EM, FitzGerald GA (2002) Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm* 65:149-65

Sneddon JM, Vane JR (1988) Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2800-4

Sorensen MB, Collins P, Ong PJ, Webb CM, Hayward CS, Asbury EA, Gatehouse PD, Elkington AG, Yang GZ, Kubba A, Pennell DJ (2002) Long-term use of contraceptive depot medroxyprogesterone acetate in young women impairs arterial endothelial function assessed by cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 106:1646-51

Sowa G, Liu J, Papapetropoulos A, Rex-Haffner M, Hughes TE, Sessa WC (1999) Trafficking of endothelial nitric-oxide synthase in living cells. Quantitative evidence supporting the role of palmitoylation as a kinetic trapping mechanism limiting membrane diffusion. *J Biol Chem* 274:22524-31

Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LA, Thorogood M, MacRae KD (1996) Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *Bmj* 312:83-8

Stadel BV (1981a) Oral contraceptives and cardiovascular disease (first of two parts). *N Engl J Med* 305:612-8

Stadel BV (1981b) Oral contraceptives and cardiovascular disease (second of two parts). *N Engl J Med* 305:672-7

Stamler J, Mendelsohn ME, Amarante P, Smick D, Andon N, Davies PF, Cooke JP, Loscalzo J (1989) N-acetylcysteine potentiates platelet inhibition by endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 65:789-95

Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Speizer FE, Hennekens CH (1990) Past use of oral contraceptives and cardiovascular disease: a meta-analysis in the context of the Nurses' Health Study. *Am J Obstet Gynecol* 163:285-91

Svensson LO, Johnson SH, Olsson SE (1994) Plasma concentrations of medroxyprogesterone acetate, estradiol and estrone following oral administration of Klimaxil, Trisequence/Provera and Divina. A randomized, single-blind, triple cross-over bioavailability study in menopausal women. *Maturitas* 18:229-38

Tanis BC, van den Bosch MA, Kemmeren JM, Cats VM, Helmerhorst FM, Algra A, van der Graaf Y, Rosendaal FR (2001) Oral contraceptives and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 345:1787-93

Tapper H, Herwald H (2000) Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood* 96:2329-37

The Writing Group for the PEPI Trial. (1995a) Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *Jama* 273:199-208

Thompson EA, Howard MA (1986) Proteolytic cleavage of human von Willebrand factor induced by enzyme(s) released from polymorphonuclear cells. *Blood* 67:1281-5

Truss M, Beato M (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14:459-79

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A (1994) Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 90:583-612

Ungvari Z, Csiszar A, Koller A (2002) Increases in endothelial Ca(2+) activate K(Ca) channels and elicit EDHF-type arteriolar dilation via gap junctions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1760-7

Vallance P (2001) Nitric oxide. *Biologist (London)* 48:153-8

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989a) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2:997-1000

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989b) Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. *Cardiovasc Res* 23:1053-7

Van Buren GA, Yang DS, Clark KE (1992) Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 167:828-33

Vanhoutte PM (1982) Role of the endothelium in control of vascular smooth muscle function. *Verh K Acad Geneeskde Belg* 44:411-8

Vanhoutte PM (2000) Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* 81:271-7

Vanhoutte PM, Rimele TJ (1982) Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J Physiol (Paris)* 78:681-6

Vessey M, Mant D, Smith A, Yeates D (1986) Oral contraceptives and venous thromboembolism: findings in a large prospective study. *Br Med J (Clin Res Ed)* 292:526

Vessey MP, Doll R (1968) Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. *Br Med J* 2:199-205

Wagner AH, Schroeter MR, Hecker M (2001) 17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *Faseb J* 15:2121-30

Walford G, Loscalzo J (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 1:2112-8

Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, Kleinert H, Lehr HA, Lemmer B, Forstermann U (1999) Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13357-62

Wedgwood S, Black SM (2003) Molecular mechanisms of nitric oxide-induced growth arrest and apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells. *Nitric Oxide* 9:201-10

Wehling M (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59:365-93

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5212-6

Welter BH, Hansen EL, Saner KJ, Wei Y, Price TM (2003) Membrane-bound progesterone receptor expression in human aortic endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 51:1049-55

White DG, Martin W (1989) Differential control and calcium-dependence of production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 97:683-90

Whitworth JA (1994) Studies on the mechanisms of glucocorticoid hypertension in humans. *Blood Press* 3:24-32

WHO (1995) Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Lancet* 346:1575-82

WHO (1996a) Haemorrhagic stroke, overall stroke risk, and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. *WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Lancet* 348:505-10

WHO (1996b) Ischaemic stroke and combined oral contraceptives: results of an international, multicentre, case-control study. *WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Lancet* 348:498-505

WHO (1997) Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. *WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Lancet* 349:1202-9

WHO (1998) Cardiovascular disease and steroid hormone contraceptives; *Progress in Human Reproduction Research* (Editor: J Khanna) 46:1-12

WHO (1999) Essential Drugs; WHO Drug Information 13:249-262

Wiegratz I, Kuhl H (2004) Progestogen therapies: differences in clinical effects? Trends Endocrinol Metab 15:277-85

Wilcox JG, Hwang J, Hodis HN, Sevanian A, Stanczyk FZ, Lobo RA (1997) Cardioprotective effects of individual conjugated equine estrogens through their possible modulation of insulin resistance and oxidation of low-density lipoprotein. Fertil Steril 67:57-62

Williams JK, Adams MR, Klopfenstein HS (1990) Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. Circulation 81:1680-7

Williams JK, Anthony MS, Honore EK, Herrington DM, Morgan TM, Register TC, Clarkson TB (1995) Regression of atherosclerosis in female monkeys. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:827-36

Williams JK, Cline JM, Honore EK, Delansorne R, Paris J (1998) Coadministration of norgestrel acetate does not diminish the beneficial effects of estradiol on coronary artery dilator responses in nonhuman primates (*Macaca fascicularis*). Am J Obstet Gynecol 179:1288-94

Wink DA, Mitchell JB (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med 25:434-56

Wu KK (1996) Endothelial prostaglandin and nitric oxide synthesis in atherogenesis and thrombosis. J Formos Med Assoc 95:661-6

Yin K, Chu ZM, Beilin LJ (1992) Study of mechanisms of glucocorticoid hypertension in rats: endothelial related changes and their amelioration by dietary fish oils. Br J Pharmacol 106:435-42

Zachary I (2001) Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. Am J Physiol Cell Physiol 280:C1375-86

Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME (2002) Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295:505-8

Zygmunt PM, Ryman T, Hogestatt ED (1995) Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. *Acta Physiol Scand* 155:257-66