

► Les récepteurs des œstrogènes (ER) sont utilisés comme cibles thérapeutiques soit en les activant (par exemple dans le cas de la contraception ou de la ménopause), soit en les inhibant (comme pour le cancer du sein). Cependant, l'idéal serait de cibler chaque tissu spécifiquement. Certains modulateurs (les SERM, *selective estrogen receptor modulator*), spécifiques du récepteur alpha des œstrogènes (ER $\alpha$ ), sont capables partiellement de réaliser ce ciblage spécifique. Il est donc important de comprendre la spécificité tissulaire de l'action de ER $\alpha$  afin d'optimiser le rapport bénéfique/risque de ces modulateurs. À côté de sa fonction nucléaire classique comme facteur de transcription, une fraction extranucléaire d'ER $\alpha$  relaye des actions rapides membranaires des œstrogènes. De nouveaux modèles de souris transgéniques ont récemment permis de dévoiler, dans chaque tissu, les rôles physiologiques et spécifiques des effets nucléaires et des effets membranaires d'ER $\alpha$ . ◀

Les récepteurs nucléaires interviennent, de manière spécifique pour chaque tissu, dans la transcription de gènes cibles impliqués dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques, comme le métabolisme des glucides et des lipides, l'inflammation, certains cancers et les maladies cardiovasculaires. Les récepteurs des œstrogènes (ER), ER $\alpha$  et ER $\beta$ , appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, facteurs de transcription dont le rôle est essentiel non seulement pour la reproduction féminine mais aussi masculine. ER $\alpha$  intervient également dans le maintien de l'homéostasie de nombreux tissus extra-reproducteurs. Le traitement hormonal de la ménopause et la contraception sont les principaux domaines médicaux qui s'intéressent à la modulation d'ER $\alpha$ . ER $\alpha$  est par ailleurs utilisé comme une cible majeure des thérapies adjuvantes anti-hormonales, pour les traitements des cancers du sein ER $\alpha$  positifs

## Effets membranaires du récepteur alpha des œstrogènes

### Une question de spécificité tissulaire

Marine Adlanmerini, Aurélie Fabre, Frédéric Boudou, Élodie Riant, Coralie Fontaine, Henrik Laurell, Pierre Gourdy, Françoise Lenfant, Jean-François Arnal

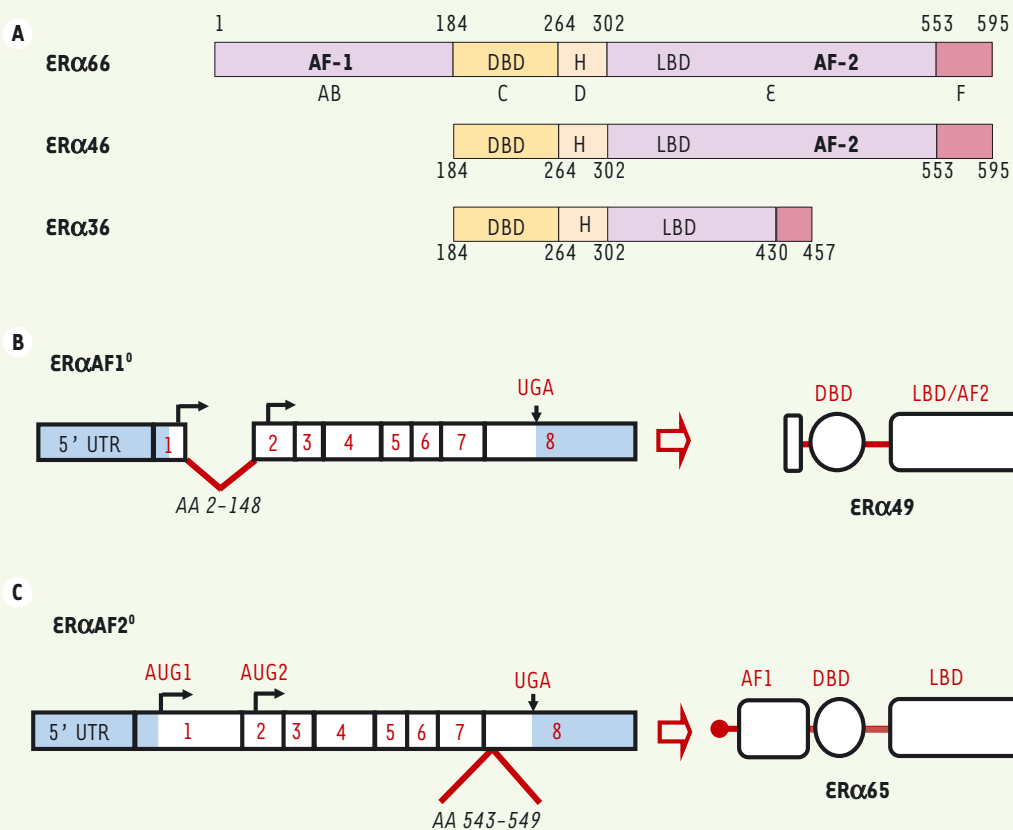


Inserm U1048-Université Paul Sabatier, I2MC, CHU Rangueil, 1, avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse, France.  
[marine.adlanmerini@gmail.com](mailto:marine.adlanmerini@gmail.com)  
[francoise.lenfant@inserm.fr](mailto:francoise.lenfant@inserm.fr)

(ou hormono-dépendants), afin d'assurer un blocage de la croissance des cellules tumorales et prévenir une éventuelle récidive.

La synthèse endogène d'œstrogènes, et principalement de 17 $\beta$ -œstradiol (E2), diminue au moment de la ménopause (qui intervient en moyenne à l'âge de 51 ans). Ces hormones sexuelles peuvent donc être considérées comme n'étant pas essentielles après la vie reproductive. Cependant, cette chute des taux hormonaux conduit souvent à des troubles fonctionnels (syndrome climatérique affectant la qualité de vie) ainsi qu'à la perte de la protection vasculaire, métabolique et osseuse, démontrant un rôle important des œstrogènes dans ces tissus et ces fonctions extra-reproductrices. Un traitement hormonal substitutif (THS) basé sur la supplémentation en œstrogène associé à un progestatif, est utilisé pour prévenir le syndrome climatérique associé à la ménopause et pour conserver l'ensemble des effets protecteurs des œstrogènes. Cependant, l'étude *Women Health Initiative* (WHI)<sup>1</sup> a mis un frein à l'utilisation de ce traitement en rapportant un risque accru de thrombose veineuse et de cancer du sein, et révélant un impact délétère sur les maladies coronariennes. Une nouvelle analyse de ces études nuance toutefois cette conclusion, en rapportant que le

<sup>1</sup> L'initiative sur la santé des femmes (WHI) est une étude à long terme axée sur les stratégies de prévention des maladies cardiaques, des cancers du sein et colorectal et des fractures ostéoporotiques chez les femmes ménopausées. Commencée en 1993, elle compte 161 808 femmes âgées de 50 à 79 ans.



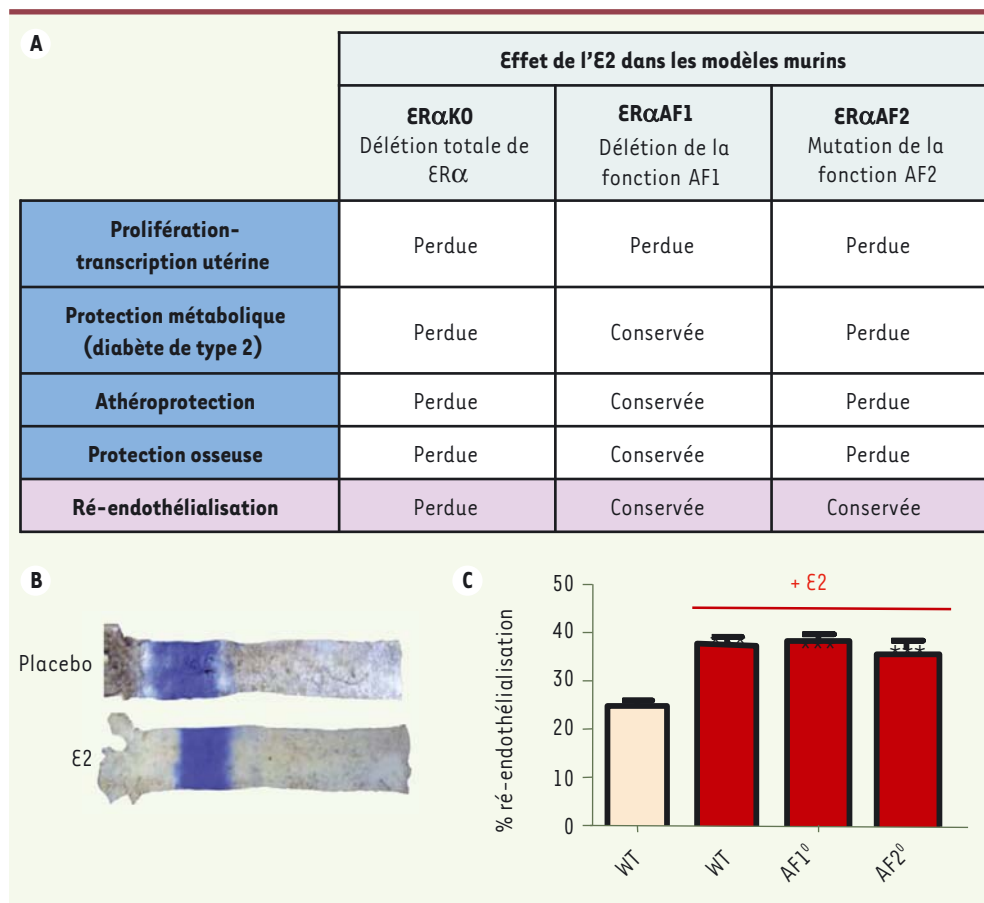
**Figure 1. Isoformes d'ER $\alpha$  et construction des modèles murins mutés pour les fonctions AF1 ou AF2 de ER $\alpha$ .** A. Structure des différentes isoformes du récepteur alpha des œstrogènes, ER $\alpha$ . DBD : DNA-binding domain ; H : hinge region ; LBD : ligand binding domain ; AF1, AF2 : fonctions de transactivation. B, C. Schématisation de la construction des modèles murins ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup> et ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>. AA : acides aminés ; AUG : codon d'initiation.

sur-risque coronarien n'apparaît que chez les femmes les plus âgées (ce qui est probablement dû à la prise du traitement après 20 ans de ménopause, et donc après une longue période de carence œstrogénique). Il semble donc que le mode d'administration du THS soit la clé de l'augmentation du risque de thrombose ; le type de progestatif utilisé apparaît aussi crucial pour le risque de cancer [1, 2]. Des modulateurs sélectifs des ER (SERM, *selective estrogen receptor modulator*)<sup>2</sup> ont été développés dans le cadre du cancer du sein car ils conservent certaines actions bénéfiques (sur l'os par exemple) et s'opposent à certains effets délétères des œstrogènes, en particulier sur la prolifération du cancer du sein ER-positif [3]. Le SERM le plus utilisé est le tamoxifène, mais on a recours également au raloxifène. Des mécanismes de résistance tumorale à ces traitements apparaissent dans environ la moitié des cas [4, 5]. La recherche de nouveaux SERM est par conséquent nécessaire pour le traitement de la ménopause, mais également pour le cancer du sein. Ceci requiert une meilleure compréhension du mode d'action de leur cible, le récepteur ER $\alpha$ .

### Le récepteur alpha des œstrogènes (ER $\alpha$ ) : un récepteur nucléaire

Le récepteur alpha des œstrogènes (ER $\alpha$ ) a une activité nucléaire de facteur de transcription en régulant la transcription de gènes cibles en réponse au 17 $\beta$ -œstradiol (E2) [6]. Il comporte deux fonctions de transactivation : AF1 (*activation function 1*) située dans la région amino-terminale de la molécule, et AF2, dans sa région carboxy-terminale. Ces fonctions sont caractéristiques de la plupart des récepteurs nucléaires, et correspondent aux deux domaines actifs qui permettent le recrutement des protéines co-régulatrices modulant l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . Il existe plusieurs isoformes d'ER $\alpha$  (de 66, 46 ou 36 kDa) qui présentent ou non les fonctions AF1 et/ou AF2 (Figure 1A). La fonction AF2 est composée de plusieurs hélices dont l'hélice 12, située dans le domaine de liaison du ligand (*ligand binding domain*, LBD) du récepteur. Le détail de cette structure, révélé par cristallographie aux rayons X, montre que la fixation de

<sup>2</sup> Les SERM sont des molécules capables de se fixer sur les récepteurs des œstrogènes et d'avoir une action à la fois agoniste et antagoniste des œstrogènes.



**Figure 2. Mise en évidence des effets membranaires d'ER $\alpha$  au travers d'un modèle de ré-endothélialisation.** **A.** Résumé de la dissection moléculaire du rôle des fonctions de trans-activation AF1 et AF2 d'ER $\alpha$  *in vivo*. Le modèle de ré-endothélialisation apparaît en rouge, il met en évidence le rôle des effets membranaires *in vivo*. **B.** Illustration de l'effet de l'E2 dans le modèle de ré-endothélialisation : 3 jours après la lésion électrique de la carotide, le marquage au bleu Evans permet de visualiser la zone non cicatrisée ; l'E2 accélère la migration et la prolifération des cellules endothéliales composant l'intima (tunique interne d'un vaisseau sanguin). **C.** Conservation de l'effet de l'E2 sur la cicatrisation endothéliale dans les mutants nucléaires ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup> et ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>. WT : sauvage.

certain ligands modifie la conformation et le positionnement de cette hélice 12 et donc d'AF2, permettant alors les interactions avec des protéines de corégulation [7]. À l'inverse, la fonction AF1 est située dans le domaine amino-terminal de la protéine (Figure 1A), dont la structure, très labile, n'a pas pu encore être cristallographiée. Dans le cas des récepteurs des hormones stéroïdiennes, AF1 est souvent la fonction de transcription la plus active. Cependant, pour ER $\alpha$ , les deux domaines AF1 et AF2 peuvent entrer en synergie pour le recrutement de différents corégulateurs, selon un contexte qui diffère d'une cellule à l'autre et selon l'environnement du promoteur du gène cible [8-12]. Une interaction entre les domaines A (contenant la fonction AF1) et le domaine E (contenant la fonction AF2) de la protéine, a été mise en évidence suggérant qu'en réponse à la liaison de l'E2, le repositionnement de l'hélice 12 du domaine de fixation du ligand démasque et active non seulement la fonction AF2, mais aussi la fonction AF1, en libérant le domaine A de la protéine [13].

Jusqu'à des études récentes, on pensait que seuls le type d'interaction et le niveau d'expression cellulaire des protéines corégulatrices (coactivateurs ou corépresseurs) des fonctions AF1 et AF2, déterminaient « l'ensemble récepteur-ligand-gène » conduisant soit à la stimulation, soit à l'inhibition, des effets biologiques tissus-spécifiques des œstrogènes [14]. La compréhension des spécificités cellulaires et tissulaires de ER $\alpha$  est d'une importance cruciale car elle conditionne l'optimisation de la synthèse et de l'utilisation

des SERM. Cette question est cependant difficilement abordable *in vitro* avec des lignées cellulaires, et nécessite une approche intégrée *in vivo*. L'utilisation de souris transgéniques a récemment permis d'apporter une dissection moléculaire *in vivo* et un éclairage nouveau sur les mécanismes de spécificité cellulaire et tissulaire de ER $\alpha$ . Grâce à l'Institut clinique de la souris<sup>3</sup> et de Pierre Chambon (Strasbourg, France), nous avons pu explorer le rôle et les fonctions des domaines AF1 et AF2 de ER $\alpha$ , en créant des souris transgéniques qui expriment une forme du récepteur ER $\alpha$  délétée spécifiquement, soit du domaine AB (souris ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup>), soit de sept acides aminés de l'hélice 12 du domaine AF2 (souris ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>) (Figure 1B, C) [15, 16]. Dans le modèle ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>, la grande majorité des effets bénéfiques de l'E2 sont abolis (athéroprotection, prévention du diabète de type 2 induit par une alimentation riche en graisse, déminéralisation osseuse) ainsi que ses effets délétères prolifératifs sur l'utérus [15, 17]. À l'inverse, dans le modèle de souris ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup>, ces effets bénéfiques sont conservés, démontrant que

<sup>3</sup> L'Institut Clinique de la Souris (ICS) est une infrastructure spécialisée dans la recherche translationnelle et la génomique fonctionnelle.

la fonction AF1 n'est pas nécessaire pour les effets bénéfiques du récepteur, mais les effets délétères prolifératifs sur l'utérus sont abolis [16, 18]. Ceci met donc en évidence une spécificité tissulaire dépendante des fonctions AF1 ou AF2, sur laquelle pourrait s'appuyer une stratégie de traitement (Figure 2A). Il est intéressant de noter que dans le modèle ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup>, qui présente une délétion du domaine AB, une isoforme tronquée de la protéine, de 49 kDa, proche de l'isoforme endogène de 46 kDa qui ne possède pas de fonction AF1, est générée (Figure 1B). Il apparaît donc que l'isoforme tronquée de 46 kDa est suffisante pour obtenir les effets vasculaires et métaboliques de l'E2 ; l'isoforme de pleine taille, de 66 kDa, est nécessaire pour les effets prolifératifs de l'hormone sur l'utérus (Figure 2A). De plus, la fonction AF2 est essentielle pour l'effet transcriptionnel de l'E2, à la fois sur l'utérus [18] et sur le foie (résultats non publiés), démontrant le rôle clé de cette fonction dans les effets nucléaires transcriptionnels de l'hormone. Korach *et al.* ont développé un autre modèle de souris altérée au niveau de ER $\alpha$ AF2 (AF2ERKI), en mutant les leucines 543 et 544 de l'hélice 12 en alanines [19]. Ce modèle a également révélé une hypoplasie utérine et des glandes mammaires rudimentaires. Ainsi, les deux modèles murins mutés sur la fonction AF2 présentent un phénotype similaire avec une absence de réponse transcriptionnelle à l'E2, faisant du modèle ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> un modèle d'inactivation des effets nucléaires d'ER $\alpha$  en réponse à l'E2.

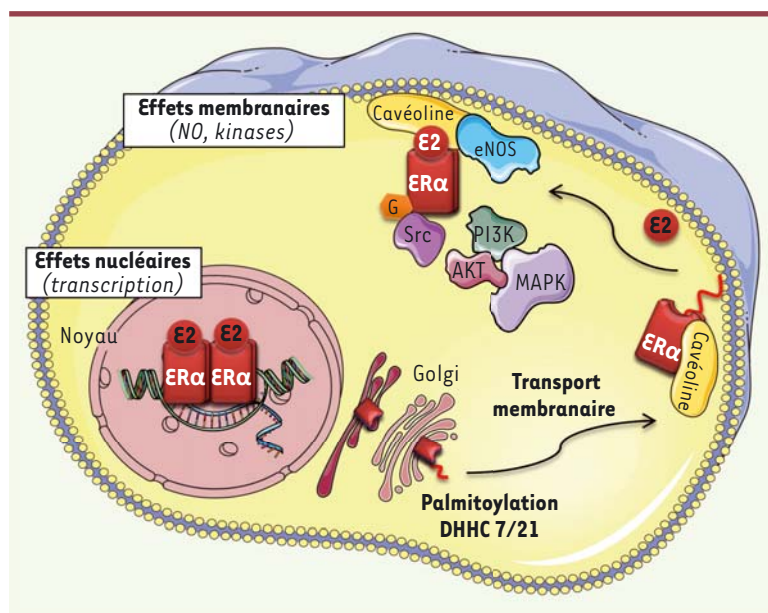
Au cours de cette dissection moléculaire du rôle des fonctions AF1 et AF2 d'ER $\alpha$ , réalisée *in vivo*, nous avons également montré, dans un modèle de cicatrisation endothéliale de la carotide (Figure 2B), que l'accélération de la ré-endothélialisation (migration suivie de la prolifération de cellules endothéliales) induite par l'E2 est un processus qui ne dépend ni d'AF1, ni d'AF2 (ces effets de l'E2 étant perdus chez les souris ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup> mais également chez les souris ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>) [15, 17]. Pourtant, cet effet nécessite ER $\alpha$  mais pas ER $\beta$  (Figure 2 A, C) [49]. Cette observation surprenante nous a amenés à suspecter fortement l'implication d'une autre fonction d'ER $\alpha$  dans cet effet de protection endothéliale, et particulièrement celle de la fonction extranucléaire du récepteur.

### **Des effets rapides des œstrogènes aux effets membranaires : structure, conformation et signalisation du ER $\alpha$ membranaire**

À côté de sa fonction nucléaire classique de facteur de transcription, de nombreuses études montrent qu'une fraction d'ER $\alpha$  est également localisée à la membrane de la cellule, et participe ainsi à une signalisation membranaire (appelée effets membranaires pour MISS : *membrane initiated steroid signaling*). Celle-ci a été initialement identifiée dans les actions rapides que présentent les œstrogènes (activation induite rapidement, de la seconde à plusieurs minutes). Dans des cellules endothéliales en culture, cette signalisation membranaire d'ER $\alpha$ , induite par E2, conduit à une activation aiguë de la monoxyde d'azote synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) qui peut être inhibée à la fois par le ICI 182,780, un antagoniste de ER, et par le tamoxifène [20]. Un rôle potentiel d'ER $\beta$  a également été suggéré mais, par l'utilisation des modèles de sou-

ris transgéniques, nous avons pu clairement montrer que les deux principaux effets endothéliaux de l'E2 (correspondant à la stimulation de la production de monoxyde d'azote endothélial et la migration cellulaire) étaient médiés par ER $\alpha$  et non par ER $\beta$  [21, 22]. Si de nombreuses études se sont concentrées sur le rôle de ER $\alpha$ 66, l'isoforme d'ER $\alpha$  de 66 kDa, il apparaît que l'isoforme tronquée ER $\alpha$ 46 pourrait également être à l'origine des effets membranaires du récepteur [23, 24]. Comme évoqué précédemment, l'accélération de la cicatrisation endothéliale, induite par l'E2, persiste dans les modèles ER $\alpha$ AF1<sup>0</sup> qui n'expriment que la forme tronquée de 46/49 kDa du récepteur. Cette isoforme de la protéine est donc capable de médier les effets extranucléaires vasculaires attribués à ER $\alpha$  [15, 25]. L'isoforme ER $\alpha$ 36, qui ne possède ni la fonction AF1, ni la fonction AF2, a été retrouvée à la membrane des cellules. Cette isoforme pourrait être impliquée dans la signalisation membranaire d'ER $\alpha$ , notamment, dans des cellules de cancer du sein, qui n'expriment aucune des autres isoformes du récepteur [26].

Le fractionnement des membranes plasmiques de cellules endothéliales a révélé une association de ER $\alpha$  extranucléaire avec en particulier, mais pas exclusivement, des cavéoles dans lesquelles le récepteur participe à une véritable plateforme de signalisation [20] (Figure 3). Une fraction d'ER $\alpha$  est en effet adressée à la membrane cytoplasmique grâce à la palmitoylation de la cystéine 447 qui permet son interaction avec la cavéoline-1 [27, 28] (Figure 3). Dans les artères ou les cellules endothéliales en culture, l'activation rapide de la eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) induite par l'E2 via ER $\alpha$ , implique plusieurs kinases : PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*), AKT (*protein kinase B*), et ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) 1/2 [20] (Figure 3). Deux acteurs moléculaires apparaissent également être des partenaires directs d'ER $\alpha$  : 1) c-Src dont le domaine SH2 (*Src homology 2*) interagit avec la Tyr537 phosphorylée d'ER $\alpha$  [29, 30] et 2) p85 $\alpha$ , la sous-unité régulatrice de PI3K. De manière intéressante, la méthylation transitoire d'ER $\alpha$  au niveau de l'Arg260 par l'arginine méthyltransférase PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*), semble nécessaire pour que ces interactions aient lieu [31]. En effet, des mutations ponctuelles, localisées dans le domaine de liaison aux protéines G présent sur ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -R256A, -D258A ou -R260A), ont permis pour la première fois d'obtenir des mutants ayant perdu les effets membranaires du récepteur *in vitro* (c'est-à-dire activation de la eNOS), mais conservant ses effets nucléaires (transcription génique), soulignant ainsi le rôle clé des résidus R256 et R258 dans la signalisation



**Figure 3. Représentation schématique de l'adressage membranaire d'ER $\alpha$ .** En parallèle de l'activité nucléaire d'ER $\alpha$ , ER $\alpha$  peut être palmitoylé et, ainsi, transporté à la membrane cytoplasmique, où il interagit avec la cavéoline. En présence d'E2, ER $\alpha$  va former une véritable plateforme de signalisation membranaire conduisant notamment à l'activation de l'eNOS (production de monoxyde d'azote [NO]) et à l'activation de nombreuses kinases impliquées dans des voies de prolifération et/ou de migration cellulaire. DHHC 7/21 : palmitoylacyltransférases 7/21.

### Approches pharmacologiques et génétiques pour étudier les effets membranaires d'ER $\alpha$ *in vivo*

Jusqu'à ces dernières années, notre capacité à distinguer rigoureusement les activités nucléaires et extranucléaires d'ER $\alpha$  était limitée. Concernant les approches pharmacologiques, l'E2 conjugué à l'albumine sérique bovine (afin d'empêcher son passage au travers de la membrane plasmique) a été utilisé initialement, principalement *in vitro*, mais sa stabilité est restée incertaine. Par la suite, J. Katzenellenbogen *et al.* ont synthétisé l'EDC (*estrogen dendrimer conjugate*), un œstrogène conjugué par une liaison covalente stable à un dendrimère afin d'empêcher sa pénétration dans le noyau cellulaire [39].

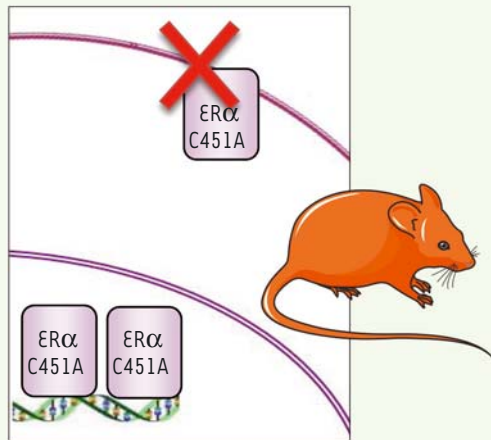
Lorsqu'il est administré *in vivo*, l'EDC n'active pas la transcription dépendante du ligand, comme en témoigne l'absence d'hypertrophie utérine et de régulation de l'expression génique dans l'utérus et le foie [40]. Cependant, comme l'E2, il est capable de stimuler *in vitro*, la prolifération et la migration de cellules endothéliales, et accélère la ré-endothélialisation, dans le modèle de cicatrisation endothéliale [40] (Figure 4). De manière très intéressante, l'activation par l'EDC des effets extranucléaires d'ER $\alpha$ , dont la voie impliquant ERK 1/2, ne stimule pas la croissance des cellules MCF-7, une lignée de cellules tumorales mammaires humaines, ni *in vitro*, ni *in vivo* (dans un modèle de xénotgreffe chez la souris) [40]. L'EDC peut donc potentiellement être utilisé pour conférer une protection vasculaire, sans être à l'origine d'une augmentation du risque de cancer. Ainsi, l'EDC peut être considéré comme le premier SERM sélectif des effets extranucléaires, ou membranaires, d'ER $\alpha$ . Il permet l'activation des effets bénéfiques sur l'endothélium, mais n'induit pas la prolifération des cellules de cancer du sein.

Pour étudier *in vivo*, par des approches génétiques, les effets membranaires d'ER $\alpha$ , il était d'abord nécessaire de comprendre le mécanisme d'adressage et d'ancrage

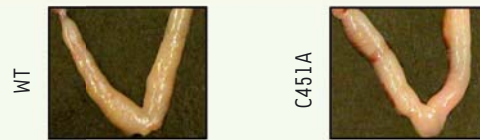
extranucléaire induite par ER $\alpha$  [32]. Outre l'activation de la eNOS au niveau de l'endothélium, des effets membranaires du récepteur ont également été décrits dans de nombreux autres types cellulaires. Ils induisent des voies de signalisation différentes comme les flux de calcium, la production d'AMPC et l'activation de nombreuses kinases (MEK [MAPK (*mitogen-activated protein kinases*)/ERK kinase], PI3K), impactant ainsi la prolifération et la migration cellulaire [20, 33]. Par ailleurs, cette signalisation d'origine membranaire peut également moduler l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  *via* l'activation de kinases qui phosphorylent le récepteur nucléaire et modulent ainsi son activité nucléaire [34].

En ce qui concerne l'étude de la conformation de l'ER $\alpha$  membranaire, la topologie du récepteur associé avec la membrane plasmique n'en est encore qu'à ses balbutiements. Il a été montré qu'ER $\alpha$ , sous forme de monomère, active la eNOS [35], mais la présence de dimère du récepteur a également été mise en évidence à la membrane plasmique [36]. La question de la configuration du récepteur, au niveau de la membrane, reste donc une question ouverte. Les études menées par le groupe de Bender, consistant à faire exprimer à des cellules une forme de ER $\alpha$ 46 marquée soit en amino-terminal, soit en carboxy-terminal, semblent démontrer que cette isoforme présente un ectodomaine en position carboxy-terminale [24]. Il est donc probable qu'il existe, là encore, plusieurs conformations membranaires possibles d'ER $\alpha$ , en fonction de ses partenaires protéiques. Un problème conceptuel soulevé par de nombreuses études est la nécessité d'utiliser des doses très importantes, supra-physiologiques, afin d'obtenir les effets membranaires de certains récepteurs stéroïdiens comme celui de la progestérone [37]. L'étude de l'affinité du récepteur ER $\alpha$  membranaire, a montré une diminution modérée de son affinité lorsqu'il était dans cette forme, surtout en ce qui concerne ER $\alpha$ 46 [38]. Une autre approche possible pour aborder la question de la conformation membranaire d'ER $\alpha$  est l'utilisation des SERM (voir plus loin).

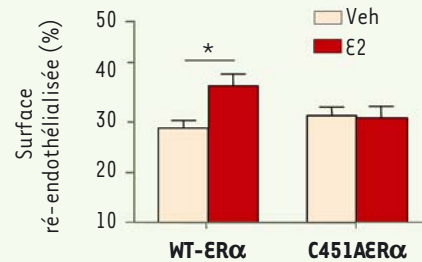
**A Absence d'effets membranaires**  
**C451A : mutation du site de palmitoylation**



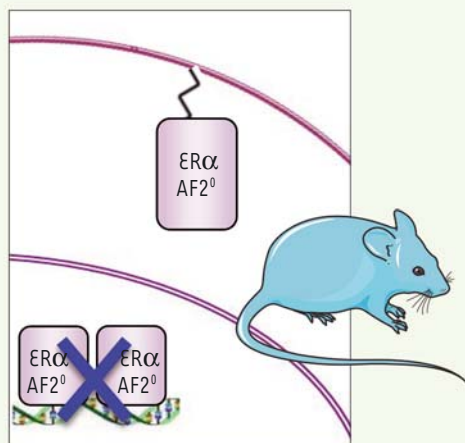
**Réponse utérine normale**



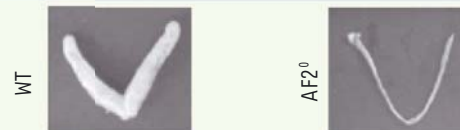
**Perte des effets vasculaires de l'E2**



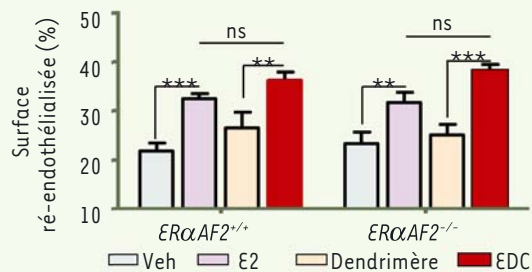
**B Absence d'effets nucléaires**  
**ERα-AF2<sup>0</sup> : délétion de 7 AA dans l'hélice 12**



**Perte de la réponse utérine**



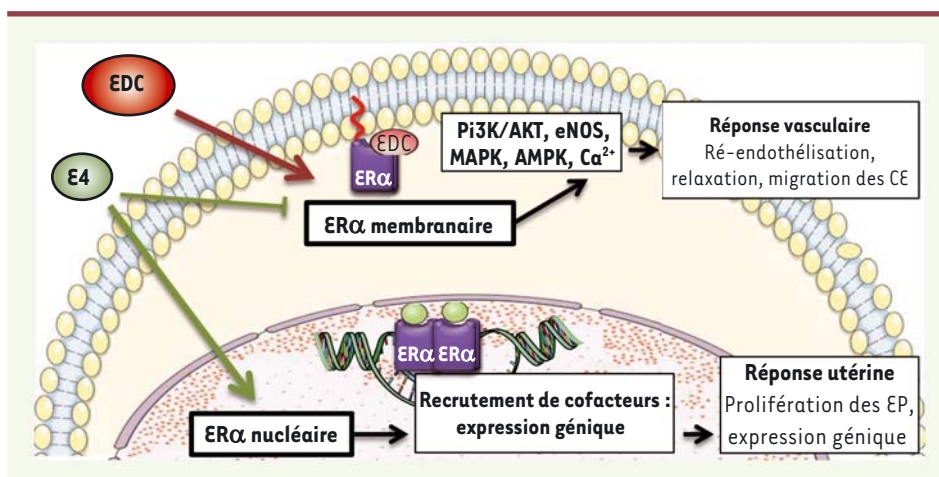
**Réponses vasculaires à l'E2 et à l'EDC normales**



**Figure 4. Mise en évidence de la spécificité tissulaire des effets membranaires et nucléaires d'ERα in vivo.** Dans le modèle murin ERαC451A (A), la réponse utérine à l'E2 est conservée alors que les effets vasculaires sont abolis. À l'inverse, dans le modèle ERαAF2<sup>0</sup> (B), la réponse utérine à l'E2 est abolie alors que les effets vasculaires sont conservés (données originales publiées dans l'article [18]). WT : sauvage ; Veh : véhicule ; EDC : estrogen dendrimer conjugate. AA : acides aminés ; ns : non significatif ; les astérisques indiquent des différences significatives.

du récepteur à la membrane plasmique de la cellule. Un site de palmitoylation, essentiel à la localisation membranaire de ERα, a été identifié au niveau de la Cys-447 d'ERα, qui est située dans le domaine de liaison du ligand [27, 41]. Sur la base de ces travaux, réalisés *in vitro*, nous avons donc généré un modèle de souris présentant une mutation ponctuelle au niveau de ce site de palmitoylation (C451AERα, Figure 4A) [18]. L'altération de la localisation membranaire d'ERα ainsi induite, a été confirmée *in vivo*, dans des hépatocytes primaires.

La souris femelle présentant la mutation C451AERα est totalement stérile. Cette infertilité est associée à une dysfonction ovarienne. Cependant, l'action de l'E2 sur l'utérus de ces souris est entièrement préservée : la régulation de l'expression génique (à l'exception de quelques gènes) et la prolifération de l'épithélium luminal de l'endomètre, sont en effet relativement similaires chez les souris mutantes C451AERα et chez



**Figure 5. Schématisation de la spécificité tissulaire des SERM (selective estrogen receptor modulator).** Exemples de l'E4 (Estérol), qui est un faible agoniste de l'activité nucléaire et un antagoniste de l'activité membranaire d'ER $\alpha$ , et de l'EDC (*estrogen dendrimer conjugate*), qui active uniquement les effets membranaires d'ER $\alpha$ . CE : cellules endothéliales ; EP : cellules épithéliales.

les souris de type sauvage. En revanche, les effets vasculaires de l'E2, comme l'activation de la eNOS, la vasorelaxation de l'artère mésentérique et l'accélération de la ré-endothélialisation, sont abrogés chez les souris mutantes (*Figure 4A*) [18]. Le modèle C451AER $\alpha$  est donc le premier modèle de perte de fonction spécifique de l'activité membranaire d'ER $\alpha$ . E. Levin a également généré un modèle de souris, nommé NOER (pour *nuclear only ER*), portant la même mutation ponctuelle d'ER $\alpha$  (C451A). Ces souris présentent un phénotype similaire aux souris C451AER $\alpha$ , en ce qui concerne la fertilité, mais une différence notable, en ce qui concerne le phénotype utérin [42]. Cette divergence, qui reste intrigante, pourrait résulter des stratégies utilisées pour la construction des deux modèles. Le modèle d'absence d'effets nucléaires ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup> que nous avons décrit précédemment, est complémentaire du modèle C451AER $\alpha$  pour étudier les rôles respectifs des effets membranaires et nucléaires de ER $\alpha$ . En effet, dans ce modèle, on observe que l'accélération de la ré-endothélialisation en réponse à l'E2, ou à l'EDC, est conservée (*Figure 4B*) alors que l'analyse à large échelle de l'expression génique en réponse à l'E2, au niveau de l'utérus, montre une perte presque totale des effets transcriptionnels en réponse à l'E2. Dans ce modèle ER $\alpha$ AF2<sup>0</sup>, les effets dits membranaires de l'E2 sont donc préservés tandis que ses effets nucléaires sont abolis. À l'inverse, dans le modèle C451A-ER $\alpha$ , la régulation de l'expression génique dans l'utérus est presque totalement conservée, alors que les effets membranaires vasculaires sont abolis [18]. Ces études ont donc permis, pour la première fois, de montrer le rôle physiologique d'ER $\alpha$  lorsqu'il est localisé à la membrane, mais aussi de différencier, par une approche de génétique, les effets nucléaires et membranaires d'un récepteur aux hormones stéroïdiennes, démontrant ainsi *in vivo* leur spécificité tissulaire (*Figure 4*).

### Vers une nouvelle vision de la spécificité tissulaire des SERM

Les résultats que nous avons présentés ici semblent réfuter l'hypothèse selon laquelle la spécificité tissulaire des SERM s'expliquerait uniquement par le recrutement par l'ER $\alpha$  nucléaire de panels différents de coactivateurs ou de corépresseurs [14, 43]. Pour les SERM déjà connus,

il a été montré, *in vitro*, que l'ICI 182,780 et le tamoxifène avaient une activité antagoniste sur l'induction de la eNOS [20]. *In vivo*, nous avons récemment confirmé que le tamoxifène n'accélère pas la ré-endothélialisation [44] mais qu'il antagonise l'effet de l'E2 sur ce processus membranaire (non publié). Il apparaît donc, à présent, que la spécificité tissulaire des SERM ne dépend pas seulement du recrutement des cofacteurs mais aussi d'une signalisation membranaire d'ER $\alpha$ . Cette spécificité peut désormais être étudiée en combinant l'utilisation des nouveaux modèles de souris transgéniques développés et des outils pharmacologiques sélectifs. L'EDC, composé synthétique d'une part, et l'estérol (E4), un œstrogène naturel produit uniquement pendant la grossesse d'autre part, semblent à cet égard tout à fait intéressants.

L'EDC qui, comme nous l'avons déjà évoqué, a permis l'étude *in vivo* des effets membranaires du récepteur, a également permis d'évaluer *in vitro*, l'impact de l'activation du ER $\alpha$  membranaire, sur la régulation de l'expression génique des cellules du cancer du sein MCF-7 [45]. L'analyse à large échelle du génome, par biopuces (*microarray*), des cellules stimulées, a conduit à l'identification, parmi les gènes induits par E2, d'un sous-ensemble de gènes (25 %) également sensibles à l'EDC. Le traitement par des antagonistes de ER $\alpha$ , ou son altération par la technique de siRNA (*small interfering RNA*), abolissent la stimulation, par l'EDC, de l'expression génique indiquant que ER $\alpha$  est à l'origine de cet effet membranaire sur la transcription. De plus, les inhibiteurs de MAP kinases et de c-Src suppriment la stimulation de l'expression génique induite par l'E2 et par l'EDC. L'analyse par immunoprécipitation de la chromatine, a révélé que l'EDC, contrairement à l'E2, est incapable de recruter ER $\alpha$  au niveau des séquences régulatrices des gènes cibles. Ces résultats suggèrent que, par

l'activation de kinases ou autres signaux, l'EDC initie des modifications au niveau des facteurs de transcription qui sont recrutés sur les régions régulatrices des gènes régulés [45].

L'estérol (E4) est un œstrogène produit uniquement par le foie fœtal durant la grossesse chez l'homme [46]. L'E4 a été découvert il y a plusieurs décennies, mais, considéré comme un œstrogène « faible » (c'est-à-dire de faible activité), il a longtemps été ignoré. En effet, bien que l'E4 ait une affinité 100 fois plus faible pour ER $\alpha$  que l'E2, nous avons montré que des doses élevées de cet œstrogène étaient capables d'induire les effets nucléaires d'ER $\alpha$ , conduisant à la prolifération épithéliale dans l'utérus et à la prévention de l'athérome dans des souris hypercholestérolémiques, et ceci de manière similaire à ce qu'on observe avec l'E2 [47]. Cependant, contrairement à l'E2, et avec les doses utilisées, l'E4 n'induit pas les effets membranaires du récepteur comme la libération de monoxyde d'azote endothélial et l'accélération de la ré-endothélialisation (Figure 5). En outre, l'E4 inhibe les effets membranaires de l'E2 sur l'endothélium, mais également sur des lignées de cancer du sein. L'E4 apparaît donc comme le premier et probablement le seul SERM endogène, capable d'activer les effets nucléaires d'ER $\alpha$  mais qui est dépourvu des effets membranaires du récepteur, pouvant même s'y opposer, en combinaison avec l'E2 [47]. Ainsi, l'EDC et l'E4 apparaissent comme deux outils pharmacologiques complémentaires. Il semble que l'E4 puisse présenter un intérêt médical : dans un essai clinique de phase II, il a été évalué en combinaison avec un progestatif, comme nouveau contraceptif oral. Il inhibe le pic d'hormone lutéinisante (LH), et donc l'ovulation, mais ne provoque pas de changement dans la synthèse des facteurs hépatiques circulants (C. Kluff Cornelis *et al.*, manuscrit en préparation) [50]. Il pourrait ainsi ne pas influencer sur les événements participant à la thrombose veineuse, contrairement aux produits pharmaceutiques comprenant de l'E2 ou de l'éthinylœstradiol [48]. Des données préliminaires indiquent clairement que dans le foie, la régulation de l'expression des gènes par ER $\alpha$  repose à la fois sur les effets nucléaires et membranaires du récepteur. Le découplage des effets membranaires et nucléaires par l'E4 pourrait donc, selon notre hypothèse, permettre d'atténuer les effets hépatiques des œstrogènes et donc présenter un profil *liver friendly*<sup>4</sup>, caractéristique unique pour un SERM.

## Conclusion

ER $\alpha$ , considéré jusqu'à récemment uniquement comme un récepteur nucléaire, peut présenter deux localisations subcellulaires qui lui permettent d'assurer les nombreuses fonctions physiologiques dans lesquelles il est impliqué. La répartition de ces localisations, nucléaires et/ou membranaires, pourrait être spécifique du tissu. Les effets physiologiques de ces *pools* de récepteurs résultent cependant d'une dynamique complexe entre les deux formes. Les mécanismes de régulation conduisant à l'une ou l'autre des deux localisations, leurs interactions et l'implication des différentes isoformes du récepteur, restent des questions ouvertes. Les réponses à ces questions dépendent

probablement du type, et même de l'état de différenciation, de la cellule. Il s'agit donc, à présent, d'étudier cette dynamique entre les différentes localisations de ER $\alpha$ , afin de mieux comprendre la spécificité d'action des œstrogènes, et ainsi d'optimiser la modulation du récepteur ER $\alpha$  dans le cadre du traitement de la ménopause et du cancer du sein.  $\diamond$

## SUMMARY

### Tissue-specific membrane effects of estrogen receptor alpha

Estrogen receptors (ER) are used as therapeutic targets, either for contraception or for the hormonal replacement therapy in menopausal women, but also in physiopathology for breast cancer treatment. It is therefore important to understand the tissue-specificity of the actions of ER $\alpha$  to optimize the benefits/risks ratio in each tissue. Besides the conventional nuclear ER $\alpha$  acting as a transcription factor, many studies have demonstrated that ER $\alpha$  is also able to mediate extra nuclear signaling, enabling rapid actions of estrogen. Recently, new transgenic mouse models were used to study these effects, and allowed to genetically segregate membrane versus nuclear actions of a steroid hormone receptor, demonstrating their *in vivo* tissue-specific roles.  $\diamond$

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, *et al.* Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 2007 ; 297 : 1465-77.
2. Lenfant F, Tremollieres F, Gourdy P, Arnal JF. Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: why protective early, and not when delayed? *Maturitas* 2011 ; 68 : 165-73.
3. McDonnell DP, Wardell SE. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2010 ; 10 : 620-8.
4. Palmieri C, Patten DK, Januszewski A, *et al.* Breast cancer: current and future endocrine therapies. *Mol Cell Endocrinol* 2014 ; 382 : 695-723.
5. Jiang Q, Zheng S, Wang G. Development of new estrogen receptor-targeting therapeutic agents for tamoxifen-resistant breast cancer. *Future Med Chem* 2013 ; 5 : 1023-35.
6. Heldring N, Pike A, Andersson S, *et al.* Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007 ; 87 : 905-31.
7. Lonard DM, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol* 2012 ; 8 : 598-604.
8. Kobayashi Y, Kitamoto T, Masuhiro Y, *et al.* p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 15645-51.
9. Metivier R, Penot G, Flouriot G, Pakdel F. Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains. *Mol Endocrinol* 2001 ; 15 : 1953-70.
10. Onate SA, Boonyaratankornkit V, Spencer TE, *et al.* The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 12101-8.

<sup>4</sup> Ami du foie.




## RÉFÉRENCES

11. Benecke A, Chambon P, Gronemeyer H. Synergy between estrogen receptor  $\alpha$  activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep* 2000 ; 1 : 151-7.
12. Zukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 1994 ; 8 : 21-30.
13. Metivier R, Stark A, Flouriot G, et al. A dynamic structural model for estrogen receptor- $\alpha$  activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* 2002 ; 10 : 1019-32.
14. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Biomedicine. Defining the S in SERMs. *Science* 2002 ; 295 : 2380-1.
15. Billon-Gales A, Krust A, Fontaine C, et al. Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor- $\alpha$  is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 13311-6.
16. Billon-Gales A, Fontaine C, Filipe C, et al. The transactivating function 1 of estrogen receptor $\alpha$  is dispensable for the vasculoprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 2053-8.
17. Adlanmerini M, Solihac R, Abot A, et al. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor  $\alpha$  in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : E283-90.
18. Handgraaf S, Riant E, Fabre A, et al. Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ER $\alpha$  activation function-2 (ER $\alpha$ AF-2), whereas ER $\alpha$ AF-1 is dispensable. *Diabetes* 2013 ; 62 : 4098-108.
19. Arao Y, Hamilton KJ, Ray MK, et al. Estrogen receptor  $\alpha$  AF-2 mutation results in antagonist reversal and reveals tissue selective function of estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 14986-91.
20. Wu Q, Chambliss K, Umetani M, et al. Non-nuclear estrogen receptor signaling in the endothelium. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 14737-43.
21. Brouchet L, Krust A, Dupont S, et al. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor- $\alpha$  but not estrogen receptor- $\beta$ . *Circulation* 2001 ; 103 : 423-8.
22. Darblade B, Bendaries C, Krust A, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the  $\alpha$ -, but not  $\beta$ -, estrogen receptor. *Circ Res* 2002 ; 90 : 413-9.
23. Russell KS, Haynes MP, Sinha D, et al. Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 5930-5.
24. Kim KH, Toomre D, Bender JR. Splice isoform estrogen receptors as integral transmembrane proteins. *Mol Biol Cell* 2011 ; 22 : 4415-23.
25. Kim KH, Bender JR. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol Cell Endocrinol* 2009 ; 308 : 3-8.
26. Chaudhri RA, Hadadi A, Lobachev KS, et al. Estrogen receptor- $\alpha$  36 mediates the anti-apoptotic effect of estradiol in triple negative breast cancer cells via a membrane-associated mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2014 ; 1843 : 2796-806.
27. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, et al. Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization: regulation by 17 $\beta$ -estradiol. *Mol Biol Cell* 2005 ; 16 : 231-7.
28. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, et al. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- $\alpha$  functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 ; 316 : 878-83.
29. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, et al. Steroid-induced androgen receptor- $\alpha$  estradiol receptor  $\beta$ -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 2000 ; 19 : 5406-17.
30. Li L, Hisamoto K, Kim KH, et al. Variant estrogen receptor- $\alpha$ -Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 16468-73.
31. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, et al. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008 ; 31 : 212-21.
32. Wu Q, Chambliss K, Lee WR, et al. Point mutations in the ER $\alpha$  Galphai binding domain segregate nonnuclear from nuclear receptor function. *Mol Endocrinol* 2013 ; 27 : 2-11.
33. Marino M, Ascenzi P. Membrane association of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  influences 17 $\beta$ -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 2008 ; 73 : 853-8.
34. La Rosa P, Pesiri V, Leclercq G, et al. Palmitoylation regulates 17 $\beta$ -estradiol-induced estrogen receptor- $\alpha$  degradation and transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2012 ; 26 : 762-74.
35. Chambliss KL, Simon L, Yuhanna IS, et al. Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ER $\alpha$  domains with known nuclear functions. *Mol Endocrinol* 2005 ; 19 : 277-89.
36. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, et al. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 2004 ; 18 : 2854-65.
37. Wendler A, Baldi E, Harvey BJ, et al. Position paper: rapid responses to steroids. Current status and future prospects. *Eur J Endocrinol* 2010 ; 162 : 825-30.
38. Lin AHY, Li RWS, Ho EYW, et al. Differential ligand binding affinities of human estrogen receptor- $\alpha$  isoforms. *PLoS One* 2013 ; 8 : e63199.
39. Harrington WR, Kim SH, Funk CC, et al. Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol* 2006 ; 20 : 491-502.
40. Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, et al. Non-nuclear estrogen receptor  $\alpha$  signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 2319-30.
41. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor  $\alpha$  variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 4807-12.
42. Pedram A, Razandi M, Lewis M, et al. Membrane-localized estrogen receptor  $\alpha$  is required for normal organ development and function. *Dev Cell* 2014 ; 29 : 482-90.
43. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 2004 ; 25 : 45-71.
44. Fontaine C, Abot A, Billon-Gales A, et al. Tamoxifen elicits atheroprotection through estrogen receptor  $\alpha$  AF-1 but does not accelerate reendothelialization. *Am J Pathol* 2013 ; 183 : 304-12.
45. Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, et al. Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2008 ; 22 : 2116-27.
46. Visser M, Foidart JM, Coelingh Bennink HJ. In vitro effects of estrol on receptor binding, drug targets and human liver cell metabolism. *Climacteric* 2008 ; 11 (suppl 1) : 64-8.
47. Abot A, Fontaine C, Buscato M, et al. The uterine and vascular actions of estrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor  $\alpha$  modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol Med* 2014 ; 10 : 1328-46.
48. Canonico M, Plu-Bureau G, Lowe GD, Scarabin PY. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008 ; 336 : 1227-31.
49. Brouchet L, Krust A, Dupont S, et al. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor- $\alpha$  but not estrogen receptor- $\beta$ . *Circulation* 2001 ; 103 : 423-8.
50. Mawet M, Maillard C, Klipping C, et al. Unique effects on hepatic function, lipid metabolism, bone and growth endocrine parameters of estrol in combined oral contraceptives. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2015 ; 20 : 463-75.

### TIRÉS À PART

M. Adlanmerini et F. Lenfant



**Tarifs d'abonnement m/s - 2014**

**Abonnez-vous**

**à médecine/sciences**

**> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales**

---

**Bulletin d'abonnement**

**page 1146 dans ce numéro de m/s**

