



**HAL**  
open science

# Expression et fonctionnalité des récepteurs aux oestrogènes dans la gliomagenèse des astrocytomes et leur progression maligne

Alex Hirtz

► **To cite this version:**

Alex Hirtz. Expression et fonctionnalité des récepteurs aux oestrogènes dans la gliomagenèse des astrocytomes et leur progression maligne. Cancer. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0319 . tel-04152715

**HAL Id: tel-04152715**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04152715>**

Submitted on 5 Jul 2023

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

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



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

## Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

### Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »**

par **Alex Hirtz**

## **Expression et fonctionnalité des récepteurs aux œstrogènes dans la gliomagenèse des astrocytomes et leur progression maligne**

**Le 13 Décembre 2022**

### **Membres du jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	M. Yves JACQUOT	Professeur, CiTCoM CNRS UMR8038, Université de Paris
	M. Jean-Marc VANACKER	Directeur de Recherche, IGFL CNRS UMR5242, Lyon
<b>Examineurs :</b>	Mme Marie-Justine GUERQUIN	Maître de Conférences, LDG UMR008, Université de Paris
	Mme Hélène DUMOND	Maître de Conférences, <b>directrice de thèse</b> CRAN CNRS UMR7039, Vandœuvre-lès-Nancy
	Mme Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER	Maître de Conférences, <b>co-directrice de thèse</b> CRAN CNRS UMR7039, Vandœuvre-lès-Nancy
<b>Président du jury :</b>	M. Luc TAILLANDIER	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CRAN CNRS UMR7039, CHRU de Nancy
<b>Membres invités :</b>	Mme Amélie DARLIX	Praticien Hospitalier, ICM, IGF CNRS UMR5203, Montpellier
	M. Tony AVRIL	Ingénieur-Biologiste, Centre Eugène Marquis INSERM UMR1242, Rennes



# Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux rapporteurs **Yves JACQUOT**, professeur et **Jean-Marc VANACKER**, directeur de recherche CNRS. Je tiens également à remercier les examinateurs **Luc TAILLANDIER**, professeur des universités et praticien hospitalier ainsi que **Marie-Justine GUERQUIN**, maître de conférences. Merci aux invités **Amélie DARLIX**, praticien hospitalier et **Tony AVRIL**, ingénieur-biologiste, d'avoir accepté mon invitation.

Je remercie également la direction du laboratoire et particulièrement **Muriel BARBERI-HEYOB** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe BioSiS. Je remercie aussi l'ensemble des membres de cette équipe pour m'avoir transmis une part de leur savoir et de l'atmosphère agréable qui règne au quotidien et qui fait que ces trois années sont passées rapidement.

Je tiens à remercier ma directrice **Hélène DUMOND** et ma co-directrice de thèse **Hélène DUBOIS-POT-SCHNEIDER** pour tout ce qu'elles m'ont apporté tout au long de cette thèse. J'ai apprécié nos discussions et votre vision de la recherche. Je m'estime très chanceux et je suis très reconnaissant d'avoir eu des directrices autant impliquées et attentives à ce travail. Je tiens aussi à souligner l'aisance avec laquelle il est de travailler avec vous deux. Hélène D, merci pour ta rigueur et ta justesse qui m'ont permis de progresser entre autres sur l'aspect rédactionnel. Hélène DPS, je tiens particulièrement à te remercier d'avoir mis en place et de m'avoir formé à la transcriptomique, un axe de travail qui m'a beaucoup plu.

Mes remerciements aux Amigos du CRAN, un dessin un peu nul qui est devenu l'emblème de notre petit groupe. **Yann**, les crises d'épilepsie provoquées par l'ouverture de tes tableurs risquent sans aucun doute de me manquer. Merci pour tout le travail que tu as réalisé au cours de ma thèse. Il est certain que sans ton aide précieuse, je n'aurais jamais réussi à produire autant de résultats. Je me souviendrai pendant longtemps de cette fameuse semaine de reviewing où nos cerveaux ont disjoncté. Ta gentillesse et ton altruisme font qu'il est facile et agréable de travailler à tes côtés. Ces qualités font de toi une personne avec qui j'ai aussi apprécié passer du temps en dehors du labo. **Alicia**, je me dois de te remercier de m'avoir formé à une grande partie des techniques du laboratoire et d'avoir grandement facilité mon intégration. J'ai adoré les moments passés avec toi et nos ragots de labo vont me manquer. J'espère ne pas avoir trop profité de ma position de chouchou pendant ces trois dernières années. Tu m'avais dit que tu

me frapperais si je changeais trop à cause de la thèse. Etant donné que je n'ai fini qu'avec quelques légers bleus, j'estime que tu m'apprécies encore tout autant que je t'apprécie. Je te souhaite plein de bonheur à toi et ta petite famille. **Julien**, merci pour ta bonne humeur quotidienne et du partage de toutes tes connaissances en expérimentation in vivo. **Maxime**, tu es un exemple de détermination et de persévérance. Je te souhaite sincèrement de réussir tout ce que tu entreprends, que ça soit personnellement ou professionnellement. Encore merci pour les dégustations de thé improvisées, je prends bien soin de ma petite théière. **Manon**, je te remercie de m'avoir supporté dans le même bureau pendant deux ans et sache qu'en soit c'est déjà un exploit. Tu es une personne sincère et touchante qui fait qu'on ne peut que t'apprécier. **Lucie**, merci pour ta jovialité et pour toutes les bonnes soirées jeux. Prends soin de toi et je te souhaite bon courage pour la suite. **Victor**, merci pour tes efforts de vulgarisation et ta curiosité pour le travail des autres. Merci aussi pour les chouettes sorties en dehors du labo. **Justine**, en pensant à toi me revient un bon nombre de conversations touchantes qu'on a pu avoir sur plein d'aspects de la vie. Merci pour ta simplicité et ton intérêt pour les autres. Ne te surmène pas trop et n'oublie pas de penser à toi. **Cyril**, c'était un réel plaisir de discuter avec toi sur différents aspects de la recherche. **Eddy**, merci pour toutes les sessions échecs même si mon niveau n'a jamais évolué. Je nous souhaite à tous les deux de nous remettre un jour du traumatisme qu'on a vécu chez toi. **Mickaël**, merci pour ton humour, ta gentillesse ainsi que nos discussions profondes sur la signalisation routière.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres de ma famille. Ma trop grande **fratrie**, je ne vais pas vous citer un par un au risque de ne pas en finir avec ces remerciements. Sachez juste que toutes vos différences ont contribué à faire grandir le petit dernier de la famille et que vous avez chacun forgé une partie de la personne que je suis aujourd'hui. Un remerciement particulier pour mes parents **Brigitte** et **Christian**, qui ont toujours tout fait pour permettre à leurs enfants de s'épanouir dans leur vie, sans leur porter de jugement, quitte à parfois s'oublier eux-mêmes.

Mes derniers remerciements vont pour **Clémence**, celle qui m'épaule au quotidien depuis plus de 8 ans maintenant. Tu es une source d'inspiration, de réconfort et d'amour. Je ne serai jamais allé aussi loin sans toi à mes côtés.



# Table des matières

## **PARTIE I - INTRODUCTION.....1**

### **CHAPITRE 1 : LA SIGNALISATION ŒSTROGÉNIQUE .....2**

1.	Les œstrogènes .....	2
1.1.	Les rôles physiologiques des œstrogènes .....	2
1.2.	La biosynthèse des œstrogènes .....	5
1.3.	La régulation de la synthèse des œstrogènes.....	9
2.	Les œstrogènes et œstrogéno-mimétiques dans le cerveau .....	11
2.1.	Les œstrogènes .....	11
2.2.	Les œstrogéno-mimétiques et la perturbation endocrinienne .....	13
3.	Les récepteurs aux œstrogènes nucléaires.....	16
3.1.	La découverte des récepteurs aux œstrogènes nucléaires .....	16
3.2.	La structure des récepteurs aux œstrogènes nucléaires .....	16
3.3.	La biodistribution des récepteurs aux œstrogènes nucléaires .....	19
3.4.	La signalisation dépendante des récepteurs aux œstrogènes nucléaires.....	19
4.	Le récepteur aux œstrogènes membranaire couplé aux protéines G : GPER... 23	
4.1.	Les généralités sur l'expression et la distribution de GPER .....	23
4.1.1.	Les généralités sur les récepteurs couplés aux protéines G .....	23
4.1.2.	La découverte de GPER.....	24
4.1.3.	La structure tridimensionnelle de GPER .....	24
4.1.4.	La biodistribution de GPER.....	25
4.1.5.	La localisation sub-cellulaire de GPER .....	26
4.2.	GPER, un récepteur aux œstrogènes .....	29
4.2.1.	La caractérisation comme récepteur aux œstrogènes.....	29
4.2.2.	L'E2 et GPER, une interaction directe ?.....	29
4.2.3.	Les rôles physiologiques de GPER.....	31
4.2.4.	La signalisation dépendante de GPER.....	32
4.2.5.	Les effets des perturbateurs endocriniens .....	33
4.3.	La régulation de l'expression de GPER... ..	35
4.3.1.	... par des ligands .....	35
4.3.2.	... par l'hypoxie .....	35
4.3.3.	... par l'hyperméthylation de son promoteur.....	36
4.3.4.	... par des traitements anticancéreux .....	36
4.4.	GPER, un facteur pronostic dans les cancers ? .....	37
4.4.1.	Le niveau d'expression de GPER corrélée à la survie des patients .....	37
4.4.2.	Le niveau d'expression de GPER corrélé à d'autres marqueurs moléculaires impliqués dans la survie des patients .....	39
4.4.3.	La localisation de GPER, un facteur important dans la prédiction de la survie .....	39
4.4.4.	Un facteur de résistance aux traitements anticancéreux ? .....	40



4.5.	Le ciblage de GPER dans les cancers, une piste thérapeutique ? .....	41
4.5.1.	La conception et la sélection du G-1, G-15 et G-36 .....	41
4.5.2.	Les effets pro- et antitumoraux du G-15 et du G-36.....	43
4.5.3.	Les effets pro- et antitumoraux du G-1 .....	44
4.5.4.	L'utilisation du G-1 en clinique.....	46

## CHAPITRE 2 : LES TUMEURS PRIMAIRES DU CERVEAU.....48

1.	Les généralités sur le cerveau.....	48
2.	Les tumeurs primaires du système nerveux central.....	50
2.1.	Classification .....	50
2.2.	Diagnostic de la maladie .....	54
2.3.	Traitement .....	56
2.3.1.	Modalités du traitement standard.....	56
2.3.2.	Bénéfices du traitement standard .....	57
2.3.3.	Le sexe des patients, un facteur de survie et de réponse aux traitements ? . .....	58
2.4.	Données épidémiologiques .....	60
2.5.	Les facteurs de risque extrinsèques d'apparition .....	61
2.6.	Origines du glioblastome .....	61
2.7.	Les zones de développement et de progression.....	63
2.8.	La signalisation œstrogénique dans le cerveau .....	64
2.8.1.	L'aromatase .....	64
2.8.2.	Le récepteur ER $\alpha$ .....	65
2.8.3.	Le récepteur ER $\beta$ .....	66
2.8.4.	Le récepteur GPER .....	67
3.	Les gliomes, des tumeurs hormonosensibles ?.....	68
3.1.	L'impact du traitement hormonal de substitution et de la prise de contraceptif sur la survenue des gliomes.....	69
3.2.	L'impact de la grossesse sur la croissance tumorale.....	70
3.3.	L'impact des œstrogènes et de leurs dérivés dans des modèles in vitro et in vivo de GBM.....	72
3.3.1.	L'exposition aux œstrogènes .....	72
3.3.2.	L'aromatase .....	74
3.3.3.	Le tamoxifène .....	75
3.4.	Les récepteurs aux œstrogènes dans les gliomes .....	77
3.4.1.	Le récepteur ER $\alpha$ et ses isoformes.....	78
3.4.2.	Le récepteur ER $\beta$ et ses isoformes.....	78
3.4.3.	Le récepteur GPER .....	80

## PARTIE II - OBJECTIFS.....81

## **PARTIE III - RÉSULTATS.....83**

ARTICLE 1 : « IDENTIFICATION OF GENDER- AND SUBTYPE-SPECIFIC GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH PATIENT SURVIVAL IN LOW-GRADE AND ANAPLASTIC GLIOMA IN CONNECTION WITH STEROID SIGNALING »..... 83

ARTICLE 2 : « GPER AGONIST G-1 DISRUPTS TUBULIN DYNAMICS AND POTENTIATES TEMOZOLOMIDE TO IMPAIR GLIOBLASTOMA CELL PROLIFERATION » ..... 86

Résultats complémentaires à l'article 2 : « GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation ». 89

1. Les cellules de GBM expriment les récepteurs aux œstrogènes nucléaires ..... 89
2. Le G-1 n'induit pas la mort des cellules de GBM par apoptose ..... 90
3. Le G-1 ne provoque pas la sénescence des cellules de GBM ..... 92
4. Le G-1 réduit la migration des cellules U251 mais pas des cellules LN229.... 93

ARTICLE 3 : « MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE DUAL EFFECT OF THE GPER AGONIST G-1 IN GBM »..... 96

## **PARTIE IV - DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES .....99**

1. Les gliomes, des tumeurs hormonosensibles ..... 99
  - 1.1. Les gliomes de bas grade ..... 99
  - 1.2. Les glioblastomes ..... 105
2. Le G-1, une chimiothérapie prometteuse pour les glioblastomes ? ..... 107
3. Faut-il cibler l'expression ou la fonctionnalité de GPER ?..... 113
4. Conclusions ..... 116

BIBLIOGRAPHIE ..... 117

ANNEXE..... 154

# Liste des figures

Figure 1 : Rôles assurés par les œstrogènes dans l'organisme. ....	2
Figure 2 : Biosynthèse des stéroïdes. ....	6
Figure 3 : Voie de biosynthèse des catéchol-œstrogènes. ....	7
Figure 4 : Voie de biosynthèse des stéroïdes dans le cerveau. ....	8
Figure 5 : Régulation du taux d'œstrogènes lors du cycle menstruel. ....	9
Figure 6 : Régulation de l'expression de l'aromatase. ....	10
Figure 7 : Structures du diéthylstilbestrol (DES), du bisphénol A (BPA) et de la génistéine comparées à celle du 17β-œstradiol (E2). ....	14
Figure 8 : Structure des récepteurs aux œstrogènes nucléaires. ....	17
Figure 9 : Signalisation dépendante des récepteurs aux œstrogènes nucléaires. ....	22
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de GPER. ....	25
Figure 11 : Distribution de GPER dans l'organisme. ....	26
Figure 12 : Localisations cellulaires de GPER. ....	28
Figure 13 : Modèle prédictif d'interaction entre GPER et le 17β-œstradiol. ....	30
Figure 14 : Signalisation dépendante de GPER. ....	33
Figure 15 : Facteur pronostic de l'expression de GPER dans les cancers. ....	38
Figure 16 : Structure et modèle prédictif d'interaction du G-1, G-15 et G-36 avec GPER. ....	42
Figure 17 : Récapitulatif des effets pro- et antitumoraux du G-1. ....	45
Figure 18 : Les différentes cellules du parenchyme cérébral. ....	49
Figure 19 : Différence de survie selon le statut moléculaire IDH et 1p19q. ....	52
Figure 20 : Aspects radiographiques d'un glioblastome. ....	55
Figure 21 : Différence de survie entre les hommes et les femmes atteints d'un glioblastome. ....	58

<b>Figure 22 : Caractéristiques des hommes et femmes « longs survivants » atteints de glioblastome.</b> .....	59
<b>Figure 23 : Incidence des gliomes de bas grade et des glioblastomes chez l'homme et la femme.</b> .....	60
<b>Figure 24 : Localisation préférentielle des glioblastomes de bon et mauvais pronostic.</b> .....	64
<b>Figure 25 : Distribution de GPER dans le cerveau.</b> .....	68
<b>Figure 26 : La grossesse accélère la croissance tumorale.</b> .....	71
<b>Figure 27 : Impact des œstrogènes endogènes sur la survie et la croissance tumorale dans un modèle de rongeurs xéno greffés avec des cellules de glioblastome.</b> .....	72
<b>Figure 28 : Signalisation médiée par les isoformes des récepteurs aux œstrogènes nucléaires dans le glioblastome.</b> .....	77
<b>Figure 29 : GPER, une cible potentielle dans le traitement des glioblastomes ?</b> .....	80
<b>Figure 30 : Illustration récapitulative de l'article 2.</b> .....	86
<b>Figure 31 : Expression et localisation des récepteurs nucléaires aux œstrogènes dans les lignées de GBM.</b> .....	90
<b>Figure 32 : Le G-1 ne déclenche pas la mort des cellules de GBM par apoptose.</b> .....	91
<b>Figure 33 : Le G-1 n'induit pas la sénescence des cellules de GBM.</b> .....	93
<b>Figure 34 : Impact du G-1 sur la migration cellulaire.</b> .....	95
<b>Figure 35 : Illustration récapitulative de l'article 3.</b> .....	96
<b>Figure 36 : Résumé de l'implication du métabolisme lipidique dans les processus cancéreux.</b> .....	110
<b>Figure 37 : site de fixation des agents de ciblage des microtubules et leurs mécanismes d'action.</b> .....	112

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 : Classification de l’OMS 2021 des gliomes.....</b>	<b>54</b>
<b>Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l’article 1. ....</b>	<b>85</b>
<b>Tableau 3 : Comparatif entre la classification de l’OMS des tumeurs du SNC de 2016 et de 2021.....</b>	<b>105</b>

# Abréviations

2-ME	: 2-méthoxyœstradiol
3 $\beta$ -HSD	: 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase
4EBP1	: ERB3-binding protein 1
ABCG2	: ATP-binding cassette sub-family G member 2
ACACA	: Acetyl-CoA carboxylase alpha
AF	: Fonction activatrice
Akt	: Protein kinase B
ANGPTL4	: Angiopoïétine like 4
AP-1	: Activator protein 1
AR	: Récepteur aux androgènes
AT1	: Angiotensine II receptor type 1
ATM	: Ataxia telangiectasia mutated
AURKA	: Aurora kinase A
AQP2	: Aquaporine 2
Aromatase	: Cytochrome P450 aromatase
AVC	: Accident vasculaire cérébral
A $\beta$	: Amyloid beta
bAr	: Brain aromatase
Bcl-2	: B-cell leukemia/lymphoma 2
Bcl-Xl	: B-cell lymphoma-extra large
BHE	: Barrière hémato-encéphalique
BORA	: BORA aurora kinase A activator
BPA	: Bisphénol A
C/EBP $\beta$	: CCAAT-enhancer-binding protein beta
CAF	: Cancer associated fibroblasts
CCR	: C-C motif chemokine receptor
CDC20	: Cell division cycle 20
CDK	: Cyclin-dependent kinase
CDKN2A/B	: Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B
CE	: Catéchol-œstrogène
CINC-1	: Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1
COMT	: Catéchol-O-méthyltransférase

COX-2	: Cyclooxygénase 2
CPO	: Cellule précurseur d'oligodendrocyte
CREB	: C-AMP response element-binding protein
CTGF	: Connective tissue growth factor
CXCR	: C-X-C motif chemokine receptor
D2HG	: D-2-hydroxyglutarate
DBD	: DNA binding domain
Décitabine	: 5-aza-2'-deoxycytidine
DEG	: Gènes différentiellement exprimés
DES	: Diéthylstilbestrol
DFS	: Survie sans récidence
DHT	: 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone
DIO	: Souris obèses induites par l'alimentation
DTT	: Dichlorodiphénultrichloroéthane
E1	: Œstrone
E2	: 17 $\beta$ -œstradiol
E3	: Œstriol
E4	: Œstétrol
EGFR	: Epidermal growth factor receptor
Egr-1	: Early growth response protein 1
Elk-1	: ETS like-1
EOR	: Etendue de la résection
EPA	: U.S Environmental Protection Agency
ERBB2	: Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2
ERE	: Élément de réponse aux œstrogènes
ERK1/2	: Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ERR $\alpha$	: Estrogen related receptor alpha
ER	: Récepteur aux œstrogènes
FAK	: Focal adhesion kinase
FASN	: Fatty acid synthetase
FDA	: Food and Drug Administration
FLAIR	: Fluid-attenuated inversion recovery
FPR	: N-formyl peptide receptor
FSH	: Hormone folliculo-stimulante

FSHR	: Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante
G-1	: GPR30-specific compound 1
G2	: Gliome de grade 2
G3	: Gliome de grade 3
GBM	: Glioblastome
gDEG	: Gènes différentiellement exprimés entre les grades
GFP	: Green fluorescent protein
GnRH	: Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GPCR	: Récepteur couplé aux protéines G
GPGR	: Récepteur aux œstrogènes couplés aux protéines G
HDL	: High density lipoprotein
HERS	: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study
HIF-1 $\alpha$	: Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$
HMGB1	: High mobility group box 1
HOXA	: Homeobox A cluster
HR	: Hazard ratio
HRE	: Élément de réponse à l'hypoxie
HSP	: Heat shock protein
IDH	: Isocitrate déshydrogénase
IFN	: Interferon
IGF-1	: Insulin growth factor 1
IGFR	: Insulin growth factor receptor
IL	: Interleukine
IL1RN	: Interleukin 1 receptor antagonist
iNOS	: Oxyde nitrique synthase
IRM	: Imagerie par resonance magnétique
ISL2	: ISL LIM homeobox 2
IUPHAR	: International Union of Basic and Clinical Pharmacology
JAK	: Janus kinase
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
LBD	: Ligand binding domain
LC3	: Microtubule-associated proteins 1A/1B
LDL	: Low density lipoprotein
LGG	: Gliome de bas grade



LH	: Hormone lutéinisante
LHCGR	: Récepteur de l'hormone lutéinisante
LTF	: Lactoferrine
M1	: Macrophage pro-inflammatoire
M2	: Macrophage anti-inflammatoire
MAPK	: Mitogen-activated protein kinases
Mcl-1	: Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
ME	: Méthoxy-œstrogène
MGMT	: O6-méthylguanine méthyltransférase
MMP	: Matrix metalloproteinase
mTOR	: Mechanistic target of rapamycin
NFAT	: Nuclear factor of activated T cells
Nfix	: Nuclear factor 1 X-type
NF-κB	: Nuclear factor-kappa B
NRF1	: Nuclear respiratory factor 1
NSC	: Cellules souches neurales
NTD	: Région N-terminale
OA	: Acide oléique
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
OPRL1	: Opioid related nociceptin receptor 1
OR	: Odd ratio
OS	: Survie globale
OSR2	: Odd-skipped related transcription factor 2
OVX	: Ovariectomie
P450 scc	: Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage
PA	: Acide palmitique
PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
PDGFR	: Platelet-derived growth factor receptor
PE	: Perturbateur endocrinien
PFS	: Survie médiane sans progression
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinases
PKA	: Protein kinase A
PKC	: Protein kinase C
PLC	: Phospholipase C

PLK1	: Polo-like kinase 1
PLIN	: Perilipin 1
PPAR	: Peroxisome proliferator-activated receptor
PPARGC1A	: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PR	: Récepteur à la progestérone
PSN	: Polymorphismes d'un seul nucléotide
Rac1	: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RB1	: Retinoblastoma-associated protein
ROS	: Reactive oxygen species
RR	: Risque relatif
SGZ	: Zone subgranulaire
SHBG	: Sex hormone binding globulin
SIM1	: Neurones single-minded-1
SNC	: Système nerveux central
SNP	: Système nerveux périphérique
Sp-1	: Specificity protein 1
Src	: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
STAT	: Signal transducers and activators of transcription
SVZ	: Zone subventriculaire du ventricule latéral
TAM	: Tamoxifène
TDM	: Tomodensitométrie
TET	: Ten-eleven translocation enzymes
TG	: Triglycérides
TGF	: Transforming growth factor
THS	: Traitement hormonal de substitution
TMZ	: Témzolomide
TNBC	: Cancer du sein triple négatif
TNF	: Tumor necrosis factor
TRIM2	: Tripartite motif-containing protein 2
UCP1	: Uncoupling protein 1
UTR	: Région non traduite
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
WHI	: Women's Health Initiative



# Partie I - Introduction

---

## Avant-propos

Les œstrogènes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes qui jouent un rôle central dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. De plus en plus de données montrent que les gliomes, une grande famille de tumeurs primaires du cerveau, sont sensibles aux hormones, et en particulier aux œstrogènes. Actuellement, la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un gliome est limitée et n'offre qu'un faible bénéfice pour leur survie. Une nouvelle piste de traitement des gliomes serait donc de prendre en compte leur caractère hormonosensible.

C'est dans ce contexte que s'est déroulée cette thèse pour une durée de trois ans au sein du laboratoire CRAN dans l'équipe BioSiS à Nancy. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la valeur pronostic de l'expression de certains acteurs des voies de signalisation hormonale dans la survie des patients. Une part importante de ce travail s'est axé sur un récepteur aux œstrogènes en particulier, le récepteur aux œstrogènes couplés aux protéines G, GPER. Nous avons ainsi tenté de décrypter les mécanismes régulés par GPER en stimulant son activité par un agoniste synthétique spécifique, le G-1, afin de savoir s'il pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des gliomes.

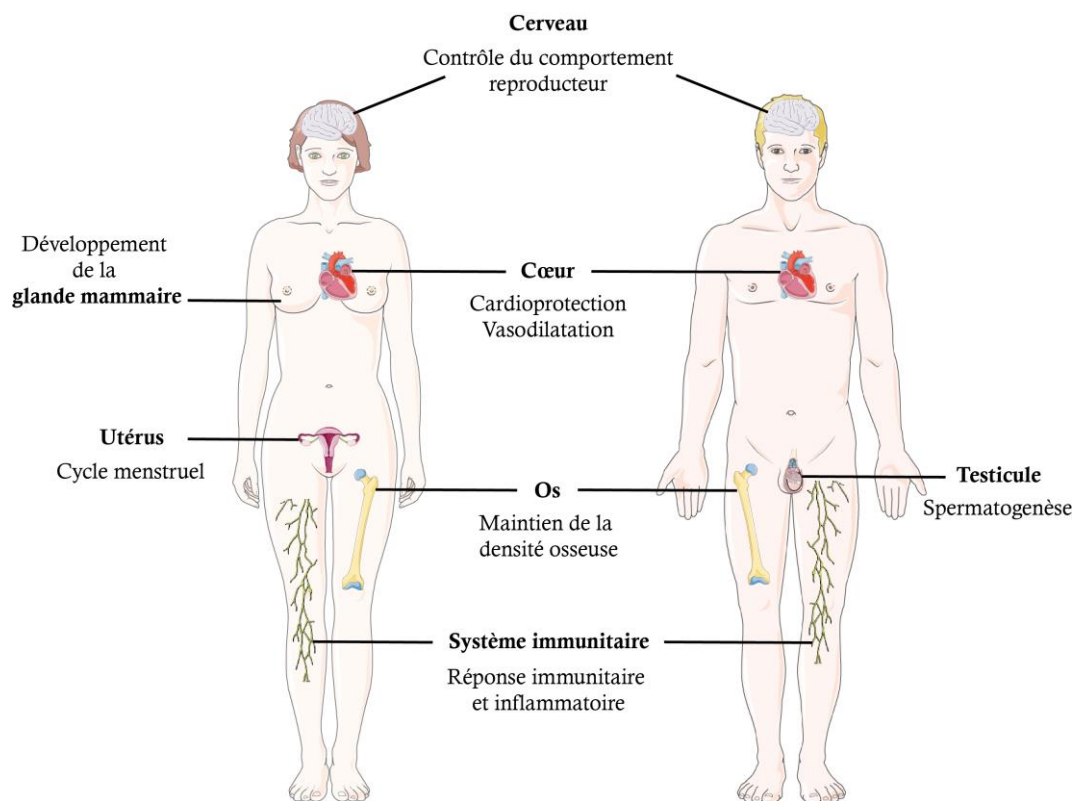
L'ensemble de ce travail de thèse est rapporté en trois parties. La première partie est divisée en deux chapitres consacrés à la revue de la littérature sur les connaissances actuelles sur les œstrogènes et leurs récepteurs ainsi que de leur implication sur l'apparition et la progression des gliomes. La seconde partie présente les différents articles que nous avons publiés autour de cette thématique. La troisième partie est consacrée à la discussion générale et aux perspectives d'étude.

# Chapitre 1 : La signalisation œstrogénique

## 1. Les œstrogènes

### 1.1. Les rôles physiologiques des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes sexuelles qui présentent un large spectre de fonctions physiologiques (**Figure 1**). Elles régulent le cycle menstruel et la reproduction, le développement du tissu mammaire et des organes sexuels, la mobilisation du cholestérol, la densité osseuse, l'inflammation et les fonctions cérébrales (Liang and Shang, 2013).



**Figure 1 : Rôles assurés par les œstrogènes dans l'organisme.**

Les œstrogènes jouent un rôle ubiquitaire dans l'organisme en intervenant dans la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques chez la femme et l'homme. Ces effets sont prédominants chez la femme qui, entre la puberté et la ménopause, présente une concentration plasmatique en œstrogènes jusqu'à 10 fois plus élevée que chez l'homme. D'après la thèse de Thiebaut, C. (2019).

La différenciation sexuelle correspond au développement de la gonade et des caractères sexuels secondaires chez l'homme et la femme. La différenciation gonadique dépend du sexe chromosomique associé à la présence d'un chromosome Y pour le développement testiculaire

ou d'un chromosome X pour le développement ovarien. Lorsque les gonades sont en place, la sécrétion d'hormones stéroïdiennes sexuelles, principalement les androgènes pour les testicules et les œstrogènes pour les ovaires, conditionnent le développement des organes génitaux externes et internes, et impactent le cerveau et les fonctions cognitives. A la puberté, les œstrogènes régulent le cycle menstruel et donc les fonctions de reproduction chez la femme (cf. partie 1.3). Ils favorisent notamment la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre utérin et de la glande mammaire. Pendant la grossesse, les œstrogènes produits par le placenta, contribuent à préparer la glande mammaire à la production de lait (Koos, 2011; Simpson et al., 2005; Gruber et al., 2002). Bien qu'ils soient produits en plus faibles quantités chez l'homme, les œstrogènes n'en sont pas moins essentiels aux fonctions de reproduction en assurant la maturation des spermatozoïdes et la fonction érectile (Schulster et al., 2016).

Les œstrogènes semblent aussi avoir des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire, en favorisant notamment la dilatation des vaisseaux pour ainsi augmenter le flux sanguin (White, 2002). Les œstrogènes augmentent le taux de cholestérol HDL (high density lipoprotein) tout en diminuant celui du cholestérol LDL (low density lipoprotein). Après la ménopause, lorsque les taux d'œstrogènes diminuent naturellement, on constate l'effet inverse. Cela va favoriser l'accumulation de graisse et de cholestérol dans les artères, ce qui serait un facteur de survenue de crises cardiaques ou d'accidents vasculaires cérébraux (AVC). A la ménopause, un traitement hormonal de substitution (THS), généralement composé d'un mélange d'œstrogènes et de progestatif, peut être prescrit pour traiter les symptômes de la ménopause comme les bouffées de chaleur et la dépression. Il est supposé que la présence d'œstrogènes dans le THS aurait un effet protecteur sur l'apparition des maladies cardiovasculaires. Les résultats de ces études sont cependant très controversés. La Women's Health Initiative (WHI) et la Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) ont constaté un risque accru de cancers et de maladies cardiovasculaires chez les femmes sous THS. Après une analyse rétrospective, il semble qu'un risque accru de survenue de ces événements ne soit constaté que durant la première année après le début du THS sans toutefois que celui-ci n'ait d'effets bénéfiques par la suite. Plusieurs études montrent que le THS augmente le risque de cancer du sein de 60% à 85%, d'AVC d'environ 1,5 fois et de caillots sanguins dans les jambes et les poumons de plus de 3 fois (Henderson and Lobo, 2012; Chen et al., 2002; Grady et al., 2002; Rossouw et al., 2002; Hulley et al., 1998). Il semble toutefois que le délai entre le début de la ménopause et la prise du THS soit important dans la survenue de ces événements. Ainsi, les femmes avec une prescription d'un THS très tôt au début de leur ménopause voient

ces effets négatifs atténués (Rossouw et al., 2007). De même, parmi les femmes qui présentent encore une forte concentration plasmatique en œstrogènes après la ménopause, on constate une augmentation du risque d'infarctus du myocarde et d'AVC (Scarabin-Carré et al., 2012).

Une carence en œstrogènes à la ménopause peut aussi favoriser la survenue d'ostéoporose, caractérisée notamment par une augmentation du nombre d'ostéoclastes et de leurs précurseurs, impliqués dans le renouvellement de la matrice osseuse, sur la surface et dans la moelle osseuse. Chez la femme, les œstrogènes agissent en inhibant le recrutement des ostéoclastes, ce qui limite l'apparition d'ostéoporose. Chez l'homme, ce sont également les œstrogènes qui sont les principaux acteurs du maintien de l'homéostasie osseuse. Plusieurs études suggèrent que le risque de fracture de la hanche et de l'avant-bras chez la femme pré- et postménopause pourrait être réduit par un THS. En effet, le THS pourrait augmenter la densité osseuse et ces effets pourraient perdurer dans le temps même après l'arrêt du traitement (Khosla et al., 2012; Väänänen and Härkönen, 1996).

Les œstrogènes peuvent aussi réguler l'inflammation en interagissant avec de nombreuses cellules du système immunitaire dont les lymphocytes T, B et les macrophages (Murphy et al., 2009). Les œstrogènes sont capables de réguler différents aspects de la réponse immunitaire et inflammatoire en modulant notamment la production de cytokines (l'interféron (IFN) $\gamma$ , les interleukines (IL)-4-6-10-12, TGF $\beta$  (transforming growth factor bêta) et TNF $\alpha$  (tumor necrosis factors alpha)) et de chimiokines (CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1), IL-8) (Trenti et al., 2018; Khan and Ansar Ahmed, 2016). Les œstrogènes influent aussi sur la fonction des cellules T et B en réponse aux antigènes. Ils augmentent la production d'anticorps spécifiques aux antigènes en réponse aux infections, aux vaccins et aux auto-antigènes par les lymphocytes B. De faibles concentrations d'œstrogènes tendent à favoriser la prolifération des cellules Th1, qui interviennent dans la réponse immunitaire cellulaire, tandis que des concentrations plus élevées augmentent la production d'IL-4 par les cellules Th2, impliquées dans la réponse immunitaire humorale ce qui améliore la fonction des cellules T régulatrices (Pennell et al., 2012). Ainsi, un modèle émerge dans lequel de faibles concentrations d'œstrogènes semblent renforcer la sécrétion d'anticorps et sont relativement inflammatoires, tandis que des concentrations plus élevées présentent des effets anti-inflammatoires. Pour ces raisons, les femmes ont tendance à avoir une réponse immunitaire plus efficace que les hommes. Ainsi, en cas d'infection ou de septicémie, les femmes ont une meilleure survie (Libert et al., 2010). En revanche, les femmes réagissent de manière plus intensément aux auto-antigènes et

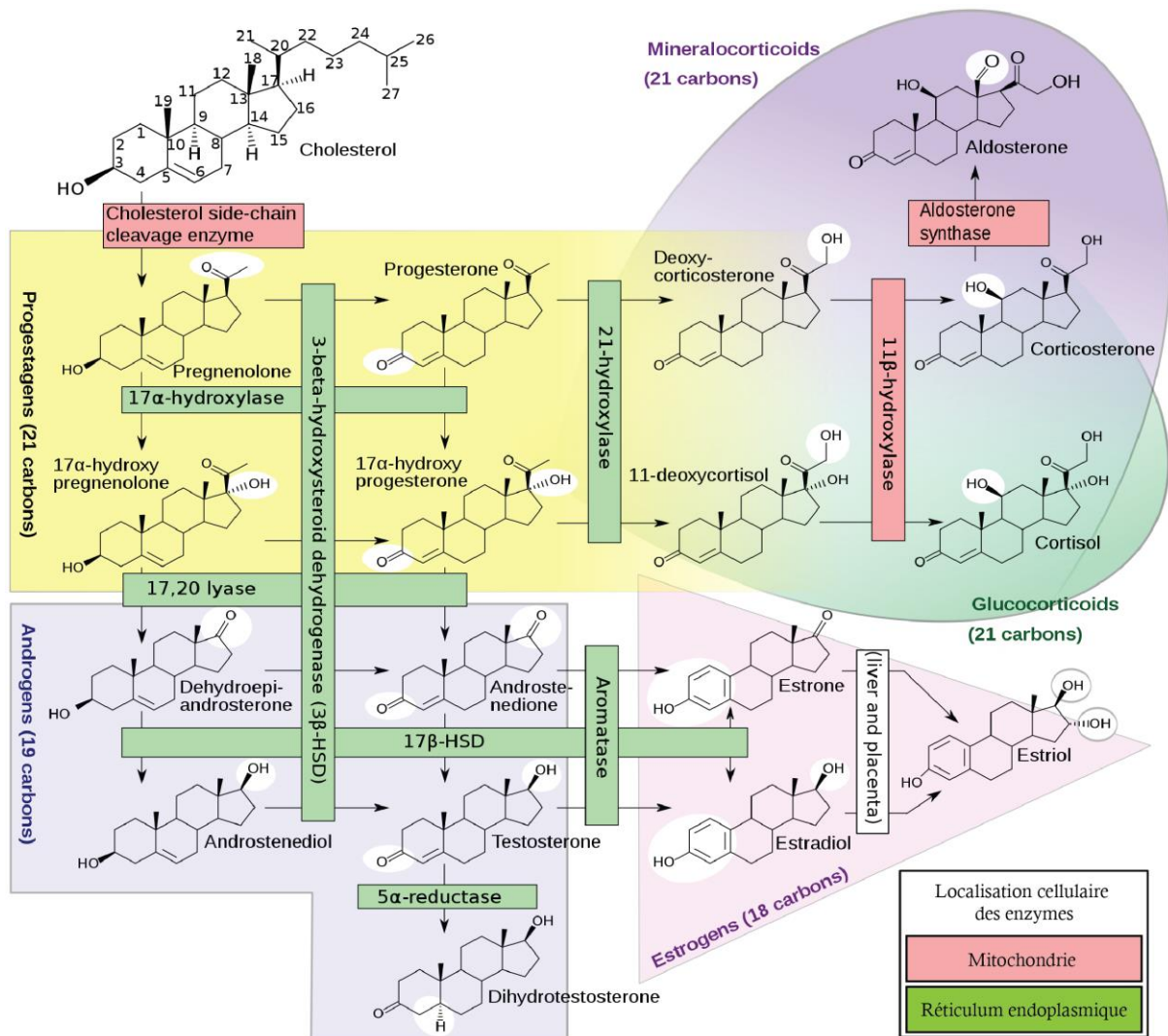
sont plus sensibles aux maladies auto-immunes puisque l'exposition aux œstrogènes peut favoriser la survie des cellules B et T auto-réactives (Gubbels Bupp, 2015).

## 1.2. La biosynthèse des œstrogènes

Chez la femme, les hormones stéroïdiennes sont synthétisées par une voie de biosynthèse enzymatique principalement active dans les ovaires avant la ménopause et dans le placenta durant la grossesse. Chez l'homme, la stéroïdogénèse se produit principalement dans les testicules. Les stéroïdes sont aussi produits, en plus faible quantité, par les tissus périphériques comme les glandes surrénales, le foie, le tissu adipeux et le cerveau. Immédiatement après leur synthèse, les stéroïdes sont libérés dans la circulation sanguine. Ils sont transportés vers leurs tissus cibles en se liant à la SHBG (sex hormone binding globulin) ou de manière non spécifique à l'albumine. Une plus faible proportion reste sous forme libre.

La stéroïdogénèse commence par le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par l'enzyme cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450 scc) située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (**Figure 2**). Cette première étape forme la prégnénolone, qui rejoint ensuite le réticulum endoplasmique où elle est transformée en progestérone après conversion par la 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD). Après intervention de deux oxydoréductases et d'une lyase, la progestérone est convertie en androgènes, androstènedione et testostérone qui sont respectivement transformées par le cytochrome P450 aromatase (aromatase) en œstrogènes (œstrone (E1), 17 $\beta$ -œstradiol (E2)) ou en 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT) par la 5 $\alpha$ -réductase. L'œstriol (E3) est obtenu après transformation de l'E1 ou de l'E2 par l'action d'enzymes cytochromes P450 (CYP3A4 et CYP3A5), exprimées uniquement dans le foie ou le placenta (Hägström and Richfield, 2014). Enfin, l'œstétrol (E4) est synthétisé à partir de l'E2 ou de l'E3 dans le foie fœtal par l'action des enzymes 15 $\alpha$ - et 16 $\alpha$ -hydroxylases (Coelingh Bennink et al., 2008). La forme majoritaire d'œstrogènes est l'E2 avant la ménopause et l'E1 après la ménopause.



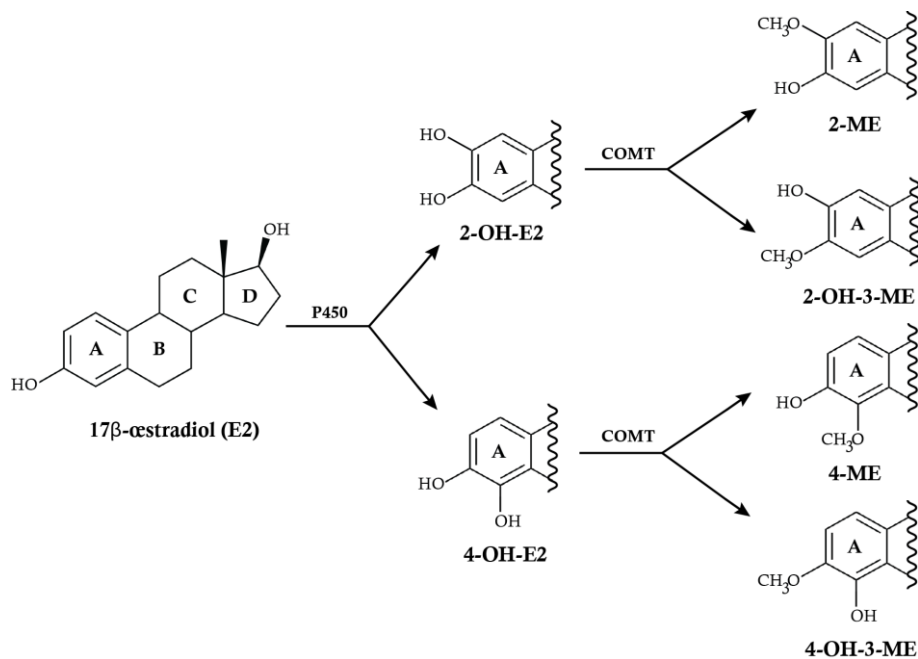


**Figure 2 : Biosynthèse des stéroïdes.**

Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol. Il est initialement métabolisé dans la voie des progestagènes par l'enzyme cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450 scc) pour aboutir notamment à la formation de progestérone. Les progestagènes sont les précurseurs des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et des androgènes. L'androstènedione et la testostérone sont prises en charge par l'aromatase pour donner de l'œstrone (E1) et du 17 $\beta$ -œstradiol (E2). La conversion réversible de l'E1 et de l'E2 est assurée par la 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD). Les cytochromes P450 (CYP3A4 et CYP3A5) convertissent l'E1 et l'E2 en œstriol (E3). La localisation des différentes enzymes de la voie de biosynthèse des stéroïdes est spécifiée en rouge pour ceux présents dans la mitochondrie et en vert pour ceux présents dans le réticulum endoplasmique (Häggröm and Richfield, 2014).

L'E1 et l'E2 peuvent être hydroxylés en position C2, C4 ou C16 par différents cytochromes P450 pour aboutir à la formation de 2-,4-,16-hydroxyœstrone ou 2-,4-,16-hydroxyœstradiol. Ces composés, appelés catéchol-œstrogènes (CE), peuvent ensuite être métabolisés en

méthoxy-œstrogènes (ME) par l'action de l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT) (**Figure 3**). Pour permettre leur élimination dans les urines et les fèces, les œstrogènes et leurs dérivés peuvent être conjugués au niveau de leur groupement hydroxyle à l'acide glucuronique ou à un groupement sulfate par les enzymes hépatiques UDP-glucuronosyltransférase et sulfotransférase (Samavat and Kurzer, 2015). Ils peuvent également être excrétés dans la bile pour participer au cycle entéro-hépatique. Le sulfate d'E1 est la forme circulante la plus abondante à une concentration 10 fois plus élevée que celle de l'E1 non conjugué (Raftogianis et al., 2000; Eckhardt et al., 1999; Coughtrie et al., 1998).

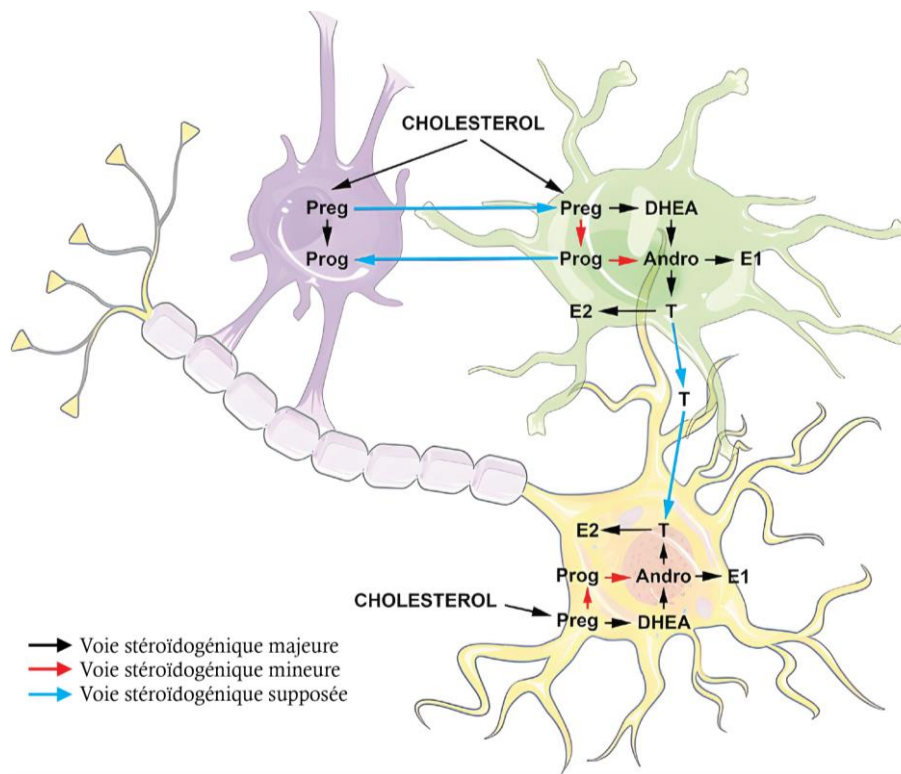


**Figure 3 : Voie de biosynthèse des catéchol-œstrogènes.**

Le 17β-œstradiol (E2) est hydroxylé par différents cytochromes P450 pour former du 2-hydroxyœstradiol (2-OH-E2) ou du 4-hydroxyœstradiol (4-OH-E2). Le 2-OH-E2 peut ensuite être méthylié par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) pour former du 2-méthoxyœstradiol (2-ME) ou du 2-hydroxy-3-méthoxyœstradiol (2-OH-3-ME). Le 4-OH-E2 peut aussi être méthylié par la COMT pour donner du 4-méthoxy-œstradiol (4-ME) ou du 4-hydroxy-3-méthoxyœstradiol (4-OH-3-ME). Ces mêmes voies de dégradation des œstrogènes peuvent prendre en charge l'œstrone (E1) où le groupement 17β-hydroxy de l'E2 est remplacé par un groupement cétone (Zhu and Conney, 1998).

Au niveau cérébral, toutes les enzymes nécessaires à la biosynthèse des œstrogènes (P450<sub>scc</sub>, 3β-HSD, 17β-HSD et l'aromatase) sont exprimées dans les neurones et certaines populations d'astrocytes et d'oligodendrocytes dans l'hypothalamus, le noyau arqué, les bulbes olfactifs, les aires préoptiques et certaines régions du cortex, de l'hippocampe et du thalamus

(Cui et al., 2013; Azcoitia et al., 2011). Par conséquent, la prégnénolone, la progestérone, la testostérone et l'E2 peuvent être synthétisées localement dans le cerveau (**Figure 4**) (Rossetti et al., 2016).



**Figure 4 : Voie de biosynthèse des stéroïdes dans le cerveau.**

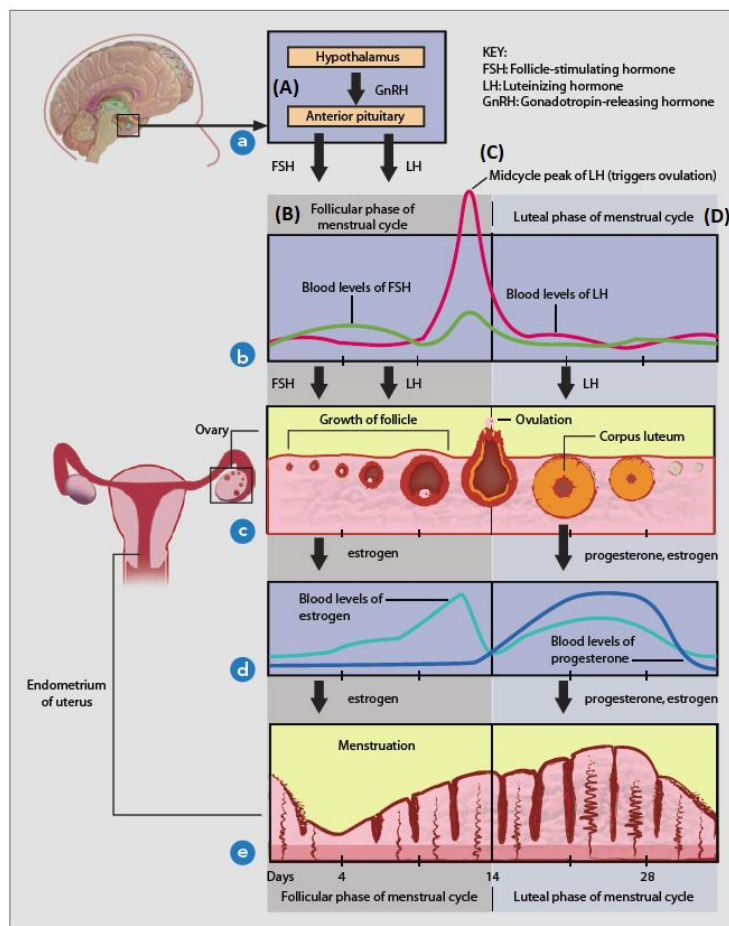
Des études chez le rat ont montré que toutes les cellules gliales participent à la stéroïdogénèse. Les astrocytes (en vert), les neurones (en jaune) et les oligodendrocytes (en violet) sont capables de convertir le cholestérol en prégnénolone (Preg), bien que les oligodendrocytes soient ceux qui le métabolisent le plus efficacement. La Preg peut ensuite être convertie en progestérone (Prog) par les trois types de cellules ou en déhydroépiandrostérone (DHEA) par les neurones et les astrocytes. L'androstènedione (Andro) est faiblement synthétisée à partir de la Prog ou du DHEA par les neurones et les astrocytes. L'Andro est ensuite converti en testostérone (T) majoritairement par les astrocytes. La T ainsi que l'Andro sont les précurseurs respectifs de l'E2 et de l'E1, produits par les neurones et les astrocytes. Il semblerait que ces cellules interagissent étroitement pour réguler la stéroïdogénèse dans le cerveau. Par exemple, les oligodendrocytes seraient capables de sécréter de la T qui sera ensuite converti par les neurones en E2 (Diotel et al., 2018).

L'aromatase appartient à la superfamille des cytochromes P450 et est largement exprimée dans de nombreux organes comme le cerveau, les gonades, les vaisseaux sanguins, le foie, les os, la peau, le tissu adipeux et l'endomètre (Santen et al., 2009). Des niveaux élevés de l'activité de l'aromatase sont mesurés dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le cervelet, le thalamus, le

tronc cérébral et le cortex cérébral (Azcoitia et al., 2011). L'aromatase est l'enzyme clé de la voie de biosynthèse de l'E2 puisque son expression et son activité sont indispensables à la présence des œstrogènes dans l'organisme. La régulation de la synthèse des œstrogènes est donc étroitement liée à la régulation de l'expression et de l'activité de l'aromatase.

### 1.3. La régulation de la synthèse des œstrogènes

Le taux d'œstrogènes est variable, notamment au cours du cycle menstruel afin de contrôler l'ovulation (**Figure 5**).

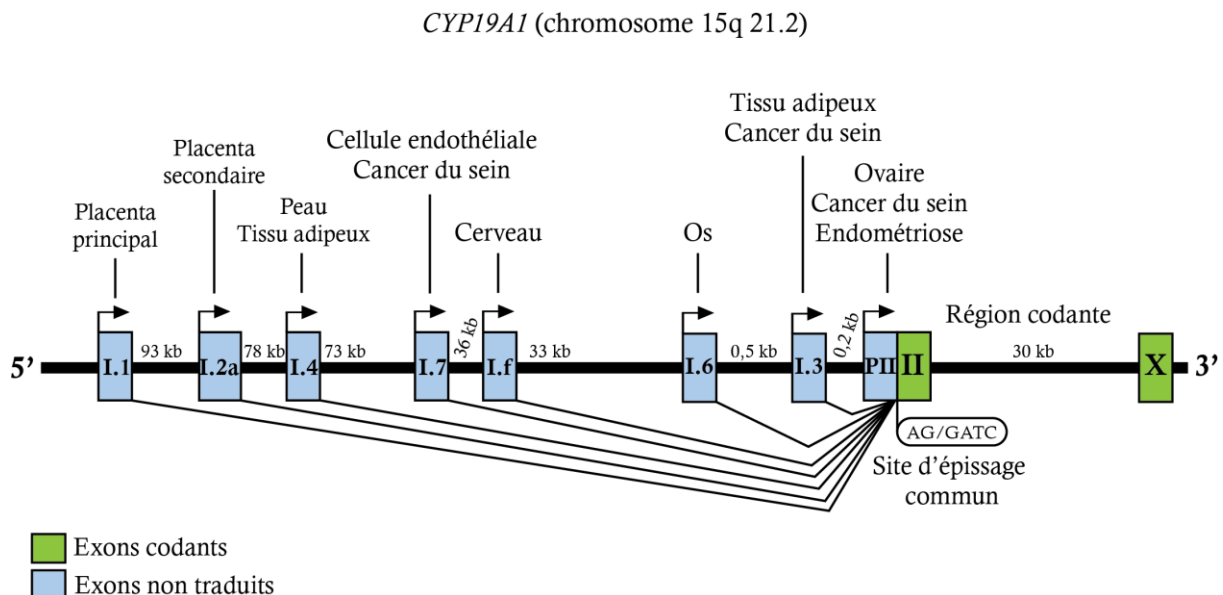


**Figure 5 : Régulation du taux d'œstrogènes lors du cycle menstruel.**

(A) Le signal initié par l'hypothalamus, qui produit l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) active l'hypophyse. En réponse, l'hypophyse produit deux hormones : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH). (B) Lors de la phase folliculaire, la FSH stimule la maturation des follicules qui vont sécréter des quantités plus importantes d'œstrogènes et provoquer un épaissement de l'endomètre. Durant la première partie du cycle menstruel, les œstrogènes exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH, de LH et de FSH. (C) A la fin de la phase folliculaire, lorsque la concentration en œstrogènes est la plus forte, ces derniers vont exercer un rétrocontrôle positif pour induire le pic préovulatoire de LH (Christian et al., 2005). Lorsque le pic de LH/FSH est

atteint, le follicule mature se rompt pour libérer l'ovocyte. **(D)** Lors de la phase lutéale, la LH permet le développement du corps jaune, qui sécrète majoritairement de la progestérone et une plus faible quantité d'œstrogènes. La progestérone diminue les contractions du myomètre pour favoriser l'implantation de l'embryon. Elle exerce aussi un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Hawkins and Matzuk, 2008). Lors de la ménopause, le métabolisme œstrogénique va être modifié. La ménopause survient lorsque les ovaires ont complètement épuisé leur stock de follicules, ce qui entraîne une diminution du taux sérique d'E2 et une augmentation de la FSH.

Le gène humain de l'aromatase *CYP19A1* comprend une région régulatrice de 93 kb et une région codante de 30 kb. L'expression de l'aromatase dans les tissus dépend de trois facteurs : des mécanismes d'épissage alternatif, des promoteurs spécifiques aux tissus et des facteurs de transcription différents. Son expression dans les différents tissus est contrôlée par plus de 10 promoteurs distincts (**Figure 6**). L'activation de ces différents promoteurs donne lieu à des formes épissées alternatives de l'ARNm mature dont le premier exon présent dans la région non traduite (5'-UTR) est spécifique du tissu, alors que la région 3'-UTR de l'ARNm reste inchangée. La région codante de l'aromatase s'étend sur neuf exons (II à X) et code pour la même protéine quel que soit le promoteur utilisé.



**Figure 6 : Régulation de l'expression de l'aromatase.**

L'expression du gène de l'aromatase (*CYP19A1*) est régulée par différents promoteurs tissus spécifiques qui donnent lieu à des formes épissées alternatives de l'ARNm mature. La région codante (de l'exon II à X) et la protéine codée sont cependant identiques quel que soit le promoteur utilisé et la région 5'-UTR transcrite (Liu et al., 2021).

En lien avec la régulation du cycle menstruel, l'expression de l'aromatase dans les ovaires est régulée par la FSH qui agit par l'intermédiaire de l'AMPc via le promoteur proximal II. Dans le placenta, son expression est régulée par le promoteur distal I.1, responsable de l'augmentation des taux d'œstrogènes circulants chez la femme enceinte (Toda et al., 1995). Dans le tissu adipeux et l'os, son expression est régulée par le promoteur distal I.4 en réponse aux glucocorticoïdes, aux cytokines de classe 1 et au TNF $\alpha$  (Simpson et al., 1997). L'expression de l'aromatase peut aussi être perturbée en conditions pathologiques. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, l'augmentation de l'expression de l'aromatase dans le coussin adipeux mammaire est partiellement due à un changement de l'utilisation du promoteur distal I.4 par le promoteur II sensible à l'AMPc (Harada et al., 1993).

L'aromatase est exprimée dans le cerveau (bAr) à partir du promoteur I.f. L'E2 augmente l'expression de bAr en favorisant la liaison du complexe récepteur aux œstrogènes (ER) $\alpha$ /Jun sur le promoteur I.f dans les neurones hypothalamiques (Yilmaz et al., 2009). Dans ce même modèle, l'activation du récepteur à la progestérone (Pgr) diminue l'expression de bAr (Yilmaz et al., 2011). Les glucocorticoïdes sont aussi des régulateurs de l'expression de bAr puisque la dexaméthasone augmente son expression (Brooks et al., 2012). Enfin, la protéine contractine qui est impliqué dans l'orientation du fuseau mitotique, agit aussi comme un facteur de transcription de bAr et augmente son expression (Honda and Harada, 2020). L'activité de bAr peut aussi être régulée par des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations. La phosphorylation dépendante de l'ATP, du Ca<sup>2+</sup> et du Mg<sup>2+</sup> provoque ainsi une diminution rapide de l'activité de bAr (Charlier et al., 2011; Balthazart et al., 2001). Les protéines kinases C (PKC) et A (PKA) sont aussi impliqués dans le contrôle de la phosphorylation de bAr (Balthazart et al., 2005).

## **2. Les œstrogènes et œstrogéno-mimétiques dans le cerveau**

### **2.1. Les œstrogènes**

Même si la plupart des stéroïdes sont produits dans des organes distants du cerveau, ils peuvent tout de même traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou être produits *in situ* et exercer des rôles multiples dans le système nerveux central (SNC) (Banks, 2012). Les hormones stéroïdiennes sont impliquées dans le développement du SNC et du système nerveux périphérique (SNP), la régulation du métabolisme des neurotransmetteurs, la connectivité synaptique, la ramification dendritique et la myélinisation des neurones (Frye, 2009). Durant la

période de gestation, les hormones sexuelles déterminent l'apoptose, la migration neuronale, la neurogenèse, le guidage axonal et la synaptogenèse. L'équilibre entre les œstrogènes et la testostérone détermine la différenciation sexuelle du cerveau en conditionnant la survie et la différenciation des cellules souches neurales.

Les œstrogènes régulent le métabolisme énergétique du cerveau. Ils régulent le transport du glucose par le transporteur GLUT, la glycolyse par l'activité de l'hexokinase et de la pyruvate déshydrogénase ainsi que la fonction mitochondriale par l'aconitase et l'ATP synthase pour générer de l'ATP. Les œstrogènes coopèrent également avec les adipokines comme la leptine ou la ghréline pour coordonner le contrôle cérébral de la prise alimentaire et de la dépense énergétique de l'organisme tout entier (Rettberg et al., 2014; He et al., 2012). Il est aussi rapporté que les œstrogènes modulent le contrôle moteur, le comportement social et cognitif, l'humeur et la sensibilité à la douleur (Barakat et al., 2016). Comme décrit dans la partie précédente, les œstrogènes exercent aussi des rétrocontrôles sur l'axe hypothalamo-hypophysaire pour réguler la progression du cycle menstruel (cf. partie 1.3).

Les œstrogènes sont également décrits comme ayant des propriétés neuroprotectrices dans certaines pathologies cérébrales (Wharton et al., 2009; Green et al., 1997, 1996; Singer et al., 1996). Des études réalisées sur des rongeurs femelles montrent que la diminution du taux d'œstrogènes après ovariectomie (OVX) est associée à une neurodégénérescence accrue (Azcoitia et al., 2001). Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, les femelles OVX présentent une diminution du métabolisme du glucose et une augmentation du taux d'oligomères d'amyloïdes  $\beta$  (Yue et al., 2005). La supplémentation de ces animaux avec de l'E2 réduit les dommages observés. Un autre modèle pour l'étude des lésions cérébrales consiste à injecter à des souris un agent neurotoxique comme l'acide kaïnique. Chez les femelles, l'administration du neurotoxique après le pic d'E2 dans le plasma dans l'après-midi du pro-œstrus entraîne moins de dommages neuronaux dans l'hippocampe qu'avant le pic d'E2 (Azcoitia et al., 2001). Chez la femme, la baisse naturelle du niveau d'E2 à la ménopause est associée à un risque accru de déficience cognitive, de troubles affectifs et même de pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Scott et al., 2012). Des études rétrospectives montrent que le THS contribue à l'amélioration des capacités cognitives (Sherwin, 2003; Tang et al., 1996).

Les œstrogènes participent aussi à la modulation des taux de neurotransmetteurs : chez des rattes OVX, le taux de renouvellement de la norépinéphrine est augmenté de façon significative

dans l'hypothalamus et le cortex cérébral par le traitement à l'E2. Cependant, le taux de renouvellement de la dopamine dans le cortex cérébral est augmenté par les 2-hydroxyœstrogènes tandis que l'E2 n'induit pas d'effet. Ces résultats suggèrent que les catéchol-œstrogènes (CE) peuvent moduler des fonctions différentes des œstrogènes dans le cerveau (Panek and Dixon, 1986). Des concentrations nanomolaires de 2-hydroxyœstradiol peuvent aussi induire des dommages à l'ADN (Hiraku et al., 2001). Dans des échantillons d'urine de patients atteints de la maladie de Parkinson, des taux beaucoup plus élevés de CE sont détectés. Une hypothèse est que certains adduits de CE, très délétère pour les composants cellulaires, peuvent jouer un rôle dans l'initiation de cette maladie (Gaikwad et al., 2011).

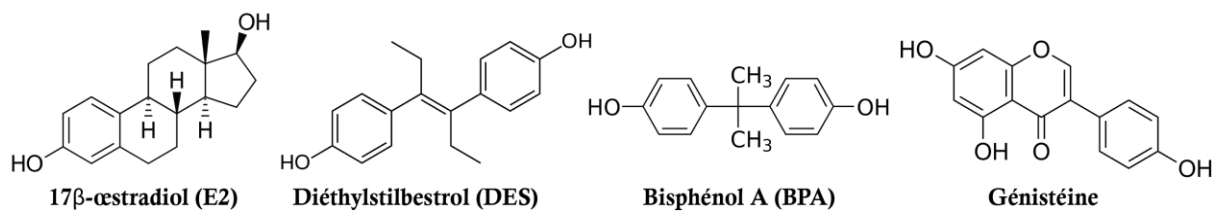
Les œstrogènes et leurs dérivés sont donc essentiels aux fonctions du cerveau. Une variation importante de la concentration en œstrogènes, notamment à la ménopause, peut être favorable à l'apparition de maladies neurodégénératives. De plus, les œstrogènes et les CE régulent des fonctions qui sont différentes. Il est donc nécessaire de contrôler finement la nature, la quantité et la signalisation des œstrogènes et de leurs dérivés pour assurer le bon fonctionnement du cerveau. Cet équilibre peut être rompu par les perturbateurs endocriniens (PE) dont certains possèdent des propriétés œstrogéno-mimétique, ce qui peut conduire à des effets délétères sur l'organisme.

## **2.2. Les œstrogéno-mimétiques et la perturbation endocrinienne**

L'U.S Environmental Protection Agency (EPA) définit un PE comme tout composé capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison ou l'élimination des hormones naturelles de l'organisme (Kavlock et al., 1996). Les PE peuvent être classés en deux catégories. La première catégorie est celle des phytoœstrogènes produits par les plantes et naturellement retrouvés dans la nourriture comme par exemple la génistéine et le coumestrol. La seconde catégorie regroupe des xénobiotiques comme les plastifiants (le bisphénol A (BPA)), les pesticides (le dichlorodiphényltrichloroéthane (DTT)) ou les médicaments (éthinyloœstradiol, mestranol, noréthynodrel, acétate de mégestrol, diéthylstilbestrol) (Grün and Blumberg, 2009). Dans cette partie ne sera abordé que quelques PE qui ont été choisis pour leur contexte historique, leur nature et la diversité des effets qu'ils provoquent. Le diéthylstilbestrol (DES) a conduit à une crise sans précédent dans l'histoire des thérapies hormonale et a été classé comme le premier PE. Le BPA, bien qu'interdit récemment, est toujours retrouvé abondamment dans l'environnement, ce qui pose la question des effets à long terme de l'exposition à ce composé. A l'inverse, la génistéine est souvent décrite comme possédant un bon nombre d'effets



bénéfiques sur la santé humaine. La structure de ces trois composés comparée à celle de l'E2 est présentée dans la **Figure 7**.



**Figure 7 : Structures du diéthylstilbestrol (DES), du bisphénol A (BPA) et de la génistéine comparées à celle du 17β-œstradiol (E2).**

L'E2 comprend un noyau œstrane, constitué de 4 cycles hydrocarbonés et de deux fonctions hydroxyle en positions 2 et 17. Le DES est un trans-hex-3-ène dans lequel les hydrogènes en positions 3 et 4 ont été remplacés par des groupes p-hydroxyphényle. Le BPA est composé de deux groupements phénols et de deux fonctions hydroxyles en positions 4 et 4'. La génistéine est une 7-hydroxyisoflavone avec des groupes hydroxy supplémentaires aux positions 5 et 4'.

Le premier exemple des effets toxiques des PE date de 1971 lorsque la Food and Drug Administration (FDA) a interdit l'utilisation du DES utilisé comme médicament pour prévenir les fausses couches et les naissances prématurées. C'est un œstrogéno-mimétique puissant puisqu'il induit une expression des gènes régulés les œstrogènes 1,5 à 2 fois plus fortement que l'E2 (Leffers et al., 2001). Ce composé induit une forte augmentation de l'incidence de carcinome à cellule claire, un cancer vaginal relativement rare. D'autres études révèlent un risque accru de cancer du sein chez les mères ayant reçu un traitement au DES ainsi que des liens avec des anomalies de l'appareil reproducteur chez leur descendance (Marty et al., 2011). Le DES peut aussi affecter les fonctions neurologiques. L'exposition *in utero* au DES augmente ainsi le risque de dépression chez les femmes d'environ 1,5 fois (O'Reilly et al., 2010). Cette observation n'est toutefois pas confirmée par une autre étude plus récente (Titus et al., 2019).

Le BPA est un composé qui a longtemps été utilisé pour la fabrication de plastique et de résine avant d'être classé comme PE et interdit en France en 2015. Il induit l'expression des gènes régulés par les œstrogènes environ 1000 fois plus faiblement que l'E2 (Baker and Chandsawangbhuwana, 2012). Le BPA pourrait être impliqué dans de nombreux processus pathologiques dont l'altération des fonctions cognitives. Plusieurs études ont signalé une altération du comportement chez des enfants exposés au BPA *in utero* ou avant la puberté (Rochester, 2013). Une exposition au BPA pendant la gestation peut aussi être associée à l'hyperactivité et à l'agressivité chez l'enfant (Inadera, 2015). Une étude a comparé les

modifications transcriptionnelles des gènes exprimés dans le cerveau chez des souris de troisième génération descendante de souris femelle de première génération exposée au BPA. L'exposition au BPA des femelles de première génération altère l'expression de 50 gènes dans le cerveau des descendants par rapport aux témoins. Parmi ces gènes, on retrouve un cluster de gènes soumis à l'empreinte parentale qui sont essentiellement impliqués dans le développement (Drobná et al., 2018). Une exposition directe au BPA peut aussi être en lien avec l'apparition d'un méningiome, une tumeur cérébrale généralement bénigne, qui survient plus fréquemment chez la femme que chez l'homme (Duan et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère que le BPA impacte la physiopathologie du cerveau et que ces effets peuvent être transgénérationnels.

La génistéine est un phytoœstrogène provenant principalement des légumineuses comme le soja ou les fèves. Il induit l'expression des gènes régulés par les œstrogènes 4 à 6 fois plus faiblement que l'E2 (Leffers et al., 2001). La génistéine limite le développement du cancer du sein et une exposition maternelle à long terme à la génistéine prévient leur survenue dans la descendance (Chen et al., 2022). A la ménopause, la diminution du taux d'œstrogènes fait que les femmes sont plus susceptibles d'avoir un AVC. Il est proposé que les propriétés œstrogénomimétiques de la génistéine permettent de prévenir leur survenue. Cela est confirmé chez des souris femelles OVX pour lesquelles la diminution en œstrogènes endogènes par rapport aux femelles sauvages favorise la survenue d'un AVC et où la supplémentation en génistéine réduit le volume de l'infarctus et améliore les résultats neurologiques (S. Wang et al., 2014). Une explication est que la génistéine diminue l'apoptose des neurones de l'hippocampe (Peng et al., 2012). La génistéine peut aussi prévenir les effets pro-tumoraux d'autres PE. Par exemple, il est montré dans des cellules de neuroblastome humain que la génistéine est capable de limiter l'augmentation de la prolifération induite par le BPA (ZHENG et al., 2013).

Bien que ces trois composés appartiennent à la même famille, chacun d'eux possède des propriétés spécifiques : Le DES et le BPA présentent des effets délétères, tandis que la génistéine possède des propriétés préventives dans la survenue de plusieurs pathologies. Une des raisons qui pourrait expliquer ces différences d'action est que ces PE n'activent pas les mêmes récepteurs aux œstrogènes.

### 3. Les récepteurs aux œstrogènes nucléaires

Une fois synthétisés, les œstrogènes sont libérés dans la circulation sanguine pour atteindre leur tissu cible. Ils peuvent aussi être produits localement puisque l'aromatase est exprimée dans de nombreux organes et tissus (cf. partie 1.3). Quelle que soit la provenance des œstrogènes, ils agissent en se fixant à différents récepteurs aux œstrogènes qui possèdent des propriétés propres à chacun.

#### 3.1. La découverte des récepteurs aux œstrogènes nucléaires

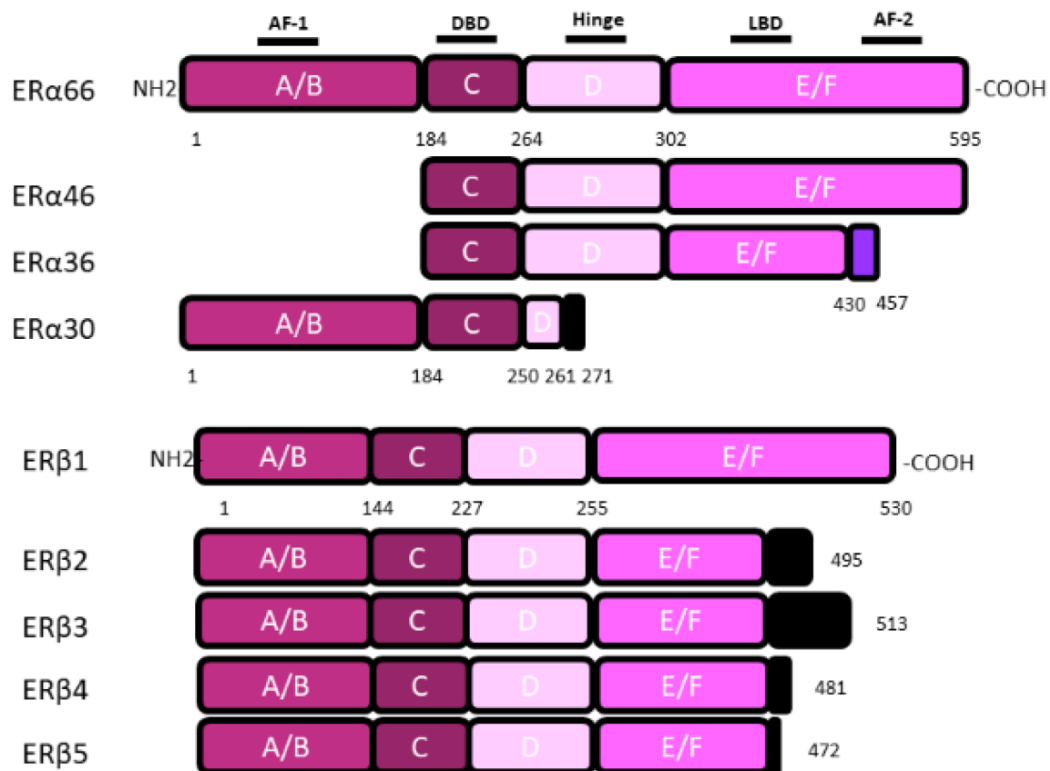
En 1958, l'équipe de Jensen a découvert le premier récepteur aux œstrogènes (ER) en montrant que les tissus féminins reproducteurs étaient capables d'absorber les œstrogènes de la circulation en se liant à des protéines. Les récepteurs liés aux œstrogènes étaient ensuite transloqués vers le noyau où ils stimulaient la transcription de gènes (Jensen et al., 1968, 1967). Plus de 20 ans plus tard, le premier ER humain ( $ER\alpha$ ) a été cloné à partir de l'ADNc de la lignée cellulaire MCF7 du cancer du sein humain (Green et al., 1986; Greene et al., 1986). Le deuxième ER ( $ER\beta$ ) a été décrit 10 ans plus tard par l'équipe de Gustafsson (Kuiper et al., 1996).

#### 3.2. La structure des récepteurs aux œstrogènes nucléaires

Les effets des œstrogènes sont médiés par les ER nucléaires,  $ER\alpha$  (codé par le gène *ESR1*, situé sur le locus 6q25.1) et  $ER\beta$  (codé par le gène *ESR2*, situé sur le locus 14q23.2). La région promotrice d'*ESR1* (estrogen receptor 1) s'étend sur 150 kb et est composé de 9 exons non codants et de 7 promoteurs alternatifs permettant de réguler l'expression d' $ER\alpha$  dans les différents tissus cibles des œstrogènes. Sa région codante s'étend sur environ 300 kb et se compose de 10 exons et de 9 introns qui sont à l'origine de 4 isoformes : la forme canonique  $ER\alpha66$ ,  $ER\alpha46$ ,  $ER\alpha36$  et  $ER\alpha30$  (Gibson and Saunders, 2012; Wang et al., 2005; Kos et al., 2001). La protéine complète  $ER\alpha66$  est constituée de 595 acides aminés pour une masse de 66 kDa.

La région promotrice d'*ESR2* s'étend sur 55 kb et comprend trois promoteurs alternatifs en positions distale, centrale et proximale. La région codante d'*ESR2* est de 60 kb et se compose de 8 exons et 7 introns qui sont à l'origine de 5 variants d'épissage : la forme canonique  $ER\beta1$ ,  $ER\beta2$ ,  $ER\beta3$ ,  $ER\beta4$  et  $ER\beta5$  (Haldosén et al., 2014; Al-Nakhle et al., 2013). La forme complète  $ER\beta1$  est composée de 530 acides aminés pour une masse de 59 kDa.

Les principaux domaines fonctionnels des ER nucléaires sont appelés A/B, C, D, E/F et sont présents dans les deux formes canoniques des récepteurs (**Figure 8**). La région A/B, située dans la région N-terminale (NTD), est impliquée dans la transactivation de gènes et contient un doigt de zinc qui sert de médiateur pour la liaison aux séquences cibles. La région C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA binding domain) et contribue à la dimérisation des ER nucléaires et à leur liaison à des séquences cibles spécifiques de la chromatine appelées éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) (Truss and Beato, 1993; Scheidereit et al., 1986). Le domaine D est une région charnière qui relie les domaines C et E, tout en permettant la fixation de protéines chaperonnes. Cette région contient aussi le signal de translocation nucléaire qui est démasqué lors de la liaison aux œstrogènes. La région E/F (LBD, ligand binding domain), située dans la région C-terminale, est la zone de liaison aux œstrogènes et aux coactivateurs ou corépresseurs. Les ER nucléaires possèdent deux domaines d'activation : la fonction activatrice (AF)1, indépendante du ligand dans le NTD, et AF2, dépendante du ligand dans le LBD (Kumar et al., 2011).



**Figure 8 : Structure des récepteurs aux œstrogènes nucléaires.**

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) nucléaires sont caractérisés par une structure en 6 domaines. Les domaines A/B, avec la région AF-1 (fonction activatrice 1) permettent une transactivation ligand indépendante. Le domaine C est le domaine de liaison à l'ADN. Le domaine D est un domaine charnière. Les domaines E/F possèdent le domaine de liaison au

ligand (LBD) et la région AF-2 pour une transactivation dépendante du ligand. Les récepteurs canoniques des œstrogènes ER $\alpha$ 66 et ER $\beta$ 1 sont codés respectivement par les gènes *ESR1* et *ESR2*. Les isoformes d'ER $\alpha$ 66 : ER $\alpha$ 46 et ER $\alpha$ 36 sont dépourvues des domaines A/B. L'isoforme ER $\alpha$ 36 possède des domaines E/F tronqué et une petite séquence de 27 acides aminés dans la région C-terminale qui lui est spécifique. L'isoforme ER $\alpha$ 30 ne conserve que les domaines A/B, C et une portion du domaine D dont une partie est remplacée par une séquence de 10 acides aminés. Les quatre isoformes d'ER $\beta$  se différencient uniquement de la forme canonique que par des domaines E/F tronqué et des séquences C-terminales différentes (Hirtz et al., 2020).

Lorsqu'ils sont activés, les ER nucléaires agissent comme des facteurs de transcription pour réguler directement l'expression de leurs gènes cibles. L'ensemble des voies de signalisation des œstrogènes médiées par les ER nucléaires seront détaillées par la suite (cf. partie 3.4.). Les différences structurales entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont un impact sur le fonctionnement de ces récepteurs. La principale différence entre les formes canoniques d'ER $\alpha$  et d'ER $\beta$  est qu'ER $\beta$  possède un domaine N-terminal plus court que celui d'ER $\alpha$ . L'activité transactivatrice du domaine AF-1 d'ER $\alpha$ 66 est plus importante que celle d'ER $\beta$ 1. De plus, ER $\beta$ 1 ne partage que 59% d'homologie de séquence protéique avec ER $\alpha$ 66 au niveau du LBD. Cette différence fait que la poche de liaison au ligand d'ER $\beta$ 1 est plus étroite que celle d'ER $\alpha$ 66. Ainsi, l'E2 a une meilleure affinité pour ER $\alpha$ 66 que pour ER $\beta$ 1. De même, ER $\beta$ 1 ne possède qu'une seule séquence de localisation nucléaire alors qu'on en retrouve plusieurs chez ER $\alpha$ 66 (Paterni et al., 2014).

Les différentes isoformes d'ER $\alpha$  et ER $\beta$  régulent chacune des voies de signalisation spécifiques. ER $\alpha$ 46 ne possède pas de domaine de transactivation AF-1 et ER $\alpha$ 36 ne possède pas les domaines de transactivation AF-1 et AF-2. Par conséquent, elles ne peuvent que peu ou pas activer directement la transcription de gènes cibles. Au contraire, elles sont capables de former des hétérodimères avec ER $\alpha$ 66 pour moduler sa capacité à activer ou réprimer ses gènes cibles ou encore à agir par des voies de signalisation dites non génomiques par l'interaction avec d'autres protéines.

Les isoformes ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4 et ER $\beta$ 5 ont un LBD tronqué ainsi qu'une absence du domaine de transactivation AF-2 par rapport à ER $\beta$ 1. Cela implique qu'ils ne sont plus capables d'induire, à eux seuls, une transactivation ligand-dépendante. Ces isoformes peuvent de ce fait supprimer la signalisation dépendante d'ER $\alpha$ 66 en se dimérisant avec lui (Haldosén et al., 2014;

Vrtačnik et al., 2014). A l'inverse, ces isoformes peuvent s'hétérodimériser avec ERβ1 et potentialiser son activité (Zhao et al., 2008).

### **3.3. La biodistribution des récepteurs aux œstrogènes nucléaires**

Au cours du développement et chez l'adulte, l'expression d'ERα et d'ERβ diffère selon les tissus. Chez le fœtus humain en milieu de gestation, ERα est abondamment exprimé dans l'utérus et en plus faible quantité dans l'ovaire, le testicule, la peau et l'intestin. Des quantités élevées d'ERβ sont présentes dans l'ovaire, le testicule, les glandes surrénales et la rate. ERβ est aussi modérément exprimé dans le thymus, l'hypophyse, la peau, les poumons, les reins et le cortex cérébral (Brandenberger et al., 1997).

Chez l'adulte, ERα est principalement exprimé dans les glandes mammaires, les cellules ovariennes, l'utérus, les os, le foie, les graisses, le cerveau ainsi que dans les organes reproducteurs masculins dont la prostate, les testicules et l'épididyme. ERβ est présent dans les cellules de la granulosa de l'ovaire, la vessie, l'épithélium de la prostate, les os, le cerveau, les poumons, le côlon, le tissu adipeux et les monocytes et macrophages (Barron et al., 2021; Pearce and Jordan, 2004).

L'expression des ER nucléaires dans de nombreux organes et tissus leur permet de réguler de nombreuses fonctions physiologiques (cf. partie 1.1.). Malheureusement, la biodistribution de chacune des isoformes d'ERα et d'ERβ est encore à préciser. Les ER nucléaires peuvent agir par les voies de signalisation génomiques où ils régulent l'expression de leurs gènes cibles et par la voie non génomique qui résultent d'un signal initié la membrane plasmique pour activer diverses kinases.

### **3.4. La signalisation dépendante des récepteurs aux œstrogènes nucléaires**

En l'absence de ligand, les ER nucléaires sont séquestrés dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes comme les HSP (heat shock protein) qui jouent un rôle majeur dans le repliement, le transport et la dégradation des protéines (**Figure 9 (1)**).

Les effets génomiques des œstrogènes impliquent la translocation du complexe œstrogènes/ER vers le noyau de la cellule (**Figure 9 (2)**). La liaison de l'E2 à ERα ou ERβ dans le cytoplasme provoque un changement de la conformation nécessaire à sa dimérisation (Le Dily and Beato, 2018). Dans ce processus, les ER nucléaires agissent comme des facteurs de

transcription pour activer ou réprimer leurs gènes cibles en interagissant directement avec les ERE, présents dans des régions régulatrices au sein ou à proximité des promoteurs et/ou des régions 3' non traduites des gènes cibles (**Figure 9 (3)**) (Marino et al., 2006; O'Malley, 2005; Klinge, 2001). Il est intéressant de noter que parmi tous les ERE, 17 000 sont situés près des sites d'initiation de la transcription et seulement 660 sont des sites conservés. Bien que les ERE partagent un haut degré de similarité de séquence, de subtiles différences peuvent complètement modifier l'affinité du récepteur pour l'ADN. Par exemple, certaines séquences ERE provoquent des changements allostériques dans la structure du récepteur et altèrent la capacité du complexe à recruter des coactivateurs et des facteurs de transcription qui peuvent contribuer à l'activité biologique des ER nucléaires (Yaşar et al., 2017; Hall et al., 2002).

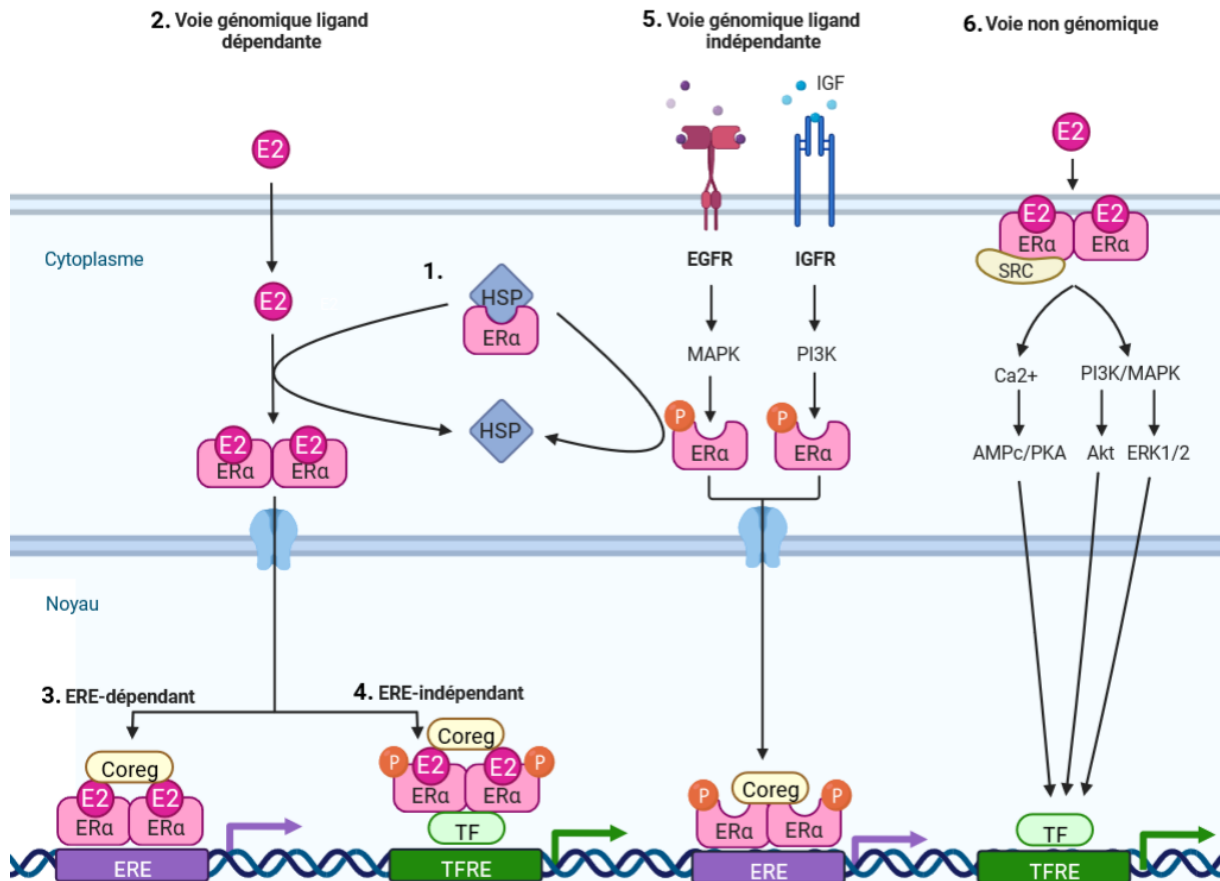
Bien que les ERE soient identifiés dans plusieurs régions promotrices et régulatrices de gènes, il est rapporté que plus d'un tiers des gènes humains régulés par les ER nucléaires ne contiennent pas d'ERE (**Figure 9 (4)**) (O'Lone et al., 2004). Dans cette voie de signalisation appelée voie génomique ERE-indépendante, le complexe œstrogènes/ER, une fois dans le noyau, s'associe avec d'autres facteurs de transcription qui reconnaissent leurs propres éléments de réponse à l'ADN (Aranda and Pascual, 2001). Un médiateur important de cette voie de signalisation est le facteur de transcription Sp-1 (specificity protein 1) dont la liaison aux régions promotrices des sites riches en GC est renforcée par la présence des ER nucléaires (O'Lone et al., 2004; Bajic et al., 2003). Les ER nucléaires modulent également l'expression de gènes contenant les sites de liaison à AP-1 (activator protein 1) par le biais d'interactions protéine-protéine. AP-1 est un facteur de transcription qui intervient dans des processus cellulaires clés tels que la différenciation, la prolifération et l'apoptose des cellules. Quelques exemples de gènes régulés par ER $\alpha$  via AP-1 sont IGF-1 (insulin growth factor 1), la collagénase, le récepteur à l'IGF-1, l'ovalbumine, EGFR (epidermal growth factor receptor), c-Fos et la cycline D1 (Fujimoto et al., 2004; Marino et al., 2002).

Un autre mécanisme d'action des ER nucléaires est médié par une sous-population de récepteurs situés à la membrane cellulaire qui peuvent déclencher des cascades de signalisation intracellulaire (**Figure 9 (6)**). Au niveau de la membrane cellulaire, ER $\alpha$  et ER $\beta$  interagissent avec des protéines d'échafaudage telles que la cavéoline-1 et MNAR/PELP-1 (modulateur de l'activité non génomique du récepteur des œstrogènes) (Cheskis et al., 2008; Chambliss et al., 2000). Par proximité, ER $\alpha$  et ER $\beta$  interagissent également avec les protéines G, divers récepteurs membranaires (par exemple, RTK (receptor tyrosine kinases), IGF-1 et EGFR) et

des molécules de signalisation, notamment les kinases Ras, Src (proto-oncogène tyrosine-protein kinase Src) et PI3K (phosphoinositide 3-kinases), ERBB2 (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2) et Shc (Boonyaratanakornkit, 2011; Song et al., 2010; Li et al., 2007; Song et al., 2007, 2005; Migliaccio et al., 1996). Ces effecteurs favorisent l'activation intracellulaire des voies de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinases) et Akt (protein kinase B) qui peuvent affecter la régulation transcriptionnelle (Li et al., 2010).

Un phénomène intéressant observé dans de nombreuses cellules est que les ER nucléaires peuvent aussi être activés en l'absence de ligand (**Figure 9 (5)**). Cette activation des ER nucléaires indépendante du ligand est principalement déclenchée par la phosphorylation de résidus spécifiques de leur domaine AF-1 ou par leur association avec des corégulateurs. Ce mécanisme se fait par l'action de molécules régulatrices nécessaires à la phosphorylation, telles que PKA (protein kinase A), PKC (protein kinase C), les composants de la cascade de phosphorylation MAPK, ainsi que les cytokines inflammatoires (par exemple l'IL-2), les régulateurs du cycle cellulaire (par exemple les cyclines A et D1) et les facteurs de croissance peptidiques, notamment l'EGF, l'insuline, IGF-1 et TGF $\beta$  (Bennesch and Picard, 2015; Vrtačnik et al., 2014; Maggi, 2011).





**Figure 9 : Signalisation dépendante des récepteurs aux œstrogènes nucléaires.**

(1) Les récepteurs aux œstrogènes (ER) nucléaires sont maintenus à l'état inactif par les protéines HSP (heat shock protein) dans le cytoplasme. (2) La voie génomique ligand dépendante est initiée par l'interaction de l'E2 avec les ER nucléaires dans le cytoplasme pour déclencher leur dimérisation et leur translocation dans le noyau. Ces derniers peuvent agir de deux manières : (3) en activant des cibles des ER en se liant directement à des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) ou (4) en interagissant avec d'autres facteurs de transcription (TF) qui possèdent leurs propres éléments de réponse (TFRE). (5) Dans la voie génomique ligand indépendante, les ER nucléaires sont phosphorylés par diverses kinases. Sous cette forme, ils sont capables d'interagir avec certains ERE pour réguler l'expression de leurs gènes cibles en l'absence de ligand. (6) La voie non génomique des ER fait intervenir certaines formes des ER associées à la membrane plasmique, notamment ER $\alpha$ 36. Ils peuvent s'associer avec différents effecteurs à la membrane et réguler l'expression de divers TF grâce à la modulation de cascades de kinases (Fuentes and Silveyra, 2019).

Abréviations : Akt (protein kinase B) ; EGFR (epidermal growth factor receptor) ; ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) ; IGFR (insulin growth factor receptor) ; MAPK (mitogen-activated protein kinase) ; PI3K (phosphoinositide 3-kinases); PKA (protein kinase A).

Les œstrogènes possèdent ainsi une multitude de fonctions en se liant aux ER nucléaires et l'existence de nombreuses de leurs isoformes permet de réguler finement leur signalisation. En plus des ER nucléaires, les œstrogènes sont aussi capables d'induire des effets en ciblant un autre ER, le récepteur aux œstrogènes couplés aux protéines G : GPER.

## **4. Le récepteur aux œstrogènes membranaire couplé aux protéines G : GPER**

### **4.1. Les généralités sur l'expression et la distribution de GPER**

#### **4.1.1. Les généralités sur les récepteurs couplés aux protéines G**

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont une superfamille de protéines membranaires, la plus vaste et la plus diversifiée des eucaryotes. On estime que le génome humain code pour plus de 700 GPCR fonctionnels, ce qui représente environ 3% du génome total (Fredriksson et al., 2003). Les GPCR partagent une architecture commune composée de 7 domaines transmembranaires reliés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. Cependant, ils ont une faible identité de séquence et possèdent des domaines extracellulaires N-terminaux et des poches de liaison au ligand qui sont très variables. En 1994 a été proposée une classification des GPCR en 6 classes (de A à F), en fonction de leurs séquences et de leurs fonctions (Kolakowski, 1994). Les protéines G sont les principaux effecteurs des GPCR et comprennent trois sous-unités  $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ . Généralement, l'activation du GPCR par son ligand provoque un changement de sa conformation et permet une interaction directe avec les protéines G pour déclencher une cascade de signalisation intracellulaire.

Les GPCR transmettent une variété de signaux exogènes et endogènes à partir de photons, de phéromones, d'hormones, de peptides, de neurotransmetteurs et d'ions vers la cellule. Ils sont fondamentaux dans les processus biologiques/physiologiques de la vision, de l'odorat, du goût, des fonctions neurologiques, cardiovasculaires, endocriniennes et reproductives (Palczewski and Orban, 2013). Du fait de leur importance dans les fonctions de l'organisme, environ 30% à 40% de tous les médicaments modernes agissent sur une quarantaine de GPCR et on estime qu'environ 400 de ces récepteurs sont potentiellement utilisables comme cibles de médicaments (Hauser et al., 2017; Wise et al., 2002). L'identification de nouveaux GPCR a été au cœur de nombreuses études pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

### 4.1.2. La découverte de GPER

La technique de PCR, décrite pour la première fois en 1987 par Kary Mullis a été une avancée majeure dans l'identification des GPCR. En utilisant des oligonucléotides dégénérés ciblant les séquences des domaines transmembranaires des GPCR déjà connus, de nouveaux GPCR ont ainsi pu être découverts. Les amplicons obtenus ont ensuite été comparés à des bases de données et, par homologie de séquence, attribués à une famille de GPCR (Wilkie et al., 1993). C'est ainsi que le récepteur GPR30, nommé par la suite GPER, a été découvert en 1996.

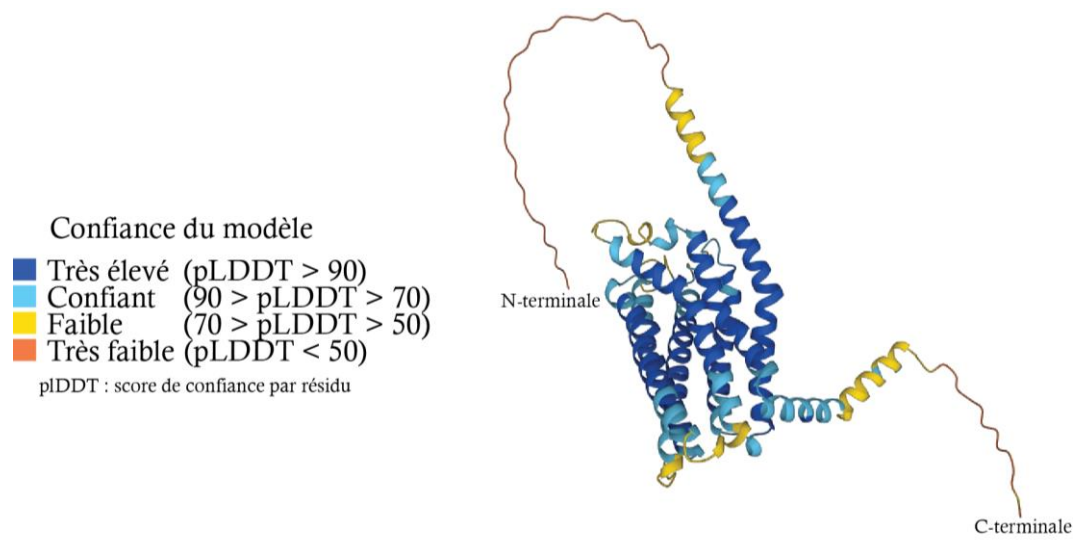
GPER fait partie de la classe A ou « rhodopsine-like » des GPCR de sous-type  $G\alpha_s$ . Le gène *GPER1* est localisé sur le chromosome 7 dans la région p22.3 qui contient une phase ouverte de lecture de 1128 pb codant un récepteur de 375 acides aminés. Il est composé de 3 exons dont le seul exon codant est l'exon 3. GPER contient un site de N-glycosylation au niveau du résidu Asn44 qui est essentiel à la structure et à l'activité du récepteur (Gonzalez de Valdivia et al., 2019). La région C-terminale de GPER contient un domaine PDZ de type I capable d'interagir avec la protéine membranaire SAP97 et la protéine AKAP5 afin d'assurer son ancrage à la membrane plasmique (Gonzalez de Valdivia et al., 2017).

Une quarantaine de polymorphismes d'un seul nucléotide (PSN) sont détectée dans le gène *GPER1*. Seulement quatre sont associés à des néoplasmes humains. Le premier, détecté dans le cancer gastrique, crée un site d'épissage alternatif qui produit un décalage de phase de lecture protéique. Les trois autres sont associés à des caractéristiques histopathologiques agressives des cancers du sein. Deux d'entre eux sont situés dans la région 5' et pourraient affecter le niveau d'expression de GPER. Le troisième entraîne un échange d'acide aminé Pro16Leu dans le seul exon codant, ce qui pourrait modifier sa structure tridimensionnelle et sa fonction (Chevalier et al., 2014).

### 4.1.3. La structure tridimensionnelle de GPER

Bien que la séquence nucléotidique et protéique de GPER ait été validée par la communauté scientifique, l'absence de structure cristalline du récepteur limite la compréhension de sa structure tridimensionnelle. A cet égard, la modélisation prédictive par homologie de séquence et de structure est devenue un outil essentiel pour simuler la structure 3D de GPER (**Figure 10**). Les premiers travaux sur GPER montrent des homologies de séquences nucléotidiques à 30% avec le récepteur à l'IL-8 (*CXCR1*, C-X-C motif chemokine receptor 1), à 32% avec les récepteurs N-formyl peptide 1 et 2 (*FPR2*, *FPR3*, N-formyl peptide receptor 1/2), entre 28-30%

avec le récepteur à l'angiotensine II de type 1 (*ATI*, angiotensin II receptor type 1) et entre 25-30% avec les récepteurs du lymphome de Burkitt (*CXCR5*, *BLR2*) (O'Dowd et al., 1998; Carmeci et al., 1997; Feng and Gregor, 1997; Owman et al., 1996). Des travaux plus récents montrent que GPER a une homologie de séquence protéique à 45% avec les récepteurs OPRL1 (opioid related nociceptin receptor 1), *CXCR4* et *CCR5* (C-C motif chemokine receptor 5) (Bruno et al., 2016). La cristallisation de la rhodopsine bovine en 2000 et du récepteur  $\beta$ 2-adrenergique en 2007 ont montré des homologies de la séquence en acides aminés avec GPER de 40% et de 58% respectivement, ce qui a permis la modélisation des premières structures 3D de GPER (Arnatt and Zhang, 2013; Lappano et al., 2010; Rasmussen et al., 2007; Palczeski et al., 2000).



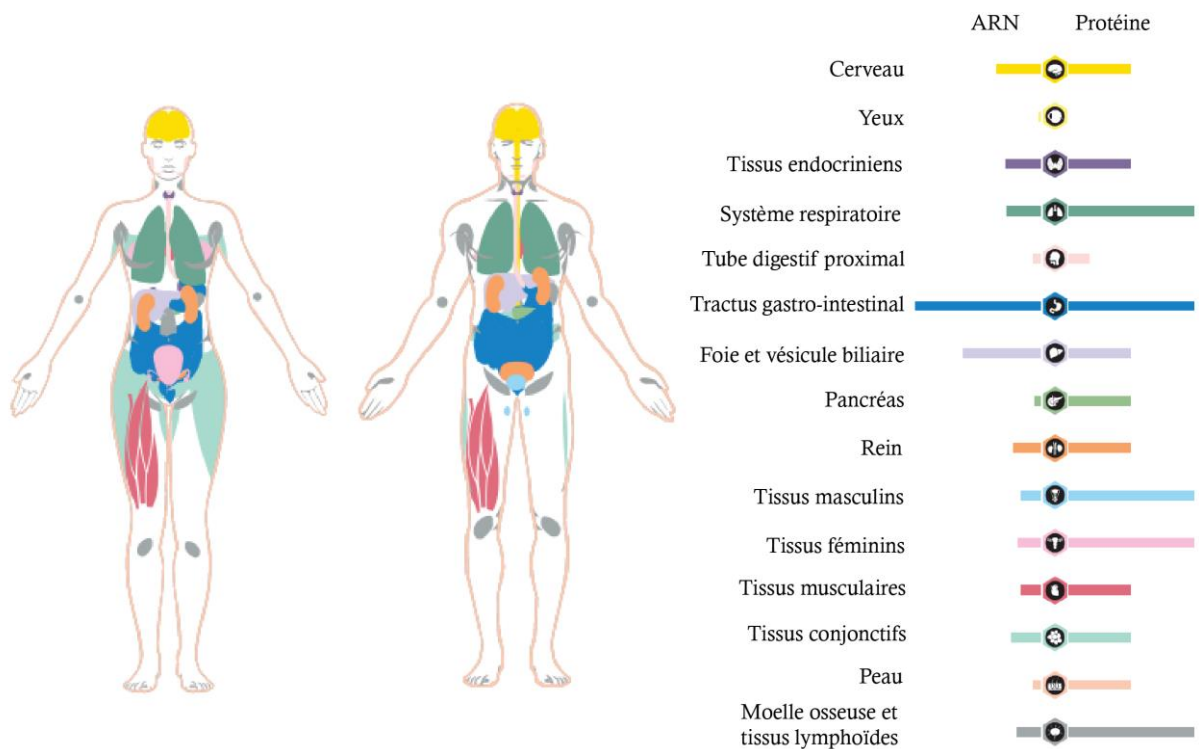
### Figure 10 : Structure tridimensionnelle de GPER.

Structure tridimensionnelle de GPER générée par AlphaFold (d'après la version du 01/06/2022).

#### 4.1.4. La biodistribution de GPER

GPER est exprimé dans de nombreux organes et tissus du corps dont : le cerveau, le cœur, le foie, les poumons, les reins, le pancréas, le placenta, les muscles squelettiques, la prostate, la rate, le côlon, les ovaires, les ganglions lymphatiques, l'appendice, le thymus, les testicules, l'intestin grêle, l'estomac, la thyroïde, l'utérus et la glande mammaire (**Figure 11**) (Carmeci et al., 1997; Feng and Gregor, 1997; Owman et al., 1996). Le placenta et les muscles squelettiques semblent être les seules régions où l'expression de GPER est très variable d'un individu à l'autre. Toutefois, chez la souris, GPER n'est pas détecté dans le foie, le thymus et les testicules

tandis que la plus forte expression est mesurée dans le cerveau (Hazell et al., 2009; Mårtensson et al., 2009; Otto et al., 2009).



**Figure 11 : Distribution de GPER dans l'organisme.**

Illustration des différentes zones d'expression de GPER dans l'organisme, généré par Protein Atlas (d'après la version du 24/08/2022). Les tissus masculins regroupent l'expression de GPER dans les testicules, l'épididyme, la prostate et les vésicules séminales. Les tissus féminins regroupent l'expression de GPER dans le vagin, la glande mammaire, le col de l'utérus, l'endomètre, les trompes de Fallope, les ovaires et le placenta.

#### 4.1.5. La localisation sub-cellulaire de GPER

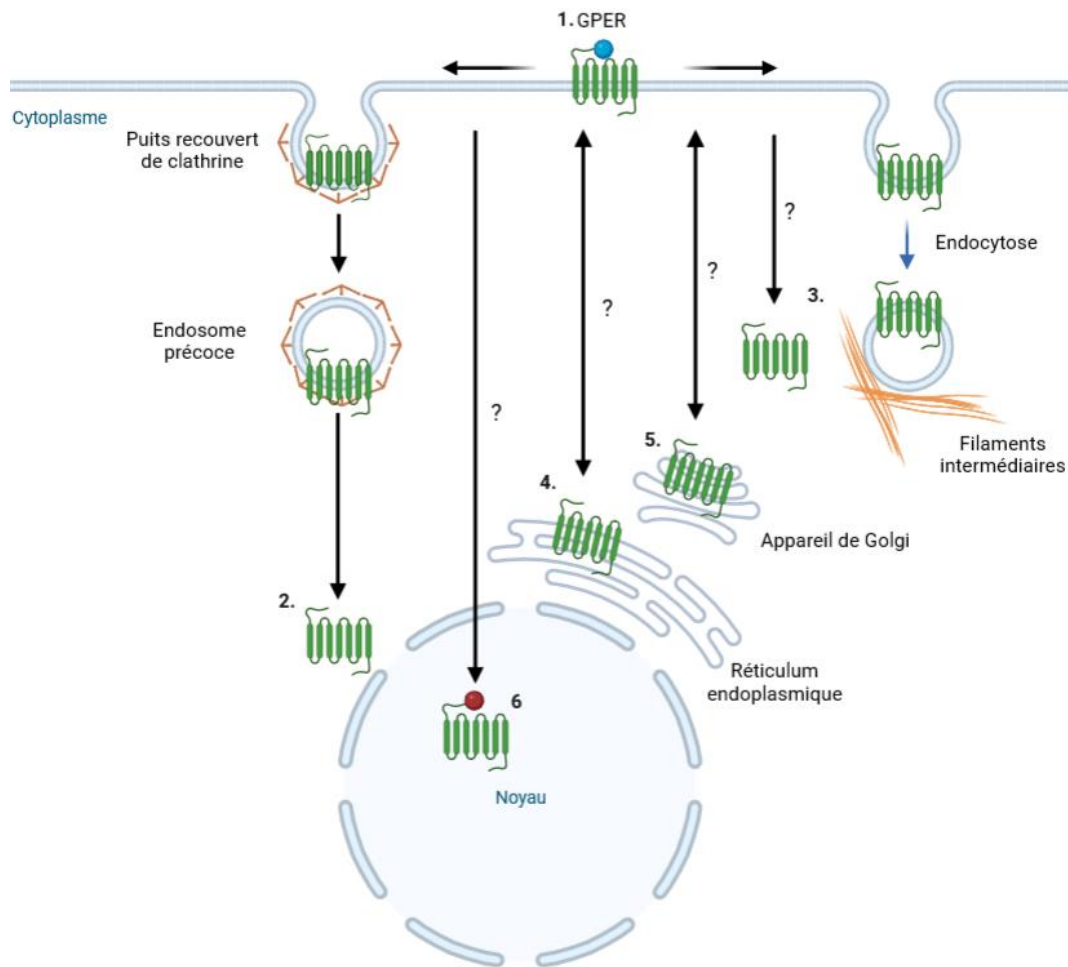
La localisation cellulaire de GPER est sujette à controverse depuis sa découverte. Etant un membre des GPCR, une localisation membranaire est attendue. Cela est vérifié dans plusieurs modèles cellulaires exprimant GPER de manière endogène dont la lignée HeLa, la lignée de cellules cancéreuses mammaires SKBR3 et de manière exogène dans des cellules HEK293 (cellules de rein embryonnaire humain) transfectées avec un plasmide codant pour GPER (Filardo et al., 2007; Thomas et al., 2005). Ces observations sont confirmées dans de nombreux modèles d'épithéliums utérins, de myomètre, d'épithéliums rénaux et de neurones de l'hippocampe (**Figure 12 (1)**) (Cheng et al., 2014; Akama et al., 2013; Gao et al., 2011; Lindsey et al., 2011; Maiti et al., 2011; Funakoshi et al., 2006). Dans un modèle de cellules HEK293 transfectées pour exprimer GPER, le récepteur est initialement présent à la membrane

plasmique et peut être internalisé au niveau des puits recouverts de clathrine pour entrer dans des endosomes précoces afin d'être adressés au niveau périnucléaire (**Figure 12 (2)**) (Cheng et al., 2011).

A l'inverse, certaines équipes n'ont pas observé la localisation membranaire de GPER mais le décrivent dans divers organites cellulaires. Historiquement, la première visualisation de GPER dans des fibroblastes de rein de singe COS7 transfectées transitoirement avec une construction GPER-GFP (green fluorescent protein) montre un marquage au niveau du RE (**Figure 12 (4)**). Cette observation a rapidement été confirmée dans d'autres lignées cellulaires exprimant GPER de manière endogène dont les lignées de cellules cancéreuses mammaires MCF7, SKBR3, MDA-MB-231, dans la lignée de cellules cancéreuses de l'endomètre Hec50 et dans des lignées transfectées transitoirement pour GPER dont les HEK293 (Lin et al., 2009; Otto et al., 2008; Revankar et al., 2005). Une seule étude montre une localisation de GPER dans l'appareil de Golgi dans des neurones à ocytocine (**Figure 12 (5)**) (Sakamoto et al., 2007).

De manière surprenante, les dernières données disponibles sur la localisation de GPER le décrivent comme étant présent dans le cytoplasme ou le noyau des cellules (**Figure 12 (3 et 6)**). Une analyse immunohistochimique sur des tumeurs mammaires montre que GPER est localisé à ces deux endroits. Dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire T47D on observe principalement la localisation cytoplasmique et dans la lignée MCF7 une localisation nucléaire (Samartzis et al., 2014). Une expression cytoplasmique de GPER est aussi détectée dans les neurones (Brailoiu et al., 2007). Le marquage de GPER endogène sur des cellules MDCK (cellules épithéliales du tubule rénal du chien) montre une localisation au niveau de la membrane plasmique et dans le cytoplasme. Cette publication a d'ailleurs souligné que GPER peut subir une endocytose et être associé à des filaments intermédiaires (Sandén et al., 2011).

De manière intéressante, GPER est mis en évidence dans les mitochondries, le RE et le noyau des myoblastes C2C12 indifférenciés et dans le cytoplasme des myotubes C2C12 différenciés. Il semblerait donc que la localisation de GPER pourrait dépendre du stade de différenciation des cellules (Ronda and Boland, 2016). Une piste permettant d'expliquer les différentes localisations de GPER est la présence de N-glycosylation dans sa région N-terminale. Ainsi, il est montré dans la lignée SKBR3 qu'un polymorphisme de l'acide aminé proline 16 en leucine (P16L) entraîne un défaut de glycosylation dans la région N-terminale de GPER. Cette altération favorise l'accumulation de GPER initialement présent dans le cytoplasme, dans le noyau des cellules (Pupo et al., 2017).



**Figure 12 : Localisations cellulaires de GPER.**

GPER est une protéine aux multiples localisations. **(1)** Il est majoritairement retrouvé associé à la membrane plasmique grâce notamment à la glycosylation de son résidu N-terminale Asn 44 (sphère bleue). **(2)** Il peut subir une endocytose médiée par des puits recouverts de clathrine et se localiser au niveau périnucléaire. **(3)** Il peut aussi être localisé dans le cytoplasme après endocytose par association avec des filaments intermédiaires et par d'autres mécanismes encore non élucidés. **(4)** Historiquement, les premières études sur la localisation de GPER montrent une localisation dans la membrane du réticulum endoplasmique. **(5)** Dans de rares cas, il est détecté dans la membrane de l'appareil de Golgi. **(6)** Les dernières études montrent une localisation nucléaire de GPER due à un défaut de N-glycosylation (sphère rouge) sans que l'on ne sache comment il l'y est transporté et s'il interagit avec d'autres partenaires (Pupo et al., 2017; Samartzis et al., 2014; Cheng et al., 2011; Sakamoto et al., 2007; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005).

L'ensemble de ces données laisse à penser que (i) la localisation de GPER est variable d'un modèle cellulaire à un autre, (ii) que l'état de glycosylation de GPER module sa localisation et (iii) que ces différentes localisations permettent de réguler les fonctions de GPER.

## **4.2. GPER, un récepteur aux œstrogènes**

### **4.2.1. La caractérisation comme récepteur aux œstrogènes**

Les homologies de séquences de GPER avec d'autres GPCR dont les ligands naturels sont des peptides ont indiqué que le ligand naturel de GPER pouvait aussi être un peptide. La distribution et l'expression de GPER dans de nombreux tissus endocriniens et neuraux indiquent que ce ligand pourrait être une hormone ou un neurotransmetteur.

Il a rapidement été montré que l'expression de GPER était corrélée à celle d'ER $\alpha$ , suggérant que l'expression de ces deux récepteurs pouvait être régulée par des facteurs transcriptionnels communs (Carmeci et al., 1997). La première preuve de l'implication de GPER dans la signalisation œstrogénique est montrée dans des cellules SKBR3, négatives pour les ER nucléaires mais positives pour GPER, qui sont capables de répondre à l'E2 en augmentant l'expression du facteur de transcription c-Fos. Cette induction est perdue lorsque l'expression de GPER est diminuée dans ces cellules par siRNA, suggérant une activation de GPER par l'E2 (Maggiolini et al., 2004). De la même manière, il est montré que l'E2 active la voie des MAPK (ERK1/2) dans des lignées exprimant GPER et non les ER nucléaires (Filardo et al., 2000). Dans des hépatocytes isolés de rats, l'absence de GPER diminue les effets dépendant de l'E2 sur l'activation de PKA (Hsieh et al., 2007).

Cependant, d'autres équipes n'ont pas été en mesure de confirmer ces résultats. Dans des cellules MCF7 (ER+, GPER+) et SKBR3 (ER-, GPER+), on observe une absence de réponse à l'E2 uniquement pour la lignée SKBR3. De même, la transfection d'un siRNA dirigé contre GPER dans la lignée MCF7 ne modifie pas le transcriptome des cellules après exposition à l'E2, ce qui indique que seuls les ER nucléaires sont les médiateurs des effets de l'E2 (Madak-Erdogan et al., 2008; Pedram et al., 2006).

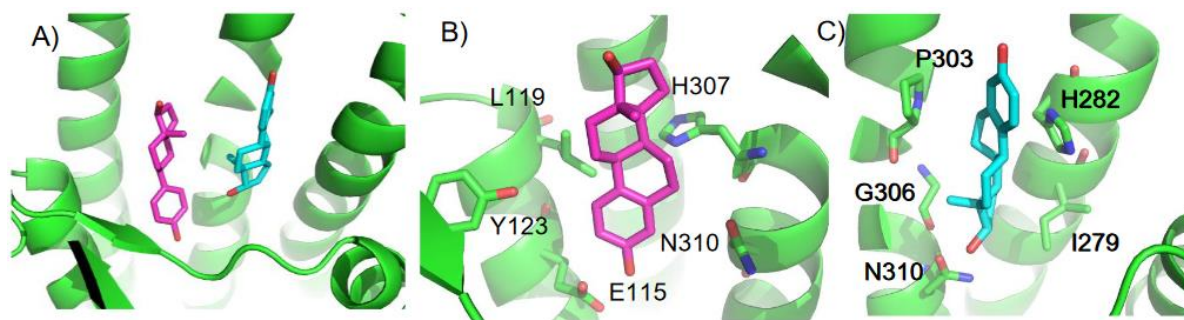
Bien qu'elles soient contradictoires, ces données ont rapidement conduit vers l'hypothèse que l'E2 est le ligand endogène de GPER. Toutefois, la validation de l'interaction directe de l'E2 avec GPER est encore aujourd'hui sujet à controverse (Tutzauer et al., 2021).

### **4.2.2. L'E2 et GPER, une interaction directe ?**

Certaines équipes ont tout de même pu valider une interaction directe de l'E2 avec GPER. Une colocalisation de GPER et de l'E2 marquée par fluorescence est observable au niveau du



RE (Revankar et al., 2005). De manière intéressante, seul l'énantiomère  $17\beta$ -E2 et non  $17\alpha$ -E2, est capable d'interagir avec GPER, montrant l'importance de la stéréochimie de l'E2 dans son interaction avec GPER (Revankar et al., 2007). Des analyses bio-informatiques récentes d'interaction ligand/récepteur entre l'E2 et GPER tendent à confirmer qu'une interaction directe entre ces deux partenaires est possible (**Figure 13**) (D'Arrigo et al., 2021; Vidad et al., 2016; Méndez-Luna et al., 2015). Bien que les modèles proposés soient assez convaincants d'un point de vue structure/fonction, les résidus impliqués dans la liaison à l'E2 sont toutefois rarement les mêmes d'un article à l'autre.



**Figure 13 : Modèle prédictif d'interaction entre GPER et le  $17\beta$ -œstradiol.**

L'absence de structure cristalline de GPER rend complexe l'identification des sites d'interaction du  $17\beta$ -œstradiol (E2) avec GPER. (A) La dernière publication en date montre que l'E2 est susceptible d'interagir avec GPER selon deux conformations assez différentes (en rose et en bleu) distantes de 4,4 Å. (B) Interaction ligand/récepteur la plus plausible. Dans cette configuration, la poche de fixation au ligand est très hydrophobe. (C) Autre modèle d'interaction ligand/récepteur possible où le ligand se trouve dans un environnement moins hydrophobe (Vidad et al., 2021).

D'autres équipes se sont confrontées à la problématique inverse : l'E2 ne se fixe que peu ou pas du tout à GPER, ce qui induit une très faible signalisation dépendante de GPER comparé à celle des ER nucléaires (Pedram et al., 2006; Thomas et al., 2005; Zeitoun et al., 1999). Des expériences similaires avec de l'E2 radioactif montrent une absence de fixation à GPER et une absence de réponse aux stimuli (Otto et al., 2008).

Bien que certaines de ces informations soient contradictoires, l'International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) continue de classer GPER comme un récepteur aux œstrogènes (Alexander et al., 2011).

### 4.2.3. Les rôles physiologiques de GPER

GPER est exprimé précocement dans l'embryon à partir du 7<sup>ème</sup> jour. Dès la 17<sup>ème</sup> semaine, il est détectable dans le cerveau, le cœur, les reins, le foie et la rate (Feng and Gregor, 1997). Chez le poisson zèbre, GPER est détecté tout au long de l'embryogenèse. L'expression de GPER à des stades précoces de l'embryogenèse est importante pour le développement normal du fœtus puisque son absence entraîne un retard de croissance des embryons et des défauts morphologiques du cerveau à cause du mauvais développement des neurones sensoriels et moteurs (Shi et al., 2013). Cependant, un défaut d'expression de GPER au moment du sevrage chez la souris n'induit pas de différence de croissance, soulignant l'importance de GPER lors du développement embryonnaire (Otto et al., 2009).

En réalisant des modèles de souris KO pour GPER, aucune perturbation du développement du système reproductif et de la glande mammaire n'est observable. Dans ce modèle, la stimulation des animaux avec de l'E2 induit toujours la prolifération des cellules épithéliales utérines, suggérant que GPER n'est pas essentiel pour le maintien de ces fonctions (Isensee et al., 2009; Otto et al., 2009). Quelques effets de l'absence de GPER ont tout de même pu être constatés : GPER est un régulateur du système immunitaire et sa déplétion entraîne une diminution de la taille du thymus (Chunhe et al., 2008). Chez des souris femelles KO pour GPER, on observe une diminution du développement et de la croissance du squelette, une augmentation de la pression sanguine et de la résistance vasculaire (Mårtensson et al., 2009). Chez des souris OVX KO pour GPER, on note aussi une progression accrue d'athérosclérose précoce lorsqu'elles sont nourries avec un régime athérogène riche en graisse (Meyer et al., 2014). Un autre modèle montre que GPER est aussi impliqué dans la gestion du stress et de l'anxiété (Kastenberger and Schwarzer, 2014).

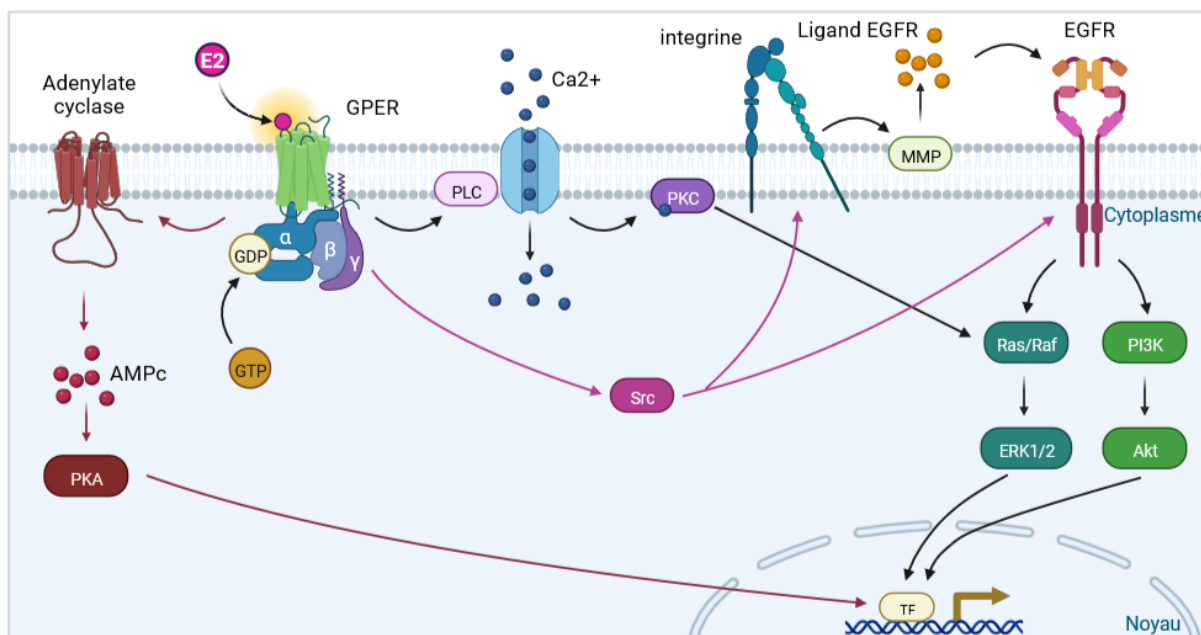
Les principaux effets délétères de l'absence de GPER impactent le métabolisme énergétique. Ainsi, des femelles KO pour GPER deviennent hyperglycémiques à cause d'une diminution du taux d'insuline, une altération de la tolérance au glucose et une réduction du taux d'IGF-1 dans le sérum (Mårtensson et al., 2009). La délétion de GPER chez des souris mâles augmente le taux de cholestérol et de triglycérides dû à une intolérance au glucose et à une résistance à l'insuline (Sharma et al., 2013). De manière intéressante, aucun changement dans l'apport alimentaire ou l'activité des animaux n'a été observé tandis qu'une diminution de la dépense énergétique est tout de même mesurée (Davis et al., 2014; Sharma et al., 2013; Haas et al., 2009).

#### 4.2.4. La signalisation dépendante de GPER

Bien qu'une proportion importante des modes d'action de l'E2 soit médiée par les ER nucléaires, les événements de signalisation rapide associés à la membrane n'ont pas pu tous leur être attribués. La plupart de ces événements sont associés à la signalisation des protéines G ou aux voies impliquant des facteurs de croissance. Ces effets sont attribués essentiellement au mode d'action de GPER (**Figure 14**) (Prossnitz and Barton, 2011). La stimulation de GPER par les œstrogènes induit un changement de la conformation du récepteur permettant une interaction entre GPER et les protéines G hétérotrimériques de type  $G\alpha_s$ .

Les actions non génomiques des œstrogènes déclenchent souvent une transduction du signal avec l'activation subséquente de seconds messagers intracellulaires. On distingue 4 cascades de protéines-kinases : la voie phospholipase C (PLC)/PKC ; la cascade Ras/Raf/MAPK ; la cascade PI3K/Akt qui induit, entre autres, la libération du calcium intracellulaire dépendante de GPER. La dernière cascade de protéines-kinases est celle de l'AMPc/PKA qui produit l'AMPc et/ou la protéine Src qui contribue au déclenchement de la signalisation dépendante d'EGFR médiée par GPER.

Les protéines kinases mentionnées ci-dessus peuvent phosphoryler des facteurs de transcription et modifier leurs fonctions et leurs capacités à se lier aux séquences génomiques pour moduler l'expression des gènes. Parmi les facteurs de transcription qui sont affectés par ces mécanismes de signalisation sont retrouvés Elk-1 (ETS like-1), CREB (C-AMP response element-binding protein), C/EBP $\beta$  (CCAAT-enhancer-binding protein beta), le complexe NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), et la famille des transducteurs et activateurs de transcription (STAT) (Fuentes and Silveyra, 2019).



**Figure 14 : Signalisation dépendante de GPER.**

La localisation de GPER étant très variable (cf. partie 4.1.5), il est représenté ici comme étant ancré à la membrane plasmique pour simplifier l'illustration. L'activation de GPER par l'E2 déclenche deux voies de signalisation différentes. (1) La première est médiée par l'activation de l'adénylate cyclase qui augmente le taux d'AMPC qui active PKA et son facteur de transcription CREB, impliquée notamment dans la prolifération cellulaire. (2) La seconde passe par l'augmentation du calcium intracellulaire qui peut déclencher la signalisation dépendante de l'EGFR et induire diverses cascades de phosphorylations pour réguler leurs gènes cibles comme par exemple les gènes c-Fos, CTGF et des cyclines, qui interviennent dans la régulation de la prolifération, de la survie et de l'invasivité des cellules (Molina et al., 2017).

Abréviations : Akt (protein kinase B) ; CREB (C-AMP response element-binding protein) ; CTGF (connective tissue growth factor) ; EGFR (epidermal growth factor receptor) ; ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) ; MMP (matrix metalloproteinase) ; PI3K (phosphoinositide 3-kinases) ; PKA (protein kinase A) ; PKC (protein kinase C) ; PLC (phospholipase C) ; Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src).

#### 4.2.5. Les effets des perturbateurs endocriniens

Le DES, qui a été décrit comme le premier PE, peut être responsable de l'apparition d'anomalies dans le système urogénital masculin. Le DES induit une forte diminution de l'expression protéique de GPER dans le gubernaculum testis chez des souris. Il est alors possible que les effets négatifs du DES soient médiés par GPER (Zhang et al., 2015).

Le BPA a une affinité 10 000 fois plus faible que l'E2 pour ER $\alpha$  et ER $\beta$ , mais c'est un concurrent relativement efficace pour la fixation de l'E2 à GPER avec une affinité de liaison

relative d'environ 2% (Thomas and Dong, 2006). GPER pourrait donc être le médiateur des effets néfastes du BPA en modulant la prolifération, la migration, l'invasion et la mort cellulaire.

Une faible concentration de BPA augmente la prolifération des cellules A7r5 (cellules de type fibroblaste de rat), HASMC (cellules musculaires lisses aortiques humaines), Hep-2 (lignée cellulaire de cancer du larynx humain), SNU-899 (cellules cancéreuses de la tête et du cou humain) et TU212 (lignée cellulaire du cancer du larynx humain) par l'intermédiaire de GPER en augmentant l'expression de PCNA (proliferating cell nuclear antigen) qui intervient dans la réplication de l'ADN, ou encore de l'angiotensine II, une protéine associée à la prolifération et à l'inflammation des cellules musculaires lisses (Gao et al., 2019; Li et al., 2017).

Le BPA favorise aussi la migration des cellules SKBR3 et des CAF (cancer associated fibroblasts) du sein en régulant la voie de signalisation GPER/EGFR/ERK (Pupo et al., 2012). Plus précisément, le BPA favorise l'assemblage de contacts focaux par l'intermédiaire des formes phosphorylées de FAK (focal adhesion kinase), Src et ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Castillo-Sanchez et al., 2020; Castillo Sanchez et al., 2016). Le BPA peut aussi augmenter l'invasion des cellules via GPER qui phosphoryle ERK1/2 et qui conduit à l'augmentation de l'expression de MMP2 (matrix metalloproteinase) et MMP9 (Zhang et al., 2014).

Une étude a montré que le BPA peut aussi induire l'apoptose des cellules KGN (lignée cancéreuse de la granulosa ovarienne). Lorsque GPER est activée par le BPA, il augmente la concentration en calcium intracellulaire et en ROS (reactive oxygen species) conduisant à la mort des cellules (Huang et al., 2021).

De nombreux effets bénéfiques sont attribués à la génistéine, dont des propriétés anti-inflammatoires. Dans des cellules microgliales, la génistéine diminue l'expression des modulateurs de l'inflammation COX-2 (cyclooxygénase 2), iNOS (oxyde nitrique synthase), TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et de l'IL-6. Ces effets sont médiés par GPER puisque la transfection d'un siRNA dirigé contre GPER restaure l'expression de ces marqueurs pro-inflammatoires (Du et al., 2018).

Ces quelques exemples montrent que GPER est un médiateur important de la transmission du signal initié par les PE. La nature de ces signaux semble toutefois variable selon la nature du ligand. Comprendre comment est régulée l'expression de GPER serait donc un moyen d'amplifier ou d'atténuer ces effets.

### **4.3. La régulation de l'expression de GPER...**

#### **4.3.1. ... par des ligands**

L'expression de GPER peut être régulée par plusieurs de ses ligands. Dans les cellules MCF7 ou HT-29 (lignée cellulaire de cancer du côlon humain), l'E2 augmente d'un facteur 2 l'expression de GPER (Yang et al., 2021; Bustos et al., 2017). Le BPA augmente l'expression de GPER au maximum d'1,5 fois dans des cellules MDA-MB-231 (Castillo-Sanchez et al., 2020). Ces résultats sont toutefois contredits par une autre étude où le BPA ne module pas l'expression de GPER dans ces mêmes cellules (Zhang et al., 2016).

L'expression de GPER peut aussi être modulée par la voie de signalisation de l'IGFR (insulin growth factor receptor) et de l'EGFR. Dans des CAF isolés de patientes atteintes de cancer du sein ou dans des SKBR3, IGF-1 augmente l'expression de GPER par l'intermédiaire de HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) (De Francesco et al., 2017). IGF-1 augmente aussi l'expression de l'ARNm et de la protéine GPER dans des cellules MCF7 et Ishikawa (cellule cancéreuse de l'endomètre humain) par la voie IGFR/PKC/ERK/c-Fos/AP-1. De manière intéressante, ces effets sont perdus lors de l'ajout d'un inhibiteur (ICI 182.780) ou d'un shRNA contre ER $\alpha$ , supposant qu'ER $\alpha$  est un intermédiaire de la régulation de l'expression de GPER induite par IGF-1 (De Marco et al., 2013). Dans des cellules d'Ishikawa, EGF et TGF augmentent l'expression de GPER par la voie de transduction du signal EGFR/ERK/c-Fos/AP-1. GPER est capable d'interagir directement avec EGFR et ER $\alpha$  et cela serait nécessaire au bon fonctionnement de la signalisation induite par GPER (Vivacqua et al., 2009).

#### **4.3.2. ... par l'hypoxie**

La stimulation des cellules HT-29 avec l'E2 augmente l'expression de GPER en conditions normoxique ou hypoxique. A noter que dans ce modèle, le faible taux d'oxygène seul ne modifie pas l'expression de GPER (Bustos et al., 2017). Toutefois, dans des CAF isolés à partir de carcinomes canauxiaux invasifs, l'hypoxie augmente l'expression d'HIF-1 $\alpha$  et de GPER (Ren et al., 2015). Plus précisément, HIF-1 $\alpha$  interagit avec les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE)

présente dans la séquence promotrice de GPER, situées entre -2812 et -2807, pour réguler positivement son expression (Recchia et al., 2011).

### **4.3.3. ... par l'hyperméthylation de son promoteur**

Dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468 traitées à la décitabine (5-aza-2'-deoxycytidine), un inhibiteur de l'ADN méthyltransférase, l'expression de GPER augmente de 4 à 6 fois respectivement. Ainsi, la méthylation du promoteur de GPER diminuerait son expression. Dans ces modèles cellulaires, une région riche en îlots CpG de 433 pb entre les nucléotides -4365 et -4797 est retrouvée dans le promoteur de GPER (Weißenborn et al., 2014). Il existe aussi 23 sites CpG présents entre les nucléotides -781 et -461 du promoteur de GPER dans des lignées cellulaires de cancer du côlon humain. Les lignées SW480 et HCT 8 qui expriment faiblement GPER ont plus de sites méthylés que la lignée LS 147T, qui exprime fortement GPER. De plus, la désacétylation de l'histone H3 est aussi impliquée dans la régulation négative de GPER (Liu et al., 2017). Dans les cancers gastriques et les cancers du sein triple négatif (TNBC), il est confirmé que l'hyperméthylation de GPER est négativement corrélée à son expression (Tian et al., 2019; Weissenborn et al., 2017).

### **4.3.4. ... par des traitements anticancéreux**

L'expression de GPER dans des cellules cancéreuses mammaires peut aussi être modulée par divers traitements anticancéreux comme la chimio ou la radiothérapie. Un traitement prolongé des cellules MCF7 au tamoxifène (TAM), une chimiothérapie largement utilisée dans le traitement du cancer du sein, entraîne une augmentation de l'expression de GPER (Molina et al., 2020).

Une exposition à 5 Gy de  $\gamma$ -radiations augmente l'expression de GPER dans les lignées MDA-MB-231, MDA-MB-468 et diminue celle des MCF7. Cette différence de réponse entre les lignées est dépendante de p53 : il est muté et non fonctionnel dans les lignées MDA et sauvage dans la lignée MCF7. Cela a été confirmé dans la lignée MCF7 où un siRNA contre p53 augmente l'expression de GPER après irradiations. Ainsi, p53 serait un régulateur négatif de l'expression de GPER après radiothérapie (Weißenborn et al., 2014).

Toutes ces données tendent à montrer que l'expression de GPER peut être régulée par (1) des ligands, comme l'E2 ; (2) l'hypoxie ; (3) la méthylation de son promoteur ; (4) les

traitements anticancéreux. On peut alors se demander si cette modulation de l'expression de GPER peut être favorable ou non à la survie des patients atteints de cancer.

#### **4.4. GPER, un facteur pronostic dans les cancers ?**

La prise en charge des patients tend à être personnalisée afin de pouvoir proposer le meilleur traitement possible à chaque patient. Cette médecine de précision passe notamment par l'identification de sous-groupes de patients exprimant des facteurs moléculaires favorables ou défavorables à leur survie. La corrélation entre l'expression de GPER et la survie globale (OS) ou la survie sans récurrence (DFS) a été explorée dans de nombreux cancers.

##### **4.4.1. Le niveau d'expression de GPER corrélée à la survie des patients**

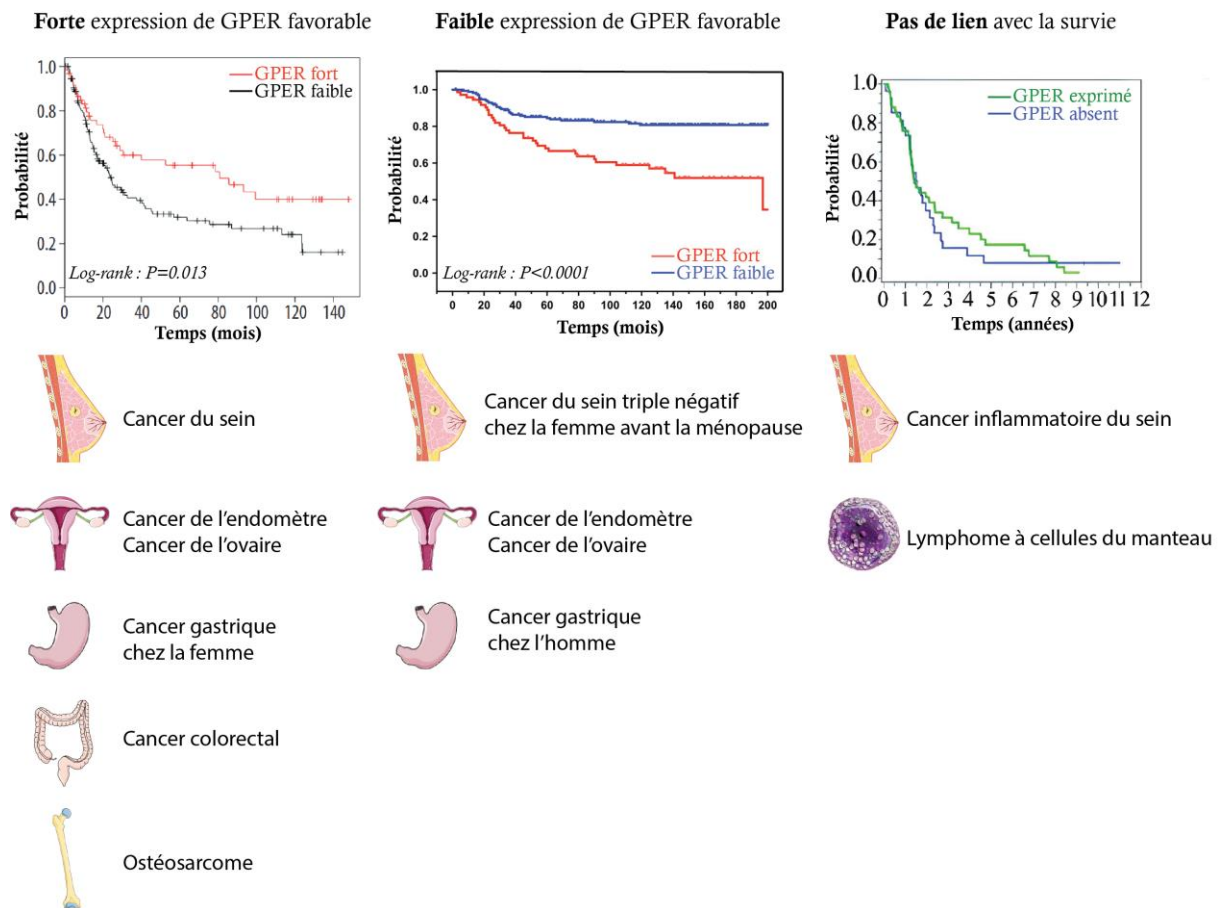
Le niveau d'expression de GPER est corrélé à la survie dans de nombreux cancers (**Figure 15**). Dans la majorité des cancers, il est un facteur favorable à la survie des patients lorsqu'il est fortement exprimé. Par exemple, dans les ostéosarcomes, les cancers gastriques, les cancers colorectaux et les carcinomes de l'endomètre, une forte expression de GPER est associée à une meilleure probabilité de survie des patients. Cependant, l'expression de GPER est généralement plus faible dans la tumeur que dans le tissu sain. Dans la majorité des cancers, aucun lien n'a pu être établi entre l'expression de GPER, la distance des métastases par rapport au foyer tumoral initial et le stade clinique, excepté pour les carcinomes de l'endomètre où on observe une perte de son expression dans les métastases (Tian et al., 2019; Wang et al., 2019; Liu et al., 2017; Krakstad et al., 2012). L'expression de GPER varie parfois selon le stade clinique de la tumeur. Dans le cancer du sein et de l'ovaire, l'expression de GPER diminue à mesure que le grade de la tumeur est haut. Cependant, les tumeurs de haut grades qui expriment encore fortement GPER sont associées à une meilleure OS et DFS (Ignatov et al., 2013a, 2013b). Le facteur pronostic de l'expression de GPER semble toutefois varier entre les hommes et les femmes. Ainsi, dans les cancers gastriques, la forte expression de GPER est favorable à l'OS et la DFS des femmes, tandis qu'une faible expression de GPER est favorable à l'OS des hommes (Tian et al., 2019). Dans ces différents cancers, l'expression de GPER semble être un facteur pronostic favorable à la survie des patients même si ce résultat est parfois à moduler en fonction du sexe.

Une forte expression de GPER peut parfois être de mauvais pronostic, comme c'est le cas dans une autre étude sur le carcinome de l'endomètre, dans les tumeurs primaires ovariennes et les TNBC (Heublein et al., 2014; Smith et al., 2009, 2007). De manière intéressante, dans les



TNBC, il semblerait que seule les femmes non ménopausées tirent un bénéfice de la faible expression de GPER pour leur survie (Ye et al., 2019).

Enfin, dans les lymphomes à cellules du manteau et dans les rares cas de cancer inflammatoire du sein, l'expression de GPER ne semble pas être prédictive de la survie des patients (Rudelius et al., 2015; Arias-Pulido et al., 2010).



**Figure 15 : Facteur pronostic de l'expression de GPER dans les cancers.**

Exemples de courbes de survie de Kaplan-Meier montrant l'impact du niveau d'expression de GPER sur la survie des patients. En dessous des courbes de survie sont représentés tous les cancers concernés pour chaque cas de figure. GPER peut être de bon pronostic lorsqu'il est (1) fortement exprimé (exemple tiré du cancer gastrique (Tian et al., 2019)), (2) faiblement exprimé (exemple tiré du cancer de l'ovaire (Smith et al., 2009)) ou (3) ne pas être corrélé à la survie (exemple tiré du lymphome à cellules du manteau (Rudelius et al., 2015)).

#### **4.4.2. Le niveau d'expression de GPER corrélé à d'autres marqueurs moléculaires impliqués dans la survie des patients**

Dans certains cancers, le facteur pronostic de la forte expression de GPER est amplifié dans des sous-groupes de patients présentant d'autres particularités moléculaires. C'est notamment le cas dans le cancer de l'endomètre, où une co-expression positive d'ER $\alpha$  et de GPER est associée au groupe présentant la meilleure survie. A l'inverse, la perte de ces deux marqueurs caractérise le groupe avec la pire survie (Krakstad et al., 2012). Dans le cancer épithélial de l'ovaire, une forte expression de GPER est de meilleur pronostic chez les patients FSHR (récepteur de l'hormone folliculo-stimulante) et LHCGR (récepteur de l'hormone lutéinisante) négatifs ou lorsqu'il est co-exprimé avec H3K4me3 (Han et al., 2021; Heublein et al., 2013). Dans les mélanomes, l'expression de GPER et ER $\beta$  prédit une meilleure DFS et est associée à une épaisseur de Breslow plus faible, un taux de mitoses plus bas et une présence plus élevée d'infiltration lymphocytaire péritumorale (Fabián et al., 2017).

Dans les TNBC, où l'expression de GPER est de mauvais pronostic, un gain de survie supplémentaire est notable pour le groupe de patients co-exprimant faiblement GPER et ER $\alpha$  (estrogen related receptor alpha) ou l'eitrine, une protéine clé de la structure cellulaire (Talia et al., 2020; Ye et al., 2020, 2019).

#### **4.4.3. La localisation de GPER, un facteur important dans la prédiction de la survie**

GPER est une protéine exprimée dans de nombreux compartiments cellulaires (cf. partie 4.1.5), et plusieurs éléments suggèrent que cela module ses fonctions. Dans le cancer du col de l'utérus, on observe une corrélation positive entre GPER et la survie des patients lorsque GPER est exprimé dans le cytoplasme (Friese et al., 2018).

Dans le cancer du sein, une forte expression membranaire de GPER est de mauvais pronostic, en raison d'une diminution de la réponse des patients au TAM (Sjöström et al., 2014). A l'inverse, une forte expression de GPER dans le cytoplasme est associée à une meilleure survie, tandis que son expression dans le noyau n'a pas d'impact sur la survie (Martin et al., 2018; Samartzis et al., 2014).

Le lien entre GPER et la survie des patients atteints de cancer ne dépend donc pas uniquement de son niveau d'expression, mais aussi de l'expression d'autres marqueurs moléculaires, de sa localisation et du sexe des patients.

#### **4.4.4. Un facteur de résistance aux traitements anticancéreux ?**

Chez les patientes atteintes de cancer du sein de type luminal, le statut d'expression de GPER pourrait être pris en compte pour la prise en charge thérapeutique. En effet, le traitement au TAM, un agoniste de GPER, provoque une réduction du volume tumoral moins importante chez les patientes GPER+ que chez les patientes GPER- (Ignatov et al., 2020). Il a ainsi été montré dans des cellules MCF7 (ER+, GPER+) que le TAM, qui active GPER, augmente aussi son expression, ce qui constituerait un double mécanisme de résistance des cellules lumineales à ce composé (Molina et al., 2020).

Dans des cellules MCF7R, résistantes au TAM, celui-ci augmente l'expression de l'aromatase par l'intermédiaire de GPER en favorisant le recrutement de c-Fos et c-Jun sur le site AP-1 du promoteur de *CYP19A1*. La production locale d'E2 par l'aromatase médiée par GPER permettrait donc aux cellules d'échapper au TAM (Catalano et al., 2014). De plus, en comparant les cellules MCF7 et MCF7R, on constate que la résistance des cellules au TAM est dépendante de la dégradation de Bim, une protéine pro apoptotique BH3, par TRIM2 (tripartite motif-containing protein 2). La voie GPER/MAPK/ERK intervient dans ce processus en augmentant l'expression de TRIM2 (Yin et al., 2017). Cependant, dans ces mêmes cellules MCF7R, la voie de signalisation GPER/EGFR/ERK diminue l'expression de la  $\beta$ 1-intégrine, ce qui permet de restaurer en partie la sensibilité au TAM (Yuan et al., 2015). Il semblerait donc que la signalisation initiée par le TAM et dépendante de GPER aient des effets ambivalents sur la réponse des cellules cancéreuses mammaires lumineales.

GPER est aussi détecté dans le microenvironnement du cancer du sein, en particulier dans les CAF. La voie GPER/PI3K/Akt favorise la sécrétion extracellulaire d'HMGB1 (high mobility group box 1), une protéine impliquée dans l'inflammation. L'HMGB1 ainsi sécrété permettrait aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose induite par le TAM en entrant en autophagie (L. Liu et al., 2021). Le TAM stimule l'axe GPER/EGFR/ERK dans les CAF, ce qui augmente également l'expression de l'aromatase et donc la production d'E2. De cette manière, l'E2 localement produit entrerait en compétition avec le TAM, ce qui contribuerait à la résistance des cellules à ce composé (Luo et al., 2014).

ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) est une protéine fortement exprimée dans les métastases de patientes atteintes de tumeur mammaire résistante au TAM. Il a ainsi été montré que le TAM est responsable de l'augmentation d'ABCG2 par les voies GPER/EGFR/ERK et GPER/EGFR/Akt. Chez les patientes résistantes au TAM et traitées à base d'anthracycline, celles à plus mauvais pronostic expriment fortement GPER et ABCG2. Ainsi, GPER pourrait aussi être impliqué dans la résistance à la chimiothérapie dans des tumeurs déjà résistantes au TAM (Yu et al., 2020).

L'expression de GPER semble être un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein en induisant notamment la résistance des cellules au TAM. Cependant, selon la nature du ligand de GPER, la signalisation qui en découle peut-être différente (cf. partie 4.2.5). Ainsi, des ligands spécifiques de GPER ont été synthétisés dans l'espoir d'être de potentiels candidats dans le traitement des cancers.

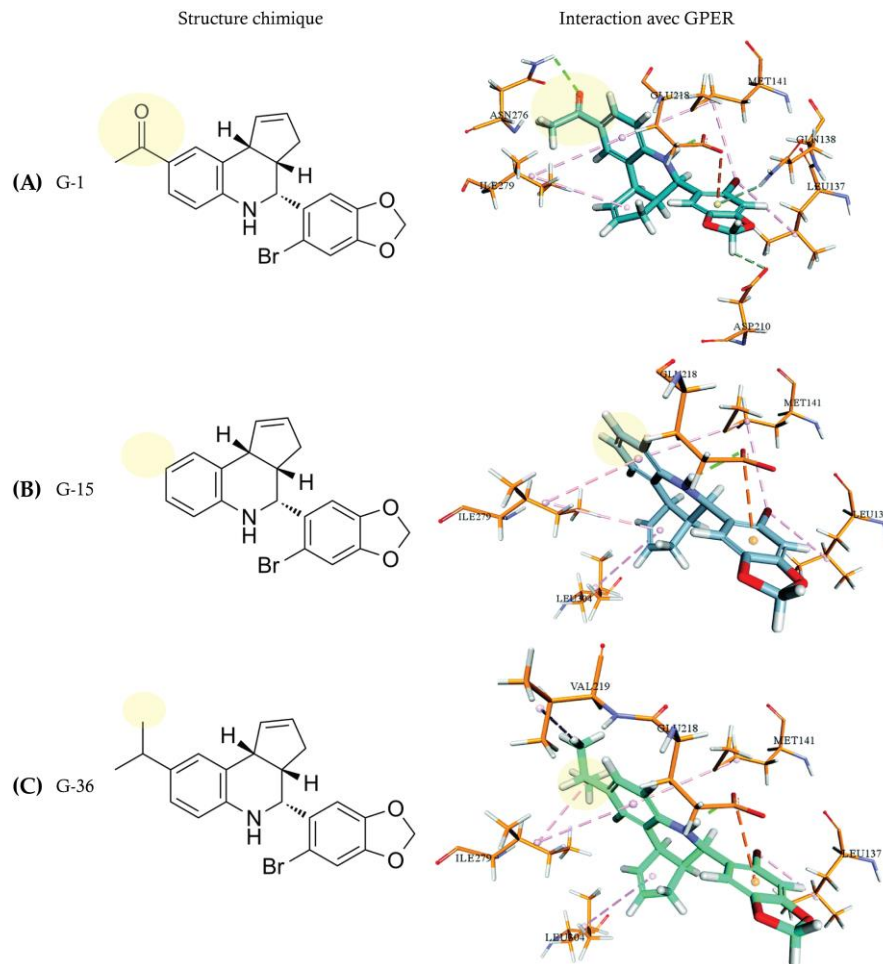
## **4.5. Le ciblage de GPER dans les cancers, une piste thérapeutique ?**

### **4.5.1. La conception et la sélection du G-1, G-15 et G-36**

Le G-1 (GPR30-specific compound 1) a été identifié comme le premier agoniste spécifique de GPER en 2006 (**Figure 16A**). Après un criblage virtuel de ligands potentiels de GPCR puis validation moléculaire, le G-1 a été choisi comme candidat ligand potentiel pour GPER. Le G-1 ( $K_i=11$  nM) est un compétiteur de l'E2 ( $K_i=5,7$  nM) pour sa fixation à GPER avec une affinité plus importante. Les auteurs ont montré que le G-1 n'entre pas en compétition avec l'E2 pour sa fixation à ER $\alpha$  ou ER $\beta$  à des doses allant jusqu'à 10  $\mu$ M, désignant le G-1 comme un agoniste spécifique de GPER. Ceci serait dû à la structure du G-1 qui ne semble pas adéquate pour établir les liaisons hydrogène clés nécessaires à l'activation des ER nucléaires. D'un point de vue fonctionnel, il a été confirmé que le G-1 induit, tout comme l'E2, une activation de PI3K dépendante de GPER (Bologa et al., 2006).

En 2009 et 2011 ont été synthétisés deux antagonistes spécifiques de GPER, respectivement le G-15 et le G-36. L'approche bio-informatique utilisée pour leur identification est la même que celle utilisée pour la découverte du G-1, à ceci près que les auteurs ont cherché des composés capables de bloquer les effets de l'E2 sur la mobilisation du calcium. Le G-15 a la même structure que le G-1 avec un groupement éthanone en moins (**Figure 16B**) (Dennis et al., 2009). Le G-15 a la même affinité que le G-1 pour GPER mais il est capable, à forte dose, de

se fixer sur ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Un autre antagoniste de GPER, le G-36 a été criblé pour ne pas induire d'activation d'ER $\alpha$  et ER $\beta$ . L'hypothèse est que le groupement cétone du G-1 était responsable de son effet agoniste. Ce groupement a été retiré dans la structure du G-36 et une absence de fixation du G-36 sur les ER nucléaires et une forte affinité pour GPER ont été démontrées (**Figure 16C**) (Dennis et al., 2011).



**Figure 16 : Structure et modèle prédictif d'interaction du G-1, G-15 et G-36 avec GPER.** (A) Le G-1 est capable d'interagir avec une forte affinité pour GPER grâce son groupement cétone. Cette forte interaction le désigne comme un agoniste spécifique de GPER sans liaison aux récepteurs aux œstrogènes (ER) nucléaires. (B) L'absence du groupement éthanone dans la structure du G-15 modifie les acides aminés impliqués dans sa fixation et induits des effets antagonistes. (C) L'absence du groupement cétone dans la structure du G-36 induit des effets antagonistes. Contrairement au G-15, le G-36 est incapable, même à forte dose, d'induire une signalisation dépendante des ER nucléaires. Les liaisons hydrogène, électrostatiques et hydrophobes sont représentées respectivement par des lignes pointillées de couleur verte, jaune et rose. Les résidus d'acides aminés sont représentés par des bâtonnets orange (Khan et al., 2019).

La création des agonistes et antagonistes spécifiques de GPER a grandement contribué à la compréhension de la signalisation médiée par GPER, même si les effets du G-1 restent débattus puisque cette molécule est décrite comme pro- ou antitumorale dans de nombreux cancers (cf. partie 4.5.3).

#### **4.5.2. Les effets pro- et antitumoraux du G-15 et du G-36**

Très peu d'effets directs des antagonistes G-15 et G-36 sont décrits dans la littérature. Généralement, ils sont utilisés pour montrer que les effets induits par l'E2 ou le G-1 sont bloqués après un prétraitement des cellules avec ces antagonistes, confirmant ainsi l'implication de GPER dans l'initiation du signal.

Dans des cellules souches mésenchymateuses osseuses, le G-15 provoque une diminution de la viabilité et de la prolifération cellulaire. Il induit un blocage des cellules en phase G0/G1, caractérisé par une diminution de l'expression des cyclines D1, E2, B et des formes phosphorylées de CDK6 (cyclin-dependent kinase) et CDK2. Le G-15 seul peut aussi bloquer la production d'AMPc (Chuang et al., 2020). Une diminution de la prolifération induite par le G-15 est aussi notable dans des cellules épithéliales de l'endomètre (Imesch et al., 2013). A l'inverse, le G-15 augmente la prolifération des cellules du gyrus denté, une structure cérébrale située proche de l'hippocampe, dans la zone dorsale uniquement (Duarte-Guterman et al., 2015).

Au niveau moléculaire, le G-15 intervient dans la régulation de plusieurs cibles impliquées entre autres dans stéroïdogénèse, l'inflammation, l'angiogénèse et la prolifération cellulaire. Dans des explants de testicules de souris et dans des cellules de Leydig, il diminue l'expression de PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), Raf-1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF (vascular endothelial growth factor), COX-2, FSHR, 3 $\beta$ -HSD, PLIN (perilipin 1), LC3 (microtubule-associated proteins 1A/1B), l'expression nucléaire de ERR $\alpha$  et ERR $\gamma$ . Il augmente aussi l'expression nucléaire d'ERR $\beta$ , de la progestérone, PPAR $\gamma$ , ERK1/2, PI3K, Akt, TGF $\beta$  (Gorowska-Wojtowicz et al., 2022; Milon et al., 2019).

Aucun effet direct du G-36 n'a été démontré.

### 4.5.3. Les effets pro- et antitumoraux du G-1

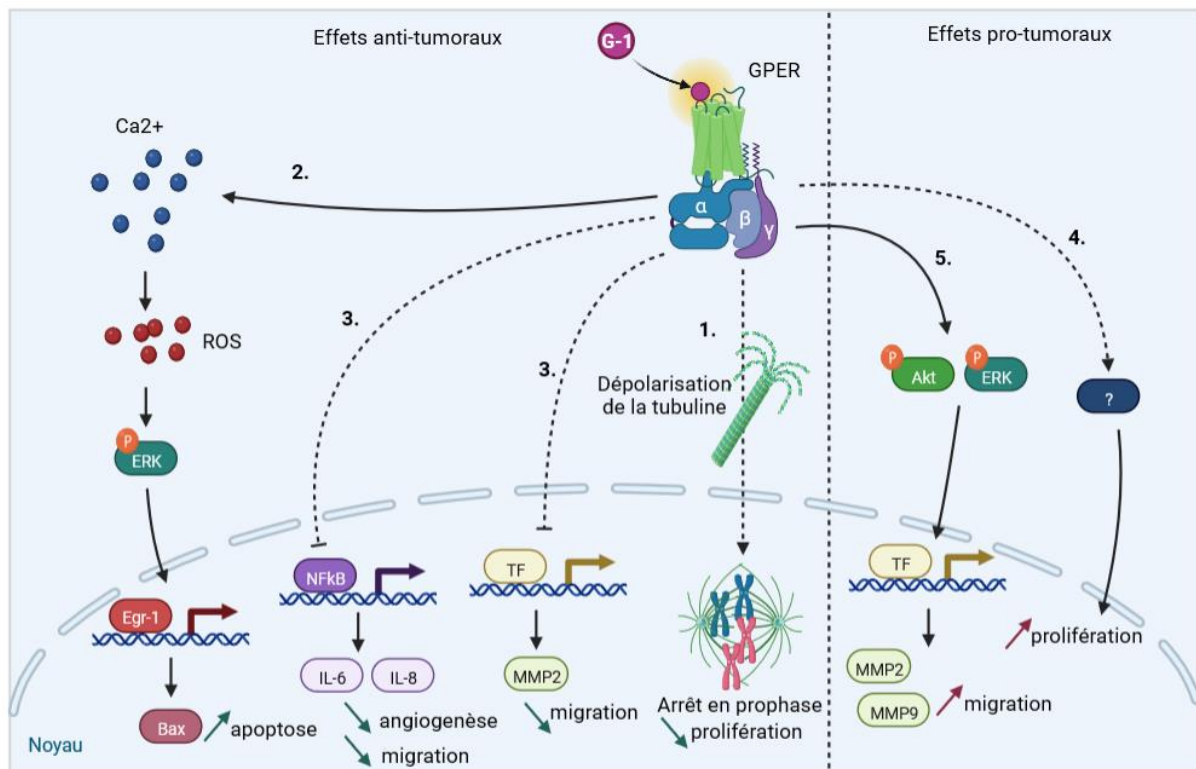
La majorité des effets du G-1 sont décrits comme antitumoraux en impactant principalement la prolifération cellulaire (**Figure 17 (1 à 3)**). A l'inverse du G-15, le G-1 diminue la prolifération des cellules de la zone dorsale du gyrus denté (Duarte-Guterman et al., 2015). Il diminue aussi la prolifération des cellules tumorales de Leydig de rat R2C, des cellules tumorales de l'endomètre humain HEC-1-A et RL95-2 et des cellules d'ostéosarcome HOS et U2OS (Zha et al., 2018; Chimento et al., 2013; Skrzypczak et al., 2013). Le mécanisme conduisant à l'arrêt de la prolifération a été exploré dans des cellules Jurkat (lymphocyte T CD4 humain) et dans les lignées cancéreuses ovariennes IGROV-1 et SK-OV-3 où le G-1 provoque une accumulation de cellules en phase G2/M. Une analyse plus spécifique montre que le G-1 altère la morphologie des cellules en bloquant la polymérisation de la tubuline, ce qui conduit à un arrêt du cycle cellulaire précisément en prophase (Torres-López et al., 2022; Wang et al., 2013).

Le G-1 peut aussi déclencher la mort des cellules par apoptose en augmentant la concentration en calcium intracellulaire ce qui conduit à l'accumulation de ROS, toxique pour les cellules (Torres-López et al., 2022). Cela est confirmé dans des cellules corticosurrénales H295R où la production de ROS active la voie des MAPK dont pERK1/2 puis Egr-1 (early growth response protein 1) et Bax, entraînant ainsi la mort des cellules (Casaburi et al., 2017). L'augmentation anormale de pERK1/2 serait précisément l'élément déclencheur de la mort des cellules par apoptose (Qiu et al., 2021; Chimento et al., 2013). La mort des cellules par autophagie induite par le G-1 a été écartée (Muler et al., 2020).

Le G-1 impacte aussi les processus de migration cellulaire, d'invasion et d'angiogénèse. Le G-1 diminue la migration des cellules HOS et U2OS, caractérisées par une diminution de MMP2 et de la vimentine. Le G-1 agit en diminuant la phosphorylation et la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau, ce qui réduit l'expression d'IL-6 et IL-8 qui sont des médiateurs directs de la migration cellulaire (Zha et al., 2018). Dans un modèle de MDA-MB-231 xénogreffées chez la souris, le G-1 inhibe la voie NF- $\kappa$ B/IL-6 conduisant à une diminution de l'angiogénèse et de l'invasion des cellules (Liang et al., 2017).

Très peu d'effets du G-1 sont décrits comme pro-tumoraux (**Figure 17 (4 et 5)**). Le traitement de cellules de tibia de rat mises en culture avec le G-1 induit une augmentation modérée de la prolifération cellulaire (Chuang et al., 2020). Sur des cellules Renca (carcinome

rénal de la souris), l'augmentation de la prolifération ainsi qu'une augmentation de la migration cellulaire sont observées (Feldman et al., 2016). Dans les lignées cellulaires de tumeur rénales ACHN et OS-RC-2, le G-1 provoque une augmentation de la migration cellulaire en induisant la phosphorylation d'Akt et ERK qui activerait à leur tour MMP2 et MMP9 (Guan et al., 2018).



**Figure 17 : Synthèse des effets pro- et antitumoraux du G-1.**

Parmi les effets antitumoraux, (1) le G-1 peut induire une diminution de la prolifération caractérisée par un arrêt des cellules en prophase à cause d'un défaut de polarisation de la tubuline (Wang et al., 2013). (2) Il peut aussi favoriser l'apoptose des cellules par l'augmentation du  $Ca^{2+}$ , qui conduit à la formation de ROS (Casaburi et al., 2017). (3) Il peut bloquer la migration en diminuant l'expression de MMP2, IL-6 et IL-8, ces derniers étant aussi impliqués dans l'angiogénèse (Zha et al., 2018). (4) Le G-1 semble aussi augmenter la prolifération cellulaire sans que l'on ne sache par quel mécanisme (Feldman et al., 2016). (5) Il est aussi capable d'augmenter l'expression de MMP2 et MMP9, ce qui augmente la migration cellulaire par la voie des MAPK (Guan et al., 2018).

Abréviations : Akt (proteine kinase B) ; Egr-1 (early growth response protein 1) ; ERK (extracellular signal-regulated kinase) ; IL (interleukine) ; MMP (matrix metalloproteinase) ; NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) ; ROS (reactive oxygen species).

Les effets du G-1 apparaissent variables selon l'origine des cellules utilisées. Cependant, les effets antitumoraux, notamment sur la prolifération et la mort cellulaires semblent être



conservés dans plusieurs modèles de cellules cancéreuses. Il convient donc de poursuivre les études sur le G-1 comme potentielle nouvelle thérapie anticancéreuse ciblant GPER.

#### 4.5.4. L'utilisation du G-1 en clinique

Le G-1, déposé sous le nom de Tespria<sup>tm</sup> (n° accession : 88448607) est actuellement en test préclinique pour le traitement de l'obésité et du diabète. Dans des modèles de rongeurs, il permet de réduire significativement le poids corporel, de diminuer le cholestérol circulant, d'augmenter la dépense énergétique, d'améliorer la tolérance au glucose et de restaurer la sensibilité à l'insuline.

Chez des souris obèses induites par l'alimentation (DIO) ou OVX, le traitement par le G-1 atténue l'adiposité tant chez les mâles que chez les femelles. Les souris femelles traitées au G-1 ont une teneur en graisse plus faible, une réduction du cholestérol à jeun, du taux de glucose et de l'insuline, et des marqueurs inflammatoires. Chez les mâles DIO, le G-1 ne provoque pas de perte de poids mais empêche une prise de poids supplémentaire et améliore la tolérance au glucose. Aucun changement dans la prise alimentaire ou le niveau d'activité n'est mesuré. Le G-1 augmente l'expression du gène thermogénique UCP1 (uncoupling protein 1) et des gènes mitochondriaux tels que PPARGC1A (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), ACACA (acetyl-CoA carboxylase alpha) et NRF1 (nuclear respiratory factor 1) dans le tissu adipeux brun des souris OVX. Ces gènes régulent le métabolisme oxydatif et le maintien de l'homéostasie du glucose et des lipides, ainsi que l'équilibre énergétique (Sharma et al., 2020a).

Le G-1 est un mélange racémique de deux énantiomères : le 1-((3aS,4R,9bR)-4-(6-bromobenzo[if][l,3]dioxol-5-yl)-3a.4.5.9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl)ethan-1-one et le 1-((3aR,4S,9bS)-4-(6-bromobenzo[if][l,3]dioxol-5-yl)-3a.4.5.9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl)ethan-1-one (identifiant d'accèsion : WO/2020/023391). Le premier énantiomère est renommé SRR-G-1 ou LNS8801 et le second RSS G-1 ou LNS8812. Il a récemment été avancé que l'énantiomère LNS8801 est le seul responsable des effets anticancéreux attribués au G-1. En 2019 a débuté un essai clinique de phase I/IIA du LNS8801 avec ou sans immunothérapie avec le pembrolizumab pour le traitement des mélanomes avancés (identifiant d'accèsion : NCT04130516). Le médicament est administré par voie orale aux patients et a pour but d'inhiber la prolifération des cellules tumorales. Nous verrons dans

la partie résultats que le G-1 pourrait également être une molécule prometteuse dans le traitement des tumeurs cérébrales.

Les œstrogènes sont donc des modulateurs importants de nombreuses fonctions, notamment cérébrales. Les œstrogènes possèdent notamment des propriétés neuroprotectrices dans certaines pathologies cérébrales. De plus en plus d'études montre que les gliomes, des tumeurs cérébrales primaires, sont sensibles aux hormones et particulièrement aux œstrogènes. Ainsi, le prochain chapitre présentera les différentes données disponibles sur l'impact des œstrogènes sur l'apparition et la progression des gliomes. Les effets des œstrogènes sont médiés par des ER nucléaires et membranaires. Le prochain chapitre abordera donc également les rôles assurés par ces différents ER dans les gliomes.

# Chapitre 2 : Les tumeurs primaires du cerveau

## 1. Les généralités sur le cerveau

Le système nerveux est composé de deux parties : le SNC qui est constitué de la moelle épinière et du cerveau et du SNP constitué de nerfs et d'autres types de cellules de soutien qui se ramifient dans le reste du corps et communiquent en retour dans le SNC.

Le SNC peut être divisé en 3 sections :

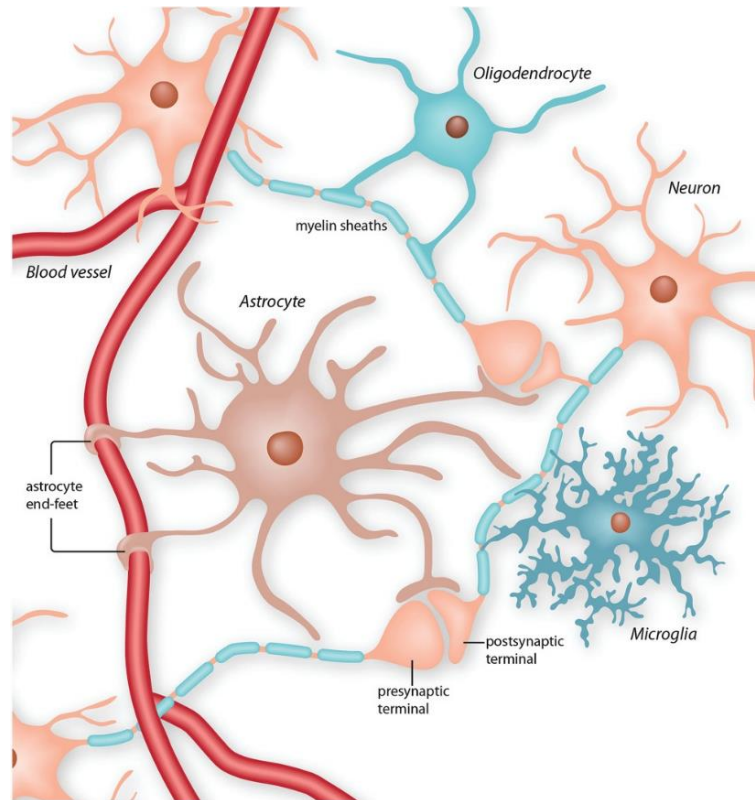
- **Le tronc cérébral** qui est responsable des processus autonomes comme la respiration et le rythme cardiaque. Il contribue également à la transmission des informations du cerveau au SNP.
- **Le cervelet** qui est situé à côté du tronc cérébral. Il gère l'équilibre et la coordination des mouvements.
- **Les hémisphères cérébraux** gauche et droit qui sont responsables de la perception sensorielle, du traitement de l'information, de la mémoire, de l'apprentissage et de la prise de décision. Les deux hémisphères sont reliés par le corps calleux, un pont de fibres nerveuses larges et plates qui aident à relayer les signaux entre les deux régions.

Les hémisphères cérébraux peuvent être subdivisés en 4 lobes principaux :

- **Le lobe occipital** qui est responsable du traitement et de l'interprétation des informations visuelles.
- **Le lobe temporal** qui est le principal centre de traitement des sons et de certaines formes de mémoire.
- **Le lobe pariétal** qui est le siège du cortex somatosensoriel, la zone du cerveau responsable du traitement des informations relatives aux sensations et au toucher ainsi que de certains aspects de la localisation spatiale.
- **Le lobe frontal** qui est responsable de la fonction exécutive. Il intervient dans le raisonnement, la prise de décision, l'intégration sensorielle, la planification et l'exécution des mouvements.

Une autre présentation courante du cerveau consiste à séparer la matière grise et la matière blanche. La matière grise représente 10% du parenchyme cérébral et elle est principalement constituée du corps cellulaire et des dendrites des neurones. La matière blanche constitue quant

à elle les 90% restants du parenchyme cérébral et est constituée des axones des neurones myélinisés. On retrouve dans ces deux substances différents types de cellules gliales (**Figure 18**) :



**Figure 18 : Les différentes cellules du parenchyme cérébral.**

Le parenchyme cérébral est constitué des neurones et de leurs prolongements axoniques myélinisés, des cellules gliales dont les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie. Les vaisseaux sanguins sont séparés du parenchyme cérébral par les pieds astrocytaires (Maiolo et al., 2021).

- **Les astrocytes** sont répartis dans la matière grise et la matière blanche, sous la dure-mère et autour de la vascularisation cérébrale. Ce sont les cellules les plus abondantes et diversifiées du SNC. Ils jouent un rôle crucial dans la formation et le maintien de la BHE. La BHE est extrêmement sélective et protège le cerveau contre l'entrée de substances toxiques, l'afflux d'ions tels que le  $K^+$  ou le  $Ca^{2+}$ , ainsi que des neurotransmetteurs tels que le glutamate. Les astrocytes régulent aussi le flux sanguin vers le cerveau et synchronisent l'activité des axones. Ils modulent le métabolisme énergétique et l'homéostasie du cerveau puisque ce sont les seules cellules du SNC

capables de stocker du glycogène et de produire et sécréter du cholestérol pour soutenir les besoins métaboliques des neurones (Lundgaard et al., 2014).

- **Les oligodendrocytes** sont localisés aussi bien dans la substance grise que blanche, où ils ont des rôles distincts. Dans la substance grise, ils assurent un rôle métabolique à proximité du corps cellulaire des neurones. Dans la substance blanche, ils participent à la myélinisation des axones des neurones. La myéline constitue une gaine protectrice qui permet aux signaux électriques de se propager efficacement.
- **La microglie** correspond aux macrophages résidents du SNC et constitue la première et principale forme de défense immunitaire active dans le SNC. Elle élimine constamment les plaques, les neurones et les synapses endommagées ainsi que les agents infectieux. La microglie joue également un rôle-clé dans le maintien des fonctions cérébrales normales. Elles peuvent se polariser et présenter un phénotype pro-(M1) ou anti-inflammatoire (M2). Le sous-type M1 produit des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-12), participe à la phagocytose et déclenche une réponse immunitaire initiée par la détection d'antigène. Le sous-type M2 peut produire soit des polyamines pour induire la prolifération, soit de la proline pour induire la production de collagène et favoriser la cicatrisation des plaies et la réparation des tissus.

## **2. Les tumeurs primaires du système nerveux central**

Le cerveau peut être l'origine de nombreuses pathologies neurodégénératives et cancéreuses. Les gliomes sont des tumeurs primaires du cerveau, séparés en différents grades selon leurs caractéristiques histo-moléculaires prédictives de la survie des patients.

### **2.1. Classification**

Les gliomes sont une famille de tumeurs très diversifiée dont la classification est régulièrement mise à jour. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des tumeurs du SNC parue en 2007 se base uniquement sur des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques (Louis et al., 2007). Chez l'adulte, la nomenclature des gliomes dépend de la cellule gliale d'origine. Les astrocytomes et les glioblastomes (GBM) désignent respectivement les gliomes d'origine astrocytaire, les oligodendrogliomes des oligodendrocytes et les épendymomes des cellules épendymaires. Quatre grades ont été décrits en fonction de la gravité de la tumeur et du pronostic des patients.

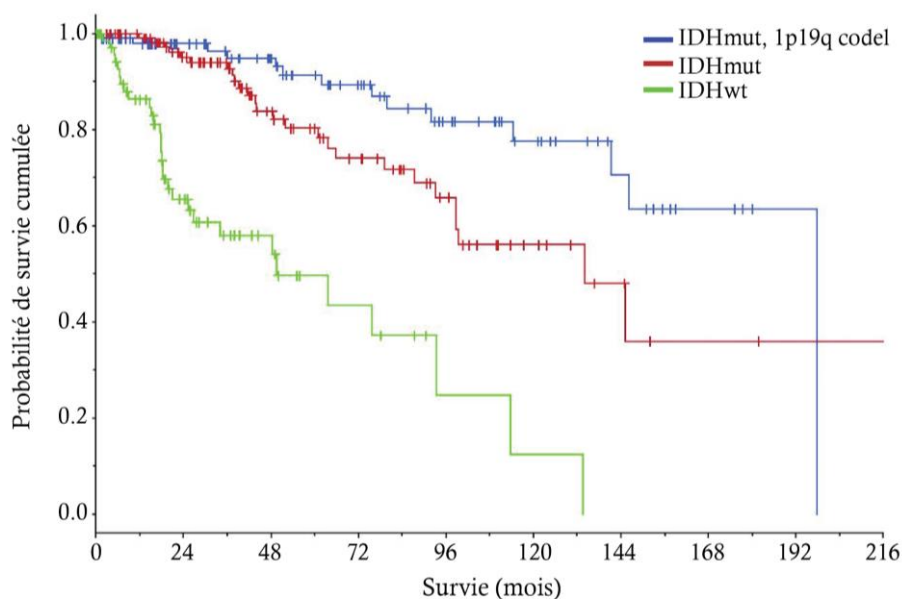
Les tumeurs de grade 1, appelées astrocytomes pilocytiques, sont souvent bénignes et peuvent être réséquées par chirurgie sans récurrence. Les grades 2 ou gliomes diffus, gliomes infiltrants ou de bas grade (low grade gliomas ou LGG) comprennent majoritairement des astrocytomes et des oligodendrogliomes. Les grades 2 sont des tumeurs à croissance lente qui vont acquérir un phénotype plus agressif avec le temps. Le passage du grade 2 au grade 3 est évalué par la densité et la différenciation des cellules tumorales, le nombre de noyaux atypiques et l'indice mitotique. Les grades 3 sont majoritairement des astrocytomes anaplasiques et des oligodendrogliomes. Les GBM sont les tumeurs de grade 4 et en tant que tels sont celles à plus mauvais pronostic. D'aspects hétérogènes, ils sont caractérisés par un phénotype à croissance rapide avec la présence de régions nécrotiques et un développement vasculaire important (Perry and Wesseling, 2016). La classification de 2007 distinguait deux catégories de GBM : les GBM primaires qui se développent *de novo* ou les GBM secondaires qui résultent du développement d'un gliome de plus bas grade.

Bien que cette classification ait grandement contribué au diagnostic de la sévérité de la tumeur, son utilisation restait souvent limitée pour la prise de décision thérapeutique et pour la prédiction de la survie du patient en réponse au traitement. En 2016, l'OMS a mis à jour une nouvelle classification des gliomes, se basant sur la classification de 2007 mais en y ajoutant des paramètres moléculaires afin de définir de nouveaux sous-types prédictifs de la survie des patients (Tabouret et al., 2016). La nouvelle classification inclut désormais la mutation de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et la codéletion des bras chromosomiques 1p/19q (Komori, 2017).

Les isocitrates déshydrogénases sont des enzymes qui convertissent l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate. Il en existe trois isoformes : IDH1, IDH2 et IDH3. IDH1 se trouve dans le cytoplasme et le peroxysome tandis qu'IDH2 et IDH3 sont dans la matrice mitochondriale. Les mutations les plus courantes dans les gliomes sont les mutations de l'acide aminé IDH1 R132 et IDH2 R172. Ces mutations vont induire un changement tridimensionnel de la structure de l'enzyme qui va modifier son activité et conduire à la conversion de l' $\alpha$ -cétoglutarate en D-2-hydroxyglutarate (D2HG). L'accumulation de cet oncométabolite est néfaste pour la cellule car il induit des modifications épigénétiques entraînant une dérégulation de l'expression de gènes (Ye et al., 2018). Le D2HG agit comme un inhibiteur de plusieurs dioxygénases  $\alpha$ -cétoglutarate-dépendante, dont les histones déméthylases ou les TET (ten-eleven translocation enzymes) 5-méthylcytosine hydroxylases conduisant à une augmentation des marques

répressives de méthylation des histones et à une augmentation globale du taux de 5-méthylcytosine. Il est intéressant de noter que dans les gliomes, les mutations d'IDH1/2 sont associées à un pronostic de survie plus favorable en partie car ces tumeurs sont plus sensibles au TMZ (**Figure 19**) (Houillier et al., 2010).

En plus des mutations d'IDH1/2, l'altération de la perte d'hétérozygotie 1p/19q est utilisée pour la classification des gliomes. La codélétion chromosomique 1p/19q associée à une mutation d'IDH1/2 amplifie la réponse à la chimiothérapie et conduit donc à un pronostic plus favorable (**Figure 19**) (Tang et al., 2018; Hu et al., 2016).



**Figure 19 : Différence de survie selon le statut moléculaire IDH et 1p19q.**

Courbes de survie globale (OS) selon la classification de l'OMS des tumeurs du SNC de 2016. L'OS diffère entre tous les sous-types moléculaires de gliome de bas grade ( $P < 0,0022$ ). Les patients atteints d'un gliome IDHwt ont l'OS médiane la plus courte ( $n=73$ , 49,5 mois), suivis par les patients atteints d'IDHmut ( $n=129$ , 134,6 mois) et les patients atteints d'IDHmut, 1p19q codel ( $n=104$ , 196,6 mois) (Darvishi et al., 2020).

D'autres altérations génétiques sont actuellement étudiées en clinique pour améliorer la classification et la prédiction de la réponse au traitement (Barthel et al., 2022). On retrouve notamment :

- **EGFR**, un récepteur tyrosine kinase transmembranaire. L'amplification d'EGFR favorise la migration des cellules, réduit la réponse inflammatoire et favorise

l'angiogenèse dans les GBM. La mutation active **EGFRvIII** qui est dépourvu des acides aminés 6 à 273 par rapport à la forme protéique complète, peut-être pro-tumorigène en favorisant notamment la survie et l'invasion des cellules tumorales. Néanmoins, EGFRvIII est parfois associé à une meilleure survie des patients atteints de GBM en raison d'une sensibilité accrue au TMZ. L'implication d'EGFR dans la survie des patients est encore grandement débattu comme l'atteste deux méta-analyses récentes qui délivrent des conclusions contradictoires (Li et al., 2018; Chen et al., 2015).

- **ATRX**, une hélicase ATP-dépendante et **TERT**, une transcriptase inverse de la télomérase. Une mutation d'ATRX et de TERT est généralement liée à une mutation d'IDH et à une présence accrue de l'EGFR. Une mutation dans le promoteur de TERT est associée à une augmentation de son expression tandis qu'une mutation d'ATRX diminue son expression. De ce fait, la régulation des gènes par le remodelage de la chromatine n'est plus régulée et cela en fait un facteur de mauvais pronostic.
- **BRAF**, est responsable de la production du proto-oncogène B-Raf. Les mutations BRAF V600E et la fusion KIAA1549-BRAF sont retrouvées dans les gliomes. La détection des variants de BRAF en combinaison avec IDH est essentielle pour différencier les astrocytomes pilocytiques et diffus.
- **MGMT** (O6-méthylguanine méthyltransférase), est une protéine de réparation de l'ADN. La méthylation de son promoteur diminue son expression et entraîne une accumulation de cassures de l'ADN conduisant à l'apoptose des cellules. Il est donc de bon pronostic puisqu'en limitant les réparations de l'ADN, le TMZ est plus efficace.
- **H3K27M**, est une mutation dans les gènes codant pour les histones HIST1H3B et H3F3A qui sont de mauvais pronostic chez les patients dont l'âge est inférieur à 35 ans et sans impact sur la survie au-delà (Hu et al., 2022).

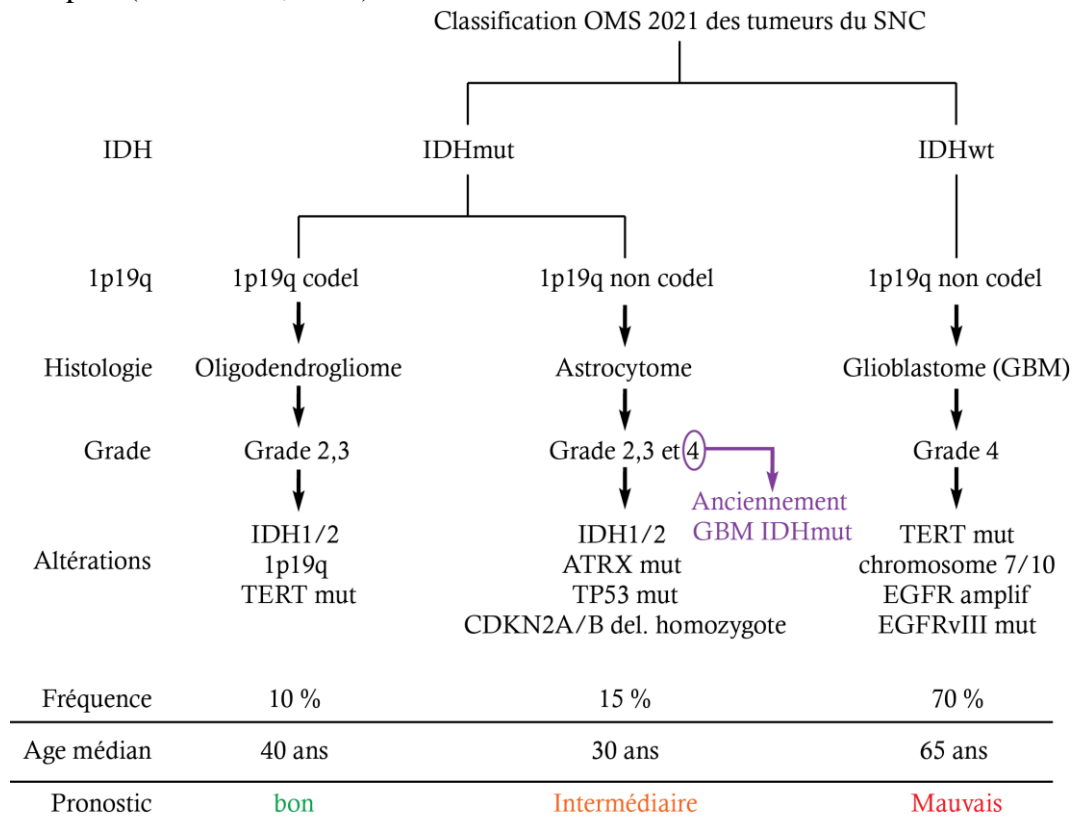
La mise à jour de la classification des tumeurs du SNC parue en 2021 tend principalement à simplifier la classification de 2016 (**Tableau 1**). Les gliomes de bas et haut grades se divisent maintenant en 3 sous-types caractérisés par leur statut moléculaire : les oligodendrogliomes mutés IDH1/1p19q codel, les astrocytomes mutés IDH1 ou les glioblastomes IDH1wt. De ce fait, les GBM anciennement secondaires sont maintenant appelés astrocytomes de grade 4 (IDHmut) et les GBM *de novo* (IDHwt) simplement GBM. A noter que la présence de la délétion homozygote de CDKN2A/B (cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B) qui sont des régulateurs de la progression du cycle cellulaire, conduit à la classification de la tumeur en



astrocytome de grade 4, même en absence de prolifération microvasculaire ou de nécrose (Louis et al., 2021).

**Tableau 1 : Classification de l’OMS 2021 des gliomes.**

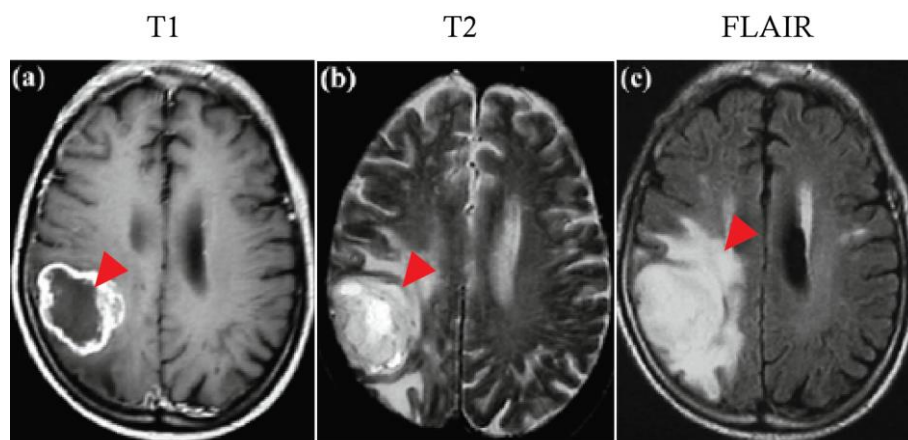
Adapté depuis (Louis et al., 2021).



## 2.2. Diagnostic de la maladie

La présence d’une tumeur cérébrale provoque une élévation de la pression intracrânienne. Les premiers signes cliniques associés à cela sont des crises d’épilepsie fréquentes, des céphalées, des nausées et des vomissements. D’autres symptômes plus évocateurs comme une vision floue, des déficits neurologiques focaux progressifs et des troubles cognitifs sont aussi fréquents (Hanif et al., 2017). La survenue de ces symptômes peut varier en fonction de la zone touchée par la tumeur, rendant le diagnostic précoce d’un gliome complexe. Une étude a tenté de déterminer le temps théorique entre l’initiation de la tumeur et son diagnostic. Pour cela, ils ont créé un modèle prédictif de croissance ajustée à partir des données d’observations de la croissance avant traitement de 106 patients atteints de GBM. Entre l’initiation de la tumeur et son diagnostic, il est estimé qu’il s’écoule entre 156 et 776 jours (Stensjøen et al., 2018).

Le diagnostic des gliomes commence par une imagerie cérébrale afin de déterminer la localisation, la taille et les caractéristiques radiologiques de la tumeur. Les techniques médicales les plus courantes sont la tomodensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La TDM fournit une localisation exacte de la tumeur et évalue sa morphologie. L'IRM, avec ou sans perfusion de gadolinium, offre une qualité d'imagerie supérieure à celle du scanner. Elle permet de définir la localisation exacte de la tumeur, des structures environnantes et guide la planification chirurgicale pour la biopsie ou l'ablation chirurgicale de la tumeur. Le gadolinium est un agent de contraste utilisé en IRM qui apparaît comme hyper-intense sur les images IRM pondérées en T1. La séquence IRM T1 permet de visualiser le corps de la tumeur, y compris les zones nécrotiques, angiogéniques et les œdèmes (**Figure 20A**). Les séries d'images IRM pondérées en T2 sont largement utilisées pour vérifier la taille, la forme et la position des tumeurs (**Figure 20B**). Une IRM T2 avec une séquence FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) permet de visualiser des anomalies comme des œdèmes entourant la tumeur et la présence de cellules tumorales invasives (**Figure 20C**) (Lundy et al., 2020). Bien que les examens d'imagerie permettent d'orienter le diagnostic, seule l'analyse histo-moléculaire permet de statuer sur le diagnostic final et le choix thérapeutique.



**Figure 20 : Aspects radiographiques d'un glioblastome.**

(A) L'IRM T1 permet d'apprécier la structure globale des tissus mous en gris clair et de l'eau qui apparaît en hyposignal. Cette technique permet de distinguer la morphologie de la tumeur (B) l'IRM T2 fait apparaître les structures du cerveau et de la tumeur en signal inversé par rapport à la séquence T1 : l'eau est en hypersignal et les tissus mous en hyposignal. Cette technique est utilisée pour vérifier la structure de la tumeur (C) L'IRM T2-FLAIR se distingue de l'IRM T2 par la soustraction de l'hypersignal de l'eau pour mieux distinguer la tumeur et son environnement (par exemple la présence d'œdèmes). Cette observation est notamment utile pour délimiter la tumeur lorsqu'elle est proche des ventricules, qui apparaissent tout comme la tumeur en hypersignal en T2 (J. Liu et al., 2014).

## 2.3. Traitement

### 2.3.1. Modalités du traitement standard

Le traitement standard de première ligne pour les GBM nouvellement diagnostiqués a été développé en 2005 et comprend une résection chirurgicale maximale, une radiothérapie et une chimiothérapie concomitantes. La prise en charge des patients atteints d'un LGG, qui ont de ce fait une survie plus longue, est aussi plus délicate puisqu'il faut réussir à trouver un équilibre entre les avantages de ces thérapies et les effets secondaires afin de préserver au maximum la qualité de vie du patient (Stupp et al., 2005).

Une résection chirurgicale sécurisée au maximum est effectuée en fonction de la localisation de la tumeur et des régions cérébrales fonctionnelles environnantes. Pour les GBM, une résection chirurgicale complète est presque impossible en raison de la nature invasive et infiltrante de ces tumeurs. Pour les LGG et dans certains cas pour les GBM, la chirurgie est réalisée chez un patient éveillé. De cette manière le chirurgien peut stimuler différentes zones du cerveau afin d'identifier les zones fonctionnelles autour de la masse tumorale à préserver (Osorio and Aghi, 2014).

Après une chirurgie, les délais pour initier un traitement par radiothérapie varie selon le temps de cicatrisation des plaies, mais il est généralement commencé dans les six semaines suivant la chirurgie (Geurts and van den Bent, 2018). La radiothérapie est utilisée pour traiter les cellules marginales entourant la zone de résection et atteindre les cellules invasives. Une radiothérapie fractionnée par rayons X à 2 Gy par jour est appliquée pendant 5 jours par semaine sur un total de 6 semaines pour une dose cumulée de 60 Gy. L'irradiation induit des effets directs et indirects sur la croissance tumorale. Les effets directs se manifestent par des lésions de l'ADN qui peuvent induire des erreurs de réplication et des mutations conduisant à la mort des cellules tumorales. Les effets indirects sont liés aux réponses immunitaires antitumorales de l'hôte en alertant les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T naïfs. En outre, les radiations induisent une rupture de la BHE ce qui permet aux médicaments, notamment la chimiothérapie, d'atteindre plus facilement la tumeur (Sia et al., 2020).

De ce fait, la radiothérapie est accompagnée de l'administration d'un agent alkylant, le TMZ à une dose de 75 mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle. Le traitement au TMZ est ensuite poursuivi avec 6 cycles à 150-200 mg/m<sup>2</sup> pendant 5 jours sur 28 jours. Le TMZ a un faible poids moléculaire

(194.15g/mol), ce qui lui permet de traverser facilement la BHE. Une biodisponibilité systémique élevée du TMZ a été rapportée après une administration orale avec environ 20% à 30% de la concentration initiale du médicament capable de traverser la BHE pour atteindre les cellules tumorales. Le TMZ délivre un groupe méthyle aux bases puriques et induit de cette manière des lésions de l'ADN (O6-guanine ; N7-guanine et N3-adénine). La lésion cytotoxique la plus importante, la O6-méthylguanine (O6-MeG) peut être éliminée par MGMT. Ces lésions vont perturber la réplication de l'ADN et conduire à la mort des cellules par apoptose ou autophagie (Singh et al., 2021).

La majorité des LGG et GBM récidiveront, quel que soit le traitement de première ligne utilisé. Une intervention chirurgicale peut être considérée mais généralement les marges tumorales sont moins bien définies qu'à l'origine, ce qui complique une seconde intervention. Dans la même ligne, un nombre limité de patients sont candidats à une seconde irradiation pour prévenir l'apparition de radionécrose. Le TMZ est aussi remplacé dans le traitement de seconde ligne par d'autres agents de chimiothérapie comme par exemple la lomustine ou le carboplatine ou par l'anticorps anti VEGF (vascular endothelial growth factor) bévécizumab (Wick et al., 2017).

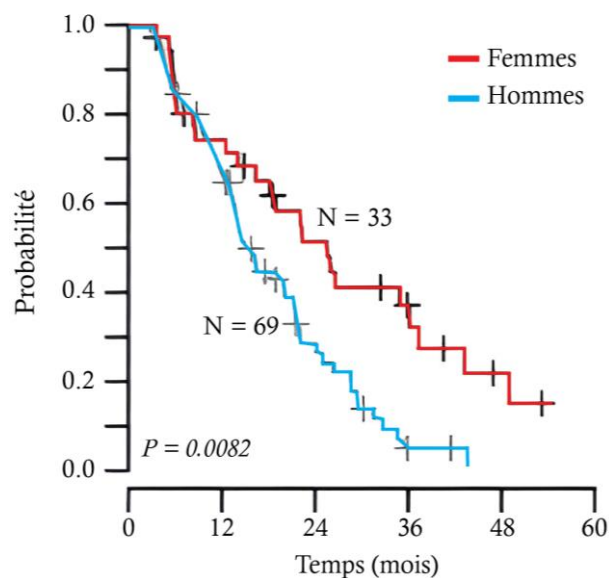
### **2.3.2. Bénéfices du traitement standard**

Les LGG sont des tumeurs hétérogènes avec un pronostic de survie très variable selon le patient. La médiane de survie des LGG est comprise entre 10 et 15 ans (Obara et al., 2020). Une résection chirurgicale totale de la tumeur conduit à un meilleur pronostic post-opératoire (Sanai and Berger, 2008). Le TMZ et la radiothérapie induisent une diminution du volume tumoral d'une durée médiane respective de 23 et 49 mois (Izquierdo et al., 2018; Pallud et al., 2012).

La médiane de survie pour les GBM est d'environ 16 mois (Ostrom et al., 2018). Le protocole standard de traitement améliore d'environ 6 mois la survie des patients. Sur un total de 16 171 patients de plus de 65 ans atteints d'un GBM, la médiane de survie à base de radiochimiothérapie est de 9 mois, pour la radiothérapie seule de 4.7 mois, pour la chimiothérapie seule de 4.3 mois et 2.8 mois sans traitement (Rusthoven et al., 2016). Le bénéfice de survie lié à la chirurgie dépend grandement de l'étendue de la résection (EOR). Les gains médians de survie résultant d'une EOR de 50%, 75%, 90%, 95% et 99% sont respectivement de 1.4, 2.5, 3.6, 4.3 et 5.6 mois (Stensjøen et al., 2018).

### 2.3.3. Le sexe des patients, un facteur de survie et de réponse aux traitements ?

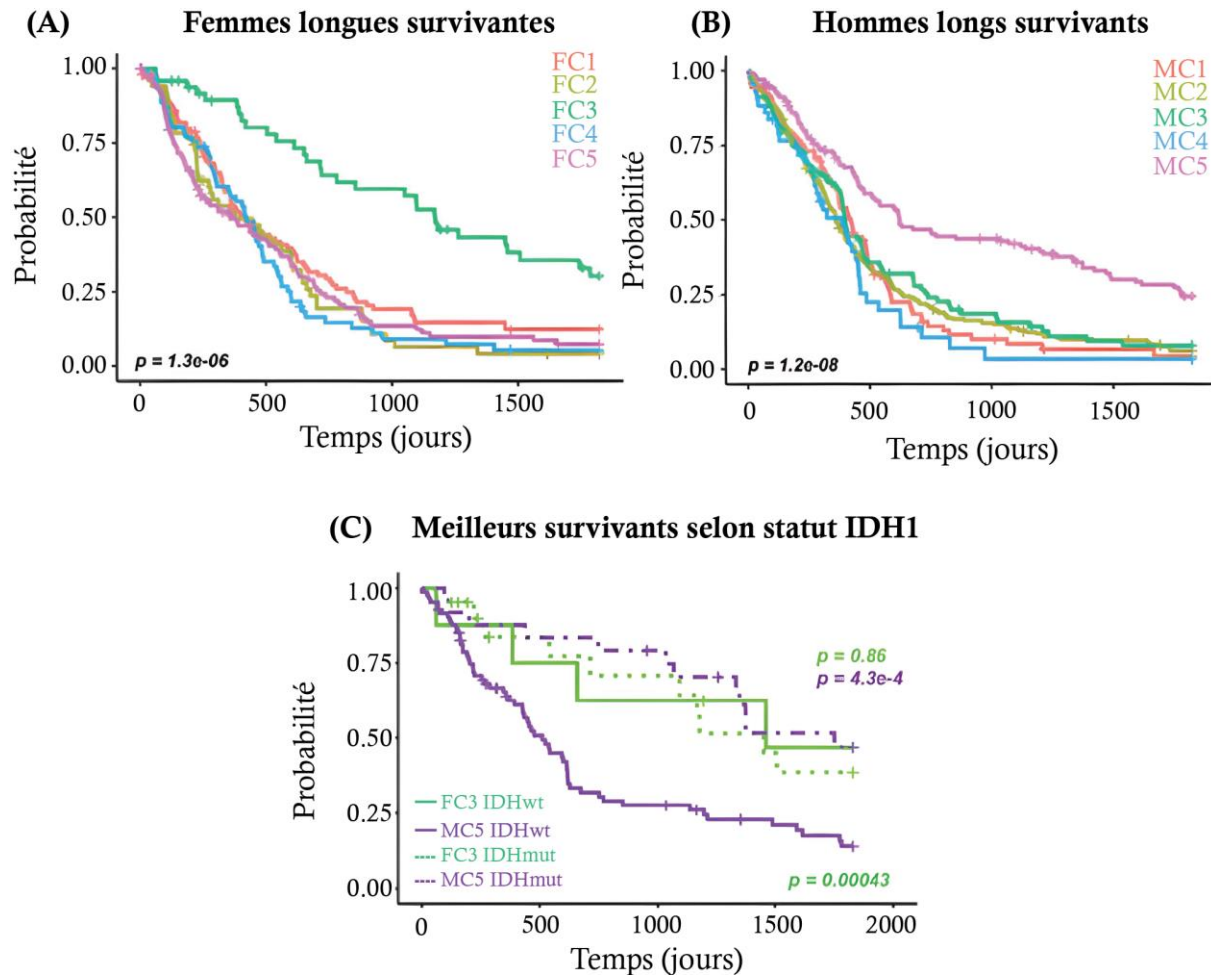
Le sexe des patients pourrait être un facteur important dans la survie et dans la prédiction de la réponse au traitement. En effet, une étude a montré que les femmes atteintes d'un LGG ont une meilleure survie que les hommes (Claus and Black, 2006). Cependant, ces résultats n'ont pas pu être confirmés par la suite (Gittleman et al., 2019). De manière intéressante, une analyse confirme un avantage de survie des femmes parmi les patients atteints de GBM ayant reçu un traitement standard (**Figure 21**) (Ostrom et al., 2018).



**Figure 21 : Différence de survie entre les hommes et les femmes atteints d'un glioblastome.** Chez les femmes, la survie médiane est de 25,5 mois (IC 95% = 18,1 – 43,2) et de 15,0 mois (IC 95% = 13,6 – 21,4) chez les hommes ( $P = 0,0082$ ) qui ont reçu un traitement standard (Ostrom et al., 2018).

Récemment, une étude a tenté d'expliquer ces différences entre les hommes et les femmes en utilisant un algorithme de calcul permettant de relier et d'interpréter les données d'IRM, les données cliniques et les données transcriptomiques disponibles dans la base de données TCGA-GBM. L'analyse a montré que les femmes répondaient mieux au TMZ que les hommes. Bien que les vitesses initiales de croissance de la tumeur aient été distribuées de manière équitable entre les deux groupes, un déclin régulier et significatif de la vitesse de croissance provoqué par le TMZ n'a été mis en évidence que chez les femmes. En se basant sur les profils transcriptomiques et la survie des patients a été créée une sous-population de patients dits

« longs survivants » (**Figure 22**). Le cycle cellulaire est déterminant pour la définition du groupe des hommes « longs survivants » tandis que la signalisation des intégrines caractérise celui des femmes « longues survivantes » (Yang et al., 2019).



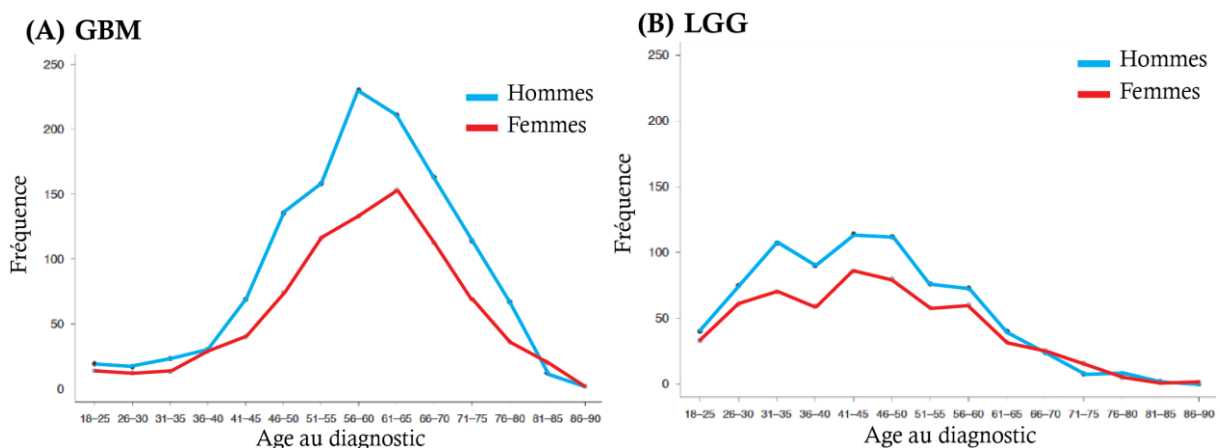
**Figure 22 : Caractéristiques des hommes et femmes « longs survivants » atteints de glioblastome.**

Analyse bio-informatique à partir des bases de données TCGA-GBM, GSE13041, GSE160111 et REMBRANDT pour l'établissement de cinq clusters de patients atteints de GBM IDHwt et IDHmut selon leur similitude transcriptomique. Identification des clusters de **(A)** femmes longues survivantes (FC3) et **(B)** d'hommes longs survivants (MC5). **(C)** Les clusters FC3 et MC5 ont ensuite été divisés en deux selon le statut mutationnel d'IDH. Le bénéfice de survie de FC3 est indépendant du statut IDH mais serait modulé par la voie de signalisation de l'intégrine. En revanche, l'absence de la mutation d'IDH exerce un effet négatif sur la survie de MC5 (Yang et al., 2019).

## 2.4. Données épidémiologiques

Les LGG, tous type histologique confondu, ont une incidence d'environ 1,0 cas pour 100 000 habitants aux Etats-Unis et touchent 1,4 fois plus les hommes que les femmes (**Figure 23B**) (Aiman and Rayi, 2022; Stabellini et al., 2021). Les GBM sont les tumeurs primaires du SNC les plus fréquentes avec une incidence de 3,30 cas pour 100 000 habitants en France (Grochans et al., 2022). Selon les données épidémiologiques, le taux d'incidence des GBM dépend principalement de trois paramètres (Ostrom et al., 2016) :

- **L'âge** - Chez les patients de la tranche d'âge 75-84 ans, l'incidence est la plus élevée avec environ 15,0 cas pour 100 000 habitants.
- **L'ethnie** - L'incidence tous âges confondus en Asie (1,48 cas pour 100 000 habitants) est plus faible que chez les caucasiens (3,45 cas pour 100 000 habitants).
- **Le sexe** - Le taux d'incidence est de 3,97 cas pour 100 000 hommes et de 2,53 cas pour 100 000 femmes. Les hommes sont donc 1.58 fois plus susceptibles de développer un GBM que les femmes (**Figure 23A**).



**Figure 23 : Incidence des gliomes de bas grade et des glioblastomes chez l'homme et la femme.**

(A) L'incidence des glioblastomes (GBM) et des (B) gliomes de bas grade (LGG) est plus faible chez les femmes que chez les hommes. L'âge moyen au moment du diagnostic est, pour les hommes-GBM (58,5 ans), femmes-GBM (58,7 ans), hommes-LGG (43,5 ans), femmes-LGG (44,0 ans) (Gittleman et al., 2019).

En conclusion, les principaux facteurs de risques intrinsèques d'apparition des GBM sont l'âge supérieur à 40 ans, le sexe masculin et l'origine caucasienne, qui peuvent se combiner à

des facteurs extrinsèques actuellement inconnus tels que l'exposition fœtale ou tout au long de sa vie à des composés inconnus, les soins de santé, l'alimentation et le mode de vie.

## **2.5. Les facteurs de risque extrinsèques d'apparition**

Les causes de l'émergence et du développement des gliomes sont encore inconnues, car seuls quelques facteurs de risque extrinsèques ont été décrits. Par exemple, les patients déjà exposés à des rayonnements ionisants ont deux fois plus de risques de développer un gliome. Certains syndromes génétiques comme celui de Cowden, Turcot, Lynch, Li-Fraumeni ou encore une Neurofibromatose de type 1 sont également responsables d'une augmentation du risque de développement d'un gliome. Cependant, ces facteurs de risque sont très spécifiques de quelques cas et n'expliquent pas la majorité des tumeurs diagnostiquées (Rasheed et al., 2021).

## **2.6. Origines du glioblastome**

Les GBM sont des tumeurs extrêmement hétérogènes. Trois principaux modèles sont proposés pour expliquer cette hétérogénéité. Le premier modèle est celui des cellules souches neurales (NSC) qui suggère une organisation hiérarchique selon laquelle la croissance tumorale dépend de ces cellules. Les NSC sont omniprésentes dans toutes les régions du SNC au cours du développement embryonnaire et sont capables d'initier différentes lignées cellulaires conduisant à la formation de neurones et de cellules gliales différenciées (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les NSC donnent naissance à des cellules progénitrices intermédiaires au potentiel plus restreint qui peuvent proliférer et se différencier ensuite dans les trois principaux types de cellules du SNC. Un sous-ensemble de NSC et de cellules progénitrices continuent de résider dans des régions restreintes du cerveau postnatal et adulte dans la zone subventriculaire du ventricule latéral (SVZ) et la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Boldrini et al., 2018; Sanai et al., 2004).

Il est possible que les GBM prennent leur origine à partir de trois types cellulaires différents dont les NSC, les astrocytes dérivés des NSC et les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPO). Différentes observations appuient ces hypothèses :

- L'expression des marqueurs de surface cellulaire et la morphologie des cellules dans les tissus des GBM sont similaires à celles des cellules normales du SNC.
- La similitude des profils génétiques entre les GBM et ces types de cellules saines.



- La modélisation génétique des GBM chez des souris montre que de nombreux types de cellules du SNC comme les NSC4, les astrocytes dérivés de NSC5 et les OPC sont capables de se transformer en GBM (Yao et al., 2018).

Si l'on considère que de multiples mutations oncogéniques sont nécessaires à la gliomagenèse, les propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération des NSC assurent des conditions favorables pour l'accumulation endogène de mutations somatiques. De plus, la plupart des mutations pilotes dans les cancers sont attribuables à des erreurs de réplication de l'ADN qui sont généralement corrélées au nombre total de divisions des cellules souches (Tomasetti et al., 2017). Les NSC de la SVZ seraient la principale source de mutations somatiques *de novo* tout au long de la vie. En effet, le tissu SVZ sain éloigné du GBM chez 56,3% des patients contient des mutations de faible niveau de p53, EGFR, RB1 (retinoblastoma-associated protein), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) ou TERT qui ont été observées à des niveaux élevés dans la tumeur correspondante. De plus, les NSC murins qui portent ces faibles niveaux de mutations sont capables de migrer depuis le SVZ pour conduire au développement d'un GBM dans des régions cérébrales distantes. Dans ce modèle, les NSC contiennent donc des mutations pilotes qui favorisent le développement d'un GBM à distance (Lee et al., 2018). Dans les GBM IDHmut (selon la classification OMS de 2016), la plupart des cellules malignes sont différenciées et rappellent des oligodendrocytes ou des astrocytes, tandis qu'un petit sous-ensemble de cellules reste indifférencié et présente les caractéristiques des NSC (Venteicher et al., 2017; Tirosh et al., 2016).

Le deuxième modèle, dit d'évolution clonale, propose que toutes les cellules tumorales proviennent d'une seule cellule et que l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques au sein de cette cellule est responsable de la progression tumorale. Toutefois, ce modèle ignore la pertinence de la variabilité non génétique et les interactions fonctionnelles potentielles entre les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral (Nowell, 1976).

Le troisième modèle dit de « big bang » suggère une organisation hiérarchique avec l'existence de différentes sous-populations clonales. En plus des mutations communes héritées de la cellule transformée/néoplasique d'origine, ces clones présenteraient des altérations moléculaires partagées et/ou uniques. Ce modèle justifie la coexistence au sein d'une même tumeur de plusieurs sous-groupes moléculaires. De plus, ce modèle explique les variations de réponse aux traitements observés au sein d'un même GBM, en raison d'une sous-population

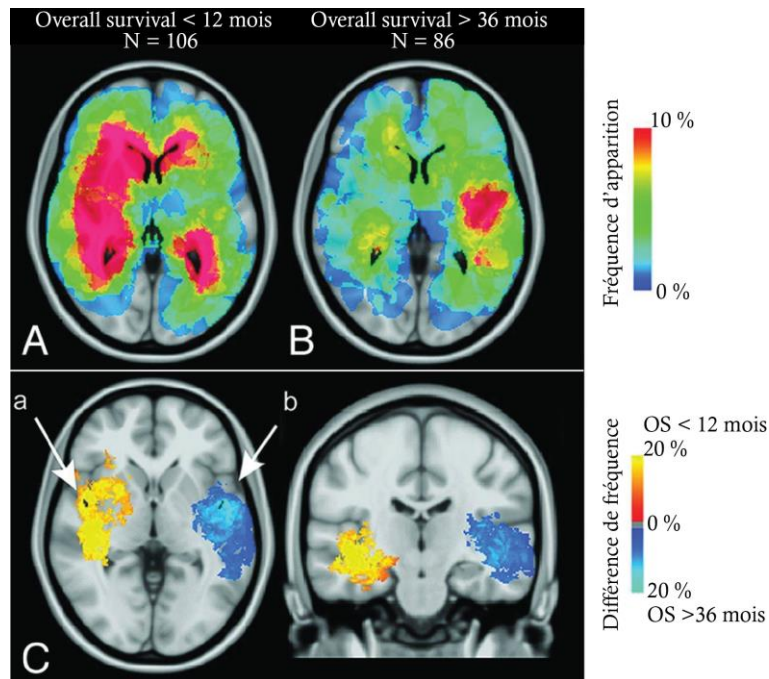
hétérogène de clones présentant des altérations génétiques et des capacités de résistance aux traitements différents (Sun et al., 2018).

Ces différents modèles laissent à penser que les GBM peuvent prendre leur origine à partir de différents précurseurs. Il est possible que les hormones stéroïdiennes et leurs récepteurs puissent être impliquées dans chacun de ces modèles. Par exemple, dans le premier modèle, l'E2 par l'intermédiaire d'ER $\alpha$  et ER $\beta$  est capable de favoriser la prolifération et la différenciation des NSC (Brännvall et al., 2002). Dans le deuxième modèle, la testostérone diminue le niveau des marques épigénétiques 5-méthylcytosines et du niveau d'acétylation des histones dans des NSC murins. Bien que les œstrogènes soient impliqués dans la régulation des marques épigénétiques dans le cerveau, aucune étude n'a, à ce jour, évalué leur impact sur les NSC (Bramble et al., 2019). Dans le troisième modèle, une hypothèse est qu'une sous-population de cellule pourrait être caractérisée par une expression différentielle des ER par rapport aux autres populations clonales.

## **2.7. Les zones de développement et de progression**

Les gliomes sont des tumeurs très hétérogènes, tant dans leur composition que dans leur localisation. Ils se développent préférentiellement à 40% dans le lobe frontal, 29% dans le temporal, 14% dans le pariétal et 3% dans l'occipital (Larjavaara et al., 2007). Concernant les GBM, une tentative de construction d'un atlas a tout de même montré que la plupart des tumeurs se développent dans les régions périventriculaires de la substance blanche adjacentes à la SVZ (**Figure 24**) (Ellingson et al., 2013). Une analyse menée chez 247 patients montre que la récurrence des GBM après chimiothérapie est pour 75.3% locale, 6.1% à distance, 13.3% une dissémination sous-épendymaire et 5.3% une dissémination leptoméningée. La survie la plus favorable est survenue chez les patients présentant une progression locale (H. Jiang et al., 2020).

Récemment, une analyse rétrospective de 215 patients montre qu'il existe des différences dans l'OS des patients en fonction de la localisation du GBM. L'OS est plus faible chez les patients présentant des tumeurs avec une localisation centrale dans le corps calleux ou les ganglions de la base et dans le pôle gauche du lobe temporal. Une OS plus élevée est observée lorsque la tumeur est localisée dans le lobe temporal dorsomédian droit et dans la région de la substance blanche impliquant le gyrus paracentral antérieure gauche/aire motrice supplémentaire dorsale/gyrus précentral médian (Fyllingen et al., 2021).



**Figure 24 : Localisation préférentielle des glioblastomes de bon et mauvais pronostic.**

La localisation de la tumeur est un paramètre important de la survie des patients. (A) Une localisation prédominante dans l'hémisphère gauche est associée à une survie globale inférieure à 12 mois. (B) Une localisation dans l'hémisphère droit est associée à une survie globale supérieure à 36 mois. (C) Zones prédominantes des tumeurs (a) de bon et (b) mauvais pronostic (Ellingson et al., 2013).

Les gliomes sont donc des tumeurs à la localisation très hétérogène, prédictives de la survie du patient. Il est possible que l'expression des ER modulent l'agressivité des gliomes dans certaines de ces zones. Par exemple, les ER sont fortement exprimés dans la zone du lobe frontal, une zone décrite précédemment comme étant corrélée à une meilleure survie (Boyle et al., 2021). Si tel est le cas, il est possible qu'il existe une corrélation entre le niveau d'expression des ER et la survie des patients.

## 2.8. La signalisation œstrogénique dans le cerveau

### 2.8.1. L'aromatase

Chez l'adulte, l'aromatase cérébrale (bAr) est exprimée de manière prédominante dans les régions hypothalamiques et limbiques. bAr est exprimé exclusivement par les neurones du SNC et localisé dans le corps cellulaire et les terminaux synaptiques. A noter que l'expression de bAr peut être induite dans des astrocytes après une lésion cérébrale ischémique (Roselli, 2007). L'expression modulable de bAr et sa présence dans différents compartiments cellulaires appuie

l'idée que bAr agit pour produire des œstrogènes localement afin d'induire des effets directs et rapides dans le cerveau.

La production locale d'œstrogènes dans le cerveau est essentielle au maintien des fonctions reproductives de l'homme et de la femme. Une étude menée chez des singes femelles propose un modèle selon lequel l'E2 sécrété par les ovaires stimule les interneurons puis les neurones à GnRH, ce qui augmente le taux de GnRH. L'E2 circulant stimule aussi les cellules synthétisant l'E2 localement dans l'hypothalamus par l'intermédiaire des interneurons, ce qui contribue encore à augmenter le taux de GnRH jusqu'à induire le pic de LH pour déclencher l'ovulation (Kenealy et al., 2017). Chez l'homme, la production locale d'œstrogènes dans le cerveau est partiellement nécessaire au comportement sexuel masculin et à l'homéostasie des hormones sexuelles (Brooks et al., 2020).

La production locale d'œstrogènes dans le cerveau peut aussi réguler diverses fonctions cérébrales, comme par exemple la transmission sensorielle pour le contrôle des capacités sociales et de la douleur (Azcoitia et al., 2021). La localisation et le niveau d'expression de bAr peut aussi influencer spécifiquement certaines fonctions. Dans l'hippocampe, le cortex préfrontal et le cortex temporal, la production locale d'E2 participe à l'apprentissage et à la mémoire (Rosenfeld et al., 2018). Chez la femme, une forte expression de bAr dans l'amygdale gauche est associée à une plus grande agressivité, tandis qu'un niveau élevé dans l'amygdale droite est négativement corrélé à la recherche de nouveauté et positivement à la coopération (Takahashi et al., 2018). En revanche, des taux globaux de bAr plus élevés dans l'amygdale sont associés à des performances cognitives verbales et non verbales plus faibles chez l'homme que chez la femme (Alia-Klein et al., 2020).

### **2.8.2. Le récepteur ER $\alpha$**

ER $\alpha$  est impliqué dans le développement du cerveau en interagissant directement avec Nfix (nuclear factor 1 X-type) qui régule la génération des cellules progénitrices intermédiaires (Gegenhuber et al., 2020). Chez l'adulte, ER $\alpha$  est exprimé principalement dans les noyaux hypothalamiques ventromédian, l'organe subfornical, dans les noyaux arqués, dans le noyau du lit et de la stria terminalis, l'amygdale médiane, la zone préoptique, les noyaux hypothalamiques, dans le gris périaqueducal et le noyau parabrachial (Mitra et al., 2003; Shughrue et al., 1998).

ER $\alpha$  est impliqué dans les effets neuroprotecteurs de l'E2 contre les lésions cérébrales (Dubal et al., 2001). ER $\alpha$  favorise la dégradation de l'A $\beta$  (amyloid beta), un peptide qui est responsable des lésions cérébrales et de la survenue de la maladie d'Alzheimer (Hwang et al., 2015). Enfin, ER $\alpha$  diminue aussi la production de ROS en augmentant l'expression du cytochrome c mitochondriale ce qui préviendrait la survenue d'un AVC (Razmara et al., 2008).

En réponse à l'E2, de nouveaux neurones exprimant ER $\alpha$  sont produits dans le noyau arqué et le noyau ventromédial de l'hypothalamus, des zones critiques dans l'homéostasie énergétique. Cela suppose que l'expression d'ER $\alpha$  intervienne dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Bless et al., 2016). De même, l'absence d'ER $\alpha$  dans les neurones single-minded-1 (SIM1) provoque une hypoactivité et une obésité chez les souris (Xu et al., 2015). L'expression d'ER $\alpha$  dans les neurones modulerait donc le comportement alimentaire et l'obésité.

Le traitement prolongé des femmes atteintes d'un cancer du sein avec le TAM est souvent accompagné d'effets secondaires comme des bouffées de chaleur, des modifications de la densité osseuse et de la fatigue. Ces effets secondaires sont perdus lorsqu'ER $\alpha$  n'est plus exprimé dans l'hypothalamus et la zone préoptique (Zhang et al., 2021). De même, une faible dose de TAM augmente l'expression de l'isoforme ER $\alpha$ 36, ce qui améliore la survie des neurones après un AVC (Zou et al., 2015). Selon l'isoforme d'ER $\alpha$  et la zone ciblée, le TAM semble avoir des effets variables.

### **2.8.3. Le récepteur ER $\beta$**

Chez l'embryon, l'absence d'ER $\beta$  perturbe la migration neuronale et le développement normal du cerveau dès le 14,5<sup>ème</sup> jour embryonnaire (Fan et al., 2006). Chez l'adulte, ER $\beta$  est exprimé dans les neurones et les astrocytes du bulbe olfactif, du cervelet, du cortex cérébral, du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et de l'hippocampe (Milner et al., 2010; Mitterling et al., 2010; Weiser et al., 2008; Milner et al., 2005; Shughrue and Merchenthaler, 2001).

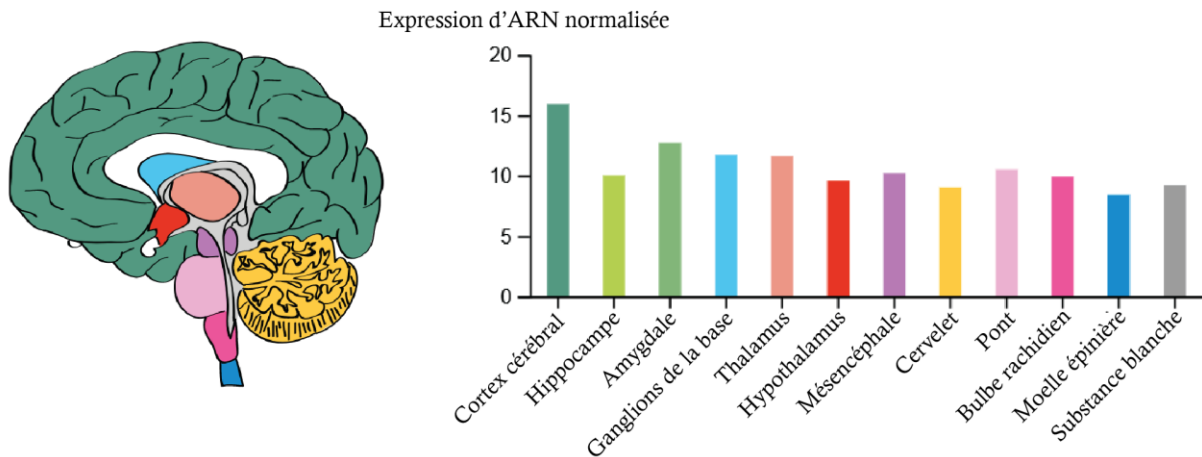
Chez la souris, une étude montre que l'absence d'ER $\beta$  diminue l'interaction sociale et augmente le comportement agressif, tandis qu'une autre étude montre que son absence augmente la recherche sociale et diminue l'anxiété des femelles (Dombret et al., 2020; Tsuda et al., 2014). L'absence d'ER $\beta$  est aussi corrélée à une augmentation de l'activité et des troubles de la coordination motrice. Ces effets sont dus à une réduction de la signalisation GABAérgique

qui entraîne un déséquilibre de la neurotransmission ainsi qu'une différenciation altérée des oligodendrocytes et donc un défaut de myélinisation (Varshney et al., 2021).

ER $\beta$  est impliqué dans des effets neuroprotecteurs contre la maladie neurodégénérative d'Alzheimer. Il intervient en limitant les effets cytotoxiques de l'A $\beta$  par la voie Akt. Dans des échantillons de la zone corticale frontale de cerveau humain, l'expression d'ER $\beta$  et de pAkt augmentent en fonction de l'âge chez l'homme mais pas chez la femme. Ces données permettraient d'expliquer, au moins en partie, pourquoi les hommes sont moins touchés que les femmes par la maladie d'Alzheimer (Almutairi et al., 2021).

#### **2.8.4. Le récepteur GPER**

Chez l'embryon, l'absence de GPER altère la morphologie du cerveau à cause du mauvais développement des neurones sensoriels et moteurs (Shi et al., 2013). Chez l'adulte, il est exprimé dans de nombreuses régions du cerveau (**Figure 25**). On le retrouve dans les amygdales, les noyaux caudés, le corpus callosum, l'hippocampe, la substance noire, les noyaux subthalamiques, le thalamus, l'hypothalamus, le cervelet, le cortex cérébral, le bulbe rachidien, le lobe frontal, le lobe temporal, le putamen, la moelle épinière, le lobe occipital et le corps calleux (Feng and Gregor, 1997; Owman et al., 1996). Son expression semble très forte dans de nombreux noyaux hypothalamiques tels que les noyaux paraventriculaires supraoptiques, arqués et suprachiasmatiques (Brailoiu et al., 2007; O'Dowd et al., 1998). On détecte une plus forte expression de GPER dans les noyaux arqués, dans l'hypothalamus latéral et les noyaux supraoptiques chez les femelles, tandis que chez les mâles, son expression est plus élevée dans les noyaux paraventriculaires (Marraudino et al., 2021). De nombreuses cellules des vaisseaux de surface du cerveau expriment aussi GPER. Il est fortement exprimé dans l'artère cérébrale moyenne, les branches rostrales et caudales et plus faiblement dans les vaisseaux veineux (Isensee et al., 2009). Au niveau cellulaire, GPER est détecté dans les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes de l'hypothalamus de rat (Roque et al., 2019).



**Figure 25 : Distribution de GPER dans le cerveau.**

Distribution de l'ARNm de GPER dans le cerveau, générée par Protein Atlas (d'après la version du 24/08/2022).

Il est difficile de différencier si les effets de l'E2 dans le cerveau sont médiés par les ER nucléaires ou par GPER. Parmi les rôles potentiellement attribués à GPER : (1) il serait un facteur favorable à la survenue de trouble temporo-mandibulaire et la survenue de migraine ; (2) il serait un régulateur de l'humeur ; (3) il régulerait les fonctions cognitives, en particulier chez les femmes après la ménopause ; (4) il interviendrait dans les effets protecteurs de l'E2 contre les lésions neuro-induites (Prossnitz and Barton, 2011).

L'ensemble de ces données montre que les œstrogènes, en agissant à travers les ER nucléaires et GPER, sont essentiels aux fonctions cérébrales tout en limitant l'apparition de maladies neurodégénératives. Ainsi, il est possible qu'une dérégulation de leur expression ou de leur activité interviennent aussi dans l'apparition et la progression des gliomes.

### 3. Les gliomes, des tumeurs hormonosensibles ?

Dans les études épidémiologiques, les termes de hazard ratio (HR), d'odd ratio (OR) et de risque relatif (RR) sont souvent utilisés dans les études de causalité comme des indicateurs de la force de l'association entre deux paramètres. Le RR mesure le rapport entre la probabilité de survenue d'un évènement dans un groupe par rapport à un autre. L'OR est le rapport du nombre de patients présentant un évènement rapporté au nombre de patients ne présentant pas l'évènement. L'OR est proche du RR lorsque le nombre d'évènements est faible. Cependant, dans les études cas-témoins, seul l'OR peut être estimé puisque le nombre de témoins est déterminé par le nombre de cas. Le HR est proche du RR avec une dimension temporelle en

plus. Le HR se définit à un temps  $t$  et représente le risque instantané sur la période de l'étude ou sur un sous-ensemble de celle-ci.

Les études épidémiologiques indiquent que l'incidence des gliomes est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (cf. partie 2.4). Ceci soulève la question des mécanismes sous-jacents, notamment le rôle potentiel des hormones dans le développement de ces tumeurs. Au début de la ménopause, les femmes entre 50 et 54 ans ont un RR de déclarer un GBM de 0,51. Pour les femmes entre 55 et 79 ans, on observe une augmentation du RR à 0,71, bien que celui-ci ne dépasse jamais celui des hommes. La diminution du taux d'hormones après la ménopause serait donc favorable à la survenue d'un GBM chez la femme. Ces résultats, fournis au début des années 2000, ont été les premiers à suggérer que les hormones féminines puissent avoir des effets préventifs sur la survenue des GBM (McKinley et al., 2000). En annexe est disponible une revue que nous avons publiée présentant l'ensemble des données actuelles sur le rôle des hormones et de leurs récepteurs dans les gliomes. Les prochaines parties de cette introduction seront consacrées exclusivement à l'implication des œstrogènes et de leurs récepteurs dans les gliomes.

### **3.1. L'impact du traitement hormonal de substitution et de la prise de contraceptif sur la survenue des gliomes**

Afin d'expliquer les différences d'incidence entre les hommes et les femmes, plusieurs études se sont penchées sur l'impact de la prise d'hormones exogènes via les contraceptifs oraux (CO) ou le THS sur le risque d'apparition des gliomes.

Une récente méta-analyse menée sur un total de 8 055 027 femmes a ainsi montré que la prise de CO au cours de la vie d'une femme limite légèrement la survenue des gliomes, avec un RR de 0,75 dans les études de cohortes (Lan et al., 2018). Le statut ménopausal des femmes au moment de l'étude ou la durée de la prise du CO ne semble pas être des paramètres qui influent sur le risque de survenue d'un gliome (Shao et al., 2022; Benson et al., 2008). La composition du CO semble toutefois être un paramètre important pour limiter l'apparition des gliomes. Avant la ménopause, l'OR pour les CO à base de progestatif seul est de 2,8, contre 1,4 pour ceux combinant œstrogènes et progestatif. La présence d'œstrogènes dans la composition du CO semble donc réduire l'impact négatif du progestatif seul (Andersen et al., 2015). Bien que les résultats d'une autre étude ne soient pas décrits comme statistiquement significatif, certaines tendances liées à la composition du CO se dégagent. La prise d'un CO à base



d'œstrogènes pendant 1 à 9 ans tend à augmenter le HR à 1,31 tandis qu'une exposition supérieure à 10 ans présente un HR à 0,69. Pour les CO à base de progestine, la même tendance est observée avec un HR de 1,39 entre 1 et 9 ans et un HR de 1,02 au-delà de 10 ans (Kabat et al., 2011). Il semblerait donc qu'en plus de la composition du CO, la durée de prise du contraceptif module le risque d'apparition d'un gliome.

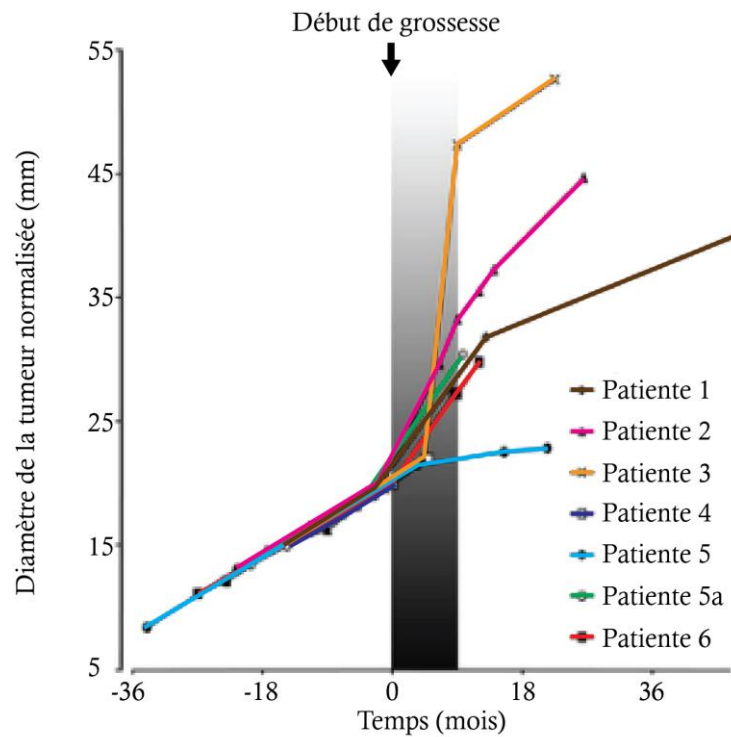
Les effets du THS sur la survenue des gliomes semblent plus modérés que ceux des CO. Dans la méta-analyse de Lan et ses collègues, le THS a un OR de 0,91 dans les études cas-témoins et un RR de 0,95 dans les études de cohortes (Lan et al., 2018). Cependant, une autre étude a tout de même été en mesure de montrer que la prise de THS réduit le risque de développer un gliome avec un OR de 0,57. Ces effets semblent être amplifiés lorsque la prise de THS est couplée à l'utilisation d'un CO au cours de la vie de la femme, avec un OR cumulée de 0,36 (Felini et al., 2009).

Dans l'ensemble, ces études tendent à montrer que la prise d'hormone exogène a un impact sur le risque de survenue des gliomes. Cependant, ces études ne stratifient pas toujours selon le statut ménopausal des femmes et la composition du CO, ce qui rend parfois difficile leur interprétation. De plus, ces études ne séparent pas les gliomes selon le grade ou le statut moléculaire de la tumeur. Un autre moyen de comprendre le rôle des hormones dans l'apparition et la progression des gliomes est d'étudier ces tumeurs chez des femmes enceintes. En effet, ces femmes présentent des taux d'œstrogènes et de progestérones pouvant être multipliés jusqu'à 200 fois par rapport aux concentrations physiologiques.

### **3.2. L'impact de la grossesse sur la croissance tumorale**

Une étude du service de neuro-oncologie de l'hôpital de Nancy a suivi l'évolution de 11 femmes atteintes d'un gliome de grade 2 (selon la classification OMS de 2007) et qui ont déclaré une grossesse durant leur pathologie. Dans 75% des cas on observe une accélération de la vitesse de croissance tumorale au moment de la grossesse et dans 40% des cas on note une augmentation de la fréquence des crises d'épilepsie associées à la pathologie (**Figure 26**) (Pallud et al., 2010). Une autre étude corrobore ces résultats dans des gliomes de grade 2 à 4 où la croissance tumorale s'accélère dans 87% des cas et est associée à une détérioration clinique précoce dans 38% des cas (Peeters et al., 2018; van Westrhenen et al., 2018). Plus récemment, chez 16 femmes enceintes atteintes d'un gliome de grade 2, 7 d'entre elles ont subi une accélération de la vitesse d'expansion et du diamètre de la tumeur pendant ou dans les 3 mois

suyvants la grossesse (Ng and Duffau, 2022). Une autre étude n'a pas été en mesure de confirmer l'influence de la grossesse sur la croissance des tumeurs (Somma et al., 2020).



**Figure 26 : La grossesse accélère la croissance tumorale.**

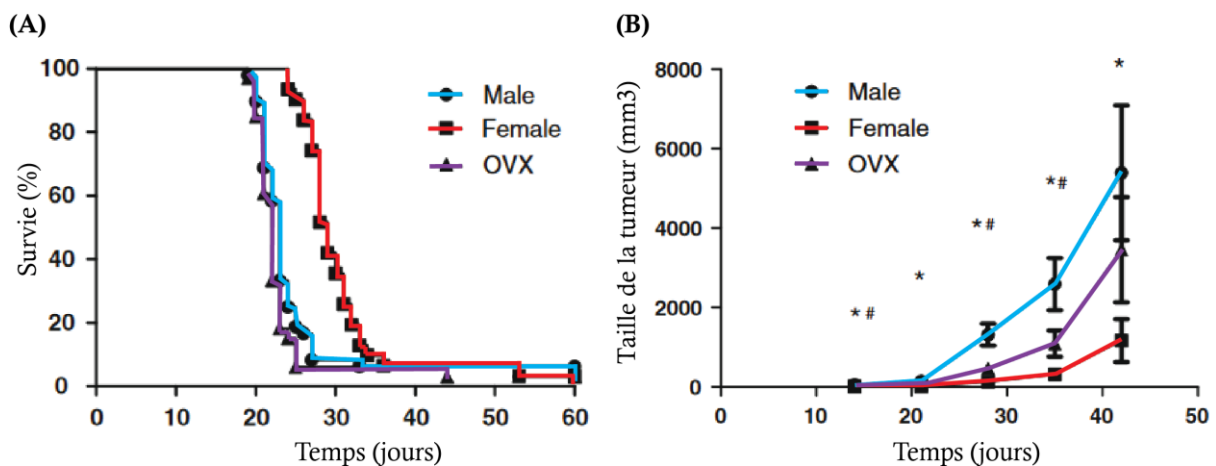
Evolution du diamètre tumoral moyen normalisée au fil du temps, avant, pendant et après la grossesse chez 6 patientes atteintes d'un gliome de bas grade. Pendant la grossesse, la vitesse d'expansion diamétrale a augmenté dans tous les cas et a diminué après l'accouchement (Pallud et al., 2010).

Il n'existe toutefois pas de corrélation entre le risque de développer un gliome et l'âge de la première grossesse ou le nombre de gestations (Forster et al., 2019; Felini et al., 2009; Benson et al., 2008). A la vue de ces études, il semblerait que les taux élevés d'hormones durant la grossesse n'impliquent pas une augmentation du risque d'apparition d'un gliome, mais qu'en cas de tumeur déjà présente, ils contribuent fortement à son expansion.

### 3.3. L'impact des œstrogènes et de leurs dérivés dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de GBM

#### 3.3.1. L'exposition aux œstrogènes

L'impact de l'E2 sur la progression tumorale a été abordé dans plusieurs groupes de rats mâles, femelles et femelles OVX qui ont été xéno greffées par voie orthotopique avec des cellules U87 de GBM humain. En l'absence de traitement, les femelles ont une survie médiane supérieure (29 jours) aux femelles OVX (22 jours) et aux mâles (23 jours) (**Figure 27A**). Les femelles OVX, une fois traitées avec de l'E2 à une concentration physiologique ont une survie comparable aux femelles (Barone et al., 2009). Une autre étude utilisant les mêmes modèles mais traités avec du benzoate d'œstradiol confirme ces observations (Plunkett et al., 1999). De manière intéressante, le traitement des rats mâles avec de l'E2 n'entraîne pas de gain de survie. L'implantation des cellules U87 en sous-cutanée chez les trois groupes d'animaux montre qu'elles s'implantent et se multiplient plus rapidement chez les mâles que chez les femelles. De la même manière, les femelles OVX ont une vitesse de croissance des tumeurs plus rapide que les femelles (**Figure 27B**) (Barone et al., 2009). Ces données suggèrent que l'E2 est responsable de la meilleure survie des femelles en ralentissant le développement de la tumeur.



**Figure 27 : Impact des œstrogènes sur la survie et la croissance tumorale dans un modèle de rongeurs xéno greffés avec des cellules de glioblastome.**

(A) Après implantation intracérébrale des tumeurs U87, les rates femelles ont survécu plus longtemps que les mâles ou les femelles ovariectomisées (OVX) ( $P < 0,05$ ). (B) Les tumeurs U87 implantées en sous-cutané se développent plus rapidement chez les mâles que chez les femelles (\*,  $P < 0,05$ ) ou les OVX (#,  $P < 0,05$ ) (Barone et al., 2009).

Sur des cellules de GBM humain T98G et de gliome de rat C6, l'E2 inhibe la croissance cellulaire avec une IC50 respective de 3,8  $\mu\text{M}$  et 3,5  $\mu\text{M}$ . Une concentration élevée de 20  $\mu\text{M}$  d'E2 favorise l'apoptose de ces cellules par l'activation de la voie JNK-c-Jun (c-Jun N-terminal kinase) (ALTIOK et al., 2011). Ces doses sont toutefois très éloignées des concentrations physiologiques. Une autre étude montre à l'inverse une augmentation de la prolifération des cellules C6 et des cellules de glioblastome U87 traitées avec 2 ou 5 nM d'E2 (Castracani et al., 2020; Bishop and Simpkins, 1994). Pris ensemble, ces résultats soulignent l'importance des œstrogènes dans le contrôle de la prolifération des cellules de GBM en fonction des doses et des lignées cellulaires utilisées.

Des doses allant de 1 à 100 nM d'E2 provoquent également une augmentation des capacités migratoires et invasives des cellules U87 et T98G. Ces effets sont médiés par la diminution de 40% à 60% des niveaux d'ARNm et de protéines de l'aquaporine 2 (AQP2) (Wan et al., 2018). Des doses de 10 à 100 nM d'E2 augmentent le potentiel migratoire des cellules C6 alors qu'aucun effet significatif n'est observé pour la lignée cellulaire de gliome embryonnaire de rat F98. L'E2 diminue l'expression de la connexine 43, une protéine de jonction lacunaire, dans la lignée C6 et augmente son expression dans la lignée F98. Ces différences sont dues à une plus forte expression d'ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans la lignée C6 que dans la lignée F98 (Moinfar et al., 2016). Ces données montrent que l'E2 est aussi un régulateur des propriétés migratrices des cellules.

La croissance des GBM peut être influencée par leur microenvironnement. On peut retrouver des kystes à proximité des tumeurs qui contiennent des facteurs stimulant leur croissance dont des hormones. La concentration en E2 ( $0,22 \pm 0,28$  nM) est plus élevée dans le liquide du kyste que dans le sérum chez les hommes. Cette variation de concentration en E2 dans le liquide kystique pourrait influencer la croissance tumorale (Dahlberg et al., 2022).

L'E2 peut être métabolisé par les cellules gliales en 2-ME, dont l'affinité est 2000 fois inférieure à celle de l'E2 pour les ER nucléaires mais 2 fois supérieure pour GPER. Une dose de 3,3  $\mu\text{M}$  de 2-ME provoque une diminution de la prolifération des cellules U87, T98G et U138 due à une accumulation de cellules en phase G2/M (Lis et al., 2004). Des concentrations de 2 à 20  $\mu\text{M}$  de 2-ME provoquent une diminution de la viabilité cellulaire des cellules de GBM humains U87, U138, LN405 et RG-2 de plus de 75% par induction de l'apoptose (Chamaon et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation dépendantes de GPER pourraient être une cible intéressante pour la modulation de la croissance des GBM.

Les œstrogènes modulent trois des principales caractéristiques des GBM : (1) la prolifération, (2) la migration, l'invasion et (3) la survie des cellules. Une manière d'agir sur la production d'œstrogènes endogènes est de réguler directement sa synthèse en ciblant l'aromatase.

### **3.3.2. L'aromatase**

Bien que l'impact des œstrogènes sur la progression des gliomes soit encore débattu, de nombreuses études se sont intéressées à la régulation de la production d'œstrogènes endogènes par l'aromatase. Sur la base de 36 biopsies d'astrocytomes de grades 1 à 4, plus la tumeur est de haut grade et donc à mauvais pronostic, plus l'aromatase est exprimée (Dueñas Jiménez et al., 2014). Paradoxalement, une autre étude montre que les patients atteints de GBM avec une forte expression de l'aromatase ont une meilleure survie que ceux qui l'expriment faiblement (Hönikl et al., 2020).

Dans les cellules de GBM T98G, le traitement à la vitamine D, à la dexaméthasone et à la mifépristone augmente l'expression de l'aromatase et l'agressivité des cellules tumorales (Yague et al., 2009). A l'inverse, la mélatonine, décrite comme ayant des propriétés inhibitrices de l'aromatase, provoque une diminution de la prolifération des cellules C6 (González et al., 2007). De même, une concentration de 100 nM de létrozole (anti-aromatase) nano-encapsulé diminue la prolifération et la migration des cellules dérivées de patients atteints de GBM (Tivnan et al., 2017). Une dose de 4 mg/kg de létrozole entraîne une diminution du volume tumoral de 75% après 8 jours de traitements de rats xéno greffés par voie orthotopique avec des cellules C6. Ces effets seraient dus à une réduction de l'expression de l'aromatase induite par le létrozole (Dave et al., 2015). Dans la lignée C6, une dose de 50 µg/ml d'anastrozole, un autre inhibiteur de l'aromatase, provoque une diminution de la viabilité et de la prolifération de 95% et de 50% respectivement. Sur un modèle de souris xéno greffés avec ces cellules et traitées à une dose de 0.1mg/kg/jour d'anastrozole pendant 7 jours, on observe des effets similaires à ceux décrits précédemment. Spécifiquement, les effets antitumoraux de l'anastrozole seraient médiés par une réduction du taux d'aromatase et une augmentation de celui d'ER $\alpha$  et des caspases 8 et 9 (Aguilar García et al., 2017).

Ces différentes études tendent toutes à démontrer que l'aromatase est un facteur favorable à la progression tumorale et que son inhibition pourrait être une piste thérapeutique.

### 3.3.3. Le tamoxifène

Le TAM, un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes, est largement utilisé dans la chimiothérapie du cancer du sein. Des études récentes ont indiqué que le TAM pourrait être une nouvelle chimiothérapie potentielle des GBM.

Le TAM induit un effet cytotoxique significatif dans les lignées cellulaires de GBM A172 (IC<sub>50</sub> : 16,99 µM), U251 (IC<sub>50</sub> : 32,05 µM), BT325 (IC<sub>50</sub> : 12,87 µM) et U87 (IC<sub>50</sub> : 53,85 µM) (He et al., 2015). Ces valeurs sont proches de celles retrouvées dans les lignées cancéreuses mammaires MCF7 (15,2 µM), MDA-MB-231 (35,8 µM) et SKRB3 (28,3 µM) (Rohlenova et al., 2017). Une exposition des cellules BT325 au TAM inhibe l'activité du complexe I de la mitochondrie, ce qui induit l'apoptose des cellules (He et al., 2015). Dans les cellules RT-2, le TAM augmente l'expression de la forme phosphorylée de JNK1, ce qui active ensuite la caspase 3 et conduit à la mort des cellules par apoptose (Tseng et al., 2004). Dans la lignée U87, le TAM induit une réduction de la viabilité cellulaire en favorisant une autophagie cytotoxique dépendante de la diminution du niveau protéique d'EGFR. De manière intéressante, l'expression du variant EGFRvIII rend les cellules résistantes à la mort induite par le TAM (Graham et al., 2016).

32 patients atteints de GBM, comprenant 20 hommes et 12 femmes ont été traités avec une dose de TAM de 200 mg/jour pour les hommes et de 160 mg/jour pour les femmes. La survie médiane pour la cohorte complète est de 10,1 mois. Cependant, pour 8 patients de l'étude une amélioration de la réponse clinique et radiographique a été notée. Pour 6 autres patients, le TAM a stabilisé l'évolution de la maladie lors des phases de traitement (Couldwell et al., 1996). Cette première étude a ouvert la possibilité de l'utilisation du TAM pour le traitement des GBM. Une étude plus récente sur 22 patients dont 13 hommes et 9 femmes n'a pas été en mesure d'apporter les mêmes conclusions. Un traitement quotidien de 80 mg/m<sup>2</sup> de TAM est administré chez les patients jusqu'à la progression de la maladie ou le développement d'une toxicité importante. Après 8 mois de suivi, 6 patients ont montré une réponse partielle, 3 ont stabilisé la progression tumorale et 13 ont eu une progression classique (Abdelmaksoud, 2016). Bien que le TAM présente une efficacité modeste, il est bénéfique pour certains patients. Malheureusement, aucune de ces études ne s'est penchée sur les caractéristiques moléculaires des patients pour expliquer la différence de réponse au TAM.

Le TAM seul ayant une efficacité modérée, plusieurs études ont tenté de le coupler à d'autres molécules anticancéreuses, dans l'espoir d'amplifier ses effets.

Le LY24002, un inhibiteur spécifique de PI3K augmente la sensibilité des cellules C6 au TAM. Cela se traduit par une plus forte proportion de cellules apoptotiques. La combinaison des deux traitements diminue la part de  $\beta$ -caténine nucléaire ce qui conduit à la diminution de l'expression des gènes anti-apoptotiques Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2), Bcl-Xl (B-cell lymphoma-extra large) et Mcl-1 (induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1) (Li et al., 2011).

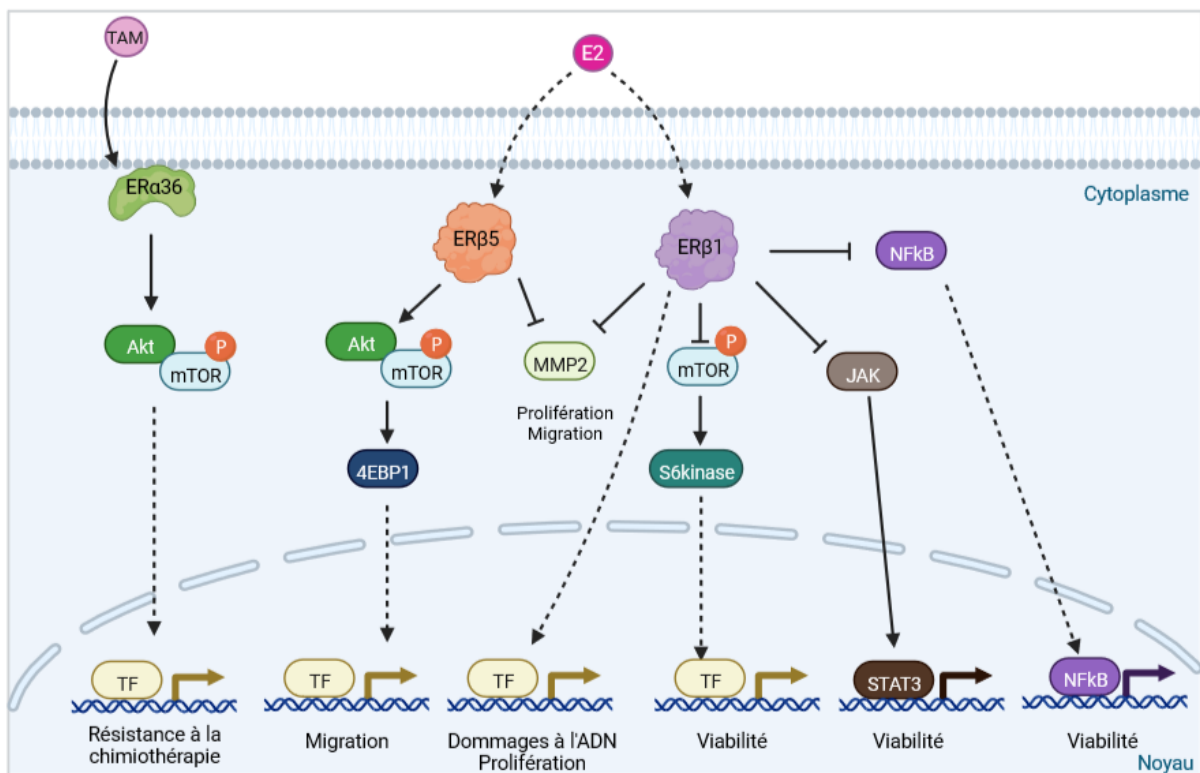
Une combinaison d'1 mM de TMZ et de 10  $\mu$ M de TAM potentialise leurs effets d'inducteur de l'apoptose, en diminuant notamment l'expression des marqueurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 dans la lignée A172 (Gupta et al., 2006). Une étude clinique menée chez 32 patients dont 18 hommes et 14 femmes atteints de récurrence de GBM a cherché à étudier le rôle antitumoral du TMZ associé au TAM. Le TMZ est administré à une dose de 75 à 150 mg/m<sup>2</sup> par semaine, 1 semaine sur 2 et le TAM à 80 mg/m<sup>2</sup> tous les jours. La durée médiane de survie globale (OS) est de 17,5 mois et la survie médiane sans progression (PFS) de 7 mois (DI Cristofori et al., 2013). A titre de comparaison, le traitement de référence des GBM conduit à une OS de 14,6 mois et une PFS de 6,9 mois. La combinaison du TMZ et du TAM semble donc améliorer légèrement l'OS des patients.

Sur des cellules A172 et U251, le TAM en combinaison avec de la radiothérapie augmente le pourcentage de cellules apoptotiques. L'irradiation seule induit un arrêt du cycle en phase G2/M, qui s'estompe rapidement après 24h. L'ajout du TAM à la radiothérapie permet de retarder la reprise de la prolifération cellulaire (Yang et al., 2015). Une étude clinique a étudié l'effet combiné du TAM et de la radiothérapie comme potentiel traitement des GBM. Une dose de 120 mg/m<sup>2</sup> de TAM est administrée pendant 3 mois et la radiothérapie débute 2 semaines après la première injection de TAM à une dose de 59,4 Gy distribuée sur 33 fractions pendant 6,5 semaines. L'OS pour la combinaison des traitements est de 33,4 semaines (Muanza et al., 2000). Une autre étude a testé une dose de 80 mg/m<sup>2</sup> de TAM associée à une radiothérapie conventionnelle. Aucun impact notable de la combinaison des traitements n'est rapporté chez les 77 patients recrutés pour l'étude (Robins et al., 2006).

Un point important qui n'a été abordé dans aucune de ces études est l'implication des récepteurs aux œstrogènes dans la réponse aux traitements. Le TAM en est le parfait exemple :

initialement il est caractérisé comme un modulateur sélectif des ER et est utilisé en tant que tel dans le traitement du cancer du sein. Cependant, dans ces études il est utilisé comme une chimiothérapie classique sans stratifier les patients selon leurs statuts d'expression des ER, alors que certains patients semblent mieux répondre que d'autres au TAM. Il est donc important de comprendre l'implication des différents récepteurs aux œstrogènes et de leurs isoformes dans les gliomes.

### 3.4. Les récepteurs aux œstrogènes dans les gliomes



**Figure 28 : Signalisation médiée par les isoformes des récepteurs aux œstrogènes nucléaires dans le glioblastome.**

La voie ER $\alpha$ 36-dépendante induite par le tamoxifène (TAM) implique la signalisation PI3K/Akt et mTOR pour renforcer l'autophagie et la résistance aux traitements anticancéreux des cellules de GBM (Qu et al., 2019). ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 5 stimulent la signalisation mTOR, JAK/STAT, NF- $\kappa$ B ou JNK pour impacter la prolifération, la migration, l'invasion, la survie ou la résistance à la chimiothérapie des cellules cancéreuses. La signalisation en aval reste à déterminer car ces informations proviennent de cellules modifiées n'exprimant plus certaines isoformes (Liu et al., 2018; Li et al., 2013).

Abréviations : PI3K (phosphoinositide 3-kinases) ; 4EBP1 (ERB3-binding protein 1) ; Akt (protein kinase B) ; JAK (Janus kinase) ; JNK (c-Jun N-terminal kinase) ; MMP (matrix metalloproteinase) ; mTOR (mechanistic target of rapamycin) ; NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) ; STAT (signal transducers and activators of transcription).



### 3.4.1. Le récepteur ER $\alpha$ et ses isoformes

Une étude immunohistochimique montre que les gliomes de bas grade expriment ER $\alpha$ , tandis que les haut grade ne l'expriment plus (Tavares et al., 2018). Toutefois, les GBM exprimant encore ER $\alpha$  à un niveau élevé sont associés à une meilleure survie (Hönikl et al., 2020).

Dans les modèles cellulaires de GBM U87 et U251, on rapporte une forte expression de l'isoforme ER $\alpha$ 36 qui est ancrée à la membrane plasmique en interagissant avec la caveoline-1. Le TAM augmente l'expression de cette isoforme et en retour, ER $\alpha$ 36 contribue à la résistance des cellules au TAM en régulant l'autophagie par la voie de signalisation Akt/mTOR (mechanistic target of rapamycin) (**Figure 28**) (Qu et al., 2019).

Dans les cellules de rat C6 et F98, l'équilibre ER $\alpha$ /ER $\beta$  module l'expression de la connexine 43, qui serait impliquée dans la progression des gliomes (Moinfar et al., 2016; Huang et al., 1999). Historiquement, l'isoforme la plus étudiée dans les GBM est ER $\beta$ .

### 3.4.2. Le récepteur ER $\beta$ et ses isoformes

Une étude immunohistochimique montre que les tumeurs de haut grade expriment moins ER $\beta$  comparées aux tumeurs de bas grade. Par rapport au tissu sain environnant, ER $\beta$  est plus exprimé dans la tumeur, même si son expression est variable entre les patients (C. Liu et al., 2014). Ceux qui expriment un fort taux d'ER $\beta$  ont un meilleur pronostic de survie que ceux qui l'expriment faiblement (Batistatou et al., 2006).

Afin d'étudier plus spécifiquement les rôles d'ER $\beta$ , des agonistes ayant une meilleure affinité pour ce récepteur sont utilisés comme le LY500307 et la toosendanine. Ces deux molécules augmentent l'expression d'ER $\beta$  et favorisent l'apoptose des cellules tout en diminuant leur prolifération. Chez des souris implantées par voie intracrânienne dans le striatum droit avec des cellules U251, une dose de 5 mg/kg/jour de LY500307 pendant 28 jours réduit le volume de la tumeur (Sareddy et al., 2016). De même, le traitement à base d'1 mg/kg de toosendanine chez des souris xénotransplantées avec des cellules U87 diminue la taille de la tumeur d'un facteur 2. Ces effets antitumoraux sont dépendants de l'augmentation de l'expression de p53 en réponse à la toosendanine (Cao et al., 2016). Il semblerait donc que le ciblage d'ER $\beta$  présente des propriétés antitumorales intéressantes dans les cellules de GBM.

Bien qu'ER $\beta$  semble limiter la progression tumorale, la signalisation œstrogénique est plus complexe et implique l'expression, l'interaction et la fonctionnalité de nombreuses isoformes. Récemment, Liu et son équipe ont décrit que les cellules de GBM expriment principalement ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 5, tandis que des niveaux très faibles d'ER $\beta$ 2 et ER $\beta$ 4 sont détectés (Liu et al., 2018).

ER $\beta$ 5 semble être la principale isoforme d'ER $\beta$  dans les gliomes humains. On retrouve des niveaux plus élevés de cette isoforme dans les GBM que dans les LGG (Liu et al., 2018; Li et al., 2013). Afin d'étudier spécifiquement le rôle d'ER $\beta$ 5 dans les cellules de GBM U87 et U251, des lignées cellulaires KO pour toutes les isoformes d'ER $\beta$  ont été créées par Crispr/Cas9. Ces lignées ont ensuite été complétées par des vecteurs d'expression d'ER $\beta$ 5. Dans ce modèle, ER $\beta$ 5 augmente la migration et l'invasion des cellules par la voie Akt/mTOR/4EBP1 (ERB3-binding protein 1) (**Figure 28**). *In vivo*, les souris greffées avec ces cellules ne présentent aucune différence de survie par rapport aux souris KO non complétées (Liu et al., 2018). Une autre étude a montré qu'ER $\beta$ 5 est associé à une diminution de la prolifération cellulaire et du potentiel invasif en diminuant l'activité de MMP2 (Li et al., 2013). Les contradictions entre les données pourraient résulter de l'interaction d'ER $\beta$ 5 avec de multiples partenaires, en fonction du contexte cellulaire et du traitement.

La même approche que pour ER $\beta$ 5 a été utilisée pour étudier ER $\beta$ 1. Les cellules de GBM U87 et U251 exprimant uniquement ER $\beta$ 1 ne présentent qu'une faible diminution de la viabilité cellulaire par une régulation négative de NF- $\kappa$ B, de la signalisation JAK (Janus kinase)/STAT (Signal transducers and activators of transcription) et mTOR/S6kinase. Un potentiel migratoire plus faible a été mesuré, résultant d'une diminution de l'activité de MMP2 (**Figure 28**) (Liu et al., 2018; Li et al., 2013). Le rôle antitumoral d'ER $\beta$ 1 est confirmé dans un modèle *in vivo* dans lequel les souris greffées avec les cellules exprimant uniquement ER $\beta$ 1 ont une meilleure survie que celles ER $\beta$  KO (Liu et al., 2018). En utilisant une approche transcriptomique, l'équipe de Zhou a cherché à comprendre les mécanismes spécifiquement régulés par ER $\beta$ 1. Ils ont comparé le transcriptome des cellules U87 transfectées avec un vecteur vide à celui des cellules surexprimant ER $\beta$ 1. La surexpression d'ER $\beta$ 1 diminue l'expression des gènes liés à la régulation du point de contrôle des dommages de l'ADN, de la réponse aux dommages à l'ADN, de la réparation de l'ADN, des voies de signalisation ATM (ataxia telangiectasia mutated) et augmente l'expression de ceux du cycle cellulaire. De plus, la surexpression de cette isoforme potentialise le traitement par le TMZ et d'autres agents chimiothérapeutiques en

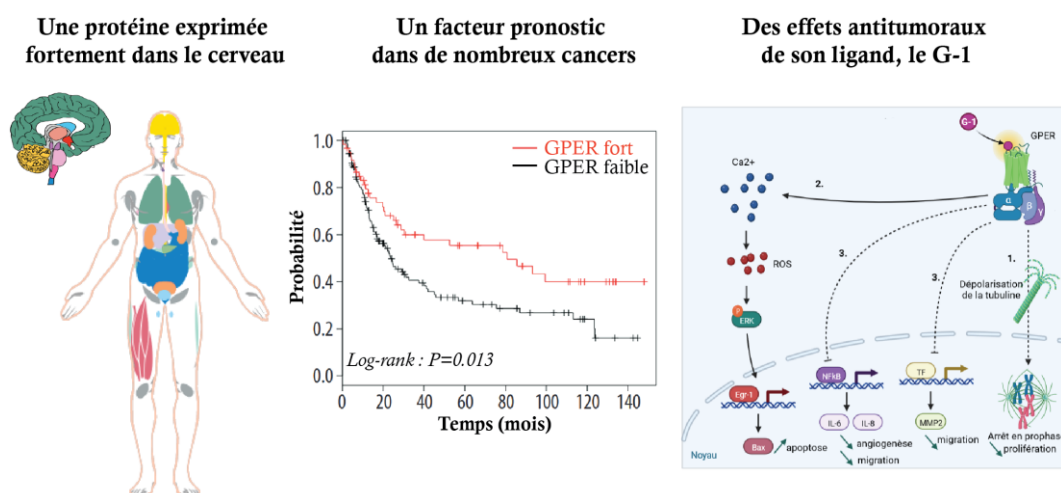
favorisant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire *in vitro* et la survie des cellules *in vivo* (Zhou et al., 2019).

Collectivement, ces résultats indiquent que chacune des isoformes d'ER $\beta$  ont un impact dans la tumorigenèse des gliomes. Etant donné que les ER nucléaires ont un rôle important à jouer dans la gliomagenèse, il est possible que le récepteur aux œstrogènes membranaire couplé aux protéines G, GPER soit aussi impliqué dans ce processus. En particulier, son expression préférentielle dans le cerveau tout comme son implication dans les maladies neurodégénératives renforce l'idée qu'il pourrait aussi intervenir dans l'apparition et la progression des gliomes.

### 3.4.3. Le récepteur GPER

Bien que GPER soit particulièrement exprimé dans le cerveau où il assure de nombreuses fonctions, aucune donnée n'existe actuellement sur son potentiel effet dans l'apparition et la progression des gliomes. L'expression de GPER étant, dans de nombreux cancers, un facteur pronostic prédictif de la survie des patients, son étude dans le contexte des tumeurs cérébrales est pertinente. Le G-1, l'agoniste spécifique de GPER, présente des propriétés anticancéreuses intéressantes en limitant notamment la prolifération des cellules dans de nombreux modèles de cancer. Il est alors possible que le G-1 puisse induire ces mêmes effets dans les cellules de GBM.

C'est à partir de ces constats que nous avons émis l'hypothèse que le niveau d'expression de GPER pourrait être un facteur pronostic dans les gliomes et que l'utilisation du G-1 serait une nouvelle piste thérapeutique prometteuse contre les gliomes (**Figure 29**).



**Figure 29 : GPER, une cible potentielle dans le traitement des glioblastomes ?**

# Partie II - Objectifs

---

Les gliomes sont des tumeurs cérébrales primaires, dont le pronostic varie selon le grade de la tumeur. Le glioblastome (GBM) est la forme la plus sévère et la plus répandue chez l'adulte. La classification de l'OMS est régulièrement mise à jour avec de nouveaux marqueurs moléculaires afin de prédire plus efficacement la survie et la progression de la maladie chez les patients. Malgré tous ces progrès, le bénéfice de cette nouvelle classification pour les patients reste très limité puisqu'elle n'influe que peu sur la prise de décision thérapeutique. Bien que le traitement de référence consiste en l'association d'une résection chirurgicale et d'une radiochimiothérapie assez lourde pour le patient, le pronostic reste très préoccupant. De nombreuses autres thérapies, plus ciblées, ont été proposées en vain. Plusieurs résultats tendent à montrer que l'histoire naturelle de ces tumeurs pourrait être influencée par une composante hormonale, en particulier œstrogénique.

Les œstrogènes sont importants pour la régulation de nombreuses fonctions biologiques, en participant notamment au développement et aux fonctions du cerveau. Plusieurs cancers sont décrits comme hormonosensibles et des thérapies ciblant les voies hormonales sont alors proposées aux patients. Les gliomes ne sont pas classés en tant que tels, mais (i) l'ensemble des données épidémiologiques montre que les femmes sont moins touchées et ont une meilleure survie que les hommes, (ii) de nombreuses études sur des rongeurs ou des modèles cellulaires suggèrent un effet protecteur de l'E2 et/ou de certaines voies de signalisation œstrogénique.

Le premier objectif de ma thèse a consisté à étudier l'impact du niveau d'expression de l'aromatase, des récepteurs aux œstrogènes, aux androgènes et à la progestérone sur la survie des patients atteints de gliomes de bas grade (LGG). Pour cela, nous avons utilisé les bases de données publiques TCGA et CGGA pour collecter un nombre important de données cliniques et moléculaires. La mise à jour de la classification des tumeurs du SNC par l'OMS en 2021 définit clairement différents sous-types de LGG selon la présence de la mutation IDH1 ou de la codélétion 1p19q. Nous avons donc stratifié les patients selon ces marqueurs moléculaires et avons étudié dans ces différents groupes si les gènes en lien avec la signalisation hormonale citée précédemment étaient de bon ou mauvais pronostic pour leur survie. Dans l'idée de

poursuivre les études sur le caractère hormonodépendant de ces tumeurs, nous avons aussi trié les patients selon leur sexe.

Le second objectif de ma thèse a consisté à caractériser spécifiquement le récepteur aux œstrogènes couplés aux protéines G : GPER dans les GBM. Comme le niveau d'expression de GPER a un fort lien avec la survie des patients dans de nombreux autres cancers, nous avons voulu vérifier si son expression avait aussi une influence sur la survie des patients atteints de GBM. Contrairement aux LGG pour lesquels il n'existe pas de modèle cellulaire, nous avons utilisé diverses lignées établies U87, U251, LN229 ainsi que la lignée primaire RADH87 pour étudier les conséquences de l'activation de GPER sur les processus tumoraux dans les GBM. Pour cela, nous avons stimulé ces différentes lignées cellulaires avec un agoniste synthétique spécifique de GPER, le G-1. Nous avons pu décortiquer ses mécanismes d'action à différentes échelles : au niveau moléculaire, cellulaire et chez l'animal.

# Partie III - Résultats

---

## Article 1 : « Identification of Gender- and Subtype-Specific Gene Expression Associated with Patient Survival in Low-Grade and Anaplastic Glioma in Connection with Steroid Signaling »



Article

### Identification of Gender- and Subtype-Specific Gene Expression Associated with Patient Survival in Low-Grade and Anaplastic Glioma in Connection with Steroid Signaling

Alex Hirtz <sup>1,†</sup>, Nolwenn Lebourdais <sup>1,†</sup>, Magalie Thomassin <sup>1</sup>, Fabien Rech <sup>1,2</sup>, Hélène Dumond <sup>1,†, </sup>  
and Hélène Dubois-Pot-Schneider <sup>1,\*,†, </sup>

**Contexte :** Cet article est l’aboutissement d’une collaboration entre biologistes, bio-informaticiens et cliniciens. En plus de ma participation à la maturation du projet, je me suis formé aux rudiments des statistiques sur l’environnement R pour assurer une partie des analyses.

**Introduction :** Les gliomes de bas grade (LGG) aussi appelés gliomes de grade 2 (G2) sont des tumeurs cérébrales rares d’origine gliale diagnostiqu es chez les jeunes adultes ( ge médian de 40 ans). Les tumeurs de grade 2 se caractérisent par une croissance lente et un envahissement progressif du parenchyme cérébral. Au bout d’un certain temps, elles vont subir une transformation anaplasique caract ris e par une prolifération beaucoup plus rapide des cellules tumorales et évoluer vers un grade 3 (G3) ou 4. Il est possible que la progression de ces tumeurs soit en partie modul e par la signalisation œstrogénique. Par exemple, la prise d’un contraceptif oral ou d’un traitement hormonal de substitution à la ménopause sont des facteurs limitant de l’apparition des gliomes. A l’inverse, l’augmentation des taux d’hormones durant la grossesse est un facteur aggravant de la croissance tumorale. Bien que l’implication de l’aromatase, l’enzyme qui synthétise les œstrogènes et des récepteurs aux œstrogènes commence à être bien caractérisé dans les glioblastomes, très peu d’informations sont disponibles dans les G2 et G3. Il est donc important de caractériser ces acteurs pour comprendre leur implication dans la progression des gliomes de bas grade et déterminer s’ils peuvent être utilisés comme marqueurs de prédiction de la survie des patients.

**Matériel et méthode :** L'absence de modèle cellulaire et l'hétérogénéité moléculaire des LGG rendent complexe leur étude. Il est donc nécessaire d'utiliser de grandes cohortes de patients pour assurer une robustesse statistique et c'est ainsi que nous avons utilisé la base de données publique actuellement la plus complète qui est celle de TCGA-LGG. Nous avons aussi utilisé la base de données CGGA pour valider certains de nos résultats. A partir des données moléculaires présentes dans TCGA-LGG, nous avons trié les patients selon la classification OMS de 2016 et les avons séparés en 3 groupes : IDHwt, IDHmut, IDHmut codel (1p19q codeletion). Dans la première partie de l'étude, nous avons réalisé une approche dite non supervisée. Nous avons identifié les gènes différentiellement exprimés entre les G2 et les G3 chez les hommes d'une part et chez les femmes d'autre part. Nous avons ensuite comparé ces listes afin de caractériser les voies de signalisation impliquées dans la progression d'une tumeur de G2 vers une tumeur de G3 selon le sexe des patients. Pour mieux caractériser le rôle du sexe dans la progression des G2 et des G3, nous avons comparé les DEG entre les hommes et les femmes dans chaque grade. Les gènes corrélés à la survie ont ensuite été analysés. Etant donné que seuls quelques gènes associés à la survie ont été identifiés par l'approche non supervisée, nous avons supposé que les différences cliniques entre les hommes et les femmes observées dans l'histoire naturelle des tumeurs pouvaient provenir de la production et/ou de la signalisation hormonale. Ainsi, dans la seconde partie de l'étude, par une approche supervisée, nous avons déterminé si des gènes liés à la signalisation des hormones stéroïdiennes comme l'aromatase (*CYP19A1*) les récepteurs aux œstrogènes nucléaires (*ESR1*, *ESR2*) et membranaire (*GPER1*), le récepteur à la progestérone (*PR*) et le récepteur aux androgènes (*AR*) étaient des facteurs favorables ou non à la survie des patients. Afin de conserver une puissance statistique suffisante, nous nous sommes concentrés sur les G3 en stratifiant selon le statut IDH1 et la codéletion 1p19q ainsi que le sexe des patients. Enfin, lorsque l'expression de l'aromatase ou de ces récepteurs était liée à la survie des patients, nous avons identifié les gènes corrélés à leur expression.

**Résultats :** Les gènes différentiellement exprimés entre les G2 et les G3 chez les hommes et les femmes sont impliqués dans la prolifération et la division cellulaire. Cela est confirmé pour les tumeurs IDHwt et IDHmut mais pas dans les IDHmut codel. Ces données confirment que la progression d'un G2 vers un G3 résulte d'une accélération de la croissance tumorale. L'étude des DEG entre les hommes et les femmes dans les G2 et les G3 IDHmut met entre autres en évidence la famille des gènes *HOX*, qui sont des gènes impliqués dans la

morphogénèse. L'ensemble des facteurs favorables à la survie des G3, trié selon le sexe des patients, statut IDH1 et la codéletion 1p19q sont référencés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif de l'article 1.**

Le tableau présente le niveau d'expression (faible : vert ou fort : rouge) des gènes liés à la signalisation des hormones stéroïdiennes qui sont de bon pronostic sur la survie des patients atteints de gliomes de grade 3. Entre parenthèses sont précisés les fonctions associées aux gènes corrélés à *AR*, *ESR1*, *ESR2*, *CYP19A1* et *GPER1*.

Sexe		Homme			Femme		
Gene	IDH	wt	mut	mut codel	wt	mut	mut codel
<i>AR</i>		Faible (biosynthèse des acides aminés)	Forte				
<i>ESR1</i>		Faible		Faible	Faible (réponse immunitaire/activation des lymphocytes T)		
<i>ESR2</i>						Faible	Faible
<i>CYP19A1</i>		Faible (adhésion cellulaire)		Faible (réponse immunitaire innée)			
<i>GPER1</i>					Forte (vascularisation)	Forte (métabolisme des ARN)	
<i>PR</i>							

**Conclusion :** Cette publication montre pour la première fois un lien entre la production /signalisation des hormones stéroïdiennes et la survie des patients. Par conséquent, la prise en compte de ces paramètres semble cruciale pour l'établissement du diagnostic des gliomes et pourrait constituer une piste thérapeutique prometteuse.



## Article

# Identification of Gender- and Subtype-Specific Gene Expression Associated with Patient Survival in Low-Grade and Anaplastic Glioma in Connection with Steroid Signaling

Alex Hirtz <sup>1,†</sup>, Nolwenn Lebourdais <sup>1,†</sup>, Magalie Thomassin <sup>1</sup>, Fabien Rech <sup>1,2</sup>, Hélène Dumond <sup>1,‡</sup>   
and Hélène Dubois-Pot-Schneider <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Service de Neurochirurgie, F-54000 Nancy, France

\* Correspondence: helene.dubois-pot-schneider@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372746115

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

**Simple Summary:** Gliomas are primary brain tumors that are initially slow growing but progress to be more aggressive and, ultimately, fatal within a few years. They are more common in men than in women, suggesting a protective role for female hormones. By analyzing patient data collected in the public TCGA-LGG database, we have demonstrated a link between the expression level of key steroid biosynthesis enzymes or hormone receptors with patient survival, in ways that are dependent on gender and molecular subtype. We also determined the genes which expression associated with these actors of steroid signaling and the functions they perform, to decipher the mechanisms underlying gender-dependent differences. Together, these results establish, for the first time, the involvement of hormones in low-grade and anaplastic gliomas and provide clues for refining their classification and, thus, facilitating more personalized management of patients.

**Abstract:** Low-grade gliomas are rare primary brain tumors, which fatally evolve to anaplastic gliomas. The current treatment combines surgery, chemotherapy, and radiotherapy. If gender differences in the natural history of the disease were widely described, their underlying mechanisms remain to be determined for the identification of reliable markers of disease progression. We mined the transcriptomic and clinical data from the TCGA-LGG and CGGA databases to identify male-over-female differentially expressed genes and selected those associated with patient survival using univariate analysis, depending on molecular characteristics (IDH wild-type/mutated; 1p/19q codeleted/not) and grade. Then, the link between the expression levels (low or high) of the steroid biosynthesis enzyme or receptors of interest and survival was studied using the log-rank test. Finally, a functional analysis of gender-specific correlated genes was performed. *HOX*-related genes appeared to be differentially expressed between males and females in both grades, suggesting that a glioma could originate in perturbation of developmental signals. Moreover, aromatase, androgen, and estrogen receptor expressions were associated with patient survival and were mainly related to angiogenesis or immune response. Therefore, consideration of the tight control of steroid hormone production and signaling seems crucial for the understanding of glioma pathogenesis and emergence of future targeted therapies.

**Keywords:** glioma; steroid signaling; transcriptomic profiles; gender-specific analysis; data mining; survival analysis; functional enrichment



**Citation:** Hirtz, A.; Lebourdais, N.; Thomassin, M.; Rech, F.; Dumond, H.; Dubois-Pot-Schneider, H. Identification of Gender- and Subtype-Specific Gene Expression Associated with Patient Survival in Low-Grade and Anaplastic Glioma in Connection with Steroid Signaling. *Cancers* **2022**, *14*, 4114. <https://doi.org/10.3390/cancers14174114>

Academic Editor: Mikael S. Lindström

Received: 20 July 2022

Accepted: 20 August 2022

Published: 25 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:**   2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Diffuse low-grade gliomas (LGG) (or grade 2 gliomas in the 2021 WHO classification; [1]) are rare brain tumors of glial origin (about 15% of gliomas) diagnosed in young adults (median age 40 years). They classically evolve in two phases: the first, corresponding

to slow growth and invasion, indolent during several years before and after the radiological diagnosis, and the second, rapid phase related to anaplastic transformation (histological grade 3 or 4), leading to neurological disorders and ultimately to the death of patients (median overall survival 15.7 years) [2]. One of the main issues for cancer biologists remains the finding of reliable markers to help the follow-up of disease progression, especially during the anaplastic transformation.

Although their management is currently not standardized, the general aim of treatment is to delay this anaplastic transformation (which remains almost inevitable). Surgery plays a key role in decreasing tumor volume, significantly impacts the course of the disease, and improves patient survival, while preserving the quality of life [3]. Alkylating agent-based chemotherapy tends to play an increasing early role, before or after surgery, while radiotherapy has the same impact whether it is delivered early or late. Therapeutic schemes remain very similar for every patient, although, according to the 2021 WHO classification, gliomas split into three types: IDH1-mutated/1p/19q-codeleted oligodendroglioma, IDH1-mutated astrocytoma, or IDH1 wild-type glioblastoma [1]. Therefore, molecular, cellular, or physiological determinants of this heterogeneous disease that would drive precision therapy or report individual response to treatment are still urgently needed.

The etiology of low-grade gliomas remains unknown. The tumor develops during adolescence or in young adults and is often diagnosed after the occurrence of an epileptic seizure (70–90%). The incidence and poor outcome of these tumors appear to be higher in men than in women [4]. Since no cellular model is currently available to decipher the underlying molecular and cellular differences, Khan et al. (2021) recently mined public databases to identify gender-specific molecular differences in transcriptomic and epigenomic datasets, mixing low-grade 2 and anaplastic grade 3 gliomas from some databases, including IDHwt and IDHmut samples [5]. From 1564 transcripts located on autosomes, ontology analyses revealed that these genes were mainly related to cell–cell junction, communication, angiogenesis, and immune system processes. However, their reliability as prognosis factors to predict patient survival and consequently refine glioma classification for precision medicine remains to be established, depending on the molecular status (IDH wild-type/mutated; 1p/19q codeleted/not) and histological grade of the tumor.

Other factors appear to influence the natural history of gliomas, including steroid hormones. In synergism with progesterone, the balance of estrogens and androgens exerts important modulator effects on brain development, including neuronal excitability and connectivity and neoplastic glial cell proliferation control. A recent review from Hirtz et al. (2020) highlighted the “female paradox” that exogenous estrogen exposure might protect women against gliomagenesis, whereas endogenously produced estrogens or progesterone could promote neoplastic transformation and tumor growth [6]. In males, high levels of circulating androgens were associated with increased glioma risk and poorer outcome [7,8]. In case of pregnancy, the deleterious effect of hormone levels appeared more striking: eight cases of pregnant LGG patients were initially reported, six of which had a negative impact of pregnancy i.e., accelerated tumor growth. Then, the series was extended to 11 pregnant LGG patients for 12 reported pregnancies and supported the increase in tumor growth velocity during pregnancy. Postpartum growth rate recovered to pre-pregnancy level [9]. Finally, Peeters et al. (2018) confirmed in a series of eight glioma patients that pregnancy accelerated the tumor growth rate by almost seven-fold and led to clinical deterioration [10]. Despite the small number of cases studied, those data suggested that the burst in estrogen/progesterone production observed during the second part of gestation might trigger a low-grade tumor growth increase and/or anaplastic transformation.

The key actors of the steroid signaling include biosynthesis enzymes such as Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1 (*CYP19A1* encoding aromatase), which converts androgens to estrogens and hormone receptors. Indeed, the effects of androgens, estrogens, and progesterone are mediated by the nuclear receptors, AR (encoded by the *AR* gene), ER $\alpha$  (encoded by the *ESR1* gene), or ER $\beta$  (encoded by *ESR2*), respectively, and progesterone PR (encoded by *PGR*), as well as by the G protein-coupled membrane receptor

*GPER1*. The *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* genes prognostic values begin to be well-described in glioblastoma (GBM) but remain unknown in low-grade and anaplastic tumors. Nevertheless,  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  mRNA decrease, whereas PR expression increases with the histological grade of the tumor [11,12]. A positive association between  $ER\alpha$  and  $ER\beta$  and survival was also reported in gliomas [12]. No data are currently available on the involvement of *GPER1* in low-grade gliomas.

In this paper, we analyzed the clinical and transcriptomic data available at the TCGA-LGG and CGGA databases, which collect samples of low-grade (grade 2) and anaplastic (grade 3) gliomas, and stratified the patients according to gender, tumor grade (2 or 3), and molecular features indicated in the WHO 2016 classification (IDH wild-type/mutated; 1p/19q codeleted/not). First, we analyzed the molecular processes underlying G2 to G3 transformation to clarify which mechanisms might be involved in accelerated tumor growth during pregnancy. For each group, we then selected the (male over female) differentially expressed genes (DEGs) and determined the impact on survival of the expression of key actors of steroid signaling. Finally, to infer the mechanisms involved in the gender-based differences in each grade 3 glioma type, we performed a gene ontology analysis on the genes whose expression was correlated with that of survival-associated steroid genes. This study brings new light in the knowledge of grade 2 and 3 gliomas by highlighting gender- and tumor-type-specific mechanisms involving angiogenesis and immune response.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Data Collection from the TCGA and CGGA Databases and Normalization

Transcriptomic and clinical data from patients with grade 2 and 3 gliomas (with reference to the WHO 2016 classification) were downloaded from TCGA-LGG project (The Cancer Genome Atlas; Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>, accessed on 4 October 2021) using the R package TCGAAbiolinks in R statistical software (retrieved from <https://www.R-project.org/>; v 4.1.1) [13]. Data included in the present study were unique samples from patients with primary tumors and a survival greater than 0 days ( $n = 507$ ). Patients' characteristics are listed in Supplementary Table S1a. To compare each patient transcriptomic data with each other, the median of the ratio normalization and variance stabilizing transformation methods were applied to these data using the R package DESeq2 [14].

For data validation, transcriptomic and clinical data from grade 2 or grade 3 glioma patients were also downloaded from the CGGA database (<http://www.cgga.org.cn>; datasets: mRNAseq\_693 and mRNAseq\_325, accessed on 18 May 2022) [15–18]. Patients' characteristics are listed in Supplementary Table S1b.

### 2.2. Selection of Differentially Expressed Genes

First of all, a differential expression analysis was performed using the R package DESeq2 [19] to identify differentially expressed genes between grade 3 and grade 2 or males and females in the TCGA database. As multiple testing was performed, we selected genes with an adjusted  $p$ -value of less than 1% with the Benjamini–Hochberg (BH) method.

### 2.3. Univariate Analysis

Univariate analysis was performed to test the link between patient survival (defined as the time between the date of surgery and the date of death or the date of the last follow-up) and each gene-expression level. This analysis consisted in fitting a Cox model per transcript from the R package survival. As above, the  $p$ -values were adjusted with the BH method with a threshold of 5%.

### 2.4. Survival Analysis

After performing a survival analysis, patients were divided into two groups of high or low (gene of interest) expression. The optimal cut-point (`surv_cutpoint` function, R package `survminer`) was obtained by using the maximally selected rank statistics, with a minimum

proportion of observations per group of 25%. The log-rank test was used to compare the Kaplan–Meier survival curves between the defined high and low groups.

### 2.5. Gene Expression Correlation Analysis in the TCGA Database

From the normalized transcriptomic data of the population of interest in the TCGA database, Spearman correlation was used to identify genes with expression that was associated with that of steroid biosynthesis enzymes or hormone receptors. Genes with an absolute value of the correlation coefficient greater than 0.6 were selected.

### 2.6. Validation of Gene Expression Correlations in the CGGA Database

From the lists of genes correlated with steroid biosynthesis enzymes or hormone receptors in the TCGA database, a correlation analysis was again performed with gene expression data from the CGGA database.

### 2.7. Functional Annotation

Gene annotation was based on gene ontology and enrichment for specific biological functions was determined using FuncAssociate 2.0 program (FuncAssociate: The Gene Set Functionator; [20]) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Unsupervised GSEA was done with the whole C5 ontology gene sets from the molecular signature database (MSigDB). Upstream regulators were identified using the C3 regulatory target gene set in the GSEA database with significant FDR q-values ( $<0.05$ ) [21,22].

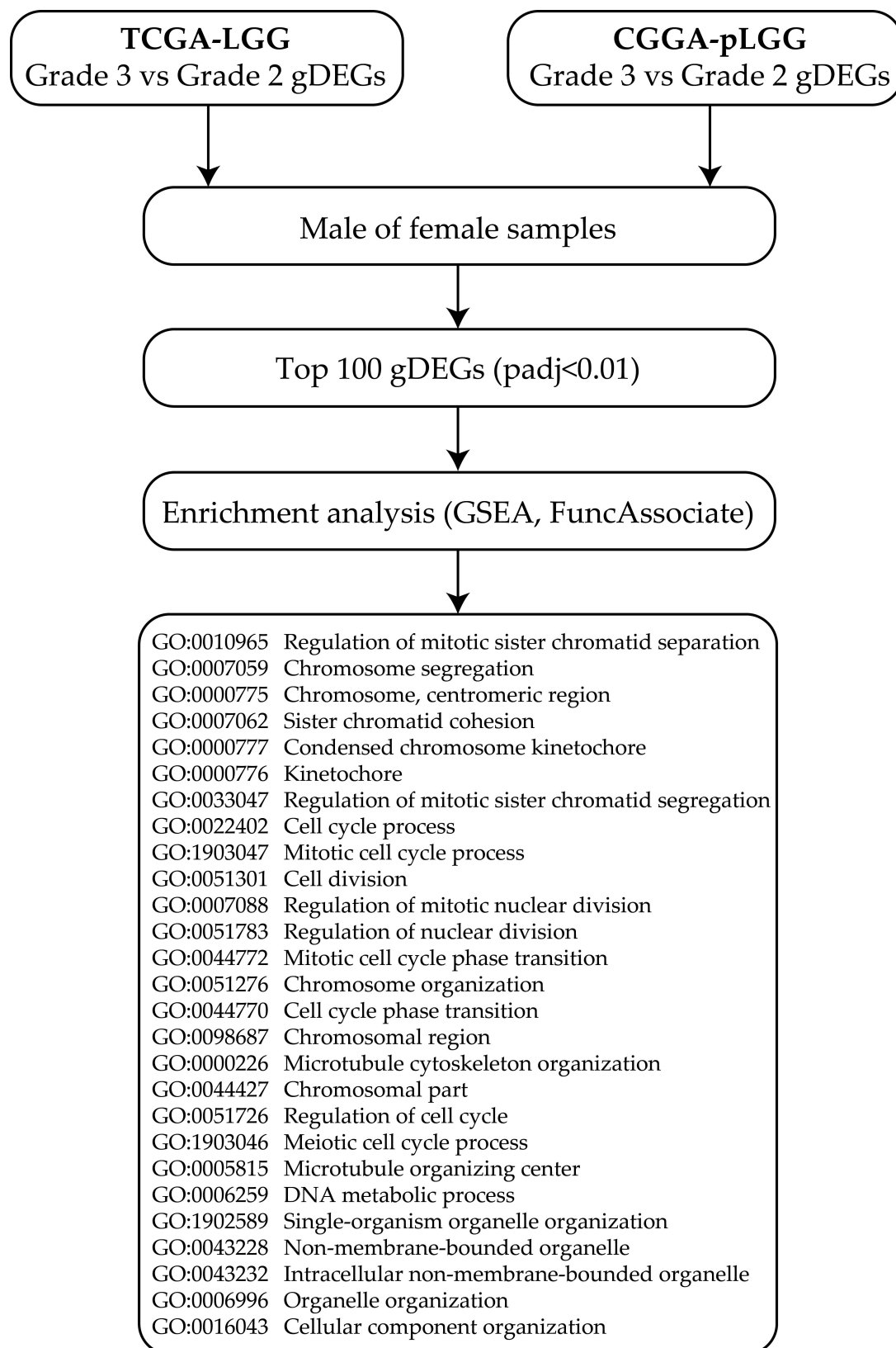
## 3. Results

### 3.1. Grade 3 over Grade 2 Differentially Expressed Genes in Males and Females

The TCGA-LGG dataset contains clinical and transcriptomic data from 507 unique primary tumor samples, 215 grade 2, 236 grade 3, and 56 without histological characterization that were excluded from the present study (Supplementary Table S1a). Grade 3 over grade 2 differentially expressed genes (gDEGs) were selected from all TCGA-LGG samples (whatever the molecular status) and were stratified by gender (Figure 1). We highlighted 3042 gDEGs in males and 6496 gDEGs in females ( $\text{padj} < 0.01$ ) (Supplementary Table S2). To confirm the relevance of our data, the same analysis was performed from LGG samples collected in the CGGA-pLGG database. However, the CGGA database and the TCGA database only share 22,087 transcripts in common (23,271 in CGGA database vs. 53,747 in TCGA) due to different sequencing depths. For this reason, we chose to compare gene ontologies enriched in the top 100 gDEGs. In both sexes, the top 100 gDEGs (based on minimal  $\text{padj}$ ) were associated with gene ontologies related to cell division. Interestingly, most of these ontologies were also found with the top 100 gDEGs from the CGGA database, such as GO:0022402 and GO:1903047, corresponding to the cell cycle process and the mitotic cell cycle process, respectively.

Then, glioma samples were stratified by gender, IDH, and 1p/19q status: IDH wild-type (IDHwt), IDH-mutated 1p/19q non-codeleted (IDHmut), and IDH-mutated 1p/19q codeleted (IDHmut codel).

For IDHwt, the top 100 gDEGs from the TCGA database highlighted GO enrichment linked to cell division in males and females. These GO terms were also observed with females' top 100 gDEGs from the CGGA database (Supplementary Table S3). However, there was no significant enrichment for males' IDHwt from the CGGA database. Similarly, for IDHmut, the top 100 gDEGs from the TCGA database were linked to cell division in males and females. This finding was validated with the top 100 gDEGs from the CGGA database for females, but no GO enrichment was found for IDHmut males (Supplementary Table S3). No significant enrichment with the top 100 gDEGs from the TCGA and CGGA databases for IDHmut codel males and females was found. Taken together, these data confirmed that grade 2 to grade 3 progression originated in accelerated cell division. To better characterize the role of gender in the grade 2 to grade 3 progression, we performed male-over-female DEGs analyses, from the more complete TCGA-LGG database.



**Figure 1.** Workflow for the selection and analysis of grade 3 over grade 2 differentially expressed genes (gDEGs) from either male or female glioma samples collected from the TCGA or CGGA databases. Once identified, top 100 gDEGs were submitted to functional enrichment analysis using GSEA or FuncAssociate pipelines. GO terms common to the lists extracted from TCGA and CGGA are indicated.

### 3.2. Male-Over-Female Differentially Expressed Genes in Grade 2 or Grade 3 Gliomas Associated with Patient Overall Survival

Overall, 117 and 120 male-over-female DEGs were selected from the grade 2 or grade 3 TCGA-LGG samples, respectively (Supplementary Table S4). Among the 54 common DEGs identified in both grades, 30 mapped on chromosome Yp11, 8 on Xp22, 4 on Xq13, and 4 on Xq11 (Figure 2a). Since those genes were expected to be selected in a male vs female screening from any tissue, they were not included in further analyses. In contrast, a univariate analysis was performed to identify DEGs linked to patient overall survival among the 63 and 66 transcripts specifically identified from the grade 2 and grade 3 samples, respectively. In total, 17 genes with an expression level associated with patient survival were selected from grade 2 (Figure 2b,c). Gene ontology enrichment analysis indicated that six of them (Matrix Metalloproteinase (*MMP*) 14, Homeobox (*HOX*)A4, *HOXA5*, Odd-Skipped Related Transcription Factor 2 (*OSR2*), Lactotransferrin (*LTF*), and Transforming Growth Factor Beta 2 (*TGFB2*)) were involved in skeletal development [GO: 0048704; GO: 0048705; GO: 0048706; GO:0001501]. *HOXA4* and *MMP14* might be regulated by the EN1 (Engrailed 1) upstream transcription factor, together with Ras Association Domain Family Member 9 (*RASSF9*) or PR/SET Domain 13 (*PRDM13*), respectively. Then, 31 DEGs were associated to survival in grade 3 tumors (Figure 2d,e and Supplementary Table S4), but this list displayed no enrichment in GO terms or upstream transcription factor. Male-over-female DEGs were further selected and analyzed depending on the three glioma molecular subtypes. No subtype-specific DEGs linked to patient survival could be identified from grade 2 tumors, due to the small number of patients who died during the study (31/215 = 14.4%), with respect to the large number of living individuals excluded from the study (85.6%). From grade 3 tumors, 22, 59, and 32 DEGs were selected from IDHwt, IDHmut, and IDHmut codel tumors, respectively (Supplementary Table S5).

Based on a univariate analysis, only three DEGs identified from the IDHmut samples were significantly ( $padj < 0.05$ ) associated with patient survival: ISL LIM Homeobox 2 (*ISL2*), Interleukin 1 Receptor Antagonist (*IL1RN*), and *HOXD13* (Figure 2f,g).

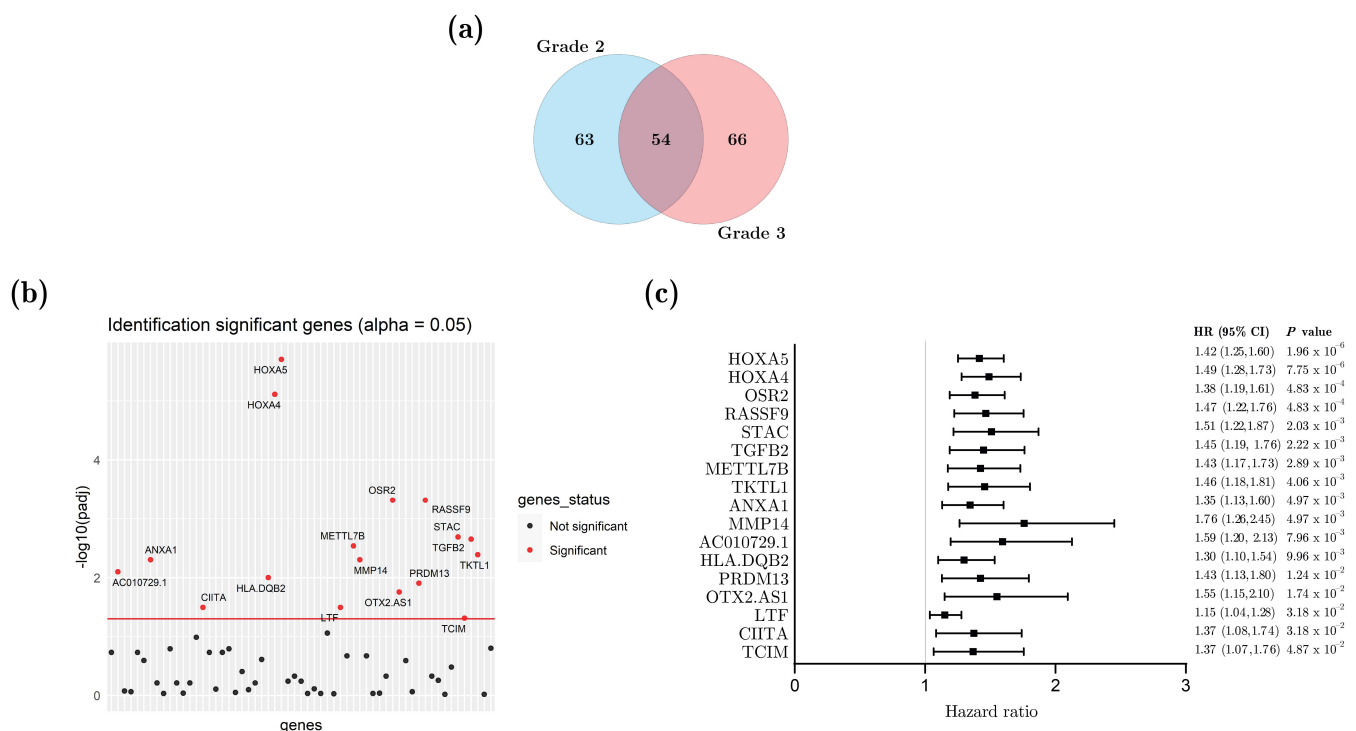
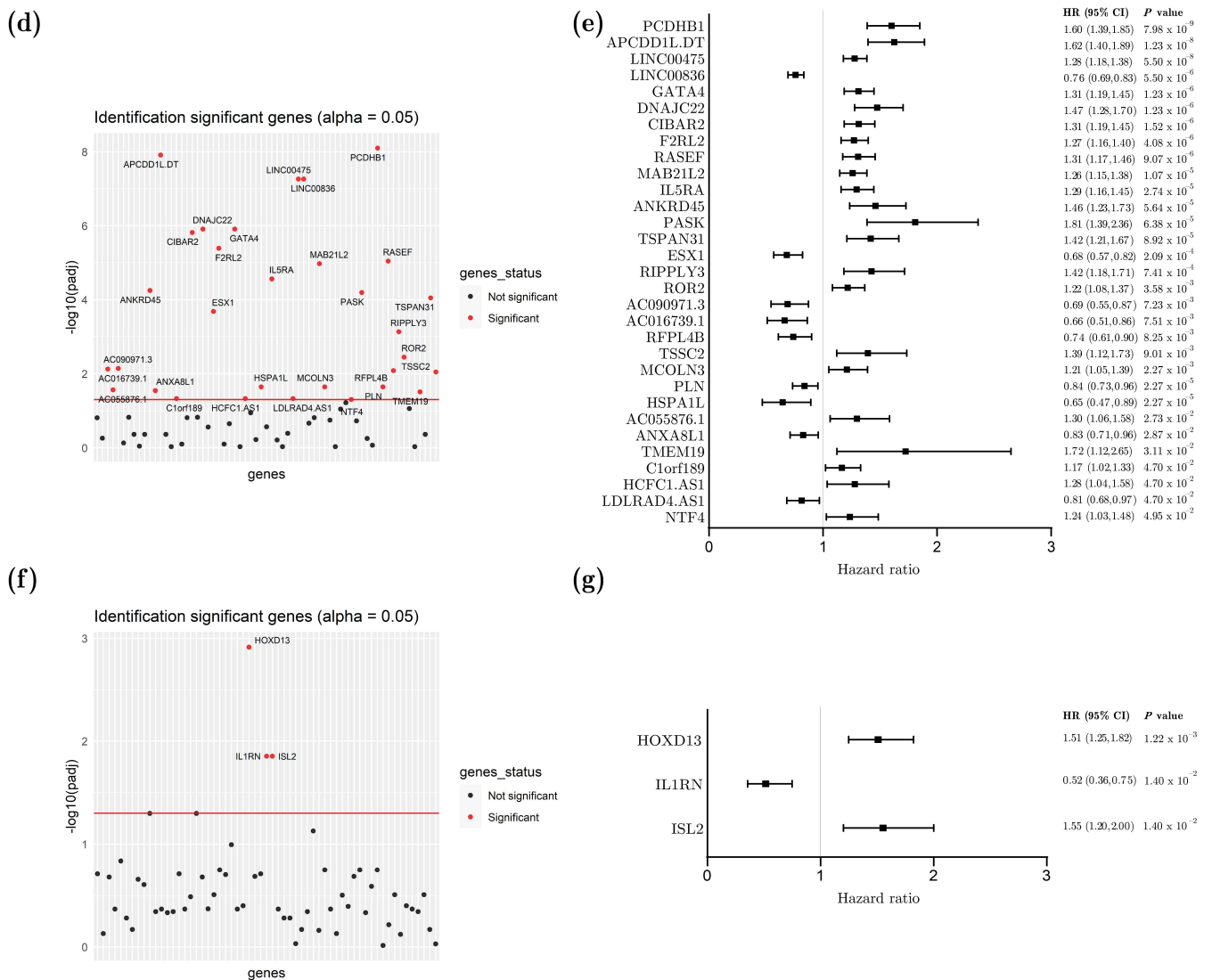


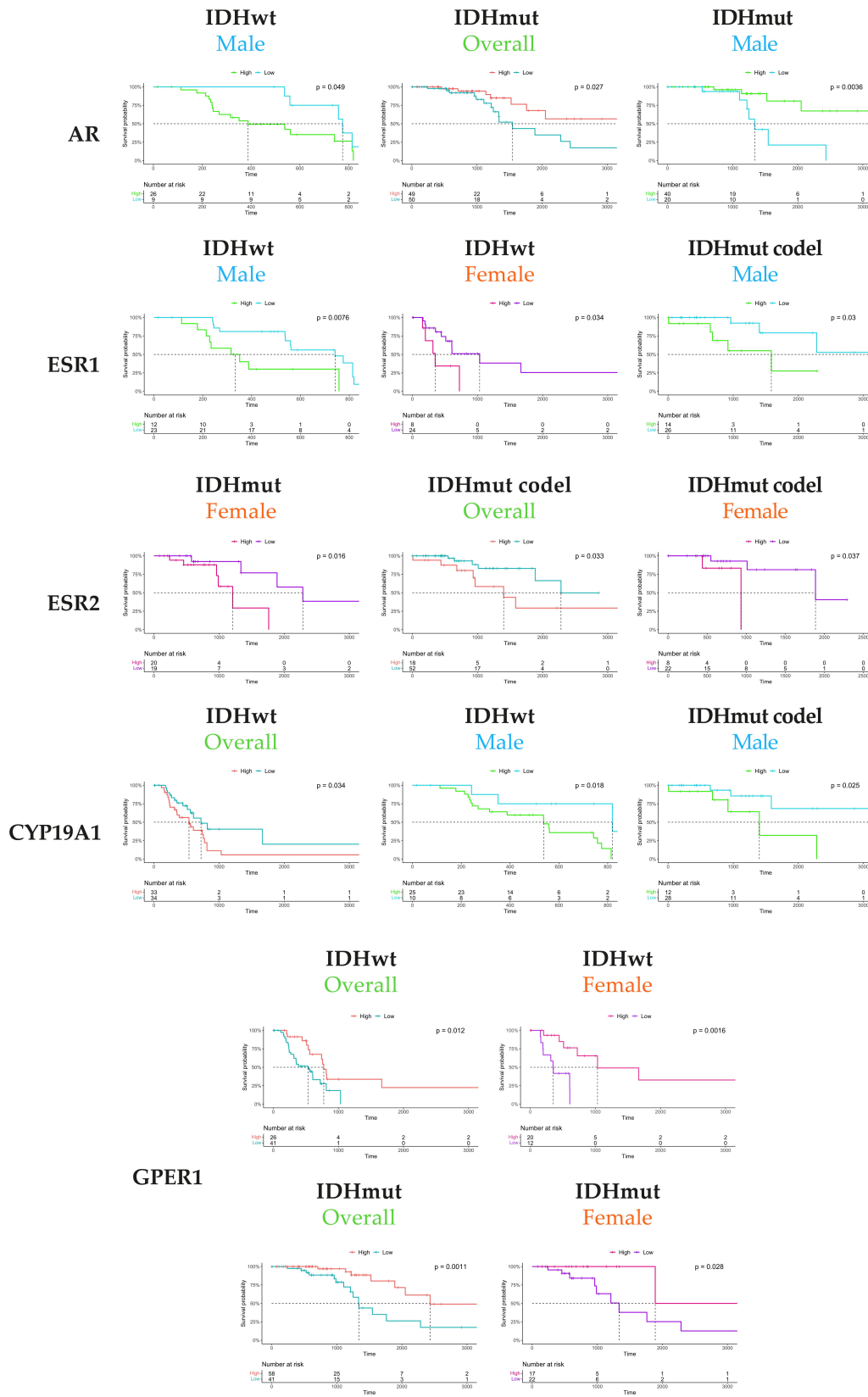
Figure 2. Cont.



**Figure 2.** Male-over-female differentially expressed genes (DEGs) associated with patient survival in grade 2 and 3 glioma samples from TCGA. Venn diagram comparing the 117 and 120 male over-female DEGs from either grade 2 or grade 3 samples, respectively (a). Manhattan plots representing the association between gene-expression level and patient survival in the univariate analysis of grade 2 (b), grade 3 (d), and grade 3 IDHmut (f) gliomas. Red line marks significance threshold where the *p*-value adjusted by the Benjamini–Hochberg method is equal to 5%. Forest plot representing the hazard ratio (HR) and its confidence interval (CI) of genes with expression that is associated with patient survival in univariate analysis of grade 2 (c), grade 3 (e), and grade 3 IDHmut (g) gliomas.

### 3.3. Expression of Aromatase and Steroid Receptors in Grade 3 Tumors Associated with Patient Overall Survival Depending on Gender and Tumor Type

Since only a few genes associated with survival were identified in the previous screening, we assumed that the clinical differences between males and females observed in the natural history of the tumors might originate from hormone production and/or signaling. From the TCGA-LGG RNAseq and clinical data, we performed a supervised analysis of the potential correlation between key steroid biosynthesis enzyme (*CYP19A1* encoding aromatase) or receptor (*AR*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER1*, *PGR*) expression and grade 3 patient survival, depending on the glioma type and patient gender (Figure 3, Table 1). *PGR* expression was not linked to survival, whatever the gender or type and was, therefore, not selected for further analysis.



**Figure 3.** Kaplan–Meier survival curves of IDHwt, IDHmut, or IDHmut codel grade 3 patients (overall population, males, females) according to the expression of *AR*, *ESR1*, *ESR2*, *CYP19A1*, and *GPER1*. The curves were selected when corresponding gene expression was significantly associated to patient survival ( $p < 0.05$ ). The optimal cut-point was obtained by using the maximally selected rank statistics, with a minimum proportion of observations per group of 25%.



**Table 1.** Type-specific correlation between key steroid biosynthesis enzyme or hormone receptor expression and patient survival. For each type (IDHwt, IDHmut, IDHmut codel) the correlation between the expression of *AR*, *ESR1*, *ESR2*, *CYP19A1*, or *GPER1* with survival was assessed. The expression level (low or high) corresponding to good prognosis was indicated. GO enrichment analysis of the genes correlated with *AR*, *ESR1*, *ESR2*, *CYP19A1*, or *GPER1* was performed: number of correlated genes, top significant GO terms, enrichment pvalue, and FDRqvalue as well as genes associated with enrichment GO terms, as identified from both TCGA and CGGA databases (based on absolute rho value), were indicated.

		Correlated Genes (IrhoI > 0.6)							
		Gender	Good Prognosis	Number	Top GO	pval	FDR qval	Genes Associated with Enriched GO (TCGA and CGGA)	
AR	IDH wt	Male	Low	11	GO:0006578	amino-acid betaine biosynthetic process	8.11.10 <sup>-7</sup>	8.44.10 <sup>-3</sup>	BBOX1
	IDH mut	All	High	3	-	-	-	-	-
		Male	High	19	-	-	-	-	-
		Male	Low	0	-	-	-	-	-
ESR1	IDH wt	Female	Low	44	GO:0006955	immune response	1.34.10 <sup>-26</sup>	1.4.10 <sup>-22</sup>	CD3G, EOMES, SLAMF1, SLAMF7, CCR4, CD3E, GZMA, CST7, LY9, CD96, FCGR2B, IL2RG, SLAMF6, FASLG, SKAP1
					GO:0042110	T cell activation	1.10 <sup>-18</sup>	1.74.10 <sup>-15</sup>	CD3G, EOMES, CD2, CD3E, LCK
	IDH mut codel	Male	Low	4	-	-	-	-	-
ESR2	IDH mut	Female	Low	29	-	-	-	-	-
	IDH mut codel	All	Low	9	-	-	-	-	-
		Female	Low	0	-	-	-	-	-
CYP19A1	IDHwt	All	Low	23	GO:0022610	Biological adhesion	6.7.10 <sup>-8</sup>	5.63.10 <sup>-4</sup>	RAC2, PLAUR, SIGLEC9, SIGLEC7, SPP1, FRMT3, S100A11
					GO:0002274	Myeloid leukocyte activation	1.84.10 <sup>-7</sup>	5.63.10 <sup>-4</sup>	RAC2, FCER1G, HMOX1
	IDH mut codel	Male	Low	22	GO:0022610	Biological adhesion	3.27.10 <sup>-6</sup>	3.4.10 <sup>-2</sup>	RAC2, PLAUR, SIGLEC9, SIGLEC7, CSTA, IL4I1, SPP1
		Male	Low	66	GO:0045087	Innate immune response	2.42.10 <sup>-19</sup>	4.19.10 <sup>-16</sup>	C1R, APOL1, HLA-E
GPER1	IDH wt	All	High	50	GO:0001944	vasculature development	3.9.10 <sup>-19</sup>	4.06.10 <sup>-15</sup>	FLT4, TIE1, ACVRL1, CLEC14A, PDGFRB, ADGRA2, ROBO4, NOTCH4, ANPEP, CDH5, ECM1, RASIP1, TMEM204, ARHGEP15
					GO:0001944	Vasculature development	3.53.10 <sup>-15</sup>	3.67.10 <sup>-11</sup>	FLT4, NOTCH4, ACVRL1, CLEC14A, RASIP1, EGFL7, ROBO4, CLDN5
	IDH mut	All	High	1	-	-	-	-	-
		Female	High	191	GO:0016070	RNA metabolic process	5.32.10 <sup>-10</sup>	1.47.10 <sup>-6</sup>	ZNF333, ZNF254, TFDP2, MGA, SETD5, ZFP69, SRSF11, PNN, HNRNPH1, TRIT1, ZNF326

A low *AR* expression was associated with a longer survival in IDHwt males, whereas a high *AR* expression was of good prognosis in IDHmut grade 3 patients overall and in the male population. A low *ESR1* and *ESR2*, as well as a low *CYP19A1* expression, were associated with good prognosis, suggesting that a low level of active estrogens might dampen anaplastic transformation. Low *ESR1* expression was of good prognosis in IDHwt tumors both in males and females, though low *ESR1* expression was of good prognosis in IDHmut codel tumors only in males. Low *ESR2* expression was related to longer survival only in females in IDHmut/codel, while low *CYP19A1* expression was associated with survival in IDHwt and IDHmut codel in males. Conversely, a high *GPER1* expression was linked to a better survival in IDHwt and IDHmut types overall. These observations were significant in both types female tumors. Taken together, these results indicated that

estrogen nuclear receptor signaling greatly differed from membrane-initiated ones, whereas both appeared to contribute to patient survival.

### 3.4. Genes Correlated with Aromatase and Steroid Receptor Expression in the Whole Population, Males, and Females, Stratified by Tumor Type

We then wanted to gain additional insight into the functionality of aromatase and steroid receptors in each grade 3 type where their expression was correlated with patient survival. We performed a co-expression correlation analysis (Supplemental Table S6  $|\rho| > 0.6$ ). Of note, all the correlated genes cited in Table 1 were validated with the CGGA database.

We identified 11 genes positively correlated with *AR* expression in IDHwt in males. These genes were associated with a GO term related to the amino acid betaine biosynthetic process, as assessed by the expression of Gamma-Butyrobetaine Hydroxylase 1 (*BBOX1*). No significant enrichment was found for *AR* correlated genes in the IDHmut type. In total, 44 genes were positively correlated with *ESR1* in IDHwt, whereas no *ESR1* correlated gene was highlighted in males. These 44 genes were related to adaptive immune response, as supported by the presence of the T-Cell Surface *CD2* surface antigen or the T-Cell Surface Glycoprotein *CD3* Gamma Chain (*CD3G*). No specific functions were enriched in the 29- and 9-gene signatures correlated with *ESR2* expression in IDHmut and IDHmut codel tumors, respectively. We highlighted a 23-gene signature positively correlated with *CYP19A1* expression in IDHwt tumors in the overall population. These genes were linked to biological adhesion and immune response, including the Fc Epsilon Receptor Ig (*FCER1G*) or the adhesion molecule Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 9 (*SIGLEC9*) and the adhesion molecule Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 7 (*SIGLEC7*). Most of these genes were also corelated to *CYP19A1* in males. Interestingly, the 66-gene signature in IDHmut codel tumors was also related to innate immune response such as the Complement Component 1, R Subcomponent (*C1R*). The 50 genes correlated with *GPER1* expression in IDHwt tumors in the whole population were involved in vasculature development through expression of cell-surface receptors such as Activin A Receptor Like Type 1 (*ACVRL1*) or the vascular endothelial growth factor receptor (*FLT4*). These genes were also correlated with *GPER1* in females. Finally, the *GPER1* negatively correlated genes of the 191 gene-signature in IDHmut females were associated with nucleic acid process, as supported by the Transcription Factor Dp-2 (*TFDP2*) or numerous Zinc Finger Protein (*ZNF*) members.

## 4. Discussion

Low-grade and anaplastic gliomas are considered as relatively rare tumors, with an incidence in the USA estimated at 0.51 and 0.25 per 100,000 per year for astrocytoma and oligodendroglioma, respectively [23]. Consequently, large cohorts remain barely available, except from public databases. In the present study, we mined the TCGA-LGG and CGGA databases to gain insight into the molecular basis of gender differences in the glioma natural history. Since glioma classification is constantly being updated since 2016, we stratified the samples not only according to the histological grade but also based on the molecular criteria such as IDHwt/mut or 1p/19q codeletion status.

In clinics, anaplastic transformation with accelerated tumor growth and aggressivity characterizes grade 2 to 3 transition. Transcriptomic data from either TCGA or CGGA datasets supported these observations, since most genes affected were involved in cell cycle, cell division, and chromosome segregation in males and females. However, IDHwt male tumors displayed a high level of gene expression heterogeneity, and no molecular pathway characterized grade 2 to grade 3 transformation. A more refined classification seems necessary for this group to ensure the robustness of the clinical prognosis and to adapt patient care.

Then, we focused on either grade 2 or grade 3 tumors and identified male-over-female DEG. As previously described, such DEG screening trivially identified many X- or Y-linked genes because of their sexually dimorphic expression. In addition, approximately 70% of

the DEGs we identified have been previously found in an analysis mixing low-grade and anaplastic grade 3 gliomas [5]. However, the grade stratification in our study allowed the identification of new grade-2-specific genes that were involved in skeletal morphogenesis (*MMP14*, *HOXA4*, *HOXA5*, *OSR2*, *LTF*, *TGFB2*). *HOXA4* and *HOXA5* homeobox genes belonged to clusters that encode transcription factors required for normal development, which are repressed in healthy adult tissues but often deregulated in brain tumors [24]. Recently, Le Boiteux et al. (2021) demonstrated that HOX clusters reactivated in aggressive IDHwt gliomas following loss of H3K27me3 and hypermethylation escape [25]. *HOXA5* was also involved in cell proliferation and apoptosis control and identified as a prognostic-related biomarker in GBM [26]. Moreover, the gene enrichment analysis identified *EN1* as an upstream transcription factor for grade-2-specific DEGs. The expression of this member of homeobox-containing transcription factors, was previously shown to correlate with shorter survival in low-grade glioma patients, irrespective of IDH status or 1p/19q codeletion [27].

Further, two of the three DEGs associated with patient survival in type stratified grade 3 tumors were homeobox-related genes. A low expression of *HOXD13* correlated to better survival in IDHmut grade 3 patients, which supported previous data indicating that a hypermethylation of *HOXD13* was observed in IDH-mutated GBM-patient long-term survivors, compared to short-term survivors [28]. Zhang et al. (2020) demonstrated that miR-7156-3p modulated *HOXD13* expression in GBM and thus, lowered GBM progression by regulating tumor cell stemness [29]. A low expression of the *ISL2* appeared to be of good prognosis, regardless of the type of grade 3 tumor. Overexpression of this transcription factor was shown to participate in a feedback loop with miR342-3p, to promote angiogenesis in GBM and control cell proliferation and malignant transformation in oligodendroglioma [30].

Taken together, the results from the present study further supported the potential role of HOX genes expression as a prognosis factor in low-grade and anaplastic gliomas, together with upstream regulators. This suggested that this disease onset might be related to the epigenetic alteration of developmental patterning, which promoted the tumor anaplastic feature through stem cell maintenance and angiogenesis. Since these HOX-related genes were selected as male-over-female DEGs, we wondered which of their common drivers could also be different between males and females. The hormonal hypothesis appeared relevant, since HOX gene expression was controlled by steroid hormones, namely estrogens and progesterone, during normal reproductive-tract development and in adult tissue, such as endometrium during the menstrual cycle. HOX clusters were also dysregulated in hormone-sensitive diseases such as endometriosis, breast or prostate cancers (for review [31]). Moreover, strong estrogen-mimicking compounds such as diethylstilbestrol (DES) or bisphenol A (BPA) might impair correct HOX patterning in sexually dimorphic organs through genetic and epigenetic alterations and lead to functional abnormalities [32,33].

Consequently, we addressed the potential association between grade 3 glioma patient survival and steroid biosynthesis enzyme or receptor expression. We showed that in addition to a stratification according to the defined glioma subtypes, a gender-stratification allowed to better define the role of steroid signaling in grade 3 gliomas and the prognostic potential of these gene expressions. Indeed, AR and aromatase were associated with patient survival in males, whereas estrogen signaling (involving ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and GPER) seemed to play a major role in females. In both cases, these observations were tumor-subtype specific.

Consistent with previous findings showing that AR had pro-tumor properties in GBM tumor cells, we found in grade 3 gliomas that a low AR expression associated with better survival and one-carbon metabolism, especially in male IDHwt tumors. This suggested that AR-dependent signaling could influence the epigenetic feature of these tumors by altering the gene methylation level [6,34]. Surprisingly, a high level of AR was of good prognosis in IDHmut tumors, especially in males, but no associated function could be inferred from gene-correlation analysis. Conflicting results previously indicated that AR expression was either higher or lower in GBM than in low-grade gliomas (reviewed in [6]).

This underlined the need to cautiously consider *AR* expression as a predictive marker for survival, according to tumor subtype.

*PGR* never associated with survival, while several studies highlighted an accelerated growth and anaplastic transformation of low-grade tumors during pregnancy, a unique hormonal period characterized by huge levels of progesterone and estrogens [10].

Low canonical estrogen signaling, mediated by estrogens (produced by *CYP19A1* encoded protein) and the *ER* $\alpha$  nuclear receptor, appeared to be linked to immune response and the adhesive interactions between immune cells in IDHwt and IDHmut codel grade 3 tumors. These findings support the role of immunity in the prognosis of anaplastic glioma. Indeed, an immune-response signature was found in the IDHwt high-risk group and was correlated with a poor prognosis for LGG patients [35]. Recently, Song et al. identified a 120-gene immune infiltration signature differentially expressed in low-grade glioma, compared with the normal brain, and selected a 20-gene immune infiltration signature that could predict the survival of the patients. Among them, *SPP1* and genes of the *SIGLEC* family, encoding Ig, such as lectins, were found correlated with *CYP19A1* in IDHwt and IDHmut 1p/19q codel tumors and associated with a poor prognosis [36]. Our study is the first one showing the link between the molecular status, aromatase, nuclear estrogen receptors' expression, and immune response. *ESR2* expression was found to be of poor prognosis in IDHmut (1p/19q codel or not) female tumors, but no correlated genes or functions were identified. Recently, Liu and coworkers observed a differential deregulation of *ER* $\beta$  isoforms in GBM and demonstrated that *ER* $\beta$ 1 has a tumor-suppression function, while *ER* $\beta$ 5 promoted oncogenic function [37]. Further work should give more insight on the prognosis value of each *ER* $\beta$  isoforms in female IDHmut low-grade gliomas.

Conversely to the low level of nuclear receptors, a high expression level of membrane estrogen receptor *GPER1* correlated with better survival in both IDHwt and IDHmut female patients, in connection with vasculature development and the RNA metabolic process, respectively. A high *GPER1* level associated with a high expression of key genes involved in angiogenesis such as *PDGFRB*, which enhanced glioma cell migration and was proposed together with *EGFR* as a target for therapeutic agents [38,39]. Ambhore et al. demonstrated that *ER* $\beta$  agonists, but not the *GPER*-agonist G-1, significantly decreased PDGF production and the proliferation of airway smooth muscle cells through non-genomic signaling [40]. Recently, Hirtz et al. (2021) showed that *GPER1* expression was also of good prognosis in the GBM tumors listed in the TCGA-GBM database and GBM cell lines, although G-1 triggered *GPER*-independent cell cycle arrest [41]. The 17 $\beta$ -estradiol and G-1 affinity and selectivity for *GPER* is increasingly being questioned [42]. In grade 3 tumors, we can, therefore, hypothesize that *GPER* might either participate in estrogen non-genomic signaling or respond to a still unknown stimulus to inhibit angiogenesis and improve patient survival. Therefore, the detailed gene network that relates *GPER* signaling to angiogenesis modulation, anaplastic progression, and survival appeared of great interest in the perspective of new targeted therapies. Indeed, the *GPER1* expression level appeared to be of high prognostic value, especially for female patients. In IDHwt and IDHmut female tumors, female-specific genes negatively correlated with *GPER1* were mainly regulated by miR548, which has been associated with impaired proliferation in various cancers [43], including glioma [44] and hormone-sensitive tumors such as prostate cancer [45] and breast cancer [43,46]. In IDHmut tumors, female-specific genes positively associated to *GPER1* were mainly regulated by upstream factors such as *HMG1*, which mediates GBM regression and promotes angiogenesis [47], and *ERR* $\alpha$ , with expression that increases with glioma grade [48]. In GBM, *ERR* $\alpha$  promotes Wnt5 expression and poor prognosis but might be targeted by several natural or xenobiotic compounds [49].

In conclusion, our results confirm the relevance of the gender-related mechanisms involved in low-grade and anaplastic gliomas by highlighting steroid-related genes and specific signaling (such as immune or angiogenic pathways) as new prognostic markers in diffuse gliomas. The results obtained in this retrospective study could not take into account all the new molecular markers allowing the classification of gliomas. Since central nervous

system tumor classification is being constantly updated with new genetic alterations, their links with steroid biosynthesis/signaling will be explored as the databases are updated to open new perspectives for targeted therapies.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14174114/s1>. Table S1: Patient characteristics of TCGA-LGG (a) and CGGA-LGG databases. IDH, isocitrate dehydrogenase; NA: not applicable. Table S2: List of grade 3 over grade 2 differentially expressed genes (gDEGs) from male (a) and female (b) LGG samples collected from the TCGA database. Table S3: GO terms significantly enriched from grade 3 over grade 2 DEGs lists in IDHwt or IDHmut tumors from the TCGA and CGGA databases. Table S4: Lists of male over female DEGs in grade 2 and/or grade 3 tumors. Table S5: Lists of male over female DEGs in IDHwt, IDHmut, and IDHmut code grade 3 tumors. Table S6: Lists of genes whose expression significantly associated with the indicated receptor or aromatase in IDHwt, IDHmut, and IDHmut code grade 3 tumors stratified by gender. Positive correlations ( $\rho > 0.6$ ) are shown in red and negative correlations ( $\rho < -0.6$ ) are shown in green.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.D.-P.-S. and H.D.; methodology, A.H., N.L., H.D.-P.-S. and H.D.; validation, H.D.-P.-S., H.D. and F.R.; investigation, A.H., M.T. and N.L.; resources, N.L. and H.D.-P.-S.; writing—original draft preparation, A.H., H.D.-P.-S. and H.D.; writing—review and editing, A.H., M.T., F.R., H.D. and H.D.-P.-S.; supervision, H.D.-P.-S. and H.D.; project administration, F.R., H.D.-P.-S. and H.D.; funding acquisition, F.R., H.D. and H.D.-P.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was funded by the Cancéropole Grand Est (Pro-Glio project 2020; Fabien Rech as principal Investigator) and the Appel unique INS2I-CNRS 2020. A.H. is the recipient of a Ph.D. fellowship from the University of Lorraine.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The results published here are based upon data generated by the TCGA Research Network at <https://www.cancer.gov/tcga> and the CGGA database at <http://www.cgga.org.cn>. Data from the TCGA-LGG dataset are available at <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LGG> and were accessed on 4 October 2021. Data from the CGGA database are available at [http://www.cgga.org.cn/download.jsp#mRNAseq\\_693](http://www.cgga.org.cn/download.jsp#mRNAseq_693) for the mRNAseq\_693 dataset and at [http://www.cgga.org.cn/download.jsp#mRNAseq\\_325](http://www.cgga.org.cn/download.jsp#mRNAseq_325) for the mRNAseq\_325 dataset. Data were accessed on 18 May 2022.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-Oncology* **2021**, *23*, 1231–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Obara, T.; Blonski, M.; Brzenczek, C.; Mézières, S.; Gaudeau, Y.; Pouget, C.; Gauchotte, G.; Verger, A.; Vogin, G.; Moureaux, J.-M.; et al. Adult Diffuse Low-Grade Gliomas: 35-Year Experience at the Nancy France Neurooncology Unit. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 574679. [[CrossRef](#)]
3. Brown, T.J.; Bota, D.A.; van Den Bent, M.J.; Brown, P.D.; Maher, E.; Aregawi, D.; Liau, L.M.; Buckner, J.C.; Weller, M.; Berger, M.S.; et al. Management of Low-Grade Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuro-Oncol. Pract.* **2019**, *6*, 249–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Fulop, J.; Liu, M.; Blanda, R.; Kromer, C.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncol.* **2015**, *17*, iv1–iv62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Khan, M.T.; Prajapati, B.; Lakhina, S.; Sharma, M.; Prajapati, S.; Chosdol, K.; Sinha, S. Identification of Gender-Specific Molecular Differences in Glioblastoma (GBM) and Low-Grade Glioma (LGG) by the Analysis of Large Transcriptomic and Epigenomic Datasets. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 699594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hirtz, A.; Rech, F.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Dumond, H. Astrocytoma: A Hormone-Sensitive Tumor? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Yu, X.; Jiang, Y.; Wei, W.; Cong, P.; Ding, Y.; Xiang, L.; Wu, K. Androgen Receptor Signaling Regulates Growth of Glioblastoma Multiforme in Men. *Tumour Biol.* **2015**, *36*, 967–972. [[CrossRef](#)]

8. Weidenfeld, J.; Schiller, H. Metabolism of Steroids by Human Brain Tumors. *Clin. Neuropharmacol.* **1984**, *7*, 395–397. [[CrossRef](#)]
9. Pallud, J.; Mandonnet, E.; Deroulers, C.; Fontaine, D.; Badoual, M.; Capelle, L.; Guillet-May, F.; Page, P.; Peruzzi, P.; Jouanneau, E.; et al. Pregnancy Increases the Growth Rates of World Health Organization Grade II Gliomas. *Ann. Neurol.* **2010**, *67*, 398–404. [[CrossRef](#)]
10. Peeters, S.; Pagès, M.; Gauchotte, G.; Miquel, C.; Cartalat-Carel, S.; Guillamo, J.-S.; Capelle, L.; Delattre, J.-Y.; Beauchesne, P.; Debouverie, M.; et al. Interactions between Glioma and Pregnancy: Insight from a 52-Case Multicenter Series. *J. Neurosurg.* **2018**, *128*, 3–13. [[CrossRef](#)]
11. Tavares, C.; Gomes-Braga, F.; Costa-Silva, D.; Escórcio-Dourado, C.; Borges, U.; Conde-Junior, A.; Barros-Oliveira, M.; Sousa, E.; Barros, L.; Martins, L.; et al. Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in Astrocytomas: A Literature Review. *Clinics* **2016**, *71*, 481–486. [[CrossRef](#)]
12. Dueñas Jiménez, J.M.; Candanedo Arellano, A.; Santerre, A.; Orozco Suárez, S.; Sandoval Sánchez, H.; Feria Romero, I.; López-Elizalde, R.; Alonso Venegas, M.; Netel, B.; de la Torre Valdovinos, B.; et al. Aromatase and Estrogen Receptor Alpha mRNA Expression as Prognostic Biomarkers in Patients with Astrocytomas. *J. Neurooncol.* **2014**, *119*, 275–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Colaprico, A.; Silva, T.C.; Olsen, C.; Garofano, L.; Cava, C.; Garolini, D.; Sabetot, T.S.; Malta, T.M.; Pagnotta, S.M.; Castiglioni, I.; et al. TCGAAbiolinks: An R/Bioconductor Package for Integrative Analysis of TCGA Data. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e71. [[CrossRef](#)]
14. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
15. Zhao, Z.; Zhang, K.-N.; Wang, Q.; Li, G.; Zeng, F.; Zhang, Y.; Wu, F.; Chai, R.; Wang, Z.; Zhang, C.; et al. Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): A Comprehensive Resource with Functional Genomic Data from Chinese Glioma Patients. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2021**, *19*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Liu, X.; Li, Y.; Qian, Z.; Sun, Z.; Xu, K.; Wang, K.; Liu, S.; Fan, X.; Li, S.; Zhang, Z.; et al. A Radiomic Signature as a Non-Invasive Predictor of Progression-Free Survival in Patients with Lower-Grade Gliomas. *Neuroimage Clin.* **2018**, *20*, 1070–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zhao, Z.; Meng, F.; Wang, W.; Wang, Z.; Zhang, C.; Jiang, T. Comprehensive RNA-Seq Transcriptomic Profiling in the Malignant Progression of Gliomas. *Sci. Data* **2017**, *4*, 170024. [[CrossRef](#)]
18. Wang, Y.; Qian, T.; You, G.; Peng, X.; Chen, C.; You, Y.; Yao, K.; Wu, C.; Ma, J.; Sha, Z.; et al. Localizing Seizure-Susceptible Brain Regions Associated with Low-Grade Gliomas Using Voxel-Based Lesion-Symptom Mapping. *Neuro Oncol.* **2015**, *17*, 282–288. [[CrossRef](#)]
19. Goel, M.K.; Khanna, P.; Kishore, J. Understanding Survival Analysis: Kaplan-Meier Estimate. *Int. J. Ayurveda Res.* **2010**, *1*, 274–278. [[CrossRef](#)]
20. Berriz, G.F.; Beaver, J.E.; Cenik, C.; Tasan, M.; Roth, F.P. Next Generation Software for Functional Trend Analysis. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 3043–3044. [[CrossRef](#)]
21. Liberzon, A.; Birger, C.; Thorvaldsdóttir, H.; Ghandi, M.; Mesirov, J.P.; Tamayo, P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) Hallmark Gene Set Collection. *Cell Syst.* **2015**, *1*, 417–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Youssef, G.; Miller, J.J. Lower Grade Gliomas. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2020**, *20*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gonçalves, C.S.; Le Boiteux, E.; Arnaud, P.; Costa, B.M. HOX Gene Cluster (de)Regulation in Brain: From Neurodevelopment to Malignant Glial Tumours. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 3797–3821. [[CrossRef](#)]
25. Le Boiteux, E.; Court, F.; Guichet, P.; Vaurs-Barrière, C.; Vaillant, I.; Chautard, E.; Verrelle, P.; Costa, B.M.; Karayan-Tapon, L.; Fogli, A.; et al. Widespread Overexpression from the Four DNA Hypermethylated HOX Clusters in Aggressive (*IDH* Wt) Glioma Is Associated with H3K27me3 Depletion and Alternative Promoter Usage. *Mol. Oncol.* **2021**, *15*, 1995–2010. [[CrossRef](#)]
26. Ding, F.; Chen, P.; Bie, P.; Piao, W.; Cheng, Q. HOXA5 Is Recognized as a Prognostic-Related Biomarker and Promotes Glioma Progression Through Affecting Cell Cycle. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 633430. [[CrossRef](#)]
27. Zhu, J.; Zhang, Y.-Q. Engrailed 1 Overexpression as a Potential Prognostic Marker in Lower Grade Glioma. *PeerJ* **2019**, *7*, e7414. [[CrossRef](#)]
28. Shinawi, T.; Hill, V.K.; Krex, D.; Schackert, G.; Gentle, D.; Morris, M.R.; Wei, W.; Cruickshank, G.; Maher, E.R.; Latif, F. DNA Methylation Profiles of Long- and Short-Term Glioblastoma Survivors. *Epigenetics* **2013**, *8*, 149–156. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, J.; Deng, M.; Tong, H.; Xue, W.; Guo, Y.; Wang, J.; Chen, L.; Wang, S. A Novel MiR-7156-3p-HOXD13 Axis Modulates Glioma Progression by Regulating Tumor Cell Stemness. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 3200–3209. [[CrossRef](#)]
30. Jiang, Y.; Zhou, J.; Zhao, J.; Zhang, H.; Li, L.; Li, H.; Chen, L.; Hu, J.; Zheng, W.; Jing, Z. The U2AF2 /CircRNA ARF1/MiR-342-3p/ISL2 Feedback Loop Regulates Angiogenesis in Glioma Stem Cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 182. [[CrossRef](#)]
31. Daftary, G.S.; Taylor, H.S. Endocrine Regulation of HOX Genes. *Endocr. Rev.* **2006**, *27*, 331–355. [[CrossRef](#)]
32. Akbas, G.E.; Song, J.; Taylor, H.S. A HOXA10 Estrogen Response Element (ERE) Is Differentially Regulated by 17 Beta-Estradiol and Diethylstilbestrol (DES). *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 1013–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Preciados, M.; Yoo, C.; Roy, D. Estrogenic Endocrine Disrupting Chemicals Influencing NRF1 Regulated Gene Networks in the Development of Complex Human Brain Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Sapienza, C.; Issa, J.-P. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu. Rev. Nutr.* **2016**, *36*, 665–681. [[CrossRef](#)]
35. Han, T.; Zuo, Z.; Qu, M.; Zhou, Y.; Li, Q.; Wang, H. Comprehensive Analysis of Inflammatory Response-Related Genes, and Prognosis and Immune Infiltration in Patients With Low-Grade Glioma. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 748993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Song, L.-R.; Weng, J.-C.; Li, C.-B.; Huo, X.-L.; Li, H.; Hao, S.-Y.; Wu, Z.; Wang, L.; Li, D.; Zhang, J.-T. Prognostic and Predictive Value of an Immune Infiltration Signature in Diffuse Lower-Grade Gliomas. *JCI Insight* **2020**, *5*, e133811. [[CrossRef](#)]
37. Liu, J.; Sareddy, G.R.; Zhou, M.; Viswanadhappalli, S.; Li, X.; Lai, Z.; Tekmal, R.R.; Brenner, A.; Vadlamudi, R.K. Differential Effects of Estrogen Receptor  $\beta$  Isoforms on Glioblastoma Progression. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3176–3189. [[CrossRef](#)]
38. Wallmann, T.; Zhang, X.-M.; Wallerius, M.; Bolin, S.; Joly, A.-L.; Sobocki, C.; Leiss, L.; Jiang, Y.; Bergh, J.; Holland, E.C.; et al. Microglia Induce PDGFRB Expression in Glioma Cells to Enhance Their Migratory Capacity. *iScience* **2018**, *9*, 71–83. [[CrossRef](#)]
39. Xu, G.; Li, J.Y. Differential Expression of PDGFRB and EGFR in Microvascular Proliferation in Glioblastoma. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 10577–10586. [[CrossRef](#)]
40. Ambhore, N.S.; Katragadda, R.; Raju Kalidhindi, R.S.; Thompson, M.A.; Pabelick, C.M.; Prakash, Y.S.; Sathish, V. Estrogen Receptor Beta Signaling Inhibits PDGF Induced Human Airway Smooth Muscle Proliferation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *476*, 37–47. [[CrossRef](#)]
41. Hirtz, A.; Lebourdais, N.; Rech, F.; Bailly, Y.; Vaginay, A.; Smail-Tabbone, M.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Dumond, H. GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation. *Cells* **2021**, *10*, 3438. [[CrossRef](#)]
42. Tutzauer, J.; Gonzalez de Valdivia, E.; Swärd, K.; Alexandrakis Eilard, I.; Broselid, S.; Kahn, R.; Olde, B.; Leeb-Lundberg, L.M.F. Ligand-Independent G Protein-Coupled Estrogen Receptor/G Protein-Coupled Receptor 30 Activity: Lack of Receptor-Dependent Effects of G-1 and 17  $\beta$ -Estradiol. *Mol. Pharmacol.* **2021**, *100*, 271–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Guo, X.; Lee, S.; Cao, P. The Inhibitive Effect of Sh-HIF1A-AS2 on the Proliferation, Invasion, and Pathological Damage of Breast Cancer via Targeting MiR-548c-3p through Regulating HIF-1 $\alpha$ /VEGF Pathway in Vitro and Vivo. *OncoTargets Ther.* **2019**, *12*, 825–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lu, J.; Zhang, M.; Yang, X.; Cui, T.; Dai, J. MicroRNA-548c-3p Inhibits T98G Glioma Cell Proliferation and Migration by Downregulating c-Myb. *Oncol. Lett.* **2017**, *13*, 3866–3872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Saffari, M.; Ghaderian, S.M.H.; Omrani, M.D.; Afsharpad, M.; Shankaie, K.; Samadaian, N. The Association of MiR-Let 7b and MiR-548 with PTEN in Prostate Cancer. *Urol. J.* **2018**, *16*, 267–273. [[CrossRef](#)]
46. Tormo, E.; Pineda, B.; Serna, E.; Guijarro, A.; Ribas, G.; Fores, J.; Chirivella, E.; Climent, J.; Lluch, A.; Eroles, P. MicroRNA Profile in Response to Doxorubicin Treatment in Breast Cancer. *J. Cell Biochem.* **2015**, *116*, 2061–2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Seidu, R.A.; Wu, M.; Su, Z.; Xu, H. Paradoxical Role of High Mobility Group Box 1 in Glioma: A Suppressor or a Promoter? *Oncol. Rev.* **2017**, *11*, 325. [[CrossRef](#)]
48. Lynch, C.; Zhao, J.; Sakamuru, S.; Zhang, L.; Huang, R.; Witt, K.; Merrick, B.; Teng, C.; Xia, M. Identification of Compounds That Inhibit Estrogen-Related Receptor Alpha Signaling Using High-Throughput Screening Assays. *Molecules* **2019**, *24*, 841. [[CrossRef](#)]
49. Zhang, L.; Zhu, Y.; Cheng, H.; Zhang, J.; Zhu, Y.; Chen, H.; Chen, L.; Qi, H.; Ren, G.; Tang, J.; et al. The Increased Expression of Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  Correlates with Wnt5a and Poor Prognosis in Patients with Glioma. *Mol. Cancer Ther.* **2019**, *18*, 173–184. [[CrossRef](#)]

## Article 2 : « GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation »

Article

### GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation

Alex Hirtz<sup>1</sup>, Nolwenn Lebourdais<sup>1</sup>, Fabien Rech<sup>1,2</sup>, Yann Bailly<sup>1</sup>, Athénaïs Vaginay<sup>1,3</sup>, Malika Smaïl-Tabbone<sup>3</sup>, Hélène Dubois-Pot-Schneider<sup>1,4</sup> and Hélène Dumond<sup>1,\*,†</sup>

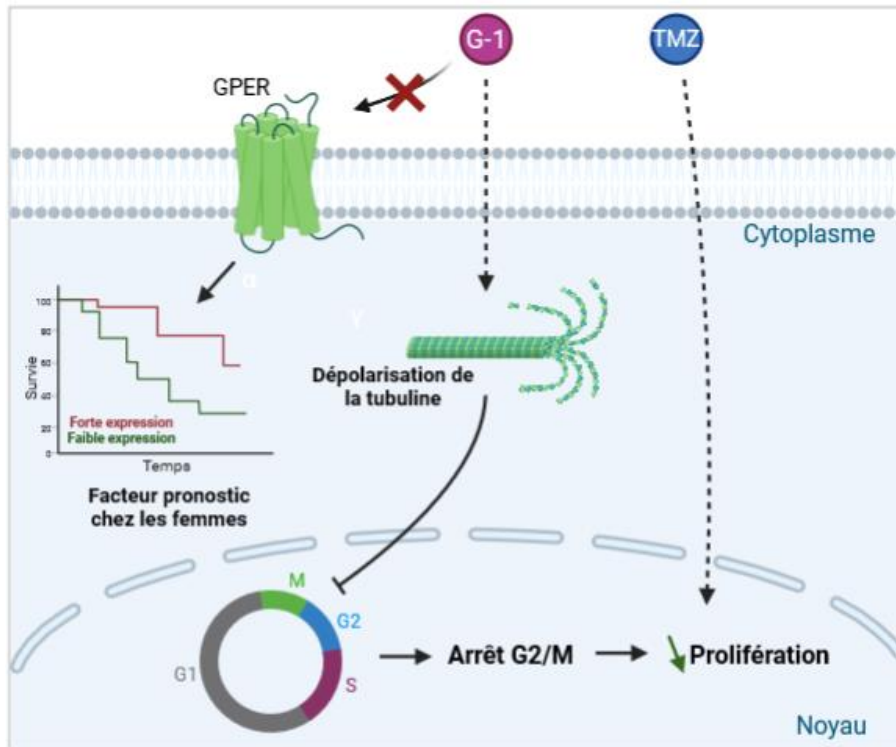


Figure 30 : Illustration récapitulative de l'article 2.

**Contexte :** Cet article repose essentiellement sur le travail expérimental de mes deux premières années de thèse. J'ai notamment participé à la conceptualisation de certains axes d'études, sous les conseils de biologistes expérimentés, cliniciens et bio-informaticiens.

**Introduction :** Le glioblastome (GBM) est la tumeur primaire cérébrale la plus fréquente chez l'adulte. Le traitement standard est une résection chirurgicale aussi large que possible, suivie d'une radiochimiothérapie concomitante à base de témozolomide (TMZ). Malgré de lourds traitements, la plupart des GBM récidivent quelques mois après la résection chirurgicale au niveau des marges opératoires. Peu de facteurs de risque sont connus mais les hommes sont plus touchés que les femmes avec un sexe-ratio de 1,4 :1. Une hypothèse discutée plus en détail



dans l'introduction générale est que les œstrogènes, présents en plus grande quantité chez les femmes, possèdent des effets neuroprotecteurs contre le GBM. De plus, l'article présenté précédemment sur les gliomes de grade 2 et 3 montre que l'expression de certains récepteurs aux œstrogènes peut être corrélée à la survie des patients. En particulier, une forte expression de *GPER1* dans les gliomes de G3 IDHwt et IDHmut chez les femmes est un facteur favorable à leur survie. Sur la base de ces observations nous avons voulu caractériser plus en détail l'impact de l'expression et de la fonctionnalité de GPER dans les GBM et déterminer si son activation par un agoniste spécifique, le G-1, constituait une piste thérapeutique potentielle pour la prise en charge du GBM.

**Matériel et méthode :** Par une approche supervisée à partir de la base de données publique TCGA-GBM, nous avons évalué si l'expression de *GPER1* était un facteur favorable à la survie des patients atteints de GBM. Par une approche *in vitro* à l'aide des modèles cellulaires de GBM IDHwt U251 (lignée mâle) et LN229 (lignée femelle), nous avons voulu caractériser l'expression et la localisation protéique de GPER dans ces cellules. Pour comprendre les mécanismes régulés par GPER nous avons stimulé ces cellules avec le G-1. Nous nous sommes particulièrement penchés sur les effets du G-1 sur la prolifération cellulaire. Nous avons aussi regardé si les effets du G-1 étaient réellement dépendants de l'activation de GPER en prétraitant les cellules avec des antagonistes spécifiques synthétiques de GPER, le G-15 et le G-36. Enfin, nous avons évalué l'impact d'une combinaison du G-1 et du TMZ sur les lignées de GBM.

**Résultats :** Comme pour les gliomes de grades 2 et 3, nous avons montré qu'une forte expression de *GPER1* est corrélée à une meilleure survie dans les GBM, et ce uniquement chez les femmes. Pour la première fois nous montrons *in vitro* que la forme protéique de GPER est exprimée dans les lignées U251 et LN229. De plus, une forte quantité de la forme glycosylée de GPER est détectée dans la lignée U251 et est associée à une localisation membranaire plus importante que dans la lignée LN229. Nous avons montré que le G-1 induit un arrêt de la prolifération cellulaire en phase G2/M. Cela résulte d'une perturbation de l'assemblage des microtubules (**Figure 30**). Le prétraitement des cellules avec le G-15 ou le G-36 ne réduit pas les effets du G-1 sur la prolifération. Il semblerait donc que les effets du G-1 dans les lignées U251 et LN229 soient indépendants de l'activité de GPER. Lorsque nous avons étudié la cinétique d'action du G-1, nous avons remarqué qu'après un renouvellement du milieu de culture sans G-1, les cellules étaient capables de proliférer à nouveau. La combinaison du G-1 avec le TMZ produit des effets additifs en amplifiant la diminution de la prolifération. Enfin,

de façon intéressante, lorsque les deux composés sont retirés du milieu de culture, la reprise de la prolifération cellulaire n'est plus observée.

**Conclusion :** Nous confirmons dans cette étude que l'expression de *GPER1* est un facteur favorable à la survie des patients atteints de GBM. De nouveaux ligands spécifiques de GPER pourraient donc être de nouvelles pistes thérapeutiques potentielles dans la prise en charge du GBM. Bien que les effets du G-1 semblent être indépendants de l'activité de GPER dans notre modèle, cette molécule présente tout de même des propriétés antiprolifératives intéressantes en ciblant les microtubules et pourrait être utilisée comme agent de chimiothérapie dans le traitement du GBM en complément du traitement standard à base de TMZ.

Certains résultats portant sur cette partie de mon travail n'ont pas été publiés. Ceux-ci sont présentés dans la partie ci-dessous.

## Article

# GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation

Alex Hirtz <sup>1</sup>, Nolwenn Lebourdais <sup>1</sup>, Fabien Rech <sup>1,2</sup>, Yann Bailly <sup>1</sup>, Athénaïs Vaginay <sup>1,3</sup> ,  
Malika Smaïl-Tabbone <sup>3</sup>, Hélène Dubois-Pot-Schneider <sup>1,†</sup>  and Hélène Dumond <sup>1,\*,†</sup> 

- <sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France; alex.hirtz@univ-lorraine.fr (A.H.); nolwenn.lebourdais@univ-lorraine.fr (N.L.); fabien.rech@univ-lorraine.fr (F.R.); yann.bailly@univ-lorraine.fr (Y.B.); athenais.vaginay@loria.fr (A.V.); helene.dubois-pot-schneider@univ-lorraine.fr (H.D.-P.-S.)
- <sup>2</sup> Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Service de Neurochirurgie, F-54000 Nancy, France
- <sup>3</sup> Université de Lorraine, CNRS, Inria, LORIA, F-54000 Nancy, France; malika.smail@loria.fr
- \* Correspondence: helene.dumond@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372746115
- † Hélène Dubois-Pot-Schneider and Hélène Dumond co-supervised this work.

**Abstract:** Glioblastoma (GBM) is the most common brain tumor in adults, which is very aggressive, with a very poor prognosis that affects men twice as much as women, suggesting that female hormones (estrogen) play a protective role. With an *in silico* approach, we highlighted that the expression of the membrane G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) had an impact on GBM female patient survival. In this context, we explored for the first time the role of the GPER agonist G-1 on GBM cell proliferation. Our results suggested that G-1 exposure had a cytostatic effect, leading to reversible G2/M arrest, due to tubulin polymerization blockade during mitosis. However, the observed effect was independent of GPER. Interestingly, G-1 potentiated the efficacy of temozolomide, the current standard chemotherapy treatment, since the combination of both treatments led to prolonged mitotic arrest, even in a temozolomide less-sensitive cell line. In conclusion, our results suggested that G-1, in combination with standard chemotherapy, might be a promising way to limit the progression and aggressiveness of GBM.

**Keywords:** glioblastoma; GPER agonist; G-1; microtubule-targeting agent; microtubule dynamics; proliferation; temozolomide



**Citation:** Hirtz, A.; Lebourdais, N.; Rech, F.; Bailly, Y.; Vaginay, A.; Smaïl-Tabbone, M.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Dumond, H. GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation. *Cells* **2021**, *10*, 3438. <https://doi.org/10.3390/cells10123438>

Academic Editors: Antonella Arcella and Markus Siegelin

Received: 14 October 2021  
Accepted: 3 December 2021  
Published: 7 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Gliomas are one of the most common groups of primary brain tumors of the central nervous system (CNS) in adults. Their classification is based on a combination of histological and molecular features for prognostic purposes [1]. The grades range from 1 to 4: grade 4 designating glioblastoma (GBM), IDH-wildtype, which are fast-growing tumors with anaplastic foci [2].

Their incidence, constantly increasing, is estimated at 6/10<sup>5</sup>. The standard treatment for patients with primary GBM is an as wide as possible surgical resection followed by concomitant radiochemotherapy followed by maintenance chemotherapy by temozolomide for 6–12 months and when possible, addition of tumor-treating field during maintenance chemotherapy [3–5]. Despite extensive treatment, most tumor recurrences occur within a few months in the excision margins of the irradiated volume, and lead to death within 21 months after diagnosis [4]. The 5-year survival rate is less than 5% [6].

Although little is known about GBM etiology, numerous sources indicate that women are 50% less likely to develop a GBM than men and respond better to standard treatment [7,8]. Thus, the circulating estrogens produced by the gonads or those synthesized locally in the brain could play a protective role against gliomagenesis [9]. This hypothesis is supported by observations linking exogenous hormone intake to a statistical increase

in survival [7,10]. In addition, several preclinical studies confirmed this protective role of estradiol in female rodents but not in males, suggesting a differential expression and/or signaling mechanisms through estrogen nuclear receptor (nER), ER $\alpha$  (encoded by the ESR1 gene) or ER $\beta$  (encoded by ESR2), or the membrane receptor GPER (G-protein-coupled estrogen receptor 1) between sexes.

GPER expression has been widely detected in normal rat brain [11–15]. In human brain, GPER distribution appeared similar in both sexes but remains to be determined in detail. Several studies indicated that GPER was functional in neurons might oppose the development of neurodegenerative disorder (for review, see [16]). GPER regulated autophagy in astrocytes [17], alleviated inflammation in microglia and stabilized the blood–brain barrier to ensure neuroprotection after ischemia [18,19]. However, no data have been published so far about a potential role for GPER expression and/or activity in brain tumors.

GPER is a 7 transmembrane domain protein, located mainly at the plasma membrane when N-terminal glycosylated and correctly folded and/or in the endoplasmic reticulum membrane [20]. Ligand stimulation of GPER led to a conformational change of the receptor, allowing a direct interaction between GPER and heterotrimeric G $\alpha$ s proteins and subsequent activation of various non-genomic signaling pathways [21–24]. Recent immuno-histological studies indicated that the non-glycosylated P16L variant of this receptor could also be found into the nucleus where it bound gene promoters as a nuclear transcription factor-like molecule [25,26].

Benefits against GBM aggressiveness were reported for estrogenic compounds, such as 2-methoxyestradiol, which might be produced locally into the brain and with high affinity for GPER [27–31]. The already well-known nER antagonist tamoxifen that acted as GPER agonist was tested alone or in combination with standard chemotherapy to treat GBM [32–34]. Therefore, the GPER-selective agonist G-1 (CAS No. 881639-98-1) or antagonists G15 (CAS No. 1161002-05-6) and G36 (CAS No. 1392487-51-2, which displayed an improved nER counter selectivity) could be regarded as compounds of interest to modulate GBM cell growth and invasiveness [35–37]. It is important to note that, while the anti-cancer effects of G-1 have been demonstrated as GPER-dependent in many solid tumors, GPER-selective activation by G-1 was also often hinted but remained to be formally and experimentally substantiated in many cases.

In this study, we first highlighted the beneficial effect of a high GPER expression for overall survival, especially for female patients. We showed that GPER was expressed in male and female GBM cell lines and localized mainly in the cytoplasm and at the plasma membrane. We explored GPER agonist G-1 effects on cell proliferation. G-1 exposure triggered a transient proliferation arrest, due to G2/M blockade through aberrant microtubules dynamics, even independently of GPER. A combination of G-1 and TMZ treatments led to a prolonged mitotic arrest. Our data suggested that G-1 could be a promising therapeutic compound in GBM that potentiated standard treatments to counteract growth and aggressiveness.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Culture and Treatment

LN229 (CRL-2611) and U251 cells lines were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), respectively. LN229 and U251 cells stably expressing eGFP were obtained in the CRAN laboratory following lentiviral infection. All cell lines were routinely cultured in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), phenol red-free (Gibco) supplemented with 10% decomplemented FBS, 1% essential amino acids (Sigma-Aldrich), 0.5% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), 0.4% vitamins (Sigma-Aldrich), 1.25% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) and 1% streptomycin/penicillin (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For each experiment, the cells were trypsinized, counted with Thoma cell counting chamber, seeded, and grown for 24 h. Then, the cells were deprived from steroid hormones for 24 h in 10% charcoal-stripped FBS medium. Thereafter, the cells

were treated as indicated in the figure legends. G-1, G15 and G36 were purchased from Tocris-BioTechne (Noyal Chatillon sur Seiche, France). Temozolomide and colchicine were purchased from Sigma-Aldrich.

### 2.2. MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) Assay

Briefly, 500 cells were seeded per well and cultured in 96-well plate in the standard growth medium. After 24 h, the cells were cultured in charcoal-stripped-depleted FBS medium and further exposed for 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h or 192 h to DMSO 0.01% as a vehicle control, G-1 or TMZ. Thereafter, 50  $\mu$ L of MTT solution (2.5 mg/mL in PBS) was added to each well for 3 h in the dark at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 3 h, the medium was replaced by pure DMSO in each well. The absorbance representing cellular metabolic activity was measured at 540 nm with a spectrophotometer (Multiskan Ascent—Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA).

### 2.3. Colony Formation Assay

Cells were seeded at a density of 500 cells per well in 6-well plates and grown for 48 h in standard medium. The culture medium was then replaced with charcoal-stripped FBS-containing medium for 24 h. Then, cells were treated with DMSO 0.01% or 1  $\mu$ M G-1 for 72 h, followed by 72 h without G-1 treatment to assess the impact of G-1 on colony growth. The colonies formed were subjected to a 10 min fixation in 4% paraformaldehyde and a 30 min staining in 0.1% crystal violet. After removing the staining solution, the colonies were air-dried. The clones of at least 300  $\mu$ m diameter were counted automatically with the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>, accessed on 10 May 2021).

### 2.4. Flow Cytometry

Cells grown in charcoal-stripped FBS-containing medium for 24 h were treated with DMSO 0.01% as vehicle control or 1  $\mu$ M G-1 for 24 h, 48 h, 72 h and 144 h. After centrifugation, the cell pellets were resuspended in phosphate-buffer saline and fixed in 70% cold ethanol overnight at 4 °C. Cells were stained with propidium iodide for 10 min. Cell cycle distribution was analyzed by estimated stained DNA content and analyzed using the Cytoflex (Beckman Coulter, Villepinte, France).

### 2.5. Immunofluorescence

Cells were grown and treated on coverslips, then fixed with a 4% paraformaldehyde Phosphate Buffer Saline solution and incubated with GPER (Santa Cruz, CA, USA; sc-48525),  $\beta$ -tubulin (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; 21285S) primary antibodies (1:100 dilution) followed by incubation with Alexa 555 anti-rabbit antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; A21429) (1:1000 dilution) as previously described [38] or with phalloidin-i-Fluor 488 reagent (Abcam, Cambridge, UK; Ab176753). Finally, the cells were incubated with 1  $\mu$ g/mL Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Images were obtained with an ImageXpress (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) microconfocal imager.

### 2.6. Western Blot Analysis

Western blot analyses were performed as previously described [38]. Briefly, the cells were collected and lysed in RIPA Buffer containing protease and phosphatase inhibitors. After addition of 2  $\times$  Laemmli (*v/v*), the total protein extracts were separated on 12% SDS-PAGE and transferred to 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 3% BSA in 0.1% Tween 50 mM TBS and then incubated with GPER (Santa Cruz sc-48525) or  $\beta$ -actin (Cell Signaling 4970S) primary antibodies (1:1000 dilution) overnight at 4 °C, followed by incubation with HRP-coupled anti-rabbit (Cell signaling 7074S) secondary antibody (1:10,000). Luminescence was measured with LAS-3000 Imaging System (Fuji).

### 2.7. Detection of Monomeric and Polymeric Tubulin

Monomeric tubulin was extracted from the cells with microtubule-stabilizing buffer (MSB) containing 0.5% (*v/v*) Triton X-100 for 3 min. The monomeric extract was then removed and diluted in 4× Laemmli (*v/v*). The remaining cytoskeleton was treated with MSB/Laemmli buffer for 5 min to extract the polymeric tubulin fraction. All extracts were subjected to Western blotting to detect  $\beta$ -tubulin [39].

### 2.8. Time-Lapse Video Microscopy Imaging

Time-lapse video microscopies were performed with ImageXpress (Molecular Devices) microconfocal Imager. LN229 or U251 cells stably expressing eGFP were allowed to attach for 24 h in 24-well glass plates in standard medium, then starved in 10% charcoal-stripped FBS-containing medium for further 24 h. Cells were treated with 1  $\mu$ M G-1 or DMSO 0.01% as vehicle control followed by time-lapse microscopy imaging every 2 h for a total of 72 h. During the experiments, cells were maintained in a controlled atmosphere for gas, humidity and temperature.

### 2.9. GBM Patient Cohort and Survival Analysis

Gene expression and patient data from GBM patients were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) using TCGAbiolinks (R package) and further processed with R software (open access available online: <https://cran.r-project.org/>, accessed on 1 November 2021; version 4.0.2). Data from patients presenting primary GBM with wild type IDH and ATRX status and who received both chemotherapy and radiotherapy ( $n = 99$ ) were selected. The normalization was performed using DESeq2 (R package). Boxplots of GPER expression level were generated for female ( $n = 30$ ) and male ( $n = 69$ ). Patients were assigned to a high- or low-GPER expression group using the optimal cut-off value obtained by using the maximally selected rank statistics by the `surv_cutpoint` function of the `survminer` R package. Kaplan–Meier survival curves and the log rank test were used to compare the survival curves (R survival package). Overall Survival (OS) was defined as the time between the date of surgery and date of death or the date of the last follow-up.

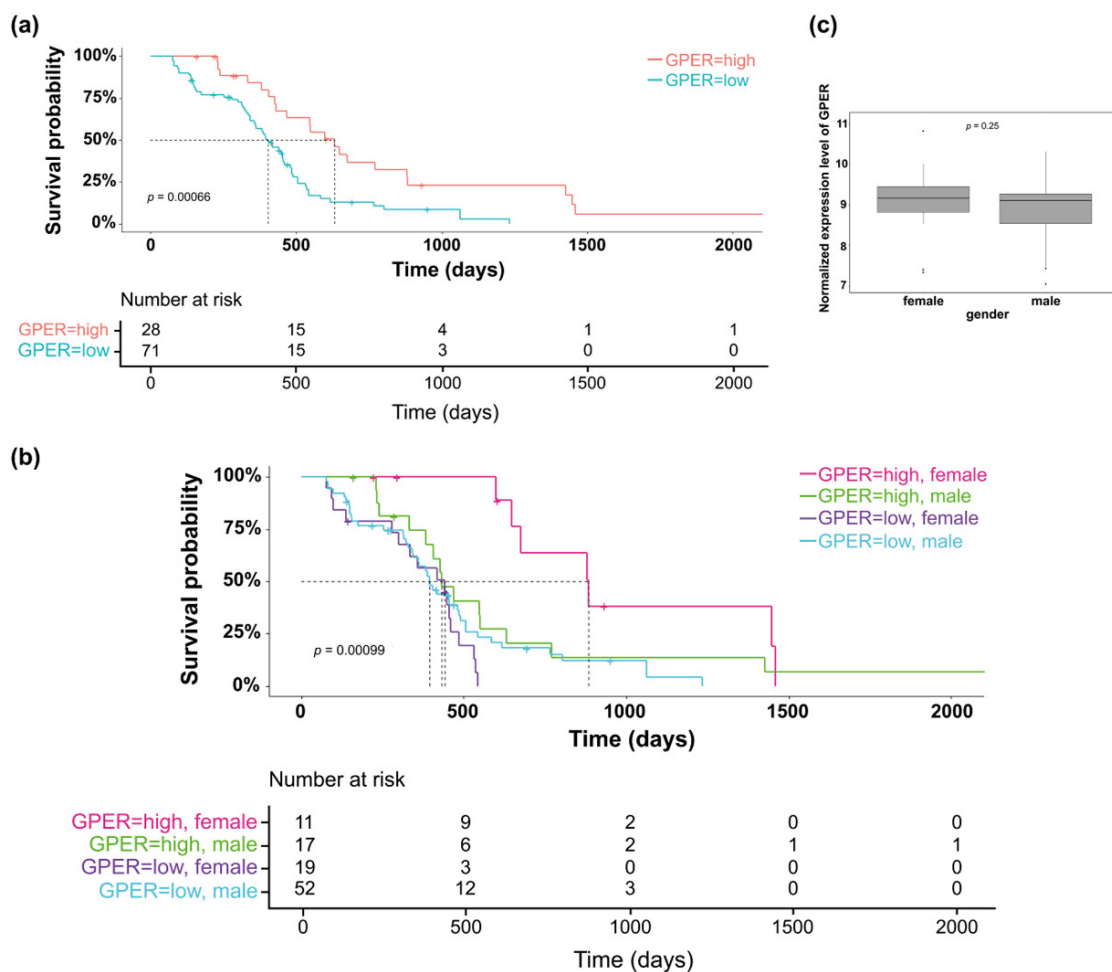
### 2.10. Statistical Analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SD (standard deviation). Statistical significance was evaluated by Student *t*-test for two-by-two comparison or using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. Standard deviations and standard errors were indicated on figures as advocated by Altman and Bland [40]. The number of independent experiments performed was indicated as *n* in each figure legend.

## 3. Results

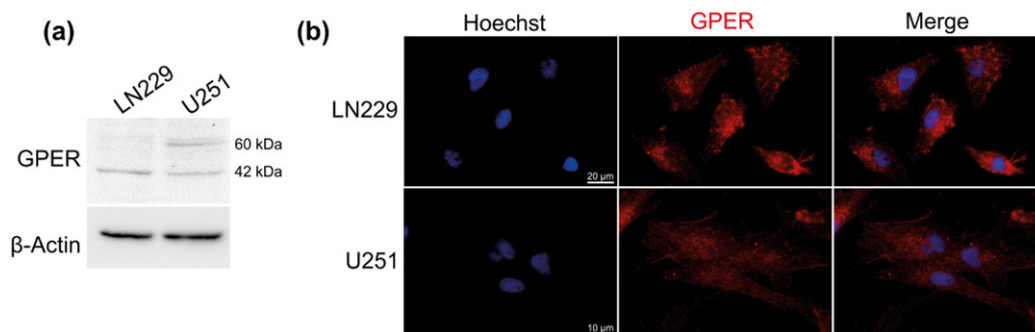
### 3.1. Clinical Relevance of GPER Expression in GBM Tumors

Exploration of the GBM project from TCGA database indicated that GPER expression was predictive of overall survival in patients who underwent radiochemotherapy treatment (Figure 1a), but not in the whole patient population (data not shown). Moreover, high GPER expression was significantly of good prognosis for female GBM patients (Figure 1b). Since this finding was not observed for male patients, this could indicate that GPER was differently expressed between both sexes. However, no difference was observed for GPER expression between males and females suggesting that not only the expression level but also the activity of the GPER receptor could be related to survival and better response to anticancer treatment (Figure 1c).



**Figure 1.** GPER expression in GBM patients. The Kaplan–Meier plots were used to visualize the survival probabilities for the patients diagnosed for a GBM and receiving chemotherapy and radiotherapy ( $n = 99$ ). (a) Kaplan–Meier estimate for all patients (male and female) or (b) according to patient gender. (c) Boxplot showed GPER expression by gender on the 99 patients diagnosed for GBM and receiving chemotherapy and radiotherapy.

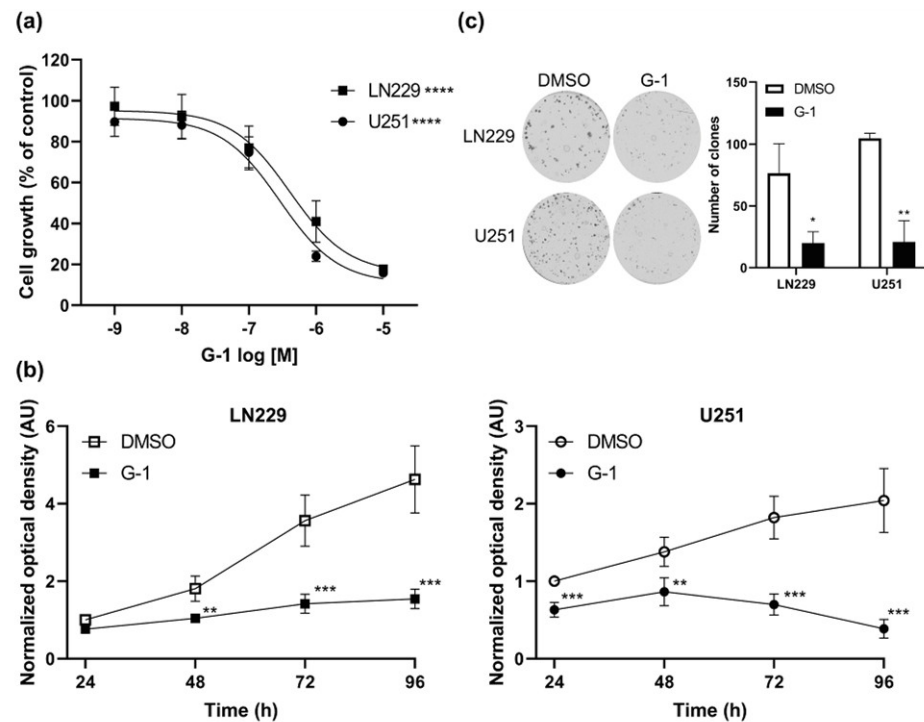
Therefore, GPER protein expression was assessed by Western blot in LN229 female and U251 male GBM cell lines. Both native (42 kDa) and glycosylated (60 kDa) forms of the GPER protein were detected in GBM cells (Figure 2a). As shown in Figure 2b, GPER localized mainly into the cytoplasm as perinuclear heaps in LN229 cells and was also observed at the plasma membrane in U251 cells.



**Figure 2.** GPER protein expression and localization. (a) Representative image of GPER protein expression in LN229 and U251 cells detected by Western blotting.  $n = 4$ . (b) Immunofluorescence staining of LN229 and U251 cells with anti-GPER specific antibody (red). The cell nuclei were stained with Hoechst (blue). Staining was representative of at least three independent experiments.

### 3.2. GPER Agonist G-1 Prevented GBM Cell Proliferation

Since GPER protein is expressed in LN229 and U251 GBM cells, we evaluated the effect of the GPER specific agonist G-1. A 72 h G-1 exposure prevented cell proliferation in a dose–response manner for both cell lines (Figure 3a). Moreover, treatment with 1  $\mu$ M G-1 resulted in growth arrest that became significant after 48 h for LN229 and 24 h for U251 cells (Figure 3b). Colony formation assays confirmed that a 72 h exposure to 1  $\mu$ M G-1 inhibited cell growth compared with DMSO control in both cell lines (Figure 3c).



**Figure 3.** G-1 had cytostatic properties on GBM cells. (a) LN229 and U251 cells were treated with indicated concentrations of G-1 for 72 h, and the number of metabolically active cells was determined using MTT assay.  $n = 4$ . The level of significance was determined using ANOVA with \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$ . (b) LN229 and U251 cells were treated with 1  $\mu$ M G-1 for 24 h, 48 h, 72 h or 96 h and the number of metabolically active cells was measured using MTT assay.  $n = 4$ . (c) Colony formation assay. Representative images of the number and size of LN229 and U251 clones stained with crystal violet and corresponding quantification of clones of at least 300  $\mu$ m diameter.  $n = 3$ . Data are presented as the mean  $\pm$  SD. The level of significance was determined using Student's  $t$ -Test with \*\*\* indicates  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ .

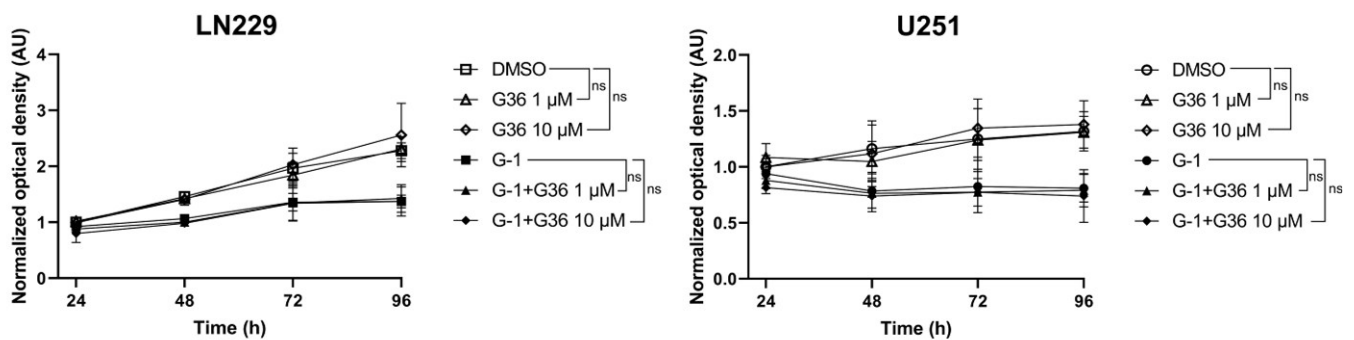
In contrast, G15 or G36 antagonists did not trigger any dose–response or time-dependent effect on GBM cell proliferation compared to DMSO-treated ones (Supplementary Figure S1). Moreover, when cells were pretreated for 24 h with the GPER antagonist G36 and then for 96 h with a combination of 1  $\mu$ M G-1 and 1  $\mu$ M G36 or 1  $\mu$ M G-1 and 10  $\mu$ M G36, the G-1-dependent cytostatic effect was still observed (Figure 4). This strongly suggested that G-1 impact was independent of GPER in GBM cells.

### 3.3. G-1 Exposure Triggered G2/M Cell Cycle Arrest in GBM Cells

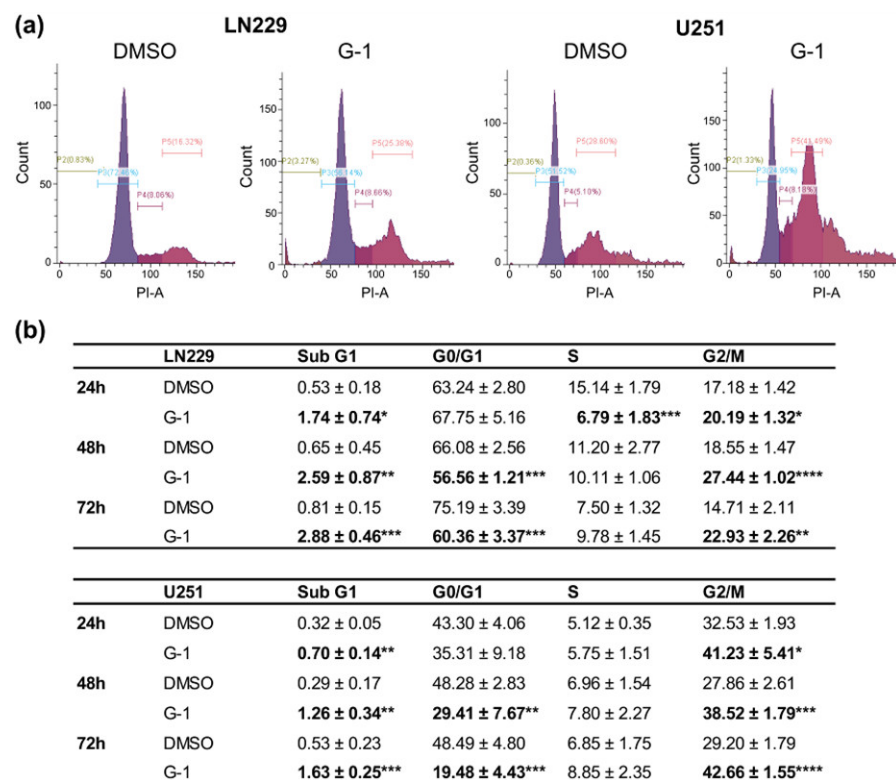
The effect of G-1 on cell cycle progression was further investigated in LN229 and U251 cells (Figure 5a). Flow cytometry analyses revealed that time-dependent G-1 treatment was able to increase subG1 cell population, which nevertheless remained less than 3% for LN229 and less than 2% for U251 (Figure 5b). G-1 treatment was also able to induce a G2/M arrest at the expense of the G0/G1 in both cell lines after a 24 h treatment. This blockage continued until 72 h of treatment, which seemed to prevent cell division (Figure 5b). The increase in p21 protein expression confirmed the cell cycle arrest (Supplementary Figure



S2) even if no variation in cyclin expression was observed, especially cyclin D or cyclin B ones (data not shown).



**Figure 4.** G-1 acted in a GPER-independent manner. LN229 and U251 cells were pretreated for 24 h with 1 μM or 10 μM of the GPER antagonist G36 and then for another 96 h with a combination of 1 μM G-1 and 1 μM G36 or 1 μM G-1 and 10 μM G36. The number of metabolically active cells was determined using MTT assay. *n* = 3. Data are presented as the mean ± SD. The level of significance was determined at 96 h using Student’s *t*-test with ns = non-significant.

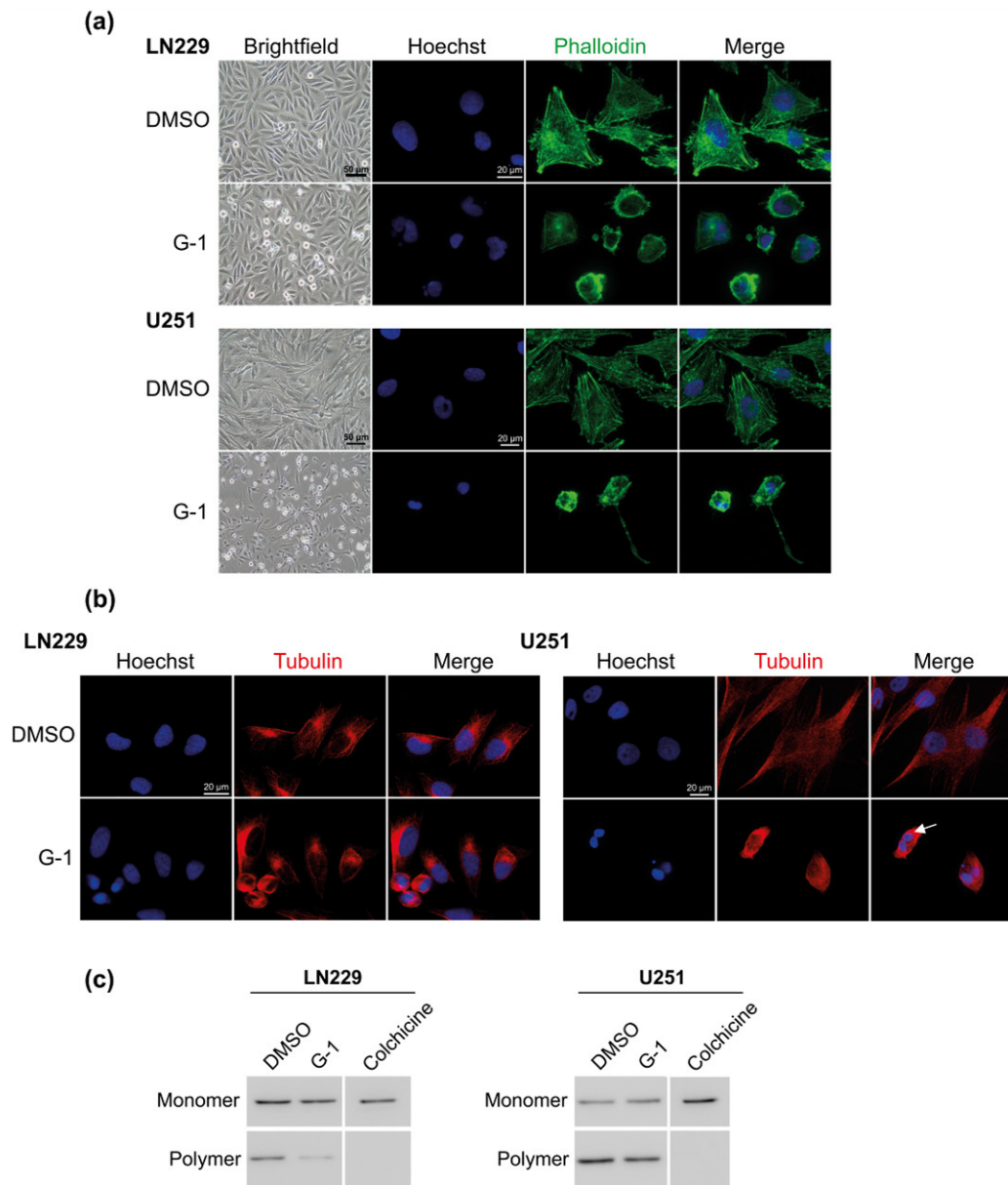


**Figure 5.** G-1 caused cell cycle arrest in G2/M phase. (a) Flow cytometry analyses of the distribution of LN229 or U251 cells in different phases of the cell cycle after 24 h, 48 h and 72 h of treatment with 1 μM of G-1 or DMSO control. Flow cytometry histograms are representative of the 72 h treatment condition. (b) Flow cytometry analysis quantifications are presented as the mean ± SD. *n* = 4. The level of significance was determined using Student’s *t*-test with \*\*\*\* indicates *p* < 0.0001, \*\*\* *p* < 0.001, \*\* *p* < 0.01 and \* *p* < 0.05.

### 3.4. G-1 Induced a Major Reorganization of Cell Cytoskeleton

Concurrently to cell cycle arrest, G-1 triggered a drastic change in cell morphology leading to round but still attached cells (Figure 6a and Supplementary Video S1). Moreover, microtubules immunostained with an anti-β-tubulin antibody appeared shortened and surrounding multiple DNA-rich compartments in round shaped cells after 72 h of treatment, especially in U251 cells (Figure 6b). Measurement of monomeric and polymeric tubulin

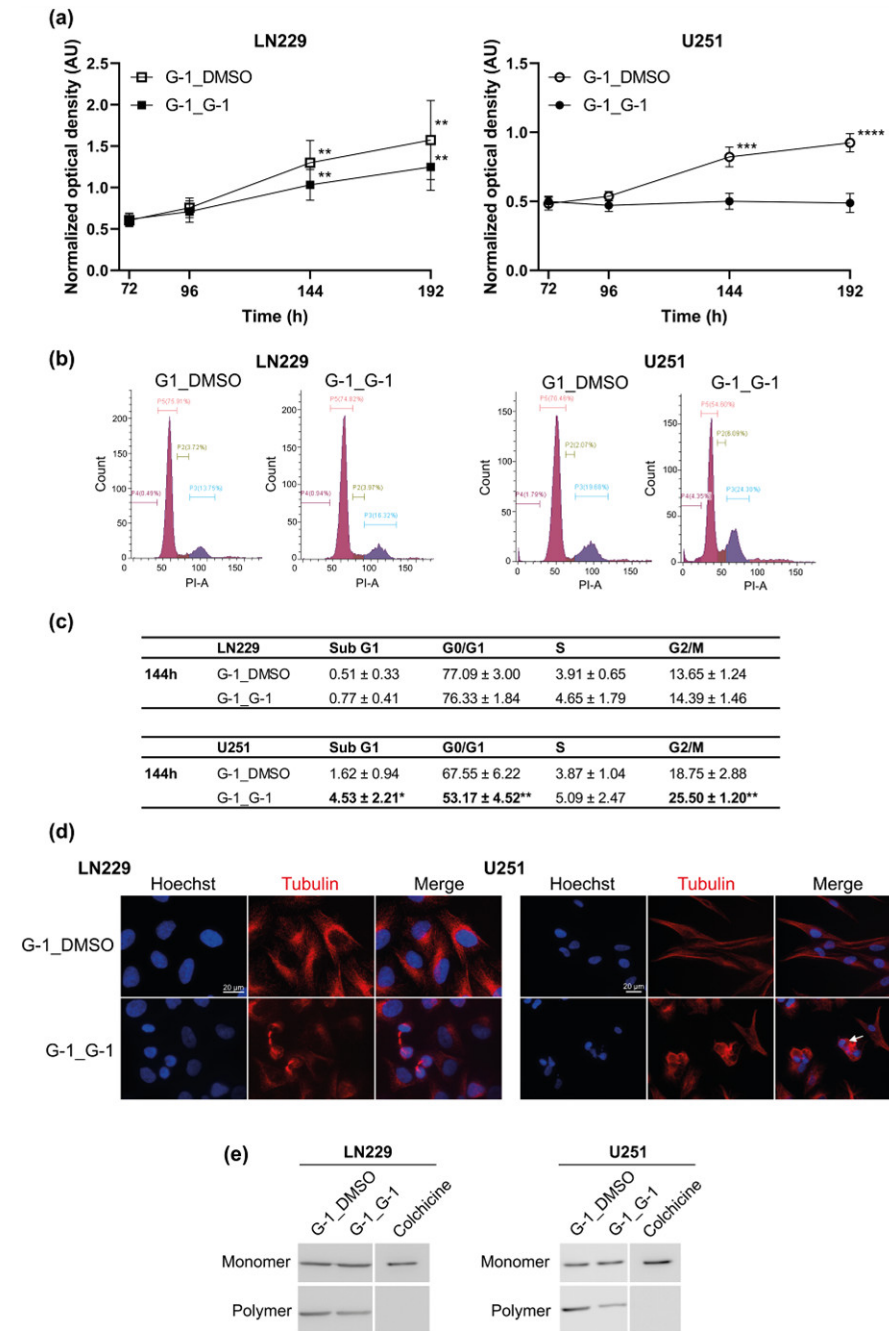
fractions showed that G-1 treatment increased the abundance of  $\beta$ -tubulin monomers and correspondingly decreased  $\beta$ -tubulin polymers for 29% in LN229 and 32% in U251 cells ( $p < 0.05$ ) (Figure 6c). Consequently, G-1 appeared to impact cell cycle and proliferation through altering cytoskeleton and microtubule dynamics.



**Figure 6.** G-1 exposure triggered major changes in cytoskeleton. Representative images of LN229 and U251 cells exposed to DMSO or 1  $\mu$ M G-1 for 72 h observed in (a) brightfield or immunostained with phalloidin (green) or (b) anti- $\beta$ -tubulin antibody (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Arrow indicates multiple DNA content.  $n = 4$ . (c) Western blot detection of monomeric and polymeric  $\beta$ -tubulin in cells treated with 1  $\mu$ M G-1 or DMSO for 72 h. Colchicine (1  $\mu$ M) was used as positive control for monomeric  $\beta$ -tubulin fraction.  $n = 3$ .

To check if G-1 exposure could ultimately lead to cell death as a result of altered microtubule dynamics G-1 treatment was renewed (G-1\_G-1) or replaced by DMSO (G-1\_DMSO) as vehicle for another 120 h. LN229 cells seemed to acquire a G-1 resistance from 144 h of exposure since proliferation resumed, even when G-1 treatment was renewed (Figure 7a–c). MTT assays also indicated that the G-1-dependent cytostatic effect was reversible in both LN229 and U251 cells since G-1\_DMSO treated cells resumed proliferation (Figure 7a). This was confirmed by cytometry since the G2/M cell cycle blockade was no longer observed in

G-1\_DMSO treated cells (Figure 7b,c). During this resumption of proliferation (G-1\_DMSO compared to G-1\_G-1), cell morphology, nuclear DNA content, cytoskeleton distribution and tubulin polymerization returned to untreated cell phenotype (Figure 7d,e), even if cell extensions appeared stretched in U251 cells.

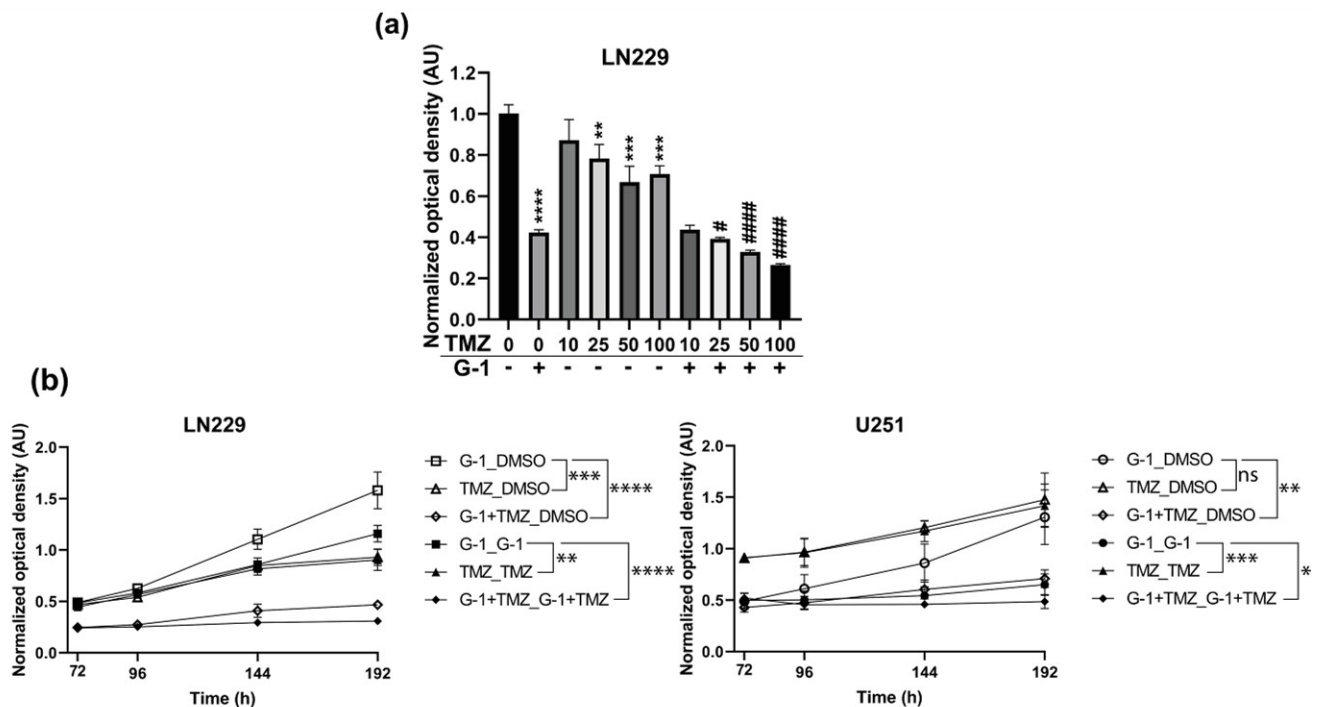


**Figure 7.** G-1 mediated cytostatic effect was reversible. (a) LN229 and U251 cells were treated with 1  $\mu$ M G-1 for 72 h. G-1 treatment was then replaced by DMSO (G-1\_DMSO) as vehicle or renewed (G-1\_G-1) for another 120 h and the number of metabolically active cells was determined using MTT assay.  $n = 4$ . For each treatment, the measured optical density at each time point was normalized and compared to the one of DMSO-treated cells at 72 h for each cell line. (b) Flow cytometry analyses of the distribution of LN229 and U251 cells in different phases of the cell cycle after 144 h of 1  $\mu$ M G-1 or 1  $\mu$ M of G-1 for 72 h followed by 72 h by DMSO (G-1\_DMSO). Flow cytometry histograms are representative of the 144 h treatment condition. (c) Flow cytometry analysis quantifications are presented as the mean  $\pm$  SD.  $n = 5$ . (d) Representative images of LN229 and U251 cells exposed to

1  $\mu\text{M}$  of G-1 for 144 h (G-1\_G-1) or 1  $\mu\text{M}$  of G-1 for 72 h followed by 72 h treatment by DMSO (G-1\_DMSO) and then stained with an anti- $\beta$ -tubulin antibody (red). Nuclei were stained with Hoechst (blue). Arrow indicates multiple DNA content. Staining was representative of at least three independent experiments. (e) Western blot detection of monomeric and polymeric  $\beta$ -tubulin in cells treated with 1  $\mu\text{M}$  G-1\_DMSO or G-1\_G-1 for 72 h. Colchicine (1  $\mu\text{M}$ ) was used as positive control for monomeric  $\beta$ -tubulin fraction.  $n = 3$ . The level of significance was determined using Student's *t*-test with \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ .

### 3.5. Additive Effect of G-1 and TMZ Suppressed Cell Proliferation Resumption

To evaluate the potential benefit of G-1 as an anti-tumor drug in GBM, in combination with the standard TMZ chemotherapy, LN229 and U251 cells were exposed for 72 h to a range of 10  $\mu\text{M}$  to 100  $\mu\text{M}$  TMZ in combination or not with 1  $\mu\text{M}$  G-1. U251 cell growth was not affected by up to 100  $\mu\text{M}$  TMZ (data not shown). LN229 proliferation was reduced by 20–30% by TMZ treatment from 25  $\mu\text{M}$  (Figure 8a). Moreover, the addition of 1  $\mu\text{M}$  G-1 led to an enhanced inhibition of proliferation compared to either G-1 or TMZ alone.



**Figure 8.** G-1 added to TMZ to prevent cell proliferation. (a) LN229 cells were exposed to 1  $\mu\text{M}$  of G-1 for 72 h with or without a dose-dependent TMZ co-treatment and submitted to MTT assay.  $n = 3$ . The level of significance was determined using ANOVA Dunnett's multiple comparison test comparing each condition to DMSO (\*\*, \*\*\*, \*\*\*\*) or G-1 (#, #####) with \*\*\*\*/##### indicates  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ . (b) LN229 or U251 cells were exposed to DMSO as vehicle or 1  $\mu\text{M}$  of G-1 for 72 h with or without 100  $\mu\text{M}$  TMZ co-treatment. Initial treatment was either renewed for another 120 h (G-1\_G-1; TMZ\_TMZ; G-1+TMZ\_G-1+TMZ) or replaced by DMSO (G-1\_DMSO; TMZ\_DMSO; G-1+TMZ\_DMSO) and cells were submitted to MTT assay. For each time point, the measured optical density was normalized by the one of DMSO-treated cells at 72 h.  $n = 4$ . The results are presented as the mean  $\pm$  SD. The level of significance was determined using Student's *t*-test with \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ , ns = non-significant.

The impact of a 1  $\mu\text{M}$  G-1 and 100  $\mu\text{M}$  TMZ co-treatment on proliferation resumption was also tested on both LN229 and U251 cells. Cells were exposed to either DMSO as vehicle, G-1, TMZ, or the combination of both for 72 h. Then, treatments were renewed or replaced by DMSO for another 120 h. A prolonged exposure to either G-1 or TMZ failed to stop proliferation of LN229 cells, whereas the combination of both G-1 and TMZ triggered a continuous growth inhibition (Figures 7a and 8b). Proliferation resumed similarly after 72 h when G-1 or TMZ treatments were replaced by DMSO (G-1\_DMSO or TMZ\_DMSO,

respectively), whereas a long-term impairment was observed when both G-1 and TMZ were applied during the first 72 h and then replaced by DMSO (G-1+TMZ\_DMSO) (Figure 8b). Taken together, those data strongly suggested that TMZ and G-1 could display additive dose- and time-dependent effects on GBM cell proliferation.

U251 cells were not sensitive to a range of TMZ concentrations up to 100  $\mu$ M, even after 192 h of exposure (TMZ\_TMZ, Figure 8b). However, a 192 h G-1 treatment, alone (G-1\_G-1) or in combination with TMZ (G-1+TMZ\_G-1+TMZ), led to a prolonged proliferation arrest (Figures 7a and 8b). Notably, while cell proliferation resumed when G-1 treatment was replaced by DMSO (G-1\_DMSO), long-term proliferation impairment up to 192 h was obtained after a 72 h G-1+TMZ co-treatment, then replaced by DMSO (G-1+TMZ\_DMSO, Figure 8b). Therefore, G-1 appeared to potentiate TMZ chemotherapeutic properties to counteract proliferation of TMZ-resistant GBM cells.

#### 4. Discussion

G-1 exposure and/or GPER signaling impacted the progression of various hormone-responsive tumors such as ovarian [41–43], endometrial [44,45], breast [46] and testicular germ cell tumors. In breast, GPER expression and localization were important factors in tumor progression. In normal breast tissue, triple-negative or high histological grade breast tumors, Samartzis and colleagues [25] detected GPER into the nucleus whereas the level of cytoplasmic (but not nuclear) GPER protein was associated with better overall survival in luminal tumors [47,48]. GPER was known to initiate non-genomic estrogen signaling when localized into the plasma or the endoplasmic reticulum membrane whereas it directly bound gene promoters and modulated transcription into the nucleus [26]. These localization profiles suggested that when a high amount of GPER receptor was able to be activated by estrogens, as in luminal breast tumors, and to trigger non-genomic signaling in the cytoplasm, its activity could contribute to alleviate tumor progression or improve response to anti-cancer treatment.

In the present study, we described for the first time the expression of GPER protein in GBM cell lines and explored its localization. Protein analyses in U251 and LN229 indicated that GPER was expressed in both native (42 kDa) and glycosylated (60 kDa) forms with a greater amount of the latter observed in U251 cells [49,50]. This difference between both cell lines correlated with differential subcellular localization: GPER was mainly cytoplasmic in LN229 but both cytoplasmic and associated with the plasma membrane in U251. Valdivia and coworkers [50] showed that the N-terminal domain residue Asn44 was critical for a mature and functional GPER protein in the plasma membrane. This suggested that the receptor might perform differential functionalities in U251 or in LN229 GBM cells.

In silico analysis of GPER expression across TCGA samples indicated that GBM are one of the tumors that expressed the most GPER mRNA (UALCAN database, [51]). Thus, GPER-dependent signaling could appear favorable since TCGA-GBM data also indicated that a high GPER expression level could be of better prognosis for female (but not male) GBM patients treated with radio-chemotherapy.

U251 and LN229 GBM cells derived from a male or a female tumor, respectively, were exposed to G-1, a synthetic agonist initially selected to specifically trigger GPER activity. G-1 treatment stopped cell proliferation by triggering a G2/M arrest combined to impaired microtubule dynamics in both cell lines, but with slight differences in sensitivity and duration of treatment impact. However, no drastic increase in apoptotic cell number was observed. Cells appeared round shaped and multi-nucleated-like, although not displaying a senescent phenotype (data not shown), which was already observed following 0.25 to 2  $\mu$ M G-1 in vitro exposure, and often confirmed in vivo by a decrease in xenografted tumor growth, in several solid tumors [41,49,52–54]. In breast cancer cells, GPER activation gave conflicting results depending on the relative expression level of nER isoforms, EGFR and GPER itself (see [55] for review). In seminoma and embryonal carcinoma, G-1, 17 $\beta$ -estradiol or xenoestrogen-dependent GPER activity were conversely shown to stimulate cell proliferation in combination with the ER $\alpha$ 36 variant [56,57]. GPER even exhibited

ligand-independent activity *in vitro*, depending on its expression level [58]. Therefore, the consequences of the modulation of not only the activity but also the expression of GPER, in combination with other steroid receptor isoforms should be carefully assessed in GBM.

In GBM cells, GPER antagonist G15 or G36 did neither modulate proliferation nor counteract G-1-dependent proliferation arrest, suggesting that observed effects of G-1 on cell phenotype are independent of GPER. The differential response observed between LN229 and U251 cells in terms of intensity and duration of proliferation blockade did not rely on GPER expression, localization or functionality but rather on growth rate, since LN229 doubling time was 1.7-fold higher than U251 in FBS-depleted medium. Therefore, LN229 cells might escape growth arrest earlier than U251. Sixto-Lopez and colleagues [59] also failed to detect any cytotoxicity or proliferative modulation of new GPER antagonists in 2D or 3D GBM stem cell cultures. As assessed by GPER antagonist treatments or GPER targeting siRNA transfection, G-1 effects were also described as GPER-independent in pancreatic ductal adenocarcinoma [52], adrenocortical carcinoma [54] and vascular smooth muscle cells [39], whereas the question is still debated in ovarian [41,49] or breast cancer cells (see [60] for review). A recent study in several eukaryotic systems *ex vivo* and *in vitro* in the presence or absence of GPER even stated that neither G-1 nor E2 stimulated its activity [58]. Therefore, G-1, initially designed as a GPER-selective agonist is increasingly described as triggering not only GPER-dependent but also GPER-independent activities.

In most studies, G-1-dependent cancer cell growth inhibition seemed to originate in a failure of tubulin dynamics [39,41,61]. Using a competitive binding assay, Lv and colleagues [61] demonstrated that G-1 bound the colchicine site of tubulin monomers and led to polymerization impairment. In U251 and LN229 cells, we confirmed that G-1 exposure alleviated tubulin polymerization, leading to an increase proportion of monomeric tubulin. Therefore, G-1 might be considered as a new chemotherapeutic drug targeting microtubules.

In a rat model of ischemia/reperfusion, G-1 exposure seemed to improve neuron survival whereas it led to astrocyte apoptosis [16,62]. The toxicity of G-1 toward healthy glial cells surrounding the GBM tumor remains to be tested *in vivo*.

In ovarian or Leydig cancer cells, G-1 enhanced apoptosis and cell death due to impaired mitotic spindle or multiple spindle aster formation. However, no significant increase in GBM cell death was detected in the present study after G-1 treatment. Unexpectedly, real-time recording of cell proliferation and MTT assays rather indicated that the G-1 blockade of cell proliferation as well as alterations of cell morphology and cytoskeleton were reversible after G-1 treatment was removed. Recent studies highlighted the sensitivity of GBM cells to microtubule-targeting agents and the crucial involvement of cytoskeleton dynamics in mediating TMZ resistance [63,64]. Our data indicated that U251 but not LN229 cells were resistant to moderate dosage of the standard chemotherapeutic agent TMZ. Addition of G-1 to TMZ-treated LN229 cells potentiated TMZ's effect. Interestingly, the combination of both treatments also led to long term growth arrest duration after compound removal even in the TMZ-resistant U251 cells. Our data supported previous observations suggesting that combination of microtubule-targeting agents, such as G-1 with TMZ, could be a promising therapeutic strategy. Indeed, Xu and coworkers demonstrated the synergic antitumor effect of the combination of Taxol and TMZ on U87 cells [65]. However, Taxol, like many microtubule-targeting drugs, did not cross the blood–brain barrier [66]. Even if the chemical structure of G-1 led us to believe that it could cross the blood–brain barrier, this point needs to be addressed experimentally.

Recently, preclinical studies reported the therapeutic benefit of G-1 treatment on obesity and diabetes in rodents [67]. The therapeutic form of G-1, Tespria™ (Patent Number: US 10,471,047 B2), is currently challenged for treating metabolic disorders in humans. In the future, G-1 should also be re-purposed as an anti-tubulin agent in rodent pre-clinical models of GBM that could act independently of GPER to block cell proliferation. Thereafter, G-1 could be validated as a promising drug to improve GBM treatment efficacy

in combination with standard chemotherapy, especially for patients with recurrent GBM and/or TMZ-resistant tumors.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10123438/s1>, Figure S1: G15 or G36 GPER antagonists had no effect on GBM cell proliferation. Figure S2: G-1 increased p21 protein expression. Video S1: G-1 altered GBM cell morphology as assessed by time-lapse video microscopy.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.D.-P.-S. and H.D.; methodology, A.V., M.S.-T., H.D.-P.-S. and H.D.; validation, H.D.-P.-S., H.D. and A.H.; investigation, A.H., Y.B., A.V. and N.L.; resources, A.V. and H.D.-P.-S.; writing—original draft preparation, A.H., H.D.-P.-S. and H.D.; writing—review and editing, A.H., H.D. and H.D.-P.-S.; supervision, H.D.-P.-S. and H.D.; project administration, F.R., H.D.-P.-S. and H.D.; funding acquisition, F.R., H.D., M.S.-T. and H.D.-P.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was funded by the Cancéropole Grand Est (Pro-Glio project 2020; Fabien Rech as principal Investigator), the University of Lorraine (ML-Brain project 2019–2020; Héléne Dubois-Pot-Schneider as principal investigator). Alex Hirtz is the recipient of a PhD fellowship from the University of Lorraine.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The results published here are based upon data generated by the TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>. Data from TCGA-GBM dataset are available at <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-GBM>.

**Acknowledgments:** We thank Alicia Chateau for her great technical assistance for cell culture and time-lapse microscopy.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–820. [[CrossRef](#)]
- Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-oncology* **2021**, *23*, 1231–1251. [[CrossRef](#)]
- Stupp, R.; Weller, M.; Belanger, K.; Bogdahn, U.; Ludwin, S.K.; Lacombe, D.; Mirimanoff, R.O. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Stupp, R.; Taillibert, S.; Kanner, A.; Read, W.; Steinberg, D.M.; Lhermitte, B.; Toms, S.; Idbaih, A.; Ahluwalia, M.S.; Fink, K.; et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **2017**, *318*, 2306. [[CrossRef](#)]
- Fernandes, C.; Costa, A.; Osório, L.; Lago, R.C.; Linhares, P. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In *Glioblastoma*; De Vleeschouwer, S., Ed.; Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Codon Publications: Leuven, Belgium, 2017; pp. 197–241. ISBN 978-0-9944381-2-6.
- Bauchet, L.; Mathieu-Daudé, H.; Fabbro-Peray, P.; Rigau, V.; Fabbro, M.; Chinot, O.; Pallusseau, L.; Carnin, C.; Lainé, K.; Schlama, A.; et al. Oncological Patterns of Care and Outcome for 952 Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma in 2004. *Neuro-oncology* **2010**, *12*, 725–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baldi, I.; Gruber, A.; Alioum, A.; Berteaud, E.; Lebailly, P.; Huchet, A.; Tourdias, T.; Kantor, G.; Maire, J.P.; Vital, A.; et al. Descriptive Epidemiology of CNS Tumors in France: Results from the Gironde Registry for the Period 2000–2007. *Neuro-oncology* **2011**, *13*, 1370–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kfoury, N.; Sun, T.; Yu, K.; Rockwell, N.; Tinkum, K.L.; Qi, Z.; Warrington, N.M.; McDonald, P.; Roy, A.; Weir, S.J.; et al. Cooperative P16 and P21 Action Protects Female Astrocytes from Transformation. *Acta Neuropathol. Commun.* **2018**, *6*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hirtz, A.; Rech, F.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Dumond, H. Astrocytoma: A Hormone-Sensitive Tumor? *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Fulop, J.; Liu, M.; Blanda, R.; Kromer, C.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro-oncology* **2015**, *17*, iv1–iv62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Toran-Allerand, C.D.; Guan, X.; MacLusky, N.J.; Horvath, T.L.; Diano, S.; Singh, M.; Connolly, E.S.; Nethrapalli, I.S.; Tinnikov, A.A. ER-X: A Novel, Plasma Membrane-Associated, Putative Estrogen Receptor That Is Regulated during Development and after Ischemic Brain Injury. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 8391–8401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Toran-Allerand, C.D.; Tinnikov, A.A.; Singh, R.J.; Nethrapalli, I.S. 17 $\alpha$ -Estradiol: A Brain-Active Estrogen? *Endocrinology* **2005**, *146*, 3843–3850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Brailoiu, E.; Dun, S.L.; Brailoiu, G.C.; Mizuo, K.; Sklar, L.A.; Oprea, T.I.; Prossnitz, E.R.; Dun, N.J. Distribution and Characterization of Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 in the Rat Central Nervous System. *J. Endocrinol.* **2007**, *193*, 311–321. [[CrossRef](#)]
14. Almey, A.; Milner, T.A.; Brake, W.G. Estrogen Receptors in the Central Nervous System and Their Implication for Dopamine-Dependent Cognition in Females. *Horm. Behav.* **2015**, *74*, 125–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kim, J.; Szinte, J.S.; Boulware, M.I.; Frick, K.M. 17-Estradiol and Agonism of G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Enhance Hippocampal Memory via Different Cell-Signaling Mechanisms. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 3309–3321. [[CrossRef](#)]
16. Roque, C.; Mendes-Oliveira, J.; Baltazar, G. G Protein-coupled Estrogen Receptor Activates Cell Type-specific Signaling Pathways in Cortical Cultures: Relevance to the Selective Loss of Astrocytes. *J. Neurochem.* **2019**, *149*, 27–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wang, X.; Yue, J.; Hu, L.; Tian, Z.; Zhang, K.; Yang, L.; Zhang, H.; Guo, Y.; Feng, B.; Liu, H.; et al. Activation of G Protein-coupled Receptor 30 Protects Neurons by Regulating Autophagy in Astrocytes. *Glia* **2020**, *68*, 27–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhao, T.; Ding, Q.; Hu, J.; He, S.; Shi, F.; Ma, L. GPER Expressed on Microglia Mediates the Anti-inflammatory Effect of Estradiol in Ischemic Stroke. *Brain Behav.* **2016**, *6*, e00449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zhang, Z.; Qin, P.; Deng, Y.; Ma, Z.; Guo, H.; Guo, H.; Hou, Y.; Wang, S.; Zou, W.; Sun, Y.; et al. The Novel Estrogenic Receptor GPR30 Alleviates Ischemic Injury by Inhibiting TLR4-Mediated Microglial Inflammation. *J. Neuroinflamm.* **2018**, *15*, 206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Barton, M.; Filardo, E.J.; Lolait, S.J.; Thomas, P.; Maggiolini, M.; Prossnitz, E.R. Twenty Years of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER: Historical and Personal Perspectives. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *176*, 4–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Thomas, P.; Pang, Y.; Filardo, E.J.; Dong, J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* **2005**, *146*, 624–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Gonzalez de Valdivia, E.; Broselid, S.; Kahn, R.; Olde, B.; Leeb-Lundberg, L.M.F. G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER1)/GPR30 Increases ERK1/2 Activity through PDZ Motif-Dependent and -Independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 9932–9943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vrtačnik, P.; Ostanek, B.; Mencej-Bedrač, S.; Marc, J. The Many Faces of Estrogen Signaling. *Biochem. Med.* **2014**, *24*, 329–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pupo, M.; Maggiolini, M.; Musti, A.M. GPER Mediates Non-Genomic Effects of Estrogen. In *Estrogen Receptors*; Eyster, K.M., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2016; Volume 1366, pp. 471–488. ISBN 978-1-4939-3126-2.
25. Samartzis, E.P.; Noske, A.; Meisel, A.; Varga, Z.; Fink, D.; Imesch, P. The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e83296. [[CrossRef](#)]
26. Pupo, M.; Bodmer, A.; Berto, M.; Maggiolini, M.; Dietrich, P.-Y.; Picard, D. A Genetic Polymorphism Repurposes the G-Protein Coupled and Membrane-Associated Estrogen Receptor GPER to a Transcription Factor-like Molecule Promoting Paracrine Signaling between Stroma and Breast Carcinoma Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 46728–46744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Li, R.; Shen, Y. Estrogen and Brain: Synthesis, Function and Diseases. *Front Biosci.* **2005**, *10*, 257–267. [[CrossRef](#)]
28. Singh, M.; Dykens, J.A.; Simpkins, J.W. Novel Mechanisms for Estrogen-Induced Neuroprotection. *Exp. Biol. Med.* **2006**, *231*, 514–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Barone, T.A.; Gorski, J.W.; Greenberg, S.J.; Plunkett, R.J. Estrogen Increases Survival in an Orthotopic Model of Glioblastoma. *J. Neurooncol.* **2009**, *95*, 37–48. [[CrossRef](#)]
30. Sareddy, G.R.; Nair, B.C.; Gonugunta, V.K.; Zhang, Q.; Brenner, A.; Brann, D.W.; Tekmal, R.R.; Vadlamudi, R.K. Therapeutic Significance of Estrogen Receptor  $\beta$  Agonists in Gliomas. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 1174–1182. [[CrossRef](#)]
31. Koganti, S.; Snyder, R.; Gumaste, U.; Karamyan, V.T.; Thekkumkara, T. 2-Methoxyestradiol Binding of GPR30 down-Regulates Angiotensin AT1 Receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *723*, 131–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kohli, L.; Kaza, N.; Coric, T.; Byer, S.J.; Brossier, N.M.; Klocke, B.J.; Bjornsti, M.-A.; Carroll, S.L.; Roth, K.A. 4-Hydroxytamoxifen Induces Autophagic Death through K-Ras Degradation. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4395–4405. [[CrossRef](#)]
33. Harmalkar, M.; Upraity, S.; Kazi, S.; Shirsat, N.V. Tamoxifen-Induced Cell Death of Malignant Glioma Cells Is Brought About by Oxidative-Stress-Mediated Alterations in the Expression of BCL2 Family Members and Is Enhanced on MiR-21 Inhibition. *J. Mol. Neurosci.* **2015**, *57*, 197–202. [[CrossRef](#)]
34. Spence, A.M.; Peterson, R.A.; Scharnhorst, J.D.; Silbergeld, D.L.; Rostomily, R.C. Phase II Study of Concurrent Continuous Temozolomide (TMZ) and Tamoxifen (TMX) for Recurrent Malignant Astrocytic Gliomas. *J. Neurooncol.* **2004**, *70*, 91–95. [[CrossRef](#)]
35. Bologa, C.G.; Revankar, C.M.; Young, S.M.; Edwards, B.S.; Arterburn, J.B.; Kiselyov, A.S.; Parker, M.A.; Tkachenko, S.E.; Savchuck, N.P.; Sklar, L.A.; et al. Virtual and Biomolecular Screening Converge on a Selective Agonist for GPR30. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 207–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Dennis, M.K.; Burai, R.; Ramesh, C.; Petrie, W.K.; Alcon, S.N.; Nayak, T.K.; Bologa, C.G.; Leitao, A.; Brailoiu, E.; Deliu, E.; et al. In Vivo Effects of a GPR30 Antagonist. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 421–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



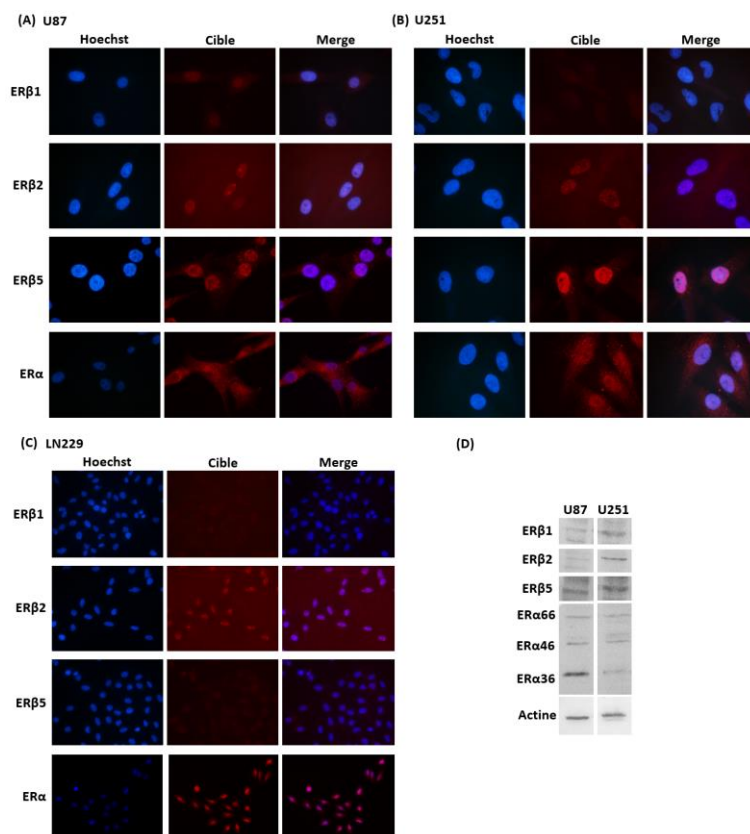
37. Dennis, M.K.; Field, A.S.; Burai, R.; Ramesh, C.; Petrie, W.K.; Bologna, C.G.; Oprea, T.I.; Yamaguchi, Y.; Hayashi, S.-I.; Sklar, L.A.; et al. Identification of a GPER/GPR30 Antagonist with Improved Estrogen Receptor Counterselectivity. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *127*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Thiebaut, C.; Chamard-Jovenin, C.; Chesnel, A.; Morel, C.; Djermoune, E.-H.; Boukhobza, T.; Dumond, H. Mammary Epithelial Cell Phenotype Disruption in Vitro and in Vivo through ERalpha36 Overexpression. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173931. [[CrossRef](#)]
39. Gui, Y.; Shi, Z.; Wang, Z.; Li, J.-J.; Xu, C.; Tian, R.; Song, X.; Walsh, M.P.; Li, D.; Gao, J.; et al. The GPER Agonist G-1 Induces Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells Independent of GPER: G-1 and Smooth Muscle Cell Apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230*, 885–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Altman, D.G.; Bland, J.M. Standard Deviations and Standard Errors. *BMJ* **2005**, *331*, 903. [[CrossRef](#)]
41. Wang, C.; Lv, X.; He, C.; Hua, G.; Tsai, M.-Y.; Davis, J.S. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist G-1 Suppresses Proliferation of Ovarian Cancer Cells by Blocking Tubulin Polymerization. *Cell Death. Dis.* **2013**, *4*, e869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Smith, H.O.; Arias-Pulido, H.; Kuo, D.Y.; Howard, T.; Qualls, C.R.; Lee, S.-J.; Verschraegen, C.F.; Hathaway, H.J.; Joste, N.E.; Prossnitz, E.R. GPR30 Predicts Poor Survival for Ovarian Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2009**, *114*, 465–471. [[CrossRef](#)]
43. Han, N.; Heublein, S.; Jeschke, U.; Kuhn, C.; Hester, A.; Czogalla, B.; Mahner, S.; Rottmann, M.; Mayr, D.; Schmoeckel, E.; et al. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Regulates Trimethylation of Histone H3 at Lysine 4 and Represses Migration and Proliferation of Ovarian Cancer Cells In Vitro. *Cells* **2021**, *10*, 619. [[CrossRef](#)]
44. Filigheddu, N.; Sampietro, S.; Chianale, F.; Porporato, P.E.; Gaggianesi, M.; Gregnanin, I.; Rainero, E.; Ferrara, M.; Perego, B.; Riboni, F.; et al. Diacylglycerol Kinase  $\alpha$  Mediates 17- $\beta$ -Estradiol-Induced Proliferation, Motility, and Anchorage-Independent Growth of Hec-1A Endometrial Cancer Cell Line through the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPR30. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1988–1996. [[CrossRef](#)]
45. Smith, H.O.; Leslie, K.K.; Singh, M.; Qualls, C.R.; Revankar, C.M.; Joste, N.E.; Prossnitz, E.R. GPR30: A Novel Indicator of Poor Survival for Endometrial Carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2007**, *196*, 386.e1–386.e11. [[CrossRef](#)]
46. Ariazi, E.A.; Brailoiu, E.; Yerrum, S.; Shupp, H.A.; Slifker, M.J.; Cunliffe, H.E.; Black, M.A.; Donato, A.L.; Arterburn, J.B.; Oprea, T.I.; et al. The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1184–1194. [[CrossRef](#)]
47. Ignatov, T.; Claus, M.; Nass, N.; Haybaeck, J.; Seifert, B.; Kalinski, T.; Ortmann, O.; Ignatov, A. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER-1 Expression in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Is Associated with Poor Benefit of Tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* **2019**, *174*, 121–127. [[CrossRef](#)]
48. Rouhimoghadam, M.; Lu, A.S.; Salem, A.K.; Filardo, E.J. Therapeutic Perspectives on the Modulation of G-Protein Coupled Estrogen Receptor, GPER, Function. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 591217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Schüler-Toprak, S.; Skrzypczak, M.; Ignatov, T.; Ignatov, A.; Ortmann, O.; Treeck, O. G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER-1) and Agonist G-1 Inhibit Growth of Ovarian Cancer Cells by Activation of Anti-Tumoral Transcriptome Responses: Impact of GPER-1 mRNA on Survival. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **2020**, *146*, 3175–3188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Gonzalez de Valdivia, E.; Sandén, C.; Kahn, R.; Olde, B.; Leeb-Lundberg, L.M.F. Human G Protein-Coupled Receptor 30 Is N-Glycosylated and N-Terminal Domain Asparagine 44 Is Required for Receptor Structure and Activity. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, BSR20182436. [[CrossRef](#)]
51. Chandrashekar, D.S.; Bashel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Ponce-Rodriguez, I.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)]
52. Natale, C.A.; Li, J.; Pitarresi, J.R.; Norgard, R.J.; Dentchev, T.; Capell, B.C.; Seykora, J.T.; Stanger, B.Z.; Ridky, T.W. Pharmacologic Activation of the G Protein-Coupled Estrogen Receptor Inhibits Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2020**, *10*, 868–880.e1. [[CrossRef](#)]
53. Chimento, A. GPER Signaling in Spermatogenesis and Testicular Tumors. *Front. Endocrin.* **2014**, *5*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Chimento, A.; Sirianni, R.; Casaburi, I.; Zolea, F.; Rizza, P.; Avena, P.; Malivindi, R.; De Luca, A.; Campana, C.; Martire, E.; et al. GPER Agonist G-1 Decreases Adrenocortical Carcinoma (ACC) Cell Growth in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2015**, *6*, 19190–19203. [[CrossRef](#)]
55. Hsu, L.-H.; Chu, N.-M.; Lin, Y.-F.; Kao, S.-H. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *IJMS* **2019**, *20*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ajj, H.; Chesnel, A.; Pinel, S.; Plenat, F.; Flament, S.; Dumond, H. An Alkylphenol Mix Promotes Seminoma Derived Cell Proliferation through an ERalpha36-Mediated Mechanism. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61758. [[CrossRef](#)]
57. Chimento, A.; De Luca, A.; Nocito, M.C.; Avena, P.; La Padula, D.; Zavaglia, L.; Pezzi, V. Role of GPER-Mediated Signaling in Testicular Functions and Tumorigenesis. *Cells* **2020**, *9*, 2115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Tutzaer, J.; Gonzalez de Valdivia, E.; Swärd, K.; Alexandrakis Eilard, I.; Broselid, S.; Kahn, R.; Olde, B.; Leeb-Lundberg, L.M.F. Ligand-Independent G Protein-Coupled Estrogen Receptor/G Protein-Coupled Receptor 30 Activity: Lack of Receptor-Dependent Effects of G-1 and 17  $\beta$ -Estradiol. *Mol. Pharm.* **2021**, *100*, 271–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sixto-López, Y.; Marhuenda, E.; García-Vazquez, J.B.; Fragoso-Vazquez, J.; Rosales-Hernández, M.C.; Zacarías-Lara, O.; Méndez-Luna, D.; Gómez-Vidal, J.A.; Cornu, D.; Bakalara, N.; et al. *Targeting Several Biologically Reported Targets of Glioblastoma Multiforme by Assaying 2D and 3D Cultured Cells*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2021.

60. Xu, S.; Yu, S.; Dong, D.; Lee, L.T.O. G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Lv, X.; He, C.; Huang, C.; Hua, G.; Wang, Z.; Remmenga, S.W.; Rodabough, K.J.; Karpf, A.R.; Dong, J.; Davis, J.S.; et al. G-1 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via Targeting Colchicine-Binding Site of Tubulin to Interfere with Microtubule Assembly. *Mol. Cancer.* **2017**, *16*, 1080–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Han, Z.-W.; Chang, Y.-C.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Chen, L.; Zhang, Y.; Si, J.-Q.; Li, L. GPER Agonist G1 Suppresses Neuronal Apoptosis Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Neural. Regen. Res.* **2019**, *14*, 1221. [[CrossRef](#)]
63. Horne, E.A.; Diaz, P.; Cimino, P.J.; Jung, E.; Xu, C.; Hamel, E.; Wagenbach, M.; Kumasaka, D.; Wageling, N.B.; Azorín, D.D.; et al. A Brain-Penetrant Microtubule-Targeting Agent That Disrupts Hallmarks of Glioma Tumorigenesis. *Neuro-Oncol. Adv.* **2021**, *3*, vdaa165. [[CrossRef](#)]
64. Wang, H.; Feng, W.; Lu, Y.; Li, H.; Xiang, W.; Chen, Z.; He, M.; Zhao, L.; Sun, X.; Lei, B.; et al. Expression of Dynein, Cytoplasmic 2, Heavy Chain 1 (DHC2) Associated with Glioblastoma Cell Resistance to Temozolomide. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 28948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Xu, Y.; Shen, M.; Li, Y.; Sun, Y.; Teng, Y.; Wang, Y.; Duan, Y. The Synergic Antitumor Effects of Paclitaxel and Temozolomide Co-Loaded in MPEG-PLGA Nanoparticles on Glioblastoma Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 20890–20901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Fellner, S.; Bauer, B.; Miller, D.S.; Schaffrik, M.; Fankhänel, M.; Spruß, T.; Bernhardt, G.; Graeff, C.; Färber, L.; Gschaidmeier, H.; et al. Transport of Paclitaxel (Taxol) across the Blood-Brain Barrier in Vitro and in Vivo. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 1309–1318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sharma, G.; Hu, C.; Staquicini, D.I.; Brigman, J.L.; Liu, M.; Mauvais-Jarvis, F.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Arterburn, J.B.; Hathaway, H.J.; et al. Preclinical Efficacy of the GPER-Selective Agonist G-1 in Mouse Models of Obesity and Diabetes. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaau5956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## **Résultats complémentaires à l'article 2 : « GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation »**

### **1. Les cellules de GBM expriment les récepteurs aux œstrogènes nucléaires**

Un des objectifs du second article était de décrypter les conséquences au niveau cellulaire de l'activation de GPER dans les cellules de GBM. Pour cela, nous pouvions utiliser deux agonistes de GPER : l'E2, qui est aussi capable d'activer les ER nucléaires ou le G-1, spécifique de GPER. L'E2 étant décrit comme le ligand naturel de GPER, il est celui préférentiellement utilisé dans les modèles cellulaires n'exprimant pas les ER nucléaires. Dans cette optique, nous avons caractérisé l'expression des différents ER nucléaires dans les cellules de GBM pour choisir quel ligand utiliser. Pour cela, nous avons caractérisé l'expression et la localisation des différentes isoformes d'ER $\alpha$  et d'ER $\beta$  par western-blot et immunofluorescence dans les lignées LN229, U251 et U87 (protocole disponible dans l'article 2) (**Figure 31**). La lignée U87 a été cultivée dans le même milieu de culture que celui utilisé pour les deux autres lignées (composition disponible dans le matériel et méthode de l'article 2). Les anticorps utilisés sont les suivants : Actine (Cell Signaling, 4970S), ER $\alpha$  (SantaCruz, sc544), ER $\beta$ 1 (Biorad, MCA1974GA), ER $\beta$ 2 (Biorad, MCA2279GT), ER $\beta$ 5 (Biorad, MCA4676GA).



**Figure 31 : Expression et localisation des récepteurs nucléaires aux œstrogènes dans les lignées de GBM.**

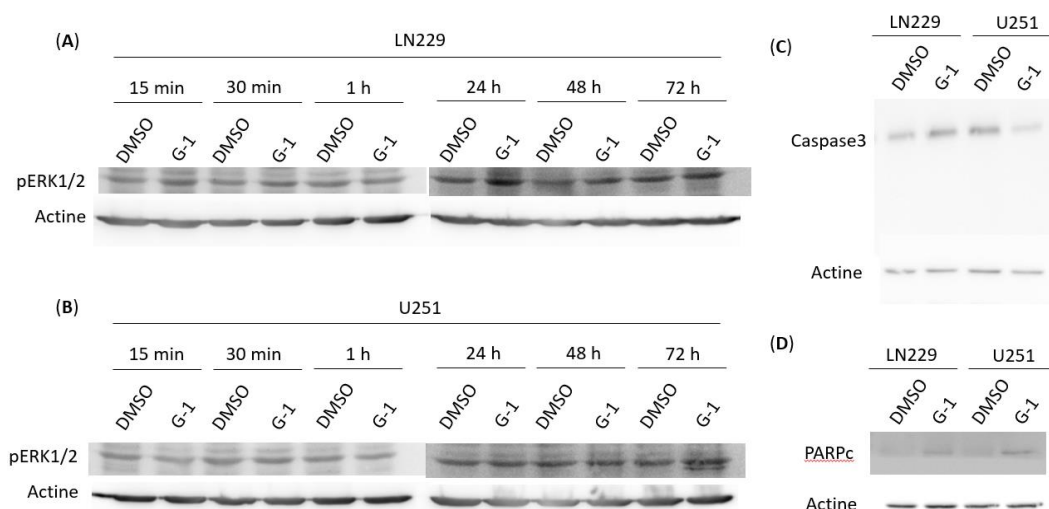
Marquage par immunofluorescence des cellules (A) U87, (B) U251 et (C) LN229 avec des anticorps spécifiques d'ERβ1, ERβ2, ERβ5 et ERα d'après au moins deux réplicats indépendants. (D) Image représentative de l'expression d'ERβ1, ERβ2, ERβ5, ERα66, ERα46 et ERα36 dans les cellules U87 et U251 détectée par western-blot. L'actine a été utilisée comme protéine de référence. n=3.

Ces résultats montrent que les lignées LN229, U251 et U87 expriment tous les isoformes d'ER nucléaires à des taux et des localisations variables. L'isoforme d'ERβ la plus exprimée dans les lignées U87 et U251 semble être ERβ5, ce qui confirme les observations d'une autre étude (Liu et al., 2018). Etant donné que les cellules de GBM expriment les ER nucléaires, nous avons choisi d'utiliser le G-1 pour activer spécifiquement la signalisation dépendante de GPER.

## 2. Le G-1 n'induit pas la mort des cellules de GBM par apoptose

Dans l'article 2, nous avons décrypté les effets du G-1 sur la prolifération cellulaire. Cependant, d'autres études montrent qu'il peut aussi induire la mort des cellules par apoptose. Nous avons donc regardé si le G-1 pouvait aussi induire la mort des cellules de GBM par apoptose en analysant le niveau protéique de marqueurs apoptotiques comme PARPc, la

caspase 3 clivée et pERK1/2 qui est décrit comme étant un marqueur de l'apoptose induite par le G-1 (**Figure 32**) (Qiu et al., 2021; Chimento et al., 2013). Le protocole de western-blot est le même que celui présenté dans l'article 2. Les anticorps utilisés sont les suivants : Actine (Cell Signaling, 4970S), caspase 3 (SantaCruz, sc271028), PARPc (BdBiosciences, 552597), pERK1/2 (Cell Signaling, 4370S).



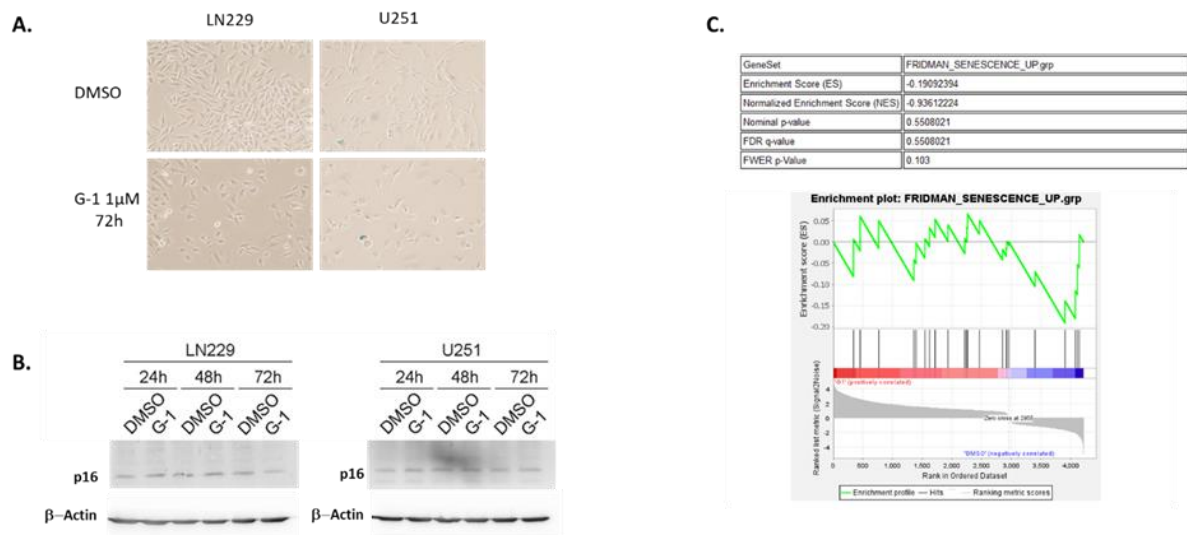
**Figure 32 : Le G-1 ne déclenche pas la mort des cellules de GBM par apoptose.**

Image représentative de l'expression de pERK1/2 dans les lignées (A) LN229 et (B) U251 après exposition à 0,01 % de DMSO ou à 1  $\mu$ M de G-1 à 3 temps courts (de 15 min à 1 h, n=1) et 3 temps longs (de 24 h à 72 h, n=2). Image représentative du niveau protéique de (C) la caspase 3 et de sa forme clivée et (D) de PARPc dans les lignées LN229 et U251 après 72 h d'exposition à 0,01% de DMSO ou à 1  $\mu$ M de G-1, images représentatives de trois réplicats indépendants. L'actine a été utilisée comme protéine de référence dans les différentes conditions.

Dans les lignées LN229 et U251, nous n'observons pas d'augmentation significative de l'expression de PARPc ou de la forme clivée de la caspase 3. De même, l'expression de pERK1/2 ne semble pas varier au cours du temps, même à des temps précoces d'exposition au G-1. Il est tout de même possible que le G-1 provoque une légère augmentation de la mort cellulaire puisque nous observons une augmentation significative du nombre de cellules en phase subG1 de l'ordre de 0,5% à 1,5% après traitement par notre analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux (article 2, figure 5). L'induction de l'apoptose par le G-1 reste donc un mécanisme minoritaire de son activité anticancéreuse.

### 3. Le G-1 ne provoque pas la sénescence des cellules de GBM

Dans nos cellules, le G-1 provoque un arrêt prolongé de la prolifération cellulaire jusqu'à plusieurs jours. Bien que le G-1 n'ait jamais été décrit comme un inducteur de la sénescence, une des caractéristiques de l'entrée des cellules en sénescence est un arrêt de la division à long terme. Les deux marqueurs forts de la sénescence sont une plus forte activité de la  $\beta$ -galactosidase ainsi qu'une plus forte expression de la protéine p16. Pour l'étude de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, une fois les cellules ensemencées et traitées avec 1  $\mu$ M de G-1 pendant 72 h, elles sont fixées avec une solution contenant 0,2% de glutaraldéhyde et 2% de formaldéhyde pendant 5 min puis marquées avec une solution contenant 5 mM de ferricyanure de potassium, 5 mM de ferrocyanure de potassium, 2 mM de  $MgCl_2$ , 150 mM de NaCl, 1 mg/ml de X-gal dilué dans du tampon contenant 20 mM d'acide citrique et 60 mM de phosphate trisodique repris dans de l'eau déminéralisée pendant toute une nuit à l'obscurité à 37 °C. Ainsi, plus l'activité  $\beta$ -galactosidase des cellules est importante, plus son substrat le X-gal est clivé et colore les cellules en bleu. Le niveau d'expression protéique a été évalué par western-blot (protocole disponible dans le matériel et méthode de l'article 2) avec l'anticorps p16 (SantaCruz, sc56330). Afin de confirmer ou non les effets du G-1 sur la sénescence, nous avons aussi comparé la signature moléculaire du G-1 obtenus par notre approche transcriptomique (résultats de l'article 3) avec des signatures caractéristiques de cellules en sénescence (**Figure 33**).



**Figure 33 : Le G-1 n'induit pas la sénescence des cellules de GBM.**

(A) Image représentative de l'activité  $\beta$ -galactosidase des cellules LN229 et U251 après 72 h de traitement avec 0,01% de DMSO ou 1  $\mu$ M de G-1. L'activité  $\beta$ -galactosidase est détectable par l'apparition de cellules bleues résultant du clivage du X-gal par la  $\beta$ -galactosidase. (B) Niveau d'expression protéique de p16 dans les lignées LN229 et U251 après 24 h, 48 h et 72 h d'exposition à 0,01% de DMSO ou à 1  $\mu$ M de G-1, image représentative de trois réplicats indépendants. (C) Exemple de la comparaison de la signature moléculaire du G-1 dans la lignée U251 après 72 h de traitement à 1  $\mu$ M à la signature de gènes surexprimés pendant la sénescence (Fridman\_senescence\_up).

Le traitement au G-1 n'induit pas une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase, l'expression de p21 reste inchangée et la signature moléculaire du G-1 ne montre l'enrichissement d'aucune signature de la sénescence. Ainsi, le G-1 n'induit pas la sénescence des cellules de GBM.

#### 4. Le G-1 réduit la migration des cellules U251 mais pas des cellules LN229

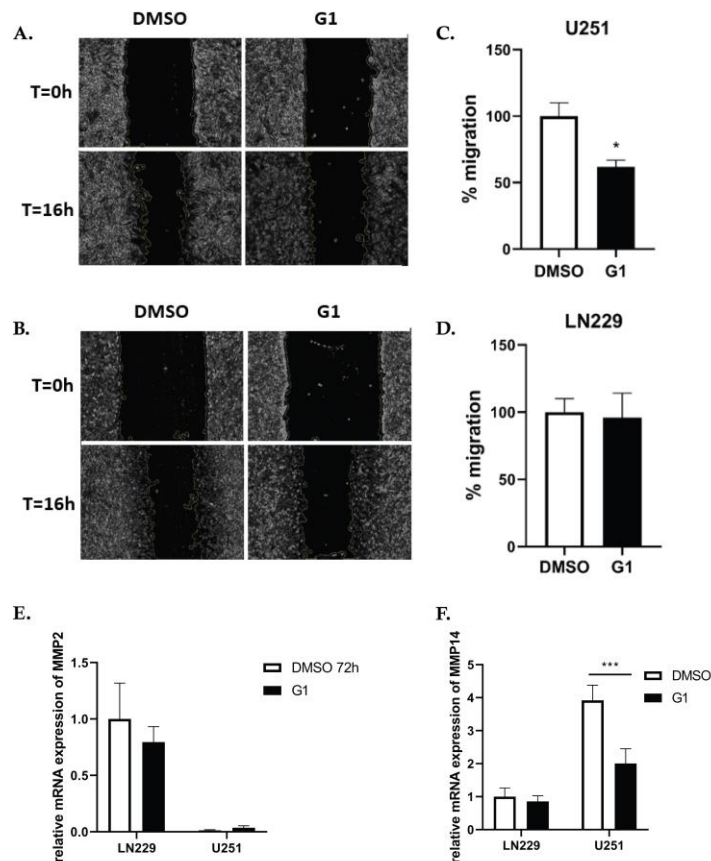
Le G-1 est bien caractérisé pour ses effets antiprolifératifs, mais il peut aussi diminuer la migration cellulaire (Zha et al., 2018). Nous avons donc entrepris d'étudier l'impact du G-1 sur la migration des cellules de GBM U251 et LN229 (Figure 34). Les cellules ont étéensemencées à une concentration de  $2,5 \cdot 10^5$  cellules par puits dans une plaque 6 puits contenant du milieu de culture (composition disponible dans le matériel et méthode de l'article 2). Une fois que les cellules forment un tapis cellulaire homogène, une blessure a été créée à l'aide de l'embout d'une pipette stérile de p200. Les traitements à 0,01% de DMSO et à 1  $\mu$ M de G-1 ont été réalisés au moment de la blessure et les mesures de cicatrisation ont été réalisées 16 h après à

l'aide d'un microscope à lumière transmise (Nikon DIAPHOT 300 équipé d'une caméra numérique Nikon Digital sight-DS-Fi1) au grossissement x40. Le plugin « MRI Wound Healing Tool » d'ImageJ permet de déterminer l'aire de la blessure pour chaque cliché. Le taux de cicatrisation a été calculé comme suit :

$$\frac{\text{Aire } 0 \text{ h} - \text{Aire } 16 \text{ h}}{\text{Aire } 0 \text{ h}} \times 100$$

Les effets du G-1 sur la migration cellulaire peuvent être dépendants d'une diminution de l'expression des MMP (Zha et al., 2018). Nous avons donc caractérisé l'impact du G-1 sur le niveau d'expression de MMP2 et MMP14 par RT-qPCR dans les cellules U251 et LN229 en normalisant leur expression avec le gène de ménage snoRNA U6 par la méthode  $\Delta\Delta C(q)$  avec les amorces suivantes : MMP2 (sens : 5'-TTGGCAGTGCAATACCTGAA-3' ; antisens : 5'-GAGCAAAGGCATCATCCACT-3'), MMP14 (sens : 5'-CACTGCCTACGAGAGGAAGG-3' ; antisens : 5'-TTGGGGTACTCGCTATCCAC-3'), snoU6 (sens : 5'-CGGGTTTGTTCATTTCT-3' ; antisens : 5'-AGTCCCAGCATGAACAGCTT-3'). L'extraction des ARN ainsi que le protocole de RT-qPCR utilisé est le même que celui détaillé dans le matériel et méthode de l'article 3.





### Figure 34 : Impact du G-1 sur la migration cellulaire.

Photographies de la lignée (A) U251 et (B) LN229 au grossissement x40 au moment de la blessure et 16 h après mise en contact avec 0,01% de DMSO ou 1  $\mu$ M de G-1. Quantification du pourcentage de migration des cellules (C) U251 et (D) LN229 en fonction du traitement à l'aide du plugin « MRI Wound Healing Tool » d'ImageJ. Niveau d'expression relatif de (E) MMP2 et (F) MMP14 évaluée par RT-qPCR et normalisée par le gène de ménage snoRNA U6 à l'aide de la méthode  $\Delta\Delta C(q)$  dans les lignées U251 et LN229. L'échantillon LN229 traité au DMSO a servi de référence et le niveau d'expression normalisé des transcrits MMP2 et MMP14 dans cet échantillon ont été placés arbitrairement à 1. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SD. Le niveau de significativité a été déterminé à l'aide du test t de Student, \*\*\* indiquant  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,05$ . Les expériences ont été réalisées au minima en triplicat biologique.

Le G-1 provoque une diminution des capacités migratoires des cellules U251 de 39%, qui pourrait dépendre de la réduction du taux de MMP14 et non de MMP2. Cependant, nous n'avons pas pu valider ces résultats dans la lignée LN229. De plus, nous avons prévu de réaliser une analyse transcriptomique de la lignée U251 exposée au G-1 (article 3) ce qui nous permettra de voir si le G-1 provoque une perturbation des voies de signalisation impliquées dans la migration cellulaire ou si ce mécanisme est mineur dans les effets du G-1.

## Article 3 : « Molecular Characterization of the Dual Effect of the GPER Agonist G-1 in glioblastoma »

Cet article a été soumis le 21/10/2022 dans la special issue « Advances in Cancer Metabolism and Tumor Microenvironment 2.0 » du journal IJMS.

Article

### Molecular Characterization of the Dual Effect of the GPER Agonist G-1 in glioblastoma

Alex Hirtz <sup>1</sup>, Yann Bailly <sup>1</sup>, Fabien Rech <sup>1,2</sup>, Julien Pierson <sup>1</sup>, Hélène Dumond <sup>1,†</sup> and Hélène Dubois-Pot-Schneider <sup>1,\*,†</sup>

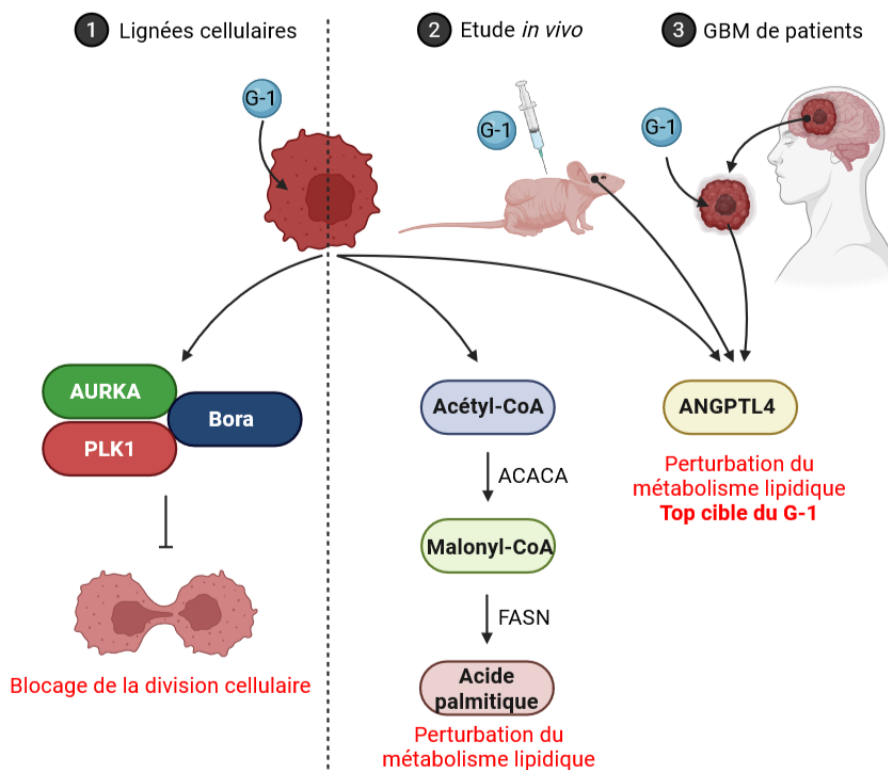


Figure 35 : Illustration récapitulative de l'article 3.

**Contexte :** Cet article repose sur mon travail expérimental ax e sur la biologie moléculaire. En plus de la réalisation et de l'analyse des puces à ADN, j'ai aussi été responsable de la prise en charge des prélèvements de patients et de leur mise en culture au sein du laboratoire.

**Introduction :** Cet article fait directement suite à l'article 2 dans lequel nous avons montr e que le G-1 déclenche un arrêt transitoire de la prolifération cellulaire en phase G2/M en raison d'une perturbation de l'assemblage des microtubules. De plus, l'association du G-1 et du TMZ empêche la reprise de la prolifération observée après retrait du G-1. De ce fait, nous avons

montré que le G-1 semblait être une molécule prometteuse comme agent de chimiothérapie dans le traitement du GBM. Dans cet article, nous avons voulu compléter les résultats de l'article 2 en détaillant les mécanismes d'action du G-1 à différentes échelles. Nous avons tout d'abord identifié la signature moléculaire du G-1 par une analyse transcriptomique de la lignée de GBM U251 exposé au G-1. Les résultats obtenus ont ensuite été validés dans la lignée de GBM primaire RADH87. Nous avons ensuite confirmé que le G-1 modulait l'expression d'une de ses cibles majoritaires dans des échantillons de GBM de patients. Enfin, par une étude préliminaire *in vivo*, nous avons étudié les effets du G-1 sur la croissance tumorale.

**Matériel et méthode :** Pour décortiquer les mécanismes d'action du G-1 au niveau moléculaire, nous avons réalisé des puces à ADN à partir des cellules U251 traitées à deux doses de G-1 (l'IC50 et 1  $\mu$ M) et à deux temps (24 h et 72 h) pour comprendre la cinétique d'action du G-1. Les voies de signalisation modulées par le G-1 identifiées dans la lignée U251 ont ensuite été confirmées dans par RT-qPCR dans la lignée primaire de GBM RADH87. De plus, nous avons cherché à confirmer la cible la plus fortement régulée par le G-1, à savoir *ANGPTL4* (angiopoïétine like 4), dans des fragments de GBM de patients exposés à 1  $\mu$ M de G-1 pendant 72 h par RT-qPCR. Nous avons aussi investigué les effets du G-1 sur la croissance tumorale *in vivo* chez des souris nudes greffées en hétérotopiques avec des cellules de GBM U87.



**Résultats :** Nous avons identifié deux mécanismes distincts d'action du G-1. D'une part, le G-1 dérégule grandement le métabolisme lipidique en augmentant l'expression d'enzymes essentielles de cette signalisation comme *FASN* (fatty acid synthetase) ou *ACACA* (FC>1,5, non présenté dans l'article), qui interviennent dans la synthèse des acides gras complexes comme les phospholipides ou les triglycérides. D'autre part, la signature moléculaire du G-1 est proche de celle d'autres agents ciblant les microtubules comme le mébendazole, la vincristine ou la vinblastine, ce qui renforce l'hypothèse que nous avons émise dans l'article 2 qui supposait que le G-1 pouvait aussi être considéré comme un membre de cette famille de molécules. Parmi les gènes associés à cette signature, on retrouve des acteurs importants de la division nucléaire comme *AURKA* (aurora kinase A), *BORA* (BORA aurora kinase A activator), *CDC20* (cell division cycle 20) et *PLK1* (polo-like kinase 1). Les effets du G-1 semblent robustes puisque nous confirmons qu'il augmente l'expression de la cible majeure du G-1, à savoir *ANGPTL4*, dans des échantillons de GBM de patients (**Figure 35**). De même, nous confirmons dans notre modèle *in vivo* que le G-1 limite la croissance tumorale.

**Conclusion :** Par une approche transcriptomique, nous confirmons que les effets du G-1 sont similaires à ceux d'autres agents ciblant les microtubules et qu'il pourrait donc appartenir à cette famille. De plus, en modulant finement la dose et le temps d'exposition, le G-1 peut exercer deux mécanismes d'action distincts : d'une part en perturbant le métabolisme lipidique et d'autre part en bloquant la division cellulaire. Sa signalisation semble confirmée dans des échantillons de GBM de patients. Pour l'ensemble de ces raisons, le G-1 est une nouvelle chimiothérapie prometteuse dans le traitement des GBM et sa caractérisation mérite d'être poursuivie.



Article

# Molecular Characterization of the Dual Effect of the GPER Agonist G-1 in Glioblastoma

Alex Hirtz <sup>1</sup>, Yann Bailly <sup>1</sup>, Fabien Rech <sup>1,2</sup>, Julien Pierson <sup>1</sup>, Hélène Dumond <sup>1,†</sup>   
and Hélène Dubois-Pot-Schneider <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Service de Neurochirurgie, F-54000 Nancy, France

\* Correspondence: helene.dubois-pot-schneider@univ-lorraine.fr

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Glioblastoma (GBM) is the most common primary brain tumor in adults. Despite conventional treatment, consisting of a chiralurgical resection followed by concomitant radio–chemotherapy, the 5-year survival rate is less than 5%. Few risk factors are clearly identified, but women are 1.4-fold less affected than men, suggesting that hormone and particularly estrogen signaling could have protective properties. Indeed, a high GPER1 (G-protein-coupled estrogen receptor) expression is associated with better survival, especially in women who produce a greater amount of estrogen. Therefore, we addressed the anti-tumor effect of the GPER agonist G-1 in vivo and characterized its molecular mechanism of action in vitro. First, the antiproliferative effect of G-1 was confirmed in a model of xenografted nude mice. A transcriptome analysis of GBM cells exposed to G-1 was performed, followed by functional analysis of the differentially expressed genes. Lipid and steroid synthesis pathways as well as cell division processes were both affected by G-1, depending on the dose and duration of the treatment. ANGPTL4, the first marker of G-1 exposure in GBM, was identified and validated in primary GBM cells and patient samples. These data strongly support the potential of G-1 as a promising chemotherapeutic compound for the treatment of GBM.

**Keywords:** glioma; GPER agonist G-1; transcriptomic analysis; lipid metabolism; tubulin inhibitor; xenograft



**Citation:** Hirtz, A.; Bailly, Y.; Rech, F.; Pierson, J.; Dumond, H.; Dubois-Pot-Schneider, H. Molecular Characterization of the Dual Effect of the GPER Agonist G-1 in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14309. <https://doi.org/10.3390/ijms232214309>

Academic Editors: Karel Smetana, Jr. and Michal Masarik

Received: 21 October 2022

Accepted: 16 November 2022

Published: 18 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:**   2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Gliomas are a large family of primary brain tumors whose classification is regularly updated. Since 2021, they are divided into three subtypes, characterized by their cell of origin combined with their molecular profiling: IDH mutated/1p19q codeleted oligodendroglioma, IDH mutated astrocytoma, or IDH wild-type glioblastoma (GBM). Four grades were also described, according to the severity of the tumor and the prognosis of the patients (WHO 2021) [1]. With the worst prognosis and an incidence of 3.2/100,000, GBM is always classified as Grade 4 [2].

The standard treatment of GBM is a surgical resection as wide as possible, followed by concomitant temozolomide (TMZ)-based chemotherapy and radiotherapy. Despite this burdensome treatment, recurrences occur within months after surgery from the resection margins. Few risk factors are known but men are more affected than women, with a sex ratio of 1.4:1. A hypothesis is that the estrogens present in greater amount in women have neuroprotective effects against GBM. Recently, Hirtz et al. explored the impact of estrogen biosynthetic enzyme or receptor expressions on glioma patient survival [3,4]. They showed that a high expression of the membrane G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) was associated with better survival in IDHmut Grades 3 and 4 astrocytoma and GBM.

In humans, GPER is expressed in many organs, including the brain [5–10]. In the embryo, the absence of GPER alters the brain morphology due to poor development of

sensory and motor neurons [11]. In adults, GPER is expressed in many brain regions [9,10], especially in several hypothalamic nuclei, such as the paraventricular, supraoptic, arcuate, and suprachiasmatic nuclei [12,13]. At the cellular level, GPER has been detected in neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat hypothalamus [14]. GPER is associated with the occurrence of migraine; it is a regulator of cognitive function, particularly in post-menopausal women, and involved in the neuroprotective effects of 17 $\beta$ -estradiol (E2) [15]. Taken together, these data suggest that the expression and/or functionality of GPER is essential for brain physiology.

GPER is a member of the Class A or “rhodopsin-like” GPCRs, subtype G $\alpha_s$ . Although the validation of a direct interaction of E2 with GPER is still controversial [16], E2 is commonly accepted as the endogenous ligand of GPER [17,18]. Hirtz and colleagues also characterized the impact of GPER activation in GBM cells exposed to the GPER ligand G-1 (GPR30-specific compound 1), identified as the first specific agonist for GPER in 2006 [4,19]. In vitro, G-1 triggered cell cycle arrest in the G2/M phase and subsequent transient cell proliferation arrest in U251 and LN229 GBM cells exposed to 1  $\mu$ M for 72 h, due to a disruption of the microtubule assembly. Pretreatment of cells with GPER antagonists G-15 or G-36 did not alleviate G-1 effects, suggesting that they were, at least in part, independent of GPER.

In the present study, we confirmed the antiproliferative effect of G-1 in a model of GBM xenografted nude mice and aimed to clarify the G-1 mechanisms of action in GBM cells. We performed a transcriptomic analysis of U251 cells exposed to 1  $\mu$ M or the IC50 dose of G-1 for 24 h or 72 h. Functional analysis of the differentially expressed genes revealed dose- and time-dependent effects of G-1 treatment: the lipid synthesis-related pathway was mainly altered by the IC50 dose at the earliest time of treatment, whereas cell division was affected by the 1  $\mu$ M G-1 treatment regardless of the duration of the treatment. Signatures of G-1 exposure were then validated in the primary GBM cells. Our analysis identified for the first time a marker of G-1 exposure, ANGPTL4, which was validated in the GBM patient samples. Taken together, these data strongly support the potential of G-1 as a promising chemotherapeutic compound for the treatment of GBM.

## 2. Results

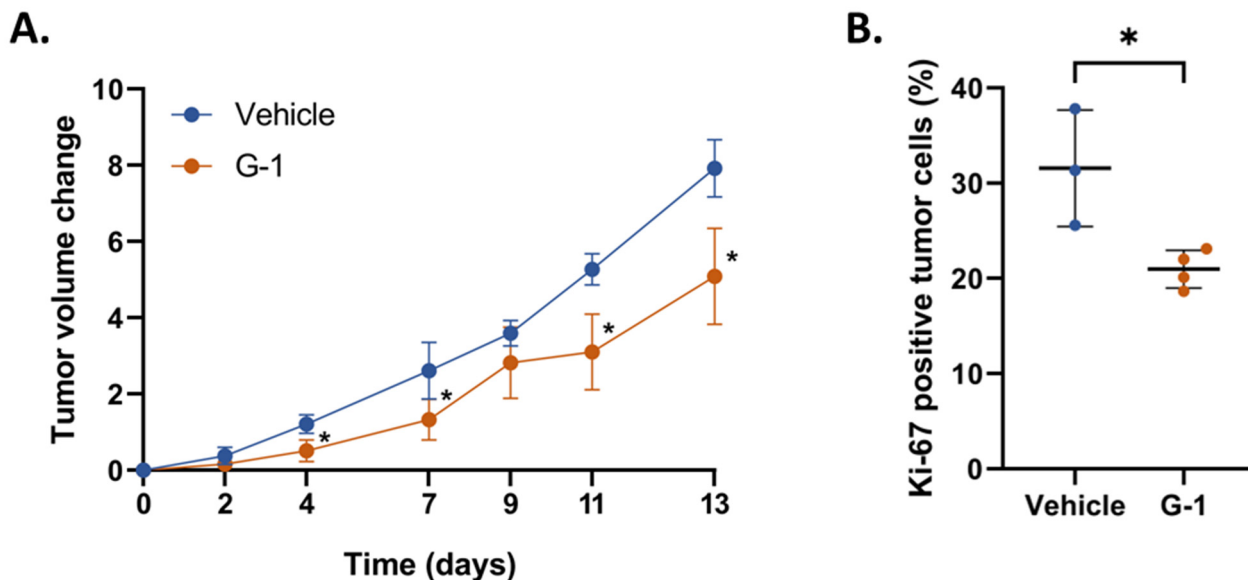
### 2.1. G-1 Elicits an Anti-Tumor Effect in GBM Cell Xenografted Nude Mice

Recently, Hirtz et al. demonstrated in vitro that G-1 triggered a cell proliferation arrest in U251 and LN229 GBM cells [4]. Therefore, we addressed the anti-tumoral effect of this GPER-agonist in a third GBM cell line, U87MG (Supplementary Figure S1), and in a corresponding model of female nude mice xenografted subcutaneously with U87MG GBM cells. When the tumor volume reached an average volume of 150  $\pm$  40 mm<sup>3</sup>, mice were injected intra-peritoneally with G-1 or the corresponding vehicle (see Materials and Methods for details). Treatment was repeated 3 times a week until the heterotopic tumor volume reached the endpoint criterion. Tumor volume, but not animal weight, was significantly reduced in G-1 treated mice at Days 4, 7, 11, and 13, suggesting that G-1 might elicit anti-tumor processes in vivo (Figure 1A and Supplementary Figure S2). In line, we observed 34% less Ki-67 immunostaining in G-1-exposed tumors than in vehicle ones, whereas no difference in tumor histology was detected (Figure 1B and Supplementary Figure S3).

### 2.2. Transcriptomic Analysis of U251 GBM Cells Exposed to G-1

To evaluate the molecular mechanisms induced by G-1 treatment in GBM cells, U251 cells were exposed to 1  $\mu$ M or the IC50 dose (644.8 nM) of G-1 for 24 h or 72 h (Supplementary Figure S4). Then, a comprehensive gene expression analysis was performed. By a one-way ANOVA, we identified 1653 deregulated genes ( $p < 0.05$ , Absolute Fold Change (|FC|)  $> 2$ ), at least in one condition of treatment (Table S1). The hierarchical clustering of the differentially expressed genes (DEGs) revealed two main branches in the dendrogram, dividing the samples according to treatments: DMSO 0.01%/G-1 IC50 in one branch and G-1 1  $\mu$ M in the other (Figure 2A). Cluster 1 was divided into two branches,

driven mainly by G-1 IC50 72 h, whereas the G-1 IC50-treated cells during 24 h clustered with the DMSO controls. This subdivision probably indicated that the impact of the G-1 treatment at IC50 for 24 h was very weak. Thus, treatment with G-1 at 1  $\mu$ M had the greatest effect, regardless of the duration of treatment.

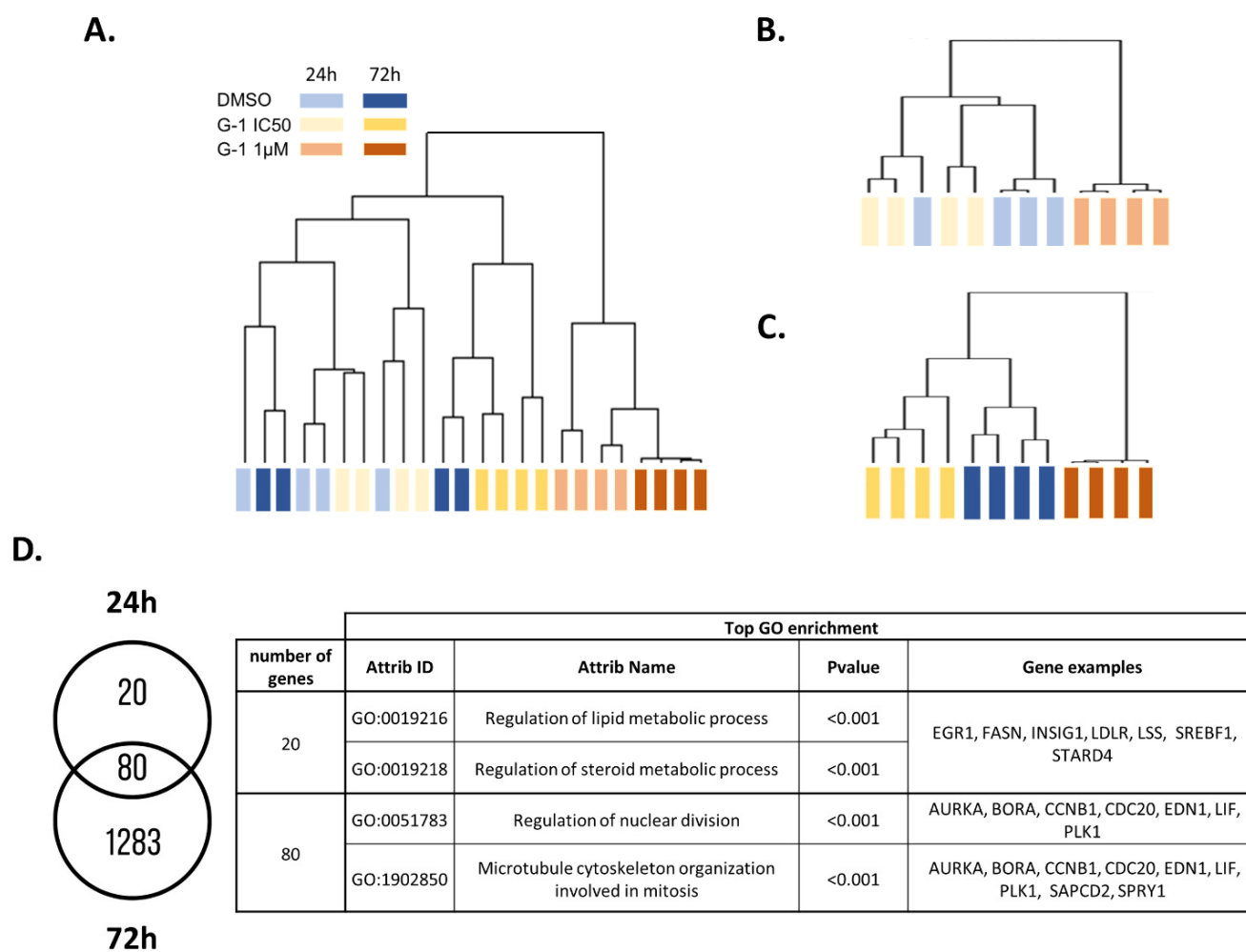


**Figure 1.** G-1 significantly decreases tumor growth in nude mice. (A) U87MG cells were subcutaneously injected into nude mice. Tumor volume change (TVC: for each mouse, the difference between tumor volume at each point of the experiment and tumor volume at the time of animal randomization) was measured during 2 weeks of treatment every 2 days. (B) Quantification of Ki-67-positive cells in tumors of the vehicle or G-1-treated mice. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. Significance level was determined using *t*-tests, with \* indicating  $p < 0.05$ . Vehicle,  $n = 3$ ; and G-1,  $n = 4$ .

To better evaluate the impact of treatment duration, we analyzed the data obtained after either 24 h or 72 h G-1 exposure. By a one-way ANOVA, we identified 100 and 1363 DEGs ( $p < 0.05$ ,  $|FC| > 2$ ; Table S2 and Table S3 respectively) in at least one condition after 24 h or 72 h of treatment, respectively. In both cases, the hierarchical clustering of the DEGs highlighted two main branches of the dendrogram, dividing the samples according to treatments: DMSO 0.01%/G-1 IC50 in one branch and G-1 1  $\mu$ M in the other (Figure 2B,C). Interestingly, 80% of the DEGs identified at 24 h were also differentially expressed at 72 h and the top enriched GO terms were mainly associated with cell division. At 24 h, the 20 specific genes were linked to sterol and lipid metabolism, as suggested by upregulation of *SREBF1*, *LDLR*, *INSIG1*, *STARD4*, *LSS*, *EGR1*, and *FASN* (Figure 2D).

### 2.3. Identification and Validation of *ANGPTL4* Expression as a Marker of G-1 Exposure

Transcriptome analysis revealed that *ANGPTL4* was the most deregulated gene after G-1 treatment for 24 h and 72 h, by 38-fold and 231-fold, respectively. This result obtained from U251 cells was verified in RADH87 primary GBM cells exposed to G-1 for 24 h or 72 h. RT-qPCR data confirmed that *ANGPTL4* was also significantly upregulated in RADH87 primary GBM cells (by 1.8-fold and 3-fold at 24 h and 72 h, respectively) as well as in patient tumors (by 2.5-fold) treated by 1  $\mu$ M G-1 for 72 h (Figure 3A,B). Therefore, *ANGPTL4* might be considered as the first marker of G-1 exposure in GBM.

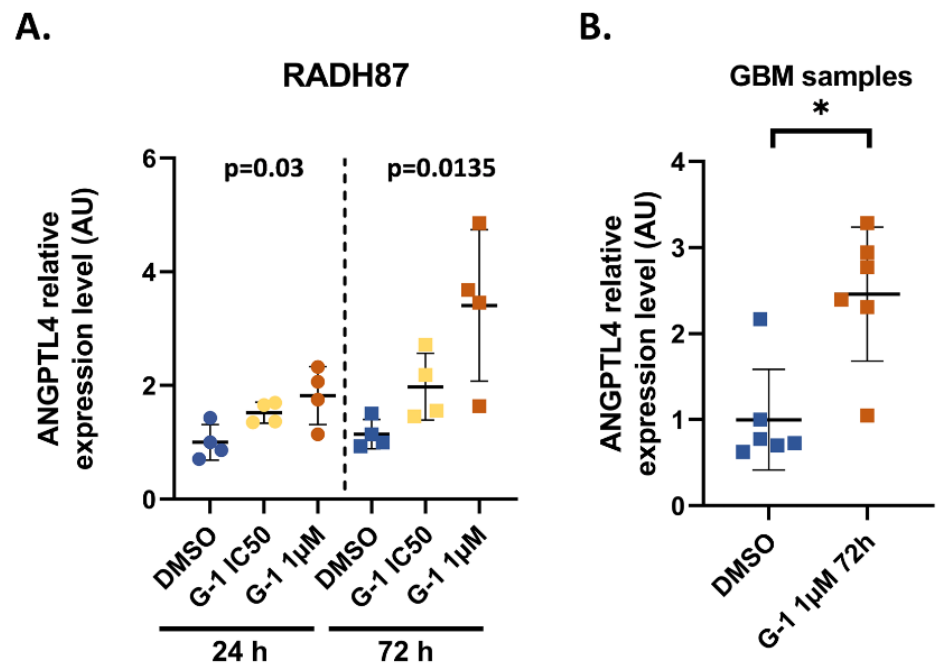


**Figure 2.** Transcriptomic profile of U251 cells exposed to G-1 in a dose- and time-dependent manner. (A) Hierarchical clustering of U251 GBM cells depending on the gene transcription between DMSO 0.01% (vehicle), G-1 IC50 (644.8 nM), and G-1 1 µM at 24 h and 72 h of treatment. (B) Hierarchical clustering at 24 h and (C) 72 h after DMSO 0.01%, G-1 IC50, and G-1 1 µM exposure. (D) Venn diagram of the corresponding differentially expressed genes after G-1 exposure at 24 h and 72 h. The corresponding top GO enrichments and genes associated are summarized in the table.

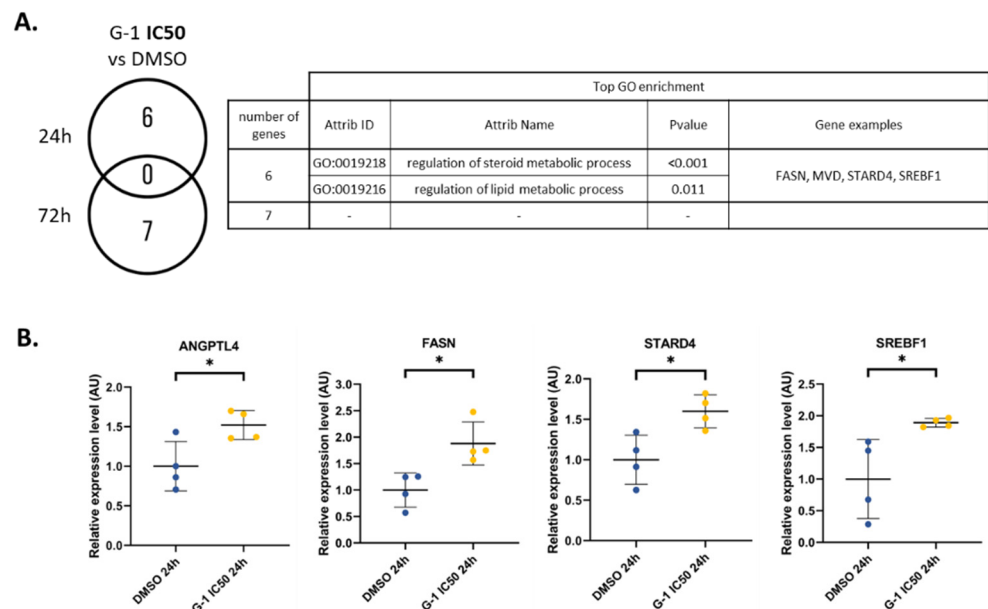
#### 2.4. G-1 Impairs Lipid Metabolism and Nuclear Division Pathways

To decipher the real impact of the G-1 dose, we then performed two-by-two comparisons (unpaired *t*-test  $p < 0.05$ ,  $|FC| > 2$ ). At a dose of G-1 IC50, only 6 and 7 genes were significantly deregulated after 24 h and 72 h, respectively (Tables S4 and S5). Associated functions were related to lipid/steroid metabolic processes, as suggested by the upregulation of *FASN*, *MVD*, *STARD4*, and *SREBF1* at 24 h. At 72 h, even if no function was significantly enriched, among the seven DEGs, three were related to lipid metabolism, such as *ACSBG1*, *MGLL*, and *ANGPTL4* (Figure 4A). The significant upregulation of *FASN*, *ANGPTL4*, *STARD4*, and *SREBF1* was confirmed in RADH87 primary GBM cells, by 1.9-fold, 1.5-fold, 1.6-fold, and 1.9-fold, respectively (Figure 4B).





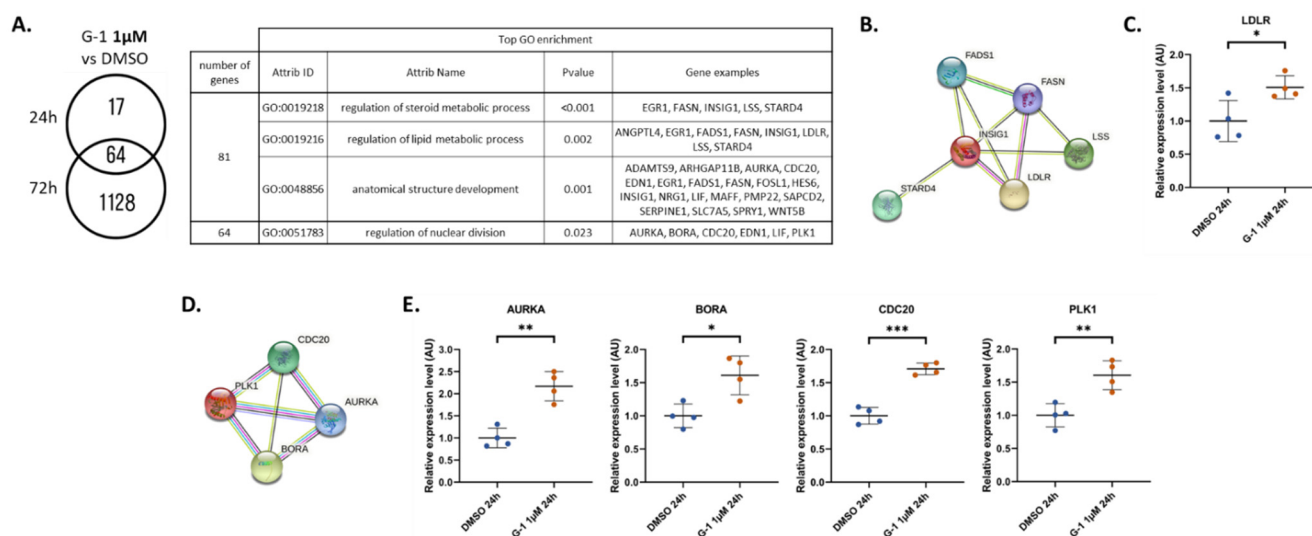
**Figure 3.** ANGPTL4 is a marker of G-1 exposure. (A) Expression level of *ANGPTL4* determined by RT-qPCR in RADH87 primary GBM cells after exposure to DMSO 0.01% (vehicle) or G-1 IC50 (562.5 nM)/1 µM for 24 h and 72 h;  $n = 4$ . (B) Expression level of *ANGPTL4* in 6 GBM patient samples after exposure to vehicle or G-1 1 µM after 72 h. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. Significance level was determined using ANOVA for RADH87 and by Wilcoxon tests in patient samples, where \* indicates  $p < 0.05$ .



**Figure 4.** Dual effect of G-1 altering lipid metabolism and nuclear division pathways. (A) Number of vehicle versus G-1 IC50 (644.8 nM) DEGs and table of associated functions at 24 h and 72 h. (B) RT-qPCR analysis of the *FASN*, *STARD4*, *ANGPTL4*, and *SREBF1* expressions in the RADH87 primary GBM cell line after 24 h of G-1 IC50 (562.5 nM) exposure. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. Significance level was determined using *t*-tests, where \* indicates  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .

For the 1 µM G-1 treatment, we highlighted a higher number of deregulated genes (Figure 5A). After 24 h of G-1 treatment, 81 genes were differently expressed (Table S6). Among them, no specific enrichment was found for the 37 downregulated genes. In contrast,

the 44 upregulated genes were associated with regulation of steroid and lipid metabolic processes or anatomical structure development. All these functions were driven by *INSIG1*, *FASN*, *FADS1*, *LSS*, and *LDLR* (Figure 5B). Interestingly, these five genes were specifically upregulated at 24 h but not at 72 h. Upregulation of *LDLR* by G-1 1  $\mu$ M was confirmed in RADH87 cells (Figure 5C). Sixty-four genes were deregulated by G-1 for the two treatment durations. These genes were linked to the GO term “regulation of nuclear division”, as suggested by the upregulation of genes encoding the key interacting proteins AURKA, BORA, CDC20, and PLK1 (Figure 5D). AURKA and PLK1 are two serine-threonine protein kinases involved in regulation of cell division and microtubule protein phosphorylation. BORA is the coactivator of AURKA. The differential expression of this functional gene cluster was fully confirmed in RADH87 cells (Figure 5E).



**Figure 5.** (A) Number of vehicle versus G-1 1  $\mu$ M DEGs and table of associated functions at 24 h and 72 h. (B) Protein–protein interactions from the STRING interaction database. Among the 17 DEGs selected after 24 h exposure to G-1 1  $\mu$ M, the cluster FADS1, FASN, LSS, LDLR, INSIG1, and STARD4 was identified. (C) RT-qPCR analysis of *LDLR* expression in the RADH87 primary GBM cell line after 24 h of G-1 1  $\mu$ M exposure (D) Protein–protein interactions from the STRING interaction database. Among the 64 common DEGs selected after 24 h and 72 h exposure to G-1 1  $\mu$ M, the cluster CDC20, PLK1, AURKA, and BORA was identified. (E) RT-qPCR analysis of *PLK1*, *BORA*, *AURKA*, and *CDC20* expressions in the RADH87 primary GBM cell line after 24 h of G-1 1  $\mu$ M exposure. Data are presented as the mean  $\pm$  SD. Significance level was determined using *t*-tests, where \*\*\* indicates  $p < 0.001$ , \*\* indicates  $p < 0.01$ , and \* indicates  $p < 0.05$ ;  $n = 4$ .

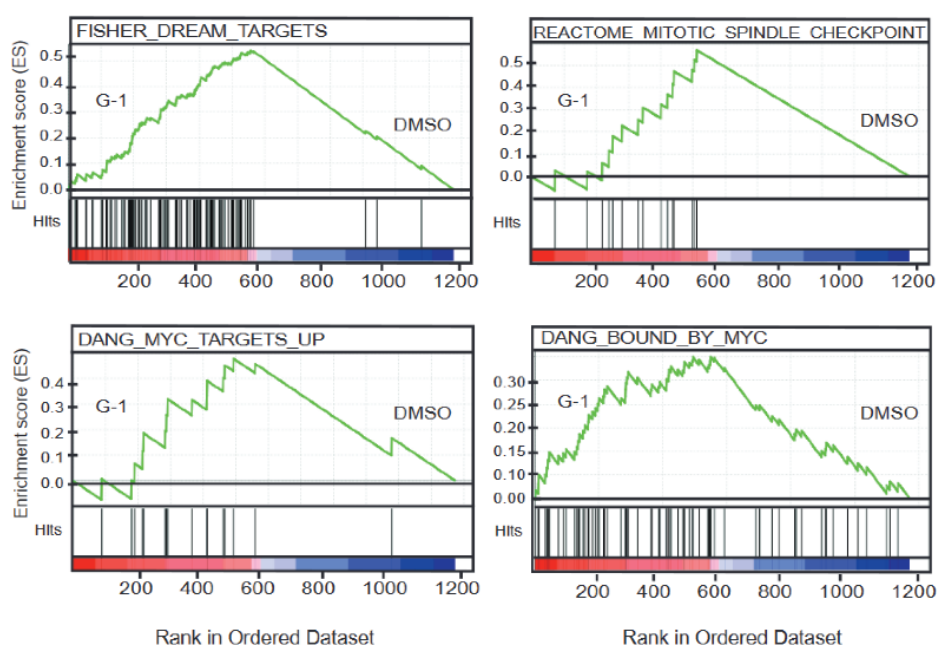
In total, 1192 DEGs were identified after 72 h of 1  $\mu$ M G-1 treatment (Table S7). No biological function was significantly enriched in this dataset when separating the 585 up- and 607 downregulated genes. As this total number of DEGs is not compatible with a pathway analysis, we performed an unsupervised GSEA signature enrichment (Figure 6). We identified a significant increase in several signatures, mainly related to cell cycle regulation. Among them are the reactomes “MITOTIC\_SPINDLE\_CHECKPOINT” or “SEPARATION\_OF\_SISTER\_CHROMATIDS”. Several Myc signatures were also enriched as “DANG\_MYC\_TARGETS\_UP” or “DANG\_BOUND\_BY\_MYC.”

### 2.5. The Molecular G-1 Signature Is Similar to Microtubule Targeting Agent One

To further characterize the role of G-1 treatment (1  $\mu$ M, 72 h), we used a connectivity map (CMap) approach. Only compounds with a connectivity score of 90 or higher were selected. Interestingly, among the 17 ranked molecules, we identified 9 tubulin inhibitors, supporting the role of G-1 as a molecule acting on the cell cycle and particularly on tubulin polymerization (Table 1). We also highlighted two PKC (protein kinase C) activators

affecting cell cycle progression and a PLK (polo-like kinase) inhibitor known to cause mitotic blockage and apoptotic cell death.

Main related signatures	NAME	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
Cell cycle	FISHER_DREAM_TARGETS	0.538	4.494	0.000	0.000
	REACTOME_CELL_CYCLE_CHECKPOINTS	0.512	2.639	0.000	0.000
	REACTOME_MITOTIC_SPINDLE_CHECKPOINT	0.569	2.381	0.000	0.001
	REACTOME_RESOLUTION_OF_SISTER_CHROMATID_COHESION	0.493	2.220	0.000	0.003
	REACTOME_SEPARATION_OF_SISTER_CHROMATIDS	0.488	2.119	0.002	0.006
Myc pathway	WEI_MYCN_TARGETS_WITH_E_BOX	0.458	3.689	0.000	0.000
	SCHLOSSER_MYC_TARGETS_REPRESSED_BY_SERUM	0.561	2.304	0.002	0.002
	DANG_BOUND_BY_MYC	0.300	2.265	0.000	0.002
	DANG_MYC_TARGETS_UP	0.478	2.046	0.006	0.009
	BENPORATH_MYC_MAX_TARGETS	0.317	2.040	0.004	0.009
	BILD_MYC_ONCOGENIC_SIGNATURE	0.373	1.996	0.004	0.012
	BENPORATH_MYC_TARGETS_WITH_EBOX	0.390	1.671	0.039	0.063



**Figure 6.** GSEA signature enrichment of G-1 is mainly related to the cell cycle and Myc pathways. GSEA analysis using the gene expression profile of U251 cells exposed to 1  $\mu$ M of G-1 for 72 h showed significant positive enrichment for gene sets that are linked to mitotic spindle and chromatid separation and gene sets related to Myc pathway signatures.

**Table 1.** The molecular signature of G-1 resembles to that of microtubule-targeting agents. The Cmap approach was used, allowing identification of the top molecules ( $\tau > 90$ ) whose molecular signatures are close to those of G-1 after 72 h of treatment with 1  $\mu$ M of the U251 cell line.

Id	median_tau_score	Name	Belongs to
BRD-K91145395	98.86	prostratin	PKC activator
BRD-K12539581	98.48	nocodazole	tubulin inhibitor
BRD-K86003836	98.31	flubendazole	tubulin inhibitor
BRD-K10916986	98.31	vinorelbine	tubulin inhibitor
BRD-A76528577	98.10	vincristine	tubulin inhibitor
BRD-K77987382	97.63	mebendazole	tubulin inhibitor

**Table 1.** *Cont.*

<b>Id</b>	<b>median_tau_score</b>	<b>Name</b>	<b>Belongs to</b>
BRD-K37456065	97.37	VU-0365114-2	M5 modulator
BRD-K91623615	97.33	ABT-751	tubulin inhibitor
BRD-K94325918	96.28	kinetin-riboside	antiproliferative and apoptosis inhibitor
BRD-A54927599	96.17	KF-38789	P-selectin-mediated cell adhesion inhibitor
BRD-K35687265	95.98	ON-01910	PLK inhibitor
BRD-A55594068	95.91	vinblastine	tubulin inhibitor
BRD-K59753975	95.71	vindesine	tubulin inhibitor
BRD-K36055864	94.89	cycloheximide	protein synthesis inhibitor
BRD-K01976263	94.67	emetine	Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor
BRD-A52650764	94.47	ingenol	PKC activator
BRD-K99498722	91.02	NPI-2358	tubulin inhibitor

### 3. Discussion

In a previous study performed *in vitro* on U251 and LN229 GBM cell lines, Hirtz et al. showed that a 1  $\mu$ M G-1 exposure caused a decrease in proliferation characterized by altered tubulin polymerization and cell cycle arrest in the G2/M phase [4]. These results were confirmed in U87MG and consistent with those found in other cell models [20,21]. In the present *in vivo* study, U87MG GBM cells were grafted heterotopically into nude mice. As indicated by Sharma et al., G-1 administration did not impair weight gain in intact female mice [22]. We observed an antitumor effect of G-1 *in vivo*, with a significant decrease in tumor size and Ki-67 immunostaining. This suggested once again that the cellular response initiated by G-1 might elicit a beneficial effect against tumor growth. Nevertheless, the proof of concept that G-1 may be used as a chemotherapeutic compound against GBM has to be confirmed in orthotopic xenograft models to ensure tumor cells to interact with the cerebral microenvironment and address G-1 brain–blood–barrier crossing. Camphausen et al. showed that while the U87MG and U251 gene expression profiles appear quite disparate in a monolayer culture *in vitro*, these differences are attenuated in sub-cutaneous xenografts and almost disappear in intra-cranial xenografts [23]. Therefore, such models also could be relevant to validate the G-1-dependent signaling processes and downstream target genes identified below.

As a follow-up to previous work from Hirtz et al., we went back *in vitro* to characterize in detail the mechanisms of action of G-1 by treating U251 GBM cells at two doses (IC50, 1  $\mu$ M) and at two different times (24 h and 72 h) [4]. This refinement of the experimental conditions allowed us to detect two distinct antiproliferative processes triggered by G-1.

At IC50, G-1 disrupted lipid metabolism. It increased the expression of a set of genes, including *ACSBG1*, *ANGPTL4*, *FASN*, *MVD*, *MGLL*, *SREBF1*, and *STARD4*, that are involved in this process. Among them, *ACSBG1*, *FASN*, and *MGLL* are critical enzymes related to fatty acid (FA) metabolism. The role of G-1 treatment on lipid metabolism, especially FA metabolism, has recently been demonstrated *in vivo* [22]. Authors show that G-1 enhances FA oxidation by upregulating FA oxidation enzymes. In U251 cells, G-1 treatment leads to an increase in Acyl-CoA Synthetase Bubblegum Family Member 1 (*ACSBG1*), an enzyme that activates FA for both degradation via  $\beta$ -oxidation or synthesis of cellular lipids [24]. Similarly, we showed an upregulation of both *MGLL*, the monoacylglycerol lipase that converts triglycerides into free FA, and *FASN*, the main enzyme of the palmitic acid (PA) synthesis. PA is the precursor for the synthesis of phospholipids, triglycerides (TG), cholesterol esters, and protein acetylation. An increase in *FASN* expression has been reported as a poor prognosis, since its expression correlates with the grade of glioma [25,26]. Similarly, stimulation of lipid metabolism fuels energetic metabolism in cancer cells and

contributes to their proliferation [27]. Conversely, we found here that stimulation of this signaling pathway by G-1 is concomitant with decreased proliferation of GBM cells. One hypothesis is that increased FASN expression promotes free PA production into the cells, which has been described to decrease cell viability [28]. In line, excess PA has been shown to be cytotoxic to neural stem cells [29]. The effects of PA depend on the balance between oleic acid (OA) and PA production. For example, in the breast cancer cell line MDA-MB-231, exposure to OA increases, whereas PA decreases their proliferation and induces apoptosis by inhibiting PI3K [30,31]. In GBM cells treated with G-1, the expression of FASN is increased, but not that of steryl CoA desaturase 1, which produces OA. It is therefore likely that PA production is higher than OA production, which might contribute to prevent cell proliferation.

In parallel, *ANGPTL4* expression is significantly induced regardless of the dose and duration of G-1 treatment of U251 cells. Even to a lesser extent, this induction was confirmed in RADH87 primary GBM cells, as well as in patient samples exposed to G-1 1  $\mu$ M for 72 h in ex vivo culture. *ANGPTL4* is an adipokine, a member of the angiopoietin-like protein family involved in angiogenesis regulation, lipid metabolism, cancer progression, and metastasis. Tsai et al. showed in U87MG cells that overexpression of *ANGPTL4* stimulated TMZ resistance and cancer stemness via a positive feedback loop involving the EGFR/PI3K/Akt/4E-BP1 signaling pathway [32]. In U251 cells, G-1 treatment activated *ANGPTL4* expression but acted synergistically with TMZ to prevent proliferation [4]. G-1 can activate EGFR indirectly via Src phosphorylation and HB-EGF release [33]. In the presence of G-1, competition between EGFR activation by HB-EGF and *ANGPTL4* may alleviate the development of TMZ resistance and even decrease cell proliferation. Indeed, *ANGPTL4* expression correlated with a decrease in cell proliferation in a model of osteosarcoma by limiting aberrant branched-chain amino acid metabolism, which is often linked to cancer progression and invasion [34]. Previous data also suggested that *ANGPTL4* limited tumor aggressiveness and invasiveness by preventing angiogenesis and vascular permeability [35,36]. While its precise role in GBM remains to be established, in relation to G-1-initiated signaling, increased *ANGPTL4* expression appears to be a robust marker of exposure to this GPER agonist, especially in U251 cells. Since *ANGPTL4* is regulated by several transcription factors at the crossroad of metabolism and tumor development, the signaling pathway leading to its upregulation after G-1 exposure remains to be determined [37].

Using our transcriptomic approach, we also demonstrated that treatment with 1  $\mu$ M G-1 for 72 h increased the expression of several actors of centrosome separation that participate in the cell cycle transition to the G2/M phase. These data were confirmed in RADH87 primary GBM cells. The key regulator of this signaling pathway is PLK1. In GBM cells, a reduction in PLK1 levels by siRNA resulted in a decrease in cell proliferation [38]. However, overexpression of PLK1 can also lead to defects in chromosome segregation and abnormal cytokinesis, generating plurinucleated cells with reduced proliferative potential [39]. In agreement, several cell cycle checkpoints and Myc signatures were enriched by G-1 treatment for 72 h. Myc is a transcription factor that regulates the transcription of multiple mitotic spindle genes, leading to impaired mitotic spindle formation [40].

At the cellular level, Hirtz et al. confirmed that G-1 disrupted the cell division, in particular tubulin polymerization, and observed plurinucleate cells [4]. In accordance, the CMap approach confirmed that G-1 might act like tubulin-destabilizing compounds. Most of them are tubulin depolymerization agents, such as vinca-alkaloids, including vinorelbine, vincristine, vinblastine, and vindesine, or NPI-2358 [41,42]. Vinca-alkaloids were previously shown to improve the treatment of some GBM patients [43]. Furthermore, the molecular signature of the G-1 treatment (1  $\mu$ M, 72 h) is very similar to that of nocodazole, which disrupts microtubules. Lv et al. have already observed a similar impact of G-1 and nocodazole in two breast cancer cell lines [44]. We also identified ABT-751, flubendazole, and mebendazole, which target the colchicine-binding site on the tubulin [45]. Mebendazole disrupts microtubule formation in GBM cells, and its activity correlates with

reduced tubulin polymerization *in vitro*. Moreover, mebendazole increases the TMZ effect in orthotopic xenografted mouse models of glioma [46]. Altogether, these data confirmed that G-1 could be a promising microtubule-targeting agent. Interestingly, we also highlighted two PKC activators, prostratin and ingenol, that displayed a similar signature to G-1. In contrast to other tumors, it has been shown that the use of PKC activators, targeting specific PKC isoenzymes, could be promising for GBM treatment [47].

Taken together, these data make G-1 an effective anti-proliferative molecule, which might be used for anti-tumor therapy in GBM. However, we were unable to confirm that the G-1 effects are dependent on the presence of GPER, since no signature associated with GPCRs were retrieved.

One of the major advantages of using G-1 in the context of GBM treatment might be the absence of side effects observed in animals [22]. A phase I/IIA clinical trial (accession number: NCT04130516) initiated for the treatment of advanced melanoma will also provide information on potential toxicity and patient metabolic response to orally administered G-1. In the present study, G-1 elicited two distinct antiproliferative effects that might synergize with TMZ: by disrupting lipid metabolism and by targeting microtubules. Once the dosage, distribution, and pharmacokinetics of G-1 in GBM and the surrounding brain tissue will be elucidated, G-1 should be considered, alone or in combination, for the management of GBM patients.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Cell Culture and Treatment

The U87MG GBM cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and the U251 GBM cells were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The RADH87 primary GBM cell line was kindly provided by Dr. Tony Avril (Inserm U1242, University of Rennes, Centre E. Marquis, Rennes, France). All cell lines were routinely cultured in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium), phenol red-free (Gibco) supplemented with 10% decompartmented FBS, 1% essential amino acids (Sigma-Aldrich), 0.5% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich), 0.4% vitamins (Sigma-Aldrich), 1.25% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), and 1% streptomycin/penicillin (Sigma-Aldrich) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. For each experiment, the cells were trypsinized, counted with a Thoma cell-counting chamber, seeded, and grown for 24 h. Then, the cells were deprived from steroid hormones for 24 h in 10% charcoal-stripped FBS medium. Thereafter, cells were exposed for 24 h or 72 h to 1 μM G-1 or the G-1 corresponding to the IC<sub>50</sub> of each cell line (Figure S1). G-1 was purchased from Tocris-BioTechne (Noyal Chatillon sur Seiche, France).

### 4.2. Transcriptomic Analysis

mRNAs from 4 independent biological replicates of 3 conditions DMSO 0.01%, G-1 IC<sub>50</sub> and G-1 1 μM and 2 durations of treatment (24 h and 72 h) were used to perform the microarray experiment. Genome-wide expression profiling was performed using the low-input QuickAmp labeling kit and human SurePrint G3 8 × 60 K pangenomic microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Gene expression data were processed using Feature Extraction (Agilent Technologies). The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible on 17 november 2022 through GEO Series accession number GSE214533 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE214533> 20 October 2022). Statistical analyses were performed with GeneSpring GX software v11.5 (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). Differentially expressed genes were identified by a one-way ANOVA test followed by a Tukey multiple-comparison (with a Benjamini FWER correction) test, with a *p*-value < 0.05 and an absolute fold change (|FC|) > 2. For 2-by-2 comparisons, a *t*-test with a *p*-value < 0.05 and an absolute fold change (|FC|) > 2 was done. Clustering analysis was performed using Cluster 3.0 and TreeView 1.6 (Java Treeview) using uncentered correlation and complete linkage.

#### 4.3. Bioinformatic Analysis

Gene annotation was based on gene ontology and enrichment for specific biological functions was determined using the FuncAssociate 2.0 program (FuncAssociate: The Gene Set Functionator [48]). For interpretation of transcriptomic data, we performed a STRING protein–protein interaction ([string-db.org](https://string-db.org)). Gene set enrichment analysis (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) was used to check whether an a priori defined set of genes shows statistically significant, concordant differences between two biological states. GSEA was performed by using the Java tool developed at the Broad Institute (Cambridge, MA, USA). Unsupervised GSEA was performed with the whole C2 collection of curated gene sets from the molecular signatures database (MSigDB). The enrichment score (ES) was determined after 1000 permutations, as previously described [49,50].

#### 4.4. GBM Tumor from Patients

Human GBM samples were collected from the neurosurgery department of the CHRU in Nancy. All patients gave informed consent (Collection reference n°DC-2019-3739). Patients' characteristics are listed in Table S8. Six GBM patient samples were fragmented and treated for 72 h by DMSO 0.01% as vehicle or 1  $\mu$ M G-1. After G-1 exposure, RNA extraction and RT-qPCR analyses were performed on each fragment from each patient tumor.

#### 4.5. RT-qPCR

Total RNA was extracted from the cell and human tumor samples using the E.Z.N.A HP total RNA kit (Omega Biotek, Norcross, GA, USA), following the manufacturer's instructions. Reverse transcription of 500 ng total RNA was performed according to the iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR kit (BioRad, Hercules, CA, USA). Real-time PCR analyses were performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, USA) with CFX96 Real Time PCR Detection System and software (Biorad, Hercules, CA, USA). The primers used are listed in Table S9. Assays were performed at least in triplicate, and the mean values were used to calculate the expression levels, using the Starting Quantity (SQ) method, referring to the U6 housekeeping gene expression. When treatments were performed, the variation in expression was reported as treated/DMSO 0.01%-treated cells (vehicle).

#### 4.6. Animal Xenograft Model and Treatments

Eight immunodeficient female mice (NMRI-nu, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) xenografted heterotopically with U87MG cells were used within the agreement of the French Minister of Research (agreement n°APAFiS #35594). U87MG cells were re-suspended in Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma Aldrich Life science ref H8264). The cells ( $2 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L) were injected subcutaneously into the right flank of 6-week-old nude mice. For tumor induction, mice were anesthetized by intraperitoneal injection (4  $\mu$ L/g of weight) of a solution mixture of xylazine/ketamine (90 and 8 mg/kg, respectively). Tumor size was monitored every 2 days by measuring two dimensions (length and width) with a caliper and the volume was estimated by calculating the length  $\times$  width<sup>2</sup>. Tumor growth was normalized by taking tumor volume at the start of treatment as a reference. When tumors reached an average volume of  $150 \pm 40$  mm<sup>3</sup>, animals were randomly divided according to their tumoral volume into 2 groups. As the tumor volume of one mouse never reached this threshold, only 7 mice were treated. Two treatment groups were assigned: animals received G-1's vehicle ( $n = 3$ ) or G-1 molecule ( $n = 4$ ) by intraperitoneal injection. For this, G-1 was diluted in 10% ethanol to a final concentration of 0.5 mg/mL. The treatment was performed every 2 days during 2 weeks of treatment (with a wash-out of 2 days during the weekend). Treatments were injected with a fixed volume of 300  $\mu$ L. When the heterotopic tumor volume reached 1500 mm<sup>3</sup> (endpoint criterion), the mice were sacrificed, and the tumors were harvested for further analyses.

#### 4.7. Immunohistochemistry and Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining

Formalin-fixed tumor tissues were embedded in paraffin and cut into 5  $\mu$ M sections. The tissue sections were stained with H&E using standard procedures. For immunohistochemical analysis, tissue sections were deparaffinized in toluene and rehydrated through graded alcohols. Antigen retrieval was performed by heating the slides in sodium citrate buffer (pH 6.0). Ki-67 staining was performed using rabbit anti-Ki-67 antibody (Ab16667, Abcam, Cambridge, UK) with 1:1500 dilution at 4 °C overnight. Slides were then treated with 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min to quench endogenous peroxidase activity. Sections were then washed with PBST and incubated with simple stain mouse max PO<sup>®</sup> anti-rabbit (414341F, Nichirei, Tokyo, Japan) antibodies at 37 °C for 20 min. The number of Ki-67-positive cells was quantified automatically using the QuPath (v.02.3) software.

#### 4.8. Connectivity Map

The clue.io platform (<https://clue.io/query> 20 October 2022) was used to compare the G-1 (1  $\mu$ M, 72 h) signature to the collection of hundreds-of-thousands of L1000 gene-expression profiles from cells exposed to reference perturbagens, available in the public LINCS Connectivity Map (CMap) resource [51]. Perturbagens with the highest similarity with G-1 signature were identified based on the CMap connectivity score ( $\tau$ ). Only perturbagens with  $\tau$  of +90 or higher were selected in our study.

#### 4.9. Statistical Analysis

Results are expressed as the means  $\pm$  SD (standard deviation). Normal distribution of the data were evaluated by a Shapiro–Wilk test. Statistical significance was evaluated by Students's *t*-test for two-by-two comparison for unpaired data and by a Wilcoxon test for paired data. Multiple comparisons were done using one-way analysis of variance (ANOVA). Standard deviations (SD) were indicated on the figures, as advocated by Altman and Bland [52]. The number of independent experiments performed was indicated as *n* in each figure legend.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232214309/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.D. and H.D.-P.-S.; methodology, A.H. and H.D.-P.-S.; validation, F.R., H.D. and H.D.-P.-S.; investigation, A.H., Y.B. and J.P.; data curation, H.D.-P.-S.; writing—original draft preparation, H.D. and H.D.-P.-S.; writing—review and editing, F.R., Y.B., A.H., H.D. and H.D.-P.-S.; supervision, H.D. and H.D.-P.-S.; funding acquisition, F.R., H.D. and H.D.-P.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This project was funded by the Cancéropole Grand Est (Pro-Glio project 2020; Fabien Rech as principal Investigator). Alex Hirtz is the recipient of a Ph.D. fellowship from the University of Lorraine.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the “The Lorraine Animal Welfare and Ethical Review Body (CELMEA; agreement n°APAFiS #35594)” for studies involving animals.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study (Collection reference n°DC-2019-3739).

**Data Availability Statement:** The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible on 17 november 2022 through GEO Series accession number GSE214533 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE214533> 20 October 2022).

**Acknowledgments:** We thank Tony Avril (Inserm U1242, University of Rennes, Centre E. Marquis, Rennes, France) for the gift of the RADH87 GBM primary cell line. We also thank the Plateforme de génomique et transcriptomique of the IUT NancyBrabois, University of Lorraine, France.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-Oncology* **2021**, *23*, 1231–1251. [[CrossRef](#)]
2. Grochans, S.; Cybulska, A.M.; Simińska, D.; Korbecki, J.; Kojder, K.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers* **2022**, *14*, 2412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Hirtz, A.; Lebourdais, N.; Thomassin, M.; Rech, F.; Dumond, H.; Dubois-Pot-Schneider, H. Identification of Gender- and Subtype-Specific Gene Expression Associated with Patient Survival in Low-Grade and Anaplastic Glioma in Connection with Steroid Signaling. *Cancers* **2022**, *14*, 4114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hirtz, A.; Lebourdais, N.; Rech, F.; Bailly, Y.; Vaginay, A.; Smail-Tabbone, M.; Dubois-Pot-Schneider, H.; Dumond, H. GPER Agonist G-1 Disrupts Tubulin Dynamics and Potentiates Temozolomide to Impair Glioblastoma Cell Proliferation. *Cells* **2021**, *10*, 3438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Hazell, G.G.J.; Yao, S.T.; Roper, J.A.; Prossnitz, E.R.; O'Carroll, A.-M.; Lolait, S.J. Localisation of GPR30, a Novel G Protein-Coupled Oestrogen Receptor, Suggests Multiple Functions in Rodent Brain and Peripheral Tissues. *J. Endocrinol.* **2009**, *202*, 223–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Mårtensson, U.E.A.; Salehi, S.A.; Windahl, S.; Gomez, M.F.; Swärd, K.; Daszkiewicz-Nilsson, J.; Wendt, A.; Andersson, N.; Hellstrand, P.; Grände, P.-O.; et al. Deletion of the G Protein-Coupled Receptor 30 Impairs Glucose Tolerance, Reduces Bone Growth, Increases Blood Pressure, and Eliminates Estradiol-Stimulated Insulin Release in Female Mice. *Endocrinology* **2009**, *150*, 687–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Otto, C.; Fuchs, I.; Kauselmann, G.; Kern, H.; Zevnik, B.; Andreassen, P.; Schwarz, G.; Altmann, H.; Klewer, M.; Schoor, M.; et al. GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 34–41. [[CrossRef](#)]
8. Carmeci, C.; Thompson, D.A.; Ring, H.Z.; Francke, U.; Weigel, R.J. Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. *Genomics* **1997**, *45*, 607–617. [[CrossRef](#)]
9. Feng, Y.; Gregor, P. Cloning of a Novel Member of the G Protein-Coupled Receptor Family Related to Peptide Receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 651–654. [[CrossRef](#)]
10. Owman, C.; Blay, P.; Nilsson, C.; Lolait, S.J. Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *228*, 285–292. [[CrossRef](#)]
11. Shi, Y.; Liu, X.; Zhu, P.; Li, J.; Sham, K.W.Y.; Cheng, S.H.; Li, S.; Zhang, Y.; Cheng, C.H.K.; Lin, H. G-Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 Is Involved in Brain Development during Zebrafish (*Danio Rerio*) Embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *435*, 21–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brailoiu, E.; Dun, S.L.; Brailoiu, G.C.; Mizuo, K.; Sklar, L.A.; Oprea, T.I.; Prossnitz, E.R.; Dun, N.J. Distribution and Characterization of Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 in the Rat Central Nervous System. *J. Endocrinol.* **2007**, *193*, 311–321. [[CrossRef](#)]
13. O'Dowd, B.F.; Nguyen, T.; Marchese, A.; Cheng, R.; Lynch, K.R.; Heng, H.H.Q.; Kolakowski, L.F.; George, S.R. Discovery of Three Novel G-Protein-Coupled Receptor Genes. *Genomics* **1998**, *47*, 310–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Roque, C.; Mendes-Oliveira, J.; Baltazar, G. G Protein-coupled Estrogen Receptor Activates Cell Type-specific Signaling Pathways in Cortical Cultures: Relevance to the Selective Loss of Astrocytes. *J. Neurochem.* **2019**, *149*, 27–40. [[CrossRef](#)]
15. Prossnitz, E.R.; Barton, M. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor GPER in Health and Disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 715–726. [[CrossRef](#)]
16. Tutzauer, J.; Gonzalez de Valdivia, E.; Swärd, K.; Alexandrakis Eilard, I.; Broselid, S.; Kahn, R.; Olde, B.; Leeb-Lundberg, L.M.F. Ligand-Independent G Protein-Coupled Estrogen Receptor/G Protein-Coupled Receptor 30 Activity: Lack of Receptor-Dependent Effects of G-1 and 17  $\beta$ -Estradiol. *Mol. Pharm.* **2021**, *100*, 271–282. [[CrossRef](#)]
17. Maggiolini, M.; Vivacqua, A.; Fasanella, G.; Recchia, A.G.; Sisci, D.; Pezzi, V.; Montanaro, D.; Musti, A.M.; Picard, D.; Andò, S. The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Mediates c-Fos Up-Regulation by 17 $\beta$ -Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27008–27016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Filardo, E.J.; Quinn, J.A.; Bland, K.I.; Frackelton, A.R. Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 1649–1660. [[CrossRef](#)]
19. Bologa, C.G.; Revankar, C.M.; Young, S.M.; Edwards, B.S.; Arterburn, J.B.; Kiselyov, A.S.; Parker, M.A.; Tkachenko, S.E.; Savchuck, N.P.; Sklar, L.A.; et al. Virtual and Biomolecular Screening Converge on a Selective Agonist for GPR30. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 207–212. [[CrossRef](#)]
20. Torres-López, L.; Olivás-Aguirre, M.; Villatoro-Gómez, K.; Dobrovinskaya, O. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist G-1 Inhibits Proliferation and Causes Apoptosis in Leukemia Cell Lines of T Lineage. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 811479. [[CrossRef](#)]
21. Wang, C.; Lv, X.; He, C.; Hua, G.; Tsai, M.-Y.; Davis, J.S. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist G-1 Suppresses Proliferation of Ovarian Cancer Cells by Blocking Tubulin Polymerization. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Sharma, G.; Hu, C.; Staquicini, D.I.; Brigman, J.L.; Liu, M.; Mauvais-Jarvis, F.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Arterburn, J.B.; Hathaway, H.J.; et al. Preclinical Efficacy of the First-in-Class GPER-Selective Agonist G-1 in Mouse Models of Obesity and Diabetes. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaau5956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Camphausen, K.; Purow, B.; Sproull, M.; Scott, T.; Ozawa, T.; Deen, D.F.; Tofilon, P.J. Influence of in Vivo Growth on Human Glioma Cell Line Gene Expression: Convergent Profiles under Orthotopic Conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8287–8292. [[CrossRef](#)]
24. Pei, Z.; Oey, N.A.; Zuidervaart, M.M.; Jia, Z.; Li, Y.; Steinberg, S.J.; Smith, K.D.; Watkins, P.A. The Acyl-CoA Synthetase “Bubblegum” (Lipidosin): Further characterization and role in neuronal fatty acid  $\beta$ -oxidation \*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47070–47078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Grube, S.; Dünisch, P.; Freitag, D.; Klausnitzer, M.; Sakr, Y.; Walter, J.; Kalff, R.; Ewald, C. Overexpression of Fatty Acid Synthase in Human Gliomas Correlates with the WHO Tumor Grade and Inhibition with Orlistat Reduces Cell Viability and Triggers Apoptosis. *J. Neurooncol.* **2014**, *118*, 277–287. [[CrossRef](#)]
26. Tao, B.-B.; He, H.; Shi, X.; Wang, C.; Li, W.; Li, B.; Dong, Y.; Hu, G.-H.; Hou, L.-J.; Luo, C.; et al. Up-Regulation of USP2a and FASN in Gliomas Correlates Strongly with Glioma Grade. *J. Clin. Neurosci.* **2013**, *20*, 717–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guo, D.; Bell, E.H.; Chakravarti, A. Lipid Metabolism Emerges as a Promising Target for Malignant Glioma Therapy. *CNS Oncol.* **2013**, *2*, 289–299. [[CrossRef](#)]
28. Yuan, Y.; Shah, N.; Almohaisin, M.I.; Saha, S.; Lu, F. Assessing Fatty Acid-Induced Lipotoxicity and Its Therapeutic Potential in Glioblastoma Using Stimulated Raman Microscopy. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7422. [[CrossRef](#)]
29. Wang, Z.; Liu, D.; Zhang, Q.; Wang, J.; Zhan, J.; Xian, X.; Du, Z.; Wang, X.; Hao, A. Palmitic Acid Affects Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells in Vitro. *J. Neurosci. Res.* **2014**, *92*, 574–586. [[CrossRef](#)]
30. Listenberger, L.L.; Han, X.; Lewis, S.E.; Cases, S.; Farese, R.V.; Ory, D.S.; Schaffer, J.E. Triglyceride Accumulation Protects against Fatty Acid-Induced Lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3077–3082. [[CrossRef](#)]
31. Hardy, S.; Langelier, Y.; Prentki, M. Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Promotes Proliferation and Reduces Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, Whereas Palmitate Has Opposite Effects. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6353–6358. [[PubMed](#)]
32. Tsai, Y.-T.; Wu, A.-C.; Yang, W.-B.; Kao, T.-J.; Chuang, J.-Y.; Chang, W.-C.; Hsu, T.-I. ANGPTL4 Induces TMZ Resistance of Glioblastoma by Promoting Cancer Stemness Enrichment via the EGFR/AKT/4E-BP1 Cascade. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Prossnitz, E.R.; Barton, M. Estrogen Biology: New Insights into GPER Function and Clinical Opportunities. *Mol. Cell Endocrinol.* **2014**, *389*, 71–83. [[CrossRef](#)]
34. Lin, S.; Miao, Y.; Zheng, X.; Dong, Y.; Yang, Q.; Yang, Q.; Du, S.; Xu, J.; Zhou, S.; Yuan, T. ANGPTL4 Negatively Regulates the Progression of Osteosarcoma by Remodeling Branched-Chain Amino Acid Metabolism. *Cell Death Discov.* **2022**, *8*, 225. [[CrossRef](#)]
35. Galaup, A.; Cazes, A.; Le Jan, S.; Philippe, J.; Connault, E.; Le Coz, E.; Mekid, H.; Mir, L.M.; Opolon, P.; Corvol, P.; et al. Angiopoietin-like 4 Prevents Metastasis through Inhibition of Vascular Permeability and Tumor Cell Motility and Invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18721–18726. [[CrossRef](#)]
36. Ito, Y.; Oike, Y.; Yasunaga, K.; Hamada, K.; Miyata, K.; Matsumoto, S.-I.; Sugano, S.; Tanihara, H.; Masuho, Y.; Suda, T. Inhibition of Angiogenesis and Vascular Leakiness by Angiopoietin-Related Protein 4. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6651–6657. [[PubMed](#)]
37. La Paglia, L.; Listì, A.; Caruso, S.; Amodeo, V.; Passiglia, F.; Bazan, V.; Fanale, D. Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. *PPAR Res.* **2017**, *2017*, 8187235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Lee, C.; Fotovati, A.; Triscott, J.; Chen, J.; Venugopal, C.; Singhal, A.; Dunham, C.; Kerr, J.M.; Verreault, M.; Yip, S.; et al. Polo-like Kinase 1 Inhibition Kills Glioblastoma Multiforme Brain Tumor Cells in Part through Loss of SOX2 and Delays Tumor Progression in Mice. *Stem Cells* **2012**, *30*, 1064–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. de Cárcer, G.; Venkateswaran, S.V.; Salgueiro, L.; El Bakkali, A.; Somogyi, K.; Rowald, K.; Montañés, P.; Sanclemente, M.; Escobar, B.; de Martino, A.; et al. Plk1 Overexpression Induces Chromosomal Instability and Suppresses Tumor Development. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3012. [[CrossRef](#)]
40. Rohrberg, J.; Van de Mark, D.; Amouzgar, M.; Lee, J.V.; Taileb, M.; Corella, A.; Kilinc, S.; Williams, J.; Jokisch, M.-L.; Camarda, R.; et al. MYC Dysregulates Mitosis, Revealing Cancer Vulnerabilities. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 3368–3382.e7. [[CrossRef](#)]
41. Dhyani, P.; Quispe, C.; Sharma, E.; Bahukhandi, A.; Sati, P.; Attri, D.C.; Szopa, A.; Sharifi-Rad, J.; Docea, A.O.; Mardare, I.; et al. Anticancer Potential of Alkaloids: A Key Emphasis to Colchicine, Vinblastine, Vincristine, Vindesine, Vinorelbine and Vincamine. *Cancer Cell Int.* **2022**, *22*, 206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Nicholson, B.; Lloyd, G.K.; Miller, B.R.; Palladino, M.A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neuteboom, S.T.C. NPI-2358 Is a Tubulin-Depolymerizing Agent: In-Vitro Evidence for Activity as a Tumor Vascular-Disrupting Agent. *Anticancer Drugs* **2006**, *17*, 25–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Berges, R.; Baeza-Kallee, N.; Tabouret, E.; Chinot, O.; Petit, M.; Kruczynski, A.; Figarella-Branger, D.; Honore, S.; Braguer, D. End-Binding 1 Protein Overexpression Correlates with Glioblastoma Progression and Sensitizes to Vinca-Alkaloids in Vitro and in Vivo. *Oncotarget* **2014**, *5*, 12769–12787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lv, X.; He, C.; Huang, C.; Hua, G.; Wang, Z.; Remmenga, S.W.; Rodabough, K.J.; Karpf, A.R.; Dong, J.; Davis, J.S.; et al. G-1 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via Targeting Colchicine-Binding Site of Tubulin to Interfere with Microtubule Assembly. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1080–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Spagnuolo, P.A.; Hu, J.; Hurren, R.; Wang, X.; Gronda, M.; Sukhai, M.A.; Di Meo, A.; Boss, J.; Ashali, I.; Beheshti Zavareh, R.; et al. The Antihelmintic Flubendazole Inhibits Microtubule Function through a Mechanism Distinct from Vinca Alkaloids and Displays Preclinical Activity in Leukemia and Myeloma. *Blood* **2010**, *115*, 4824–4833. [[CrossRef](#)]
46. Bai, R.-Y.; Staedtke, V.; Aprhys, C.M.; Gallia, G.L.; Riggins, G.J. Antiparasitic Mebendazole Shows Survival Benefit in 2 Preclinical Models of Glioblastoma Multiforme. *Neuro-Oncology* **2011**, *13*, 974–982. [[CrossRef](#)]
47. Geribaldi-Doldán, N.; Hervás-Corpión, I.; Gómez-Oliva, R.; Domínguez-García, S.; Ruiz, F.A.; Iglesias-Lozano, I.; Carrascal, L.; Pardillo-Díaz, R.; Gil-Salú, J.L.; Nunez-Abades, P.; et al. Targeting Protein Kinase C in Glioblastoma Treatment. *Biomedicines* **2021**, *9*, 381. [[CrossRef](#)]
48. Berriz, G.F.; Beaver, J.E.; Cenik, C.; Tasan, M.; Roth, F.P. Next Generation Software for Functional Trend Analysis. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 3043–3044. [[CrossRef](#)]
49. Mootha, V.K.; Lindgren, C.M.; Eriksson, K.-F.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstråle, M.; Laurila, E.; et al. PGC-1alpha-Responsive Genes Involved in Oxidative Phosphorylation Are Coordinately Downregulated in Human Diabetes. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 267–273. [[CrossRef](#)]
50. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. [[CrossRef](#)]
51. Subramanian, A.; Narayan, R.; Corsello, S.M.; Peck, D.D.; Natoli, T.E.; Lu, X.; Gould, J.; Davis, J.F.; Tubelli, A.A.; Asiedu, J.K.; et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell* **2017**, *171*, 1437–1452.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Altman, D.G.; Bland, J.M. Standard Deviations and Standard Errors. *BMJ* **2005**, *331*, 903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# Partie IV - Discussions et perspectives

---

## 1. Les gliomes, des tumeurs hormonosensibles

### 1.1. Les gliomes de bas grade

Les LGG ou gliomes de grade 2 (G2) sont des tumeurs primaires du cerveau, majoritairement des astrocytomes ou des oligodendrogliomes. Selon la classification de l'OMS 2021 des tumeurs du SNC, ils sont tous mutés pour IDH et les oligodendrogliomes se distinguent des astrocytomes par la codélétion chromosomique 1p19q. Dans la majorité des cas, les G2 progressent vers une forme plus agressive en gliomes anaplasiques ou gliomes de grade 3 (G3). Globalement, les oligodendrogliomes sont de meilleur pronostic que les astrocytomes de grade équivalent. De manière intéressante, les femmes ont une meilleure survie et sont moins touchées que les hommes par les G2 et les G3. Une hypothèse, que nous soutenons, est que ces tumeurs seraient hormonosensibles et que les œstrogènes, produits en plus grande quantité chez la femme, auraient un rôle neuroprotecteur. En effet, la prise d'un CO au cours de la vie d'une femme, tout comme la prise d'un THS à la ménopause réduisent le risque de développer un gliome (Lan et al., 2018; Felini et al., 2009). A l'inverse, les taux élevés de progestérone et d'œstrogènes produits pendant la grossesse augmentent fortement la croissance tumorale (Pallud et al., 2010). Ainsi, selon leur concentration et leur nature, les stéroïdes peuvent moduler l'apparition et le développement des gliomes. Afin de décrypter les mécanismes d'action des œstrogènes, il faut s'intéresser aux médiateurs de leurs effets : les récepteurs aux œstrogènes.

Etant donné qu'aucun modèle cellulaire provenant de LGG n'existe, nous avons utilisé les bases de données publiques de patients TCGA-LGG (117 hommes et 97 femmes) et CGGA-pLGG (116 hommes et 84 femmes) pour les étudier. Ces bases de données contiennent les données cliniques et histo-moléculaires des patients et de leur tumeur. Notre étude sur les LGG ayant débuté avant la classification de 2021, nous avons considéré certains gliomes IDHwt comme des bas grades, comme c'était le cas dans la classification de 2016. Parmi les 63 gènes différentiellement exprimés (DEG) entre les hommes et les femmes uniques aux G2, 17 sont corrélés à la survie des patients et 6 d'entre eux sont liés aux termes GO « skeletal system development », « skeletal system morphogenesis » et « ossification ». Un régulateur important de ces fonctions sont les œstrogènes, qui interviennent dans la croissance, la maturation et le renouvellement des os chez l'adulte (Khosla et al., 2012). Les 6 gènes identifiés correspondants à ces fonctions sont :

- ***MMP14*** (matrix metalloproteinase 14). De nombreuses publications montrent qu'il intervient dans la croissance, l'invasion, la migration et l'angiogenèse des GBM (Ulasov et al., 2014). Il pourrait être impliqué dans ces mêmes fonctions dans les G2 puisque nous le retrouvons comme négativement corrélé à la survie des patients.
- ***OSR2*** (odd-skipped related transcription factor 2). Les tétrahydroisoquinoléines sont utilisés pour le traitement des sarcomes à tissus mous et exercent leur effet anticancéreux en se liant et en alkylant l'ADN des cellules. Dans des cellules de GBM, l'exposition à ces composés augmente l'expression d'OSR2, ce qui conduit à l'apoptose des cellules (Tabunoki et al., 2012). Dans les G2, nous montrons à l'inverse que son expression est de mauvais pronostic. Cette tendance est confirmée dans d'autres modèles comme dans celui du cancer de la vessie invasif (Uysal et al., 2021). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre dans quelle circonstance OSR2 est de bon ou mauvais pronostic.
- ***LTF*** (lactotransferrin). La protéine lactoferrine est utilisée comme un agent anticancéreux dans les cellules de GBM pour diminuer leur prolifération (Arcella et al., 2015). Nous montrons à l'inverse que son expression est de mauvais pronostic dans les G2. Il est possible que la LTF soit de mauvais pronostic en perturbant le microenvironnement tumoral. En effet, il peut favoriser la conversion des macrophages M2 vers un phénotype M1, décrit récemment comme étant corrélée à une faible survie des patients atteints de GBM (Zhou et al., 2020; Gao et al., 2018).
- ***TGFβ2***. L'expression des TGFβ sont de mauvais pronostic dans les GBM et sont la cible de nouvelles thérapies (Chao et al., 2021) . Nous confirmons ces observations dans les G2.
- ***HOXA4*** et ***HOXA5*** (homeobox A cluster). Les gènes *HOX* sont habituellement réprimés dans les tissus adultes, mais souvent dérégulés dans les tumeurs cérébrales (Gonçalves et al., 2020). Dans les gliomes, les clusters de gènes *HOX* peuvent se réactiver suite à la perte de H3K27me3 et donc être de mauvais pronostic (Le Boiteux et al., 2021). Nous confirmons dans les G2 que l'expression d'*HOXA4* et *HOXA5* est négativement corrélée à la survie.

L'ensemble des gènes ci-dessus sont négativement corrélés à la survie des patients atteints de G2, ce qui pourrait en faire de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes. Un modulateur de l'expression de ces gènes sont les œstrogènes. En effet, l'E2 diminue l'expression de MMP14, TGFβ2 et LTF (Fan et al., 2014; Sniekers et al., 2010). Les femmes ayant une

meilleure survie que les hommes atteints de gliomes, il est possible que l'E2 soit favorable à leur survie en diminuant l'expression de ces gènes (Ostrom et al., 2018). A l'inverse, l'E2 via ER $\alpha$  et ER $\beta$  augmente l'expression d'HOXA5 (Hussain et al., 2020). Dans les G2, l'augmentation du taux d'hormones pendant la grossesse est un facteur aggravant de la croissance tumorale (Pallud et al., 2010). Une hypothèse qui pourrait expliquer cela est que les forts taux d'œstrogènes produits durant la grossesse augmentent l'expression des gènes *HOX*, défavorable à la survie des patients atteints de G2.

Pour comprendre les modalités d'évolution d'un G2 vers un G3, nous avons identifié les gènes différentiellement exprimés entre les grades 3 et 2 (gDEG), que nous avons ensuite stratifiés selon le genre des patients. Chez l'homme et la femme, les gDEG renvoient majoritairement vers des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la division cellulaire. Cela appuie l'idée que les G3 sont issus de l'évolution d'un G2 à cause d'une accélération de la prolifération cellulaire.

Par la même approche que pour les G2 (G3\_TCGA-LGG : 136 hommes et 101 femmes ; G3\_CGGA-pLGG : 91 hommes et 64 femmes), nous avons identifié 66 DEG uniques aux G3 dont 31 sont corrélées à la survie des patients, mais qui ne correspondent à aucun enrichissement de termes GO. En stratifiant selon le sous-type IDH et la codélétion 1p19q, on retrouve 22 DEG dont 3 sont liés à la survie dans les G3 IDHwt :

- ***ISL2*** (ISL LIM homeobox 2). Une autre étude bio-informatique centrée sur la base de données CGGA-pLGG montre qu'une forte expression d'*ISL2* est de mauvais pronostic dans tous les grades (Y. Jiang et al., 2020). Nous confirmons cette tendance en la spécifiant dans les G3 IDHwt. La surexpression de ce facteur de transcription participe à une boucle de rétroaction avec miR342-3p pour promouvoir l'angiogenèse des GBM et contrôler la prolifération cellulaire et la transformation maligne des oligodendrogliomes (Y. Jiang et al., 2020). Il est possible qu'il intervienne dans ces mêmes fonctions dans les G3 IDHwt.
- ***IL1RN*** (interleukin 1 receptor antagonist). Sa forme protéique IL-1ra peut contrecarrer les fonctions d'IL-1 et ainsi favoriser la prolifération des cellules de GBM (Oelmann et al., 1997). A l'inverse, nous montrons que son expression est favorable à la survie des patients atteints de G3 IDHwt. La production d'IL-1ra est augmentée par la signalisation dépendante de GPER après un AVC, ce qui permet de préserver les fonctions cognitives

(Bai et al., 2020). Une hypothèse est donc que GPER augmente l'expression d'*IL1RN* pour exercer une activité antitumorale.

- ***HOXD13***. Chez les patients atteints de GBM IDHmut (selon la classification de l'OMS 2007), l'hyperméthylation du promoteur d'*HOXD13* est un facteur qui caractérise les patients survivants moins d'un an (Shinawi et al., 2013). Dans les GBM, miR-7156 diminue le niveau d'expression d'*HOXD13*, ce qui conduit à une meilleure survie des patients (J. Zhang et al., 2020). Nous confirmons dans les G3 IDHwt que son expression est un facteur de mauvais pronostic.

Il est intéressant de retrouver un gène de la famille des *HOX* comme inversement corrélé à la survie des G3, puisque certains *HOX* le sont aussi dans les G2. Cela renforce l'idée que les G3 sont issus de la progression d'un G2. Cette famille de gènes est impliquée dans le développement et la détermination de l'identité des différents segments morphologiques de chaque partie du corps dont l'expression est régulée par les hormones stéroïdiennes. Ainsi, une hypothèse est que l'apparition de ces tumeurs ferait suite à des altérations hormonales et/ou épigénétiques du développement. Une autre étude bio-informatique a caractérisé plus précisément l'implication des gènes *HOX* dans la survie des patients atteints de LGG. Ainsi, une expression élevée d'*HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11* et *HOXA13* est toujours corrélée à une OS et une PFS plus courtes (Xiulin et al., 2022). Comme décrit précédemment, les gènes *HOX* sont naturellement régulés par les œstrogènes. Par exemple, l'E2 peut augmenter l'expression d'*HOXA10* (Kulak et al., 2013). Il est donc possible que sous certaines conditions, les œstrogènes soient plutôt favorables à la progression des gliomes comme c'est le cas pendant la grossesse où les œstrogènes sont produits à des niveaux élevés.

Si les gènes *HOX* sont essentiels au développement fœtal, une dérégulation de leur niveau d'expression peut avoir pour conséquence l'apparition de malformations congénitales. Etant donné que leur expression est régulée par les œstrogènes, une exposition au cours de la vie fœtal à des PE peut aboutir à ce type d'anomalie du développement. Par exemple, le diéthylstilbestrol induit l'expression d'*HOXA9* et *HOXA10* à des taux environ deux fois supérieurs à celle induite par l'E2, ce qui conduit à l'apparition de défauts du développement de l'appareil reproducteur (Block et al., 2000). De même, le BPA entraîne une surexpression d'*HOXA10*, ce qui conduit à des défauts de décidualisation (Cimmino et al., 2020). Les données épidémiologiques récentes tendent à montrer que les tumeurs cérébrales sont de plus en plus

fréquentes dans la population générale (Grech et al., 2020). Si le développement des gliomes de G2 et G3 implique des défauts épigénétiques du développement, il est possible que la surexposition de la population aux PE au cours de ces dernières années ait contribué à leur plus grande incidence dans les nouvelles générations.

Les effets des œstrogènes et des PE étant médiés par leurs récepteurs, nous avons réalisé une étude supervisée pour étudier le lien entre l'expression de certains acteurs de la stéroïdogénèse et la survie des patients. Le nombre de patients atteints de grade 2 étant trop faible pour assurer une robustesse statistique suffisante, nous avons uniquement considéré les G3 que nous avons subdivisés selon le statut IDH, la codélétion 1p19q et le sexe des patients dans notre étude supervisée. Le facteur pronostic de l'expression du récepteur aux androgènes (AR) chez l'homme est particulier : lorsqu'il est faiblement exprimé, il est de bon pronostic dans les IDHwt et de mauvais pronostic dans les IDHmut. Il semblerait donc que le statut mutationnel d'IDH influe sur la fonctionnalité d'AR chez les hommes. Un facteur pouvant expliquer ces différences est la production de D-2-HG suite à la mutation d'IDH. Aucune donnée ne confirme cela dans les gliomes, mais dans le cancer de la prostate, la mutation d'IDH1 produit l'oncométabolite R-2-HG qui stimule la voie de signalisation TGF $\beta$ /p-Smad2/3 impliquée dans l'invasion des cellules. De manière intéressante, une forte expression d'AR permet de réduire cette signalisation dépendante du R-2-HG (Xu et al., 2020). Une hypothèse est donc que la signalisation dépendante d'AR puisse réduire les effets néfastes du D-2-HG dans les gliomes en limitant la même voie de signalisation.

L'aromatase (*CYP19A1*), *ESR1* (qui code pour ER $\alpha$ ) et *ESR2* (qui code pour ER $\beta$ ) ne sont de bons pronostics que lorsqu'ils sont faiblement exprimés, tandis que l'expression de *PR* n'est pas corrélée à la survie des patients (**Tableau 2**). Ainsi, la forte expression de *CYP19A1* dans les gliomes conduirait donc à l'augmentation locale de la production d'œstrogènes qui serait défavorable à la survie des patients. Cette observation semble cohérente avec le fait que la prise d'un CO diminue le risque d'apparition d'un gliome puisque l'augmentation du taux d'œstrogènes et de progestérone dans le sang va exercer un rétrocontrôle négatif et potentiellement réduire l'E2 localement produit dans le cerveau (Kenealy et al., 2017). Les effets des œstrogènes dans le cerveau sont dépendants d'ER $\alpha$  et ER $\beta$ , dont l'expression est de mauvais pronostic dans les G3. Ainsi, l'augmentation du taux d'œstrogènes circulant pendant la grossesse activerait fortement les ER, ce qui pourrait expliquer pourquoi la croissance tumorale est accélérée dans ces conditions. A l'inverse, l'augmentation du taux de progestérone



durant la grossesse pourrait ne pas être un facteur aggravant de la croissance tumorale puisque l'expression de *PR* n'est pas corrélée à la survie des patients atteints de LGG (Pallud et al., 2010). Il est aussi possible que la faible expression d'*ESR1* et *ESR2* soit bénéfique à la survie des patients en réduisant l'action délétère des PE présents dans l'environnement, comme le BPA. En effet, la concentration plasmatique en BPA chez des patients atteints de gliomes est plus élevée que dans la population générale (Komarowska et al., 2022). Bien que le BPA puisse être un facteur favorable à la survenue des gliomes, de nouvelles études sont nécessaires pour savoir si l'exposition au BPA amplifie/accélère la croissance tumorale.

Une forte expression de *GPER1* est favorable à la survie des femmes atteintes d'un G3 IDHwt et IDHmut. Cette tendance est retrouvée dans la population générale dans les ostéosarcomes, les cancers gastriques et colorectaux (Tian et al., 2019; Wang et al., 2019; Liu et al., 2017). De manière intéressante, GPER est le seul ER qui est de bon pronostic quand il est fortement exprimé. Les différences d'affinité des ligands pour les ER pourraient être une piste d'explication de cette divergence de pronostic. Par exemple, l'E2 a une affinité pour les ER nucléaires 15 à 30 fois plus importante que pour GPER (Prossnitz and Arterburn, 2015). Un autre de ces ligands est la génistéine, un œstrogéno-mimétique retrouvé dans l'alimentation végétale. Dans des cellules de GBM, la génistéine provoque une diminution de la prolifération et de la viabilité cellulaire (X. Liu et al., 2021). Cela concorde aussi avec le fait que les populations asiatiques qui sont les plus grandes consommatrices de calories végétales au monde présentent l'incidence des tumeurs cérébrales la plus faible (Leece et al., 2017). Une récente publication montre que les effets de la génistéine sont dépendants de GPER dans des astrocytes (Ariyani et al., 2020). Ainsi, il est possible que les effets de la génistéine soient amplifiés chez les patients exprimant fortement *GPER1*, ce qui pourrait expliquer leur meilleure survie. D'autres pistes peuvent expliquer le bénéfice de la forte expression sur la survie des patientes. Par exemple, l'activation de GPER par le G-1 augmente en retour la production du marqueur pro-inflammatoire IL-1ra, décrit précédemment comme étant favorable à la survie des patients (Bai et al., 2020). Il est aussi possible que le facteur pronostic de GPER ne soit pas dépendant d'un ligand en particulier. En effet, il a récemment été démontré que GPER augmente l'expression de pERK1/2, diminue celle de l'AMPc, de NFAT (nuclear factor of activated T cells) et de Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) en l'absence de ligand (Tutzauer et al., 2021). Plusieurs publications ont déclaré que le point culminant de l'induction de l'apoptose par GPER était dû à une expression prolongée importante de pERK (Qiu et al., 2021;

Chimento et al., 2013). Il est alors possible que dans les gliomes, la forte expression de GPER soit bénéfique en déclenchant ce type de signalisation.

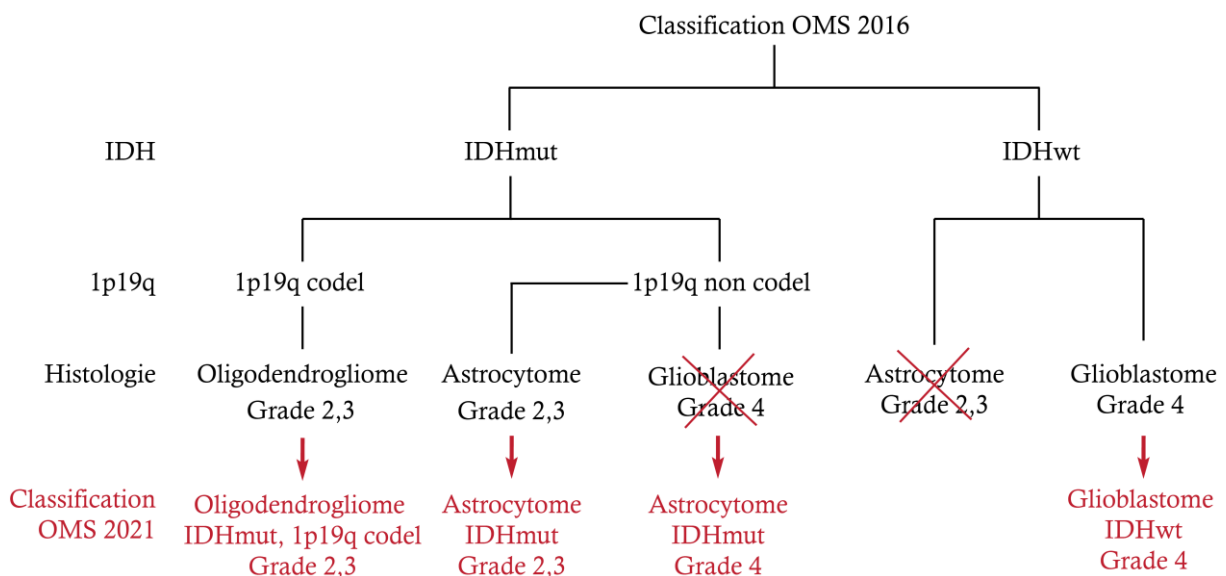
Notre étude sur les LGG ayant débuté avant la classification de l’OMS de 2021, nous avons considéré certains des gliomes IDHwt comme des bas grades, puisqu’ils étaient étiquetés de cette manière dans la base de données TCGA-LGG. Dorénavant, ces gliomes sont considérés comme des GBM. Il est donc essentiel à l’avenir de prendre en compte cette modification pour correspondre au mieux à la nouvelle classification des gliomes.

## 1.2. Les glioblastomes

Les GBM sont les tumeurs primaires du cerveau avec le plus mauvais pronostic. Selon la classification de l’OMS des tumeurs du SNC parue en 2021, les GBM sont uniquement IDHwt, tandis que les anciens GBM IDHmut sont maintenant reclassés en astrocytome de grade 4. Cette nouvelle classification supprime le terme de GBM primaire et secondaire, et présente clairement les gliomes de bas grade IDHmut comme des pathologies différentes des GBM IDHwt (**Tableau 3**) (Louis et al., 2021).

**Tableau 3 : Comparatif entre la classification de l’OMS des tumeurs du SNC de 2016 et de 2021.**

Les changements apportés à la classification de 2021 par rapport à celle de 2016 sont mis en évidence en rouge dans le tableau (Louis et al., 2021, 2016).



Le traitement standard du GBM est une résection chirurgicale associée à une radiochimiothérapie concomitante à base de TMZ, qui augmente de quelques mois la survie des patients. De ce fait, de nouvelles thérapies plus efficaces sont nécessaires pour la prise en charge des patients. Une de ces pistes thérapeutiques, encore peu exploitée, est de prendre en compte le caractère hormonosensible de ces tumeurs. En effet, tout comme les gliomes de plus bas grade, les femmes ont une meilleure survie et sont moins touchées que les hommes par les GBM, probablement grâce aux œstrogènes qui leur confèrent une neuroprotection (Gittleman et al., 2019; Ostrom et al., 2018). De plus, les travaux récents de l'équipe de Sarredy montrent que les ER nucléaires ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 5 sont impliqués, à différents niveaux, dans le contrôle de la prolifération, la migration et la résistance aux traitements (Liu et al., 2018; Li et al., 2013). Comme c'est le cas dans les G3 IDHmut et IDHwt (reclassés en GBM depuis 2021), nous avons voulu vérifier si l'expression du récepteur GPER était aussi de bon pronostic lorsqu'il est fortement exprimé dans les GBM à partir d'une analyse sur une plus grande cohorte de patients.

Nous avons pu confirmer dans la base de données TCGA-GBM (69 hommes et 30 femmes), en sélectionnant exclusivement les GBM IDHwt, que la forte expression de GPER est de bon pronostic uniquement chez les femmes. Les gènes corrélés à la forte expression de GPER chez les femmes porteuses d'une tumeur IDHwt sont liés notamment au développement vasculaire. L'implication de GPER dans l'angiogenèse est encore grandement débattue. Par exemple, dans des modèles cellulaires de cancer du sein, l'activation de GPER peut supprimer l'angiogenèse en inhibant la voie NF- $\kappa$ B/IL-6 ou à l'inverse induire l'angiogenèse par la signalisation IGF1/IGF1R (De Francesco et al., 2017; Liang et al., 2017). Ainsi, il faut caractériser plus en détail le rôle de GPER dans les GBM pour comprendre à quel niveau il est impliqué dans leur vascularisation. Etant donné qu'il est de bon pronostic lorsqu'il est fortement exprimé, on peut espérer qu'il ait un effet suppresseur de l'angiogenèse. Toutes les autres hypothèses discutées précédemment pour les G3 IDHmut sont aussi valables pour les GBM.

Nos approches bio-informatiques mettent en évidence que de nombreux acteurs de la signalisation stéroïdienne sont impliqués dans la survie des patients. Pour mettre à jour cette étude, il faudrait prendre en compte la nouvelle classification de l'OMS de 2021 en séparant dans les bases de données TCGA-LGG les gliomes IDHwt, qui sont de fait des GBM aujourd'hui. De même, la prise en compte de nouveaux marqueurs comme la délétion CDKN2A/B, l'amplification d'EGFR et de TERT permettrait de diviser les GBM en nouveaux sous-groupes.

A partir de nos résultats, qui s'ajoutent à ceux de la littérature, nous proposons de classer les gliomes comme des tumeurs sensibles aux hormones, et en particulier aux œstrogènes. Nous avons aussi montré pour la première fois que GPER pouvait être un facteur important de la survie dans les LGG et dans les GBM. Etant donné qu'aucun modèle cellulaire provenant de LGG n'existe, nous avons investigué dans des cellules de GBM les conséquences de l'activation de GPER par son ligand spécifique, le G-1 et évalué si cela pouvait constituer une nouvelle piste de traitement des GBM.

## **2. Le G-1, une chimiothérapie prometteuse pour les glioblastomes ?**

L'utilisation de l'E2 pour étudier spécifiquement les voies de signalisation déclenchées par GPER dans les lignées cellulaires de GBM n'est pas possible puisqu'elles expriment aussi ER $\alpha$  et ER $\beta$  (résultats complémentaires de l'article 2). C'est pour cette raison que nous avons utilisé le premier agoniste synthétique spécifique de GPER, le G-1 pour étudier exclusivement la signalisation dépendante de GPER.

Dans les lignées de GBM, nous montrons que le G-1 à 1  $\mu$ M provoque une diminution de la prolifération caractérisée par une altération de la polymérisation de la tubuline et un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Ces résultats sont cohérents avec ceux retrouvés dans d'autres modèles cellulaires (Torres-López et al., 2022; Wang et al., 2013). Nous confirmons les effets antiprolifératifs du G-1 *in vivo* en montrant qu'il réduit la taille des tumeurs greffées en hétérotopique chez des souris nudes femelles. De manière intéressante, nous n'avons pas pu confirmer ces résultats chez des souris nudes mâles. Il est donc possible qu'une partie des effets du G-1 *in vivo* soit dépendant de GPER et que cela soit bénéfique uniquement pour les femelles. Cela pourrait concorder avec les résultats de notre approche bio-informatique dans laquelle l'expression de GPER n'est favorable qu'à la survie des femmes.

En revanche, nous n'avons pas été en mesure de confirmer une induction de l'apoptose en réponse au G-1 *in vitro*, comme cela peut être le cas dans d'autres modèles cellulaires à cause d'une activation prolongée de pERK1/2 (résultats complémentaires de l'article 2) (Qiu et al., 2021; Chimento et al., 2013). Nous avons aussi vérifié que l'autophagie, la nécrose et la senescence n'étaient pas des mécanismes induits par le G-1 (résultats complémentaires de l'article 2). Le G-1 est aussi connu pour moduler la migration et l'invasion des cellules (Liang et al., 2017). Dans notre étude, le G-1 diminue la migration des cellules U251 par une réduction du taux de MMP14 d'environ deux fois. Cependant, nous n'avons pas pu valider ces résultats

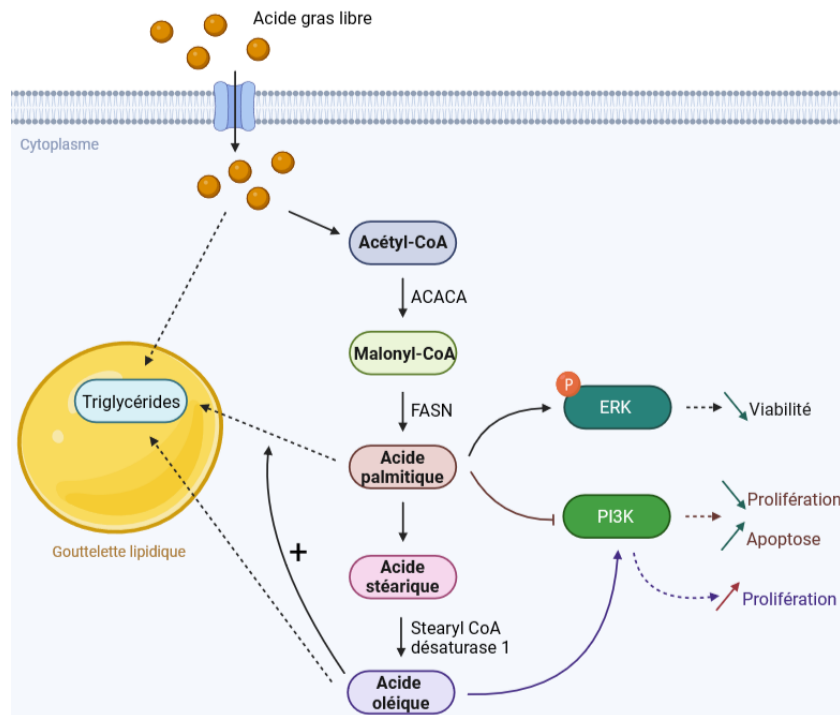
dans la lignée LN229 et l'analyse transcriptomique de la lignée U251 exposée au G-1 ne présente pas d'enrichissement des voies de signalisation impliquée dans la migration cellulaire. Il semblerait donc que les effets du G-1 sur la migration cellulaire ne soient que des effets mineurs comparés à ceux sur la prolifération.

Dans notre étude *in vitro*, Nous avons décidé de combiner l'utilisation du G-1 avec celui du TMZ pour tenter d'amplifier les effets individuels de ces deux molécules. La combinaison avec le TMZ amplifie la diminution de la prolifération et empêche la reprise de la prolifération après le retrait de ces composés du milieu de culture. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure d'observer une induction de la mort des cellules par apoptose avec la combinaison TMZ + G-1. Pour poursuivre notre étude chez l'animal, nous souhaiterions combiner le G-1 au TMZ pour essayer d'amplifier la réduction du volume tumorale. Cette approche *in vivo* sera aussi l'occasion de lever certains verrous importants pour une potentielle utilisation du G-1 en clinique. Il faudra tout d'abord s'assurer du passage de la BHE par le G-1. Pour cela, nous disposons de la signature transcriptomique du G-1 et nous pourrions vérifier si elle est retrouvée dans le cerveau des souris après traitement au G-1. De même, nous n'avons pas encore évalué la toxicité du G-1 pour les cellules saines, mais d'après quelques essais précliniques déjà réalisés dans d'autres contextes, il semblerait que cette molécule soit bien tolérée (Sharma et al., 2020a).

Dans les cellules de GBM, nous avons voulu caractériser en détail les mécanismes d'action du G-1 en traitant les cellules à deux doses (IC50, 1  $\mu$ M) et à deux temps différents (24 h et 72 h). Ce raffinement des conditions expérimentales nous a permis de déceler deux processus antiprolifératifs distincts du G-1.

En effet, le G-1 à l'IC50 perturbe le métabolisme lipidique. Il augmente notamment l'expression d'*ACACA* et de *FASN*, deux acteurs majeurs de cette signalisation. L'enzyme *ACACA* assure la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, pris ensuite en charge par *FASN* pour sa conversion en acide palmitique (PA). Le PA est le précurseur de la synthèse des phospholipides, des triglycérides (TG), des esters de cholestérol et de l'acétylation des protéines. L'activation du métabolisme lipidique et en particulier l'augmentation de l'expression d'*ACACA* ont récemment été démontrés *in vivo* (Sharma et al., 2020b). Habituellement, une augmentation de l'expression de *FASN* est décrite comme étant de mauvais pronostic puisque son expression est corrélée au grade du gliome : plus il est haut, plus *FASN* est exprimée (Grube et al., 2014; Tao et al., 2013). De même, la stimulation du métabolisme lipidique est une source d'énergie pour les cellules et contribue à leur prolifération

(Guo et al., 2013). A l'inverse, nous constatons que la stimulation de cette voie de signalisation par le G-1 est concomitante de la diminution de prolifération des cellules de GBM. Une hypothèse pouvant expliquer cela est que l'augmentation de l'expression de FASN conduit à une production excessive de PA libre dans les cellules, décrit comme pouvant entraîner une perte de viabilité des cellules (Yuan et al., 2021). Cependant, les effets du PA dépendent de l'équilibre entre la production d'acide oléique (OA) et de PA. Par exemple, dans les cellules MDA-MB-231, une exposition des cellules à l'OA augmente leur prolifération, tandis que le PA diminue leur prolifération et induit leur apoptose en inhibant la PI3K (Hardy et al., 2000). Il est également montré que le PA est cytotoxique pour les cellules souches neurales (Z. Wang et al., 2014). Les effets lipotoxiques du PA peuvent être réduits lorsqu'il est incorporé dans des gouttelettes lipidiques sous forme de triPA. De manière intéressante, cette conversion de PA en triPA est favorisée par l'OA (**Figure 36**) (Listenberger et al., 2003). Dans les cellules de GBM traitées au G-1, seule l'expression de FASN est augmentée et non celle de la steryl CoA désaturase 1 qui produit l'OA. Il est donc possible que la production de PA soit plus forte que celle de l'OA, ce qui conduit à la diminution de la prolifération des cellules. En parallèle, nous n'observons pas d'accumulation de gouttelettes lipidiques dans nos cellules, ce qui serait le signe d'un échappement des cellules aux effets lipotoxiques du PA. Il est donc possible que dans les cellules de GBM, GPER exerce des effets lipotoxiques via l'augmentation du taux de PA. Cette hypothèse peut être confirmée en mesurant les quantités relatives d'OA et de PA dans les cellules après traitement au G-1.



**Figure 36 : Résumé de l'implication du métabolisme lipidique dans les processus cancéreux.**

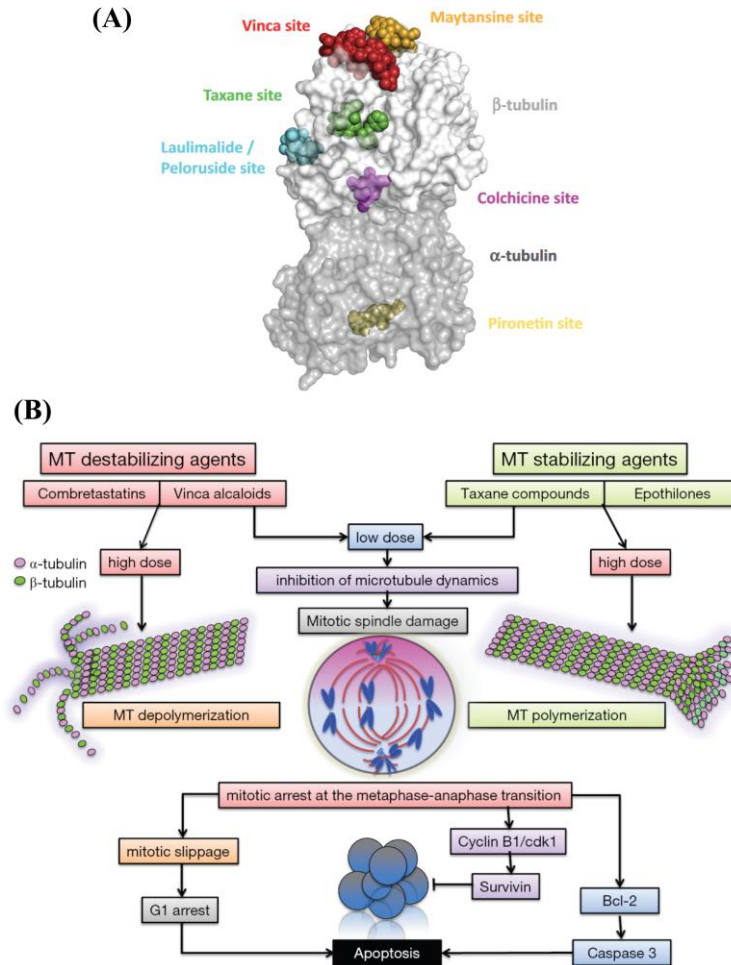
Le malonyl-CoA est converti en acide palmitique (PA) par l'enzyme FASN. Le PA peut rester sous forme libre afin d'activer la voie pERK1/2 et inhiber la PI3K, ce qui provoque une perte de la viabilité des cellules et leur mort par apoptose. Les effets lipotoxiques du PA peuvent être atténués s'il est converti en triglycéride et incorporé dans des gouttelettes lipidiques. L'acide palmitique peut aussi être converti en acide oléique (OA). L'OA libre possède des effets inverses à ceux de l'acide palmitique : il augmente la prolifération des cellules et une quantité trop importante d'OA dans les cellules favorise la conversion et l'incorporation du PA dans les gouttelettes lipidiques (Yuan et al., 2021; Listenberger et al., 2003; Hardy et al., 2000).

Par notre approche transcriptomique, nous avons mis en évidence que le traitement à 1  $\mu\text{M}$  de G-1 dans les cellules U251 augmente l'expression de plusieurs acteurs de la maturation et de la séparation des centrosomes qui participent à la transition du cycle cellulaire en phase G2/M. Le régulateur clé de cette voie de signalisation est *PLK1*. Dans des cellules de GBM, une réduction du taux de *PLK1* par siRNA entraîne une diminution de la prolifération cellulaire (Lee et al., 2012). Cependant, une surexpression de *PLK1* peut aussi entraîner des défauts de ségrégation chromosomique et une cytokinèse anormale, générant des cellules plurinucléées avec un potentiel prolifératif réduit (de Cárcer et al., 2018). Au niveau cellulaire, nous confirmons que le G-1 perturbe la division cellulaire et notamment la polymérisation de la tubuline avec l'apparition anormale de cellules plurinucléées. Toutefois, bien que ces effets

fassent du G-1 une molécule antiproliférative efficace, nous n'avons pas été en mesure de confirmer que ses effets sont dépendants de la présence de GPER.

Des effets du G-1 indépendants de GPER ont été montrés dans de nombreux autres modèles cancéreux (Gui et al., 2015; Mori et al., 2015; Ignatov et al., 2013a; Wang et al., 2013). Pour confirmer que les effets du G-1 sont dépendants ou indépendants de GPER, nous construisons actuellement une lignée cellulaire U251 KO pour GPER par la méthode CRISPR/Cas9. Une fois la lignée établit, nous pourrions vérifier si le G-1 est toujours capable de bloquer la prolifération des cellules en absence totale de GPER. En effet, certains auteurs ont montré que le modèle le plus plausible d'action du G-1 serait qu'il interagisse directement avec le site de fixation de la colchicine aux microtubules pour bloquer la division cellulaire (Lv et al., 2017). Par notre analyse transcriptomique, nous montrons que la signature moléculaire du G-1 est très proche de celle d'agents ciblant les microtubules comme le mébendazole, la vincristine ou la vinblastine (**Figure 37**). Le mébendazole est capable de se lier directement au site de fixation de la colchicine. Des études *in vivo* ont montré qu'il était bien toléré par les animaux et qu'il pouvait être combiné au TMZ pour induire une diminution de la masse tumorale plus importante (Bai et al., 2011). Sa faible toxicité chez l'Homme a été confirmée dans une étude clinique de phase 1 dans des GBM nouvellement diagnostiqués après un premier traitement standard (Gallia et al., 2021). Cependant, l'efficacité du mébendazole est très faible (Patil et al., 2022). La vincristine et la vinblastine appartiennent à la famille des vinca alcaloïdes et se lient donc au site de fixation vinca. Une méta-analyse a ainsi montré que l'utilisation de la vincristine en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme la lomustine pouvait conduire à un gain de survie de 10 mois chez les patients porteurs d'un GBM, tandis que la combinaison avec le TMZ antagoniserait les effets bénéfiques de la vincristine avec une survie passant de 6,9 mois à 0,3 mois avec le TMZ (Aydin et al., 2010). Dans des gliomes pédiatriques, la vinblastine conduit à une PFS similaire à celle du TMZ de première ligne et la présente comme une alternative viable (Bouffet et al., 2012). En plus des données présentes dans la littérature, nos analyses confirment que le G-1 pourrait être un agent efficace pour le ciblage des microtubules et ces propriétés le désignent comme une thérapie prometteuse pour limiter la prolifération des cellules de GBM.





**Figure 37 : site de fixation des agents de ciblage des microtubules et leurs mécanismes d'action.**

(A) Sites de liaison des agents ciblant les microtubules sur la tubuline. Le monomère  $\alpha$ -tubuline est représenté en gris foncé et le monomère  $\beta$ -tubuline en gris clair. Le site de fixation des différents ligands est associé au code couleur suivant : vert (site taxane), cyan (site laulimalide/péloruside), magenta (site colchicine), rouge (site vinca), orange (site maytansine) et jaune (site pironétine). (B) Schéma décrivant les mécanismes d'action des différentes classes d'agents ciblant les microtubules. A forte dose, les vinca alcaloïdes induisent la dépolymérisation des microtubules, tandis que les taxols favorisent à l'inverse leur polymérisation. A faible dose, tous les agents de liaison aux microtubules inhibent la dynamique des microtubules et empêchent l'alignement et la ségrégation des chromosomes en anaphase, ce qui entraîne l'arrêt mitotique et l'apoptose. Ce mécanisme se passe en deux temps : tout d'abord en provoquant un arrêt de la prolifération à cause d'un défaut de ségrégation des chromosomes en anaphase et ensuite par un échappement à ce mécanisme nommé mitotic slippage qui provoque l'apparition de cellules plurinuclées et un arrêt des cellules en phase G1 qui conduira vers la mort des cellules par apoptose (Steinmetz and Prota, 2018; Calinescu and Castro, 2016). Si le G-1 fait bien partie de cette classe de molécule, le fait que nous observons un arrêt des cellules en phase G2/M et une absence d'apoptose témoigne du fait que les cellules ne mettent pas en place le mécanisme de mitotic slippage.

Si le G-1 fait bien partie de cette famille de molécules ciblant les microtubules, son utilisation éventuelle pour le traitement des gliomes pose la question du passage de la BHE, même si certaines drogues ciblant les microtubules sont tout de même capables de traverser efficacement cette barrière (Horne et al., 2021). Dans le cas où le G-1 ne passerait pas la BHE, plusieurs solutions peuvent être envisagées pour pallier ce problème. L'utilisation de nanoparticules est grandement investiguée dans les GBM pour cette raison. Par exemple, une nanoparticule combinant colchicine et gadolinium présente des effets intéressants pour la visualisation des tumeurs en IRM tout en exerçant les effets antitumoraux de la colchicine. Malheureusement, dans le modèle utilisé pour cette étude, le passage de la BHE par le composé n'a pas été investigué (L. Zhang et al., 2020). Une autre piste est de combiner le G-1 avec la radiothérapie, qui a l'avantage d'exercer des effets antitumoraux tout en affectant la perméabilité de la BHE (Hart et al., 2022). Pour poursuivre notre étude chez l'animal, nous souhaiterions établir une étude pré-clinique plus représentative des GBM en implantant les tumeurs en orthotopique. De cette manière, nous pourrions vérifier que le G-1 est capable de traverser la BHE pour atteindre la tumeur et diminuer la vitesse de croissance tumorale. Nous souhaiterions ainsi combiner les effets du G-1 avec ceux de la radiothérapie pour tenter d'amplifier la réponse au traitement et de favoriser le passage du G-1 à travers la BHE.

Un des intérêts majeurs de l'utilisation du G-1 est qu'il induit très peu ou pas d'effets secondaires chez l'animal. De plus, l'effet antitumoral du G-1 combiné à celui du TMZ serait aussi un moyen de réduire la dose de TMZ administrée chez les patients pour réduire les effets secondaires de la chimiothérapie. Une des particularités notables du G-1 est qu'il est responsable de deux effets antiprolifératifs distincts : d'une part en perturbant le métabolisme lipidique et d'autre part en ciblant les microtubules. De ce fait, son utilisation pourrait être envisagée pour la prise en charge des patients atteints de GBM. L'étude clinique de phase I/IIA initiée pour le traitement des mélanomes avancés sera aussi en mesure de montrer si le G-1, administré par voie orale, est bien toléré par les patients.

### **3. Faut-il cibler l'expression ou la fonctionnalité de GPER ?**

Sur la base d'un faible nombre de publications, GPER a été classé comme un récepteur aux œstrogènes par l'IUPHAR en 2007. Ce classement est encore aujourd'hui sujet à controverse, notamment parce que plusieurs équipes n'ont pas été en mesure de confirmer que l'E2 est capable d'induire une signalisation dépendante de GPER (Otto et al., 2008; Pedram et al., 2006; Thomas et al., 2005; Zeitoun et al., 1999). De même, il semblerait que l'E2 et le G-1 soient

aussi capables d'interagir directement avec la forme membranaire d'ER $\alpha$ 36, ce qui conduit aussi à l'activation de la voie MAPK/pERK1/2 et à la mobilisation de calcium intracellulaire (Kang et al., 2010). De ce fait, il est possible que certaines voies de signalisation attribuées à GPER soient en réalité initiées par ER $\alpha$ 36. De même, la description de certaines voies de signalisation présentées comme dépendantes de GPER est parfois remise en cause. En effet, de nombreuses publications ne s'assurent plus de vérifier que les effets du G-1 sont dépendants de GPER, alors que plusieurs équipes recensent des effets du G-1 indépendants de GPER (Gui et al., 2015; Mori et al., 2015; Ignatov et al., 2013a; Wang et al., 2013). Pour ces raisons, il est nécessaire d'identifier de nouveaux ligands spécifiques uniquement de GPER pour comprendre les mécanismes qu'il régule. Une de ces pistes est la création de nouveau ligand d'ER nommé PaPE pour « pathway preferential estrogens » qui activent uniquement la signalisation membranaire d'ER $\alpha$  tout en limitant les effets directs du récepteur dans le noyau. Cette stratégie repose essentiellement sur des ligands ayant une affinité plus faible que l'E2 pour les ER (Madak-Erdogan et al., 2016). Cette approche pourrait donc être une piste prometteuse pour identifier de nouveaux ligands de GPER.

Un ligand présumé de GPER est le TAM, utilisé notamment dans le traitement du cancer du sein. Plusieurs essais cliniques sur l'utilisation du TAM dans le traitement du GBM, seul ou en combinaison, montrent parfois des réponses cliniques intéressantes (Abdelmaksoud, 2016). Dans le cancer du sein, une forte expression de GPER est corrélée à une diminution de la réponse des patientes au TAM (Sjöström et al., 2014). Cela peut être due au fait que l'activation de GPER par le TAM stimule l'expression de l'aromatase, qui en retour, augmente la production d'E2 locale, ce qui constitue un mécanisme de résistance des cellules au TAM (Catalano et al., 2014). Dans les gliomes, une forte expression de GPER est un facteur favorable à la survie des patients. Le TAM provoque l'apoptose des cellules de GBM U87 et U251 (Qu et al., 2019). Il est donc possible que les mécanismes de résistance au TAM présentés dans le cadre du cancer du sein n'aient pas lieu dans les gliomes. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les GBM n'expriment plus ER $\alpha$ , la cible préférentielle du TAM (Tavares et al., 2018). De ce fait, il est possible que les patients qui ont le mieux répondu au TAM lors des essais cliniques étaient ceux qui exprimaient le plus GPER. Ces études n'ayant pas caractérisé le profil d'expression des ER des patients, il sera important à l'avenir d'évaluer leur niveau d'expression pour voir si une corrélation existe avec la réponse au traitement.

GPER peut aussi lier une autre famille de molécules, les PE. On lui attribue notamment les effets anti-inflammatoires de la génistéine dans les cellules de la microglie (Du et al., 2018). Sur des cellules dérivées de gliomes de bas grade, la génistéine réduit fortement l'expression de MMP2, un médiateur important de l'angiogenèse (Yazdani et al., 2016). Un traitement combinant radiothérapie et génistéine sur des cellules U87 diminue la survie des cellules (Atefeh et al., 2016). Ainsi, il serait intéressant de caractériser si les effets de la génistéine sont dépendants de GPER dans les gliomes. Dans ce cas, une supplémentation en génistéine apportée par l'alimentation pourrait être une nouvelle recommandation dans la prise en charge des patients.

De nouveaux ligands de GPER ont été synthétisés. Le MIBE est un antagoniste d'ER $\alpha$  et de GPER. C'est un compétiteur efficace de l'E2 puisqu'il bloque l'augmentation de la prolifération induite par l'E2 dans les cellules MCF7. Il diminue aussi efficacement la signalisation dépendante de GPER sur la voie pERK1/2 (Lappano et al., 2012). Ce ligand pourrait être une alternative à l'utilisation du G-15 ou du G-36 pour confirmer que les effets du G-1 sont dépendants ou non de GPER. Un autre ligand de GPER est le peptide ER $\alpha$ 17p qui provient des résidus 295–311 d'ER $\alpha$ . Ce ligand a la particularité de réduire la quantité protéique de GPER en favorisant sa dégradation par le protéasome, ce qui diminue la prolifération des cellules SKBR3 (Lappano et al., 2019). Son utilisation pourrait constituer une alternative à l'utilisation de siRNA pour comprendre les mécanismes dépendants de GPER dans les cellules de GBM. De même, en diminuant l'expression protéique de GPER avec ce ligand, il serait possible de confirmer si cela a un impact sur la réponse au G-1. Toutefois, l'utilisation de ce ligand en clinique pourrait être limitée dans les gliomes puisqu'il diminuerait l'expression de GPER, décrit précédemment comme étant positivement corrélée à la survie des patients. A l'exception des vecteurs de surexpression, il existe peu d'autres moyens d'augmenter le niveau d'expression de GPER dans les cellules de GBM. Il serait possible d'augmenter son expression en utilisant des inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase comme la décitabine, puisque l'hyperméthylation du promoteur de GPER diminue son expression (Tian et al., 2019; Weissenborn et al., 2017; Weißenborn et al., 2014). Il est aussi envisageable de cibler les miRs qui réduisent le niveau d'expression de GPER. La miR database a ainsi identifié 22 miRs pouvant cibler GPER. En confirmant le mode d'action de ces miRs, il serait possible de les utiliser pour réduire le taux de GPER dans les cellules et étudier les voies de signalisation régulées par GPER. De plus, de nombreuses nouvelles molécules thérapeutiques sont testées pour moduler la production de certains miRs impliqués dans des processus cancéreux (Sethi et

al., 2013). Ainsi, en ciblant les miRs interagissant avec GPER et en régulant leur expression par des agents thérapeutiques, il deviendrait alors possible d'augmenter l'expression de GPER dans les GBM.

#### **4. Conclusions**

En conclusion, ce travail de thèse a permis de montrer que la signalisation stéroïdienne peut être prédictive de la survie des patients atteints de gliomes et que les hommes et les femmes n'en tirent pas le même bénéfice. Il convient donc, dans les études à venir, de prendre en compte le caractère hormonosensible des gliomes pour tenter de proposer des thérapies adaptées selon le sexe et/ou le profil d'expression des gènes liés à la signalisation stéroïdienne. Bien que le débat sur la vraie nature de GPER soit encore au cœur des discussions, il joue de nombreux rôles dans l'organisme normal et pathologique et est un facteur prédictif de la survie dans de nombreux cancers, dont les gliomes. Faisant partie de la famille des GPCR, qui sont des cibles thérapeutiques préférentielles, il devient nécessaire de trouver de nouveaux ligands agonistes spécifiques de GPER.

Dans nos modèles, nous avons pu mettre en évidence deux modes d'action du G-1 en affectant d'une part le métabolisme lipidique et d'autre part en perturbant la division cellulaire par défaut de polymérisation de la tubuline. Les effets du G-1 sont aussi additifs avec ceux du TMZ. Ces propriétés du G-1 en font une thérapie prometteuse, seule ou en combinaison avec le TMZ, pour limiter la progression des GBM.

# Bibliographie

---

- Abdelmaksoud, B., 2016. Effect of Continuous Relatively High Dose Tamoxifen on Survival of Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme. *JCPCR* 6. <https://doi.org/10.15406/jcpcr.2016.06.00195>
- Aguilar García, I.G., Galvan Ramirez, M. de la, Jimenez, S.H.D., Castaneda Arellano, R., Rivas Carrillo, J.D., Dominguez Rangel, E.P., Jimenez, J.M.D., 2017. Anastrozole Reduce Cell Proliferation and Induce Apoptosis in Glioblastoma Multiforme Xenograft Mouse Model. *J Cancer Sci Ther* 09. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000488>
- Aiman, W., Rayi, A., 2022. Low Grade Gliomas, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Akama, K.T., Thompson, L.I., Milner, T.A., McEwen, B.S., 2013. Post-synaptic Density-95 (PSD-95) Binding Capacity of G-protein-coupled Receptor 30 (GPR30), an Estrogen Receptor That Can Be Identified in Hippocampal Dendritic Spines. *Journal of Biological Chemistry* 288, 6438–6450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.412478>
- Alexander, S., Mathie, A., Peters, J., 2011. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition: Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *British Journal of Pharmacology* 164, S1–S2. [https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x)
- Alia-Klein, N., Preston-Campbell, R.N., Kim, S.W., Pareto, D., Logan, J., Wang, G.-J., Moeller, S.J., Fowler, J.S., Biegan, A., 2020. Human Cognitive Ability Is Modulated by Aromatase Availability in the Brain in a Sex-Specific Manner. *Frontiers in Neuroscience* 14.
- Almutairi, J.A., Gee, J.M., Kidd, E.J., 2021. Increased ER $\beta$  expression during ageing could be neuroprotective against Alzheimer's disease development in the male but not the female brain. *Alzheimer's & Dementia* 17, e052991. <https://doi.org/10.1002/alz.052991>
- Al-Nakhle, H., Smith, L., Bell, S.M., Burns, P.A., Cummings, M., Hanby, A.M., Lane, S., Parker, M.D., Hughes, T.A., Speirs, V., 2013. Regulation of estrogen receptor  $\beta$ 1 expression in breast cancer by epigenetic modification of the 5' regulatory region. *Int J Oncol* 43, 2039–2045. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2112>
- ALTIOK, N., ERSOZ, M., KOYUTURK, M., 2011. Estradiol induces JNK-dependent apoptosis in glioblastoma cells. *Oncol Lett* 2, 1281–1285. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.385>
- Andersen, L., Friis, S., Hallas, J., Ravn, P., Kristensen, B.W., Gaist, D., 2015. Hormonal contraceptive use and risk of glioma among younger women: a nationwide case-control study. *Br J Clin Pharmacol* 79, 677–684. <https://doi.org/10.1111/bcp.12535>
- Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* 81, 1269–1304. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269>
- Arcella, A., Oliva, M.A., Staffieri, S., Aalberti, S., Grillea, G., Madonna, M., Bartolo, M., Pavone, L., Giangaspero, F., Cantore, G., Frati, A., 2015. In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J Neurosurg* 123, 1026–1035. <https://doi.org/10.3171/2014.12.JNS14512>
- Arias-Pulido, H., Royce, M., Gong, Y., Joste, N., Lomo, L., Lee, S.-J., Chaher, N., Verschraegen, C., Lara, J., Prossnitz, E.R., Cristofanilli, M., 2010. GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast

- cancer. *Breast Cancer Res Treat* 123, 51–58. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0631-7>
- Ariyani, W., Miyazaki, W., Amano, I., Hanamura, K., Shirao, T., Koibuchi, N., 2020. Soy Isoflavones Accelerate Glial Cell Migration via GPER-Mediated Signal Transduction Pathway. *Frontiers in Endocrinology* 11.
- Arnatt, C.K., Zhang, Y., 2013. G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Agonist Dual Binding Mode Analyses Toward Understanding of Its Activation Mechanism: A Comparative Homology Modeling Approach. *Mol. Inf.* 32, 647–658. <https://doi.org/10.1002/minf.201200136>
- Atefeh, Z., Vahid, C., Hasan, N., Saeed, A., Mahnaz, H., 2016. Combination Treatment of Glioblastoma by Low-Dose Radiation and Genistein. *Curr Radiopharm* 9, 258–263. <https://doi.org/10.2174/1874471009666160813232031>
- Aydin, B., Patil, M., Bekele, N., Wolff, J.E.A., 2010. Vincristine in High-grade Glioma. *Anticancer Research* 30, 2303–2310.
- Azcoitia, I., Mendez, P., Garcia-Segura, L.M., 2021. Aromatase in the Human Brain. *Androgens: Clinical Research and Therapeutics* 2, 189–202. <https://doi.org/10.1089/andro.2021.0007>
- Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S., Harada, N., Garcia-Segura, L.M., 2001. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 47, 318–329. <https://doi.org/10.1002/neu.1038>
- Azcoitia, I., Yague, J.G., Garcia-Segura, L.M., 2011. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* 191, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.012>
- Bai, N., Zhang, Q., Zhang, W., Liu, B., Yang, F., Brann, D., Wang, R., 2020. G-protein-coupled estrogen receptor activation upregulates interleukin-1 receptor antagonist in the hippocampus after global cerebral ischemia: implications for neuronal self-defense. *J Neuroinflammation* 17, 45. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1715-x>
- Bai, R.-Y., Staedtke, V., Aprhys, C.M., Gallia, G.L., Riggins, G.J., 2011. Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 13, 974–982. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor077>
- Bajic, V.B., Tan, S.L., Chong, A., Tang, S., Ström, A., Gustafsson, J.-A., Lin, C.-Y., Liu, E.T., 2003. Dragon ERE Finder version 2: A tool for accurate detection and analysis of estrogen response elements in vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* 31, 3605–3607. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg517>
- Baker, M.E., Chandsawangbhuwana, C., 2012. 3D Models of MBP, a Biologically Active Metabolite of Bisphenol A, in Human Estrogen Receptor  $\alpha$  and Estrogen Receptor  $\beta$ . *PLoS ONE* 7, e46078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046078>
- Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G.F., 2005. Interactions between kinases and phosphatases in the rapid control of brain aromatase. *J Neuroendocrinol* 17, 553–559. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01344.x>
- Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G.F., 2001. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79, 261–277. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(01\)00143-1](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(01)00143-1)
- Banks, W.A., 2012. Brain meets body: the blood-brain barrier as an endocrine interface. *Endocrinology* 153, 4111–4119. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1435>

- Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., Ko, C.J., 2016. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Reports* 49, 488–496. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.141>
- Barone, T.A., Gorski, J.W., Greenberg, S.J., Plunkett, R.J., 2009. Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma. *J Neurooncol* 95, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9904-6>
- Barron, M., Asaad, A., Idaewor, P., Rasheed, N., Saad Abdalla Al-Zawi, A., 2021. Hormone Receptor Down-Regulation in Metastatic Breast Cancer After Endocrine Therapy Detected Oophorectomy: A Case Report and Review of Literature. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.19994>
- Barthel, L., Hadamitzky, M., Dammann, P., Schedlowski, M., Sure, U., Thakur, B.K., Hetze, S., 2022. Glioma: molecular signature and crossroads with tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 41, 53–75. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09997-9>
- Batistatou, A., Kyzas, P.A., Goussia, A., Arkoumani, E., Voulgaris, S., Polyzoidis, K., Agnantis, N.J., Stefanou, D., 2006. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours. *J Neurooncol* 77, 17–23. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9005-0>
- Bennesch, M.A., Picard, D., 2015. Minireview: Tipping the balance: ligand-independent activation of steroid receptors. *Mol Endocrinol* 29, 349–363. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1315>
- Benson, V.S., Pirie, K., Green, J., Casabonne, D., Beral, V., 2008. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. *Br J Cancer* 99, 185–190. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604445>
- Bishop, J., Simpkins, J.W., 1994. Estradiol treatment increases viability of glioma and neuroblastoma cells in vitro. *Mol Cell Neurosci* 5, 303–308. <https://doi.org/10.1006/mcne.1994.1036>
- Bless, E.P., Yang, J., Acharya, K.D., Nettles, S.A., Vassoler, F.M., Byrnes, E.M., Tetel, M.J., 2016. Adult Neurogenesis in the Female Mouse Hypothalamus: Estradiol and High-Fat Diet Alter the Generation of Newborn Neurons Expressing Estrogen Receptor  $\alpha$ . *eNeuro* 3, ENEURO.0027-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0027-16.2016>
- Block, K., Kardana, A., Igarashi, P., Taylor, H.S., 2000. In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing müllerian system. *FASEB J* 14, 1101–1108. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.9.1101>
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., Hen, R., Mann, J.J., 2018. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589–599.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bologa, C.G., Revankar, C.M., Young, S.M., Edwards, B.S., Arterburn, J.B., Kiselyov, A.S., Parker, M.A., Tkachenko, S.E., Savchuck, N.P., Sklar, L.A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., 2006. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2, 207–212. <https://doi.org/10.1038/nchembio775>
- Boonyaratanakornkit, V., 2011. Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor. *Steroids* 76, 877–884. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.017>



- Bouffet, E., Jakacki, R., Goldman, S., Hargrave, D., Hawkins, C., Shroff, M., Hukin, J., Bartels, U., Foreman, N., Kellie, S., Hilden, J., Ettl, M., Wilson, B., Stephens, D., Tabori, U., Baruchel, S., 2012. Phase II study of weekly vinblastine in recurrent or refractory pediatric low-grade glioma. *J Clin Oncol* 30, 1358–1363. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.34.5843>
- Boyle, C.P., Raji, C.A., Erickson, K.I., Lopez, O.L., Becker, J.T., Gach, H.M., Kuller, L.H., Longstreth Jr, W., Carmichael, O.T., Riedel, B.C., Thompson, P.M., 2021. Estrogen, brain structure, and cognition in postmenopausal women. *Human Brain Mapping* 42, 24–35. <https://doi.org/10.1002/hbm.25200>
- Brailoiu, E., Dun, S.L., Brailoiu, G.C., Mizuo, K., Sklar, L.A., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Dun, N.J., 2007. Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *Journal of Endocrinology* 193, 311–321. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0017>
- Bramble, M.S., Vashist, N., Vilain, E., 2019. Sex steroid hormone modulation of neural stem cells: a critical review. *Biology of Sex Differences* 10, 28. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0242-x>
- Brandenberger, A.W., Tee, M.K., Lee, J.Y., Chao, V., Jaffe, R.B., 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3509–3512. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.10.4400>
- Brännvall, K., Korhonen, L., Lindholm, D., 2002. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci* 21, 512–520. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1194>
- Brooks, D.C., Coon V, J.S., Ercan, C.M., Xu, X., Dong, H., Levine, J.E., Bulun, S.E., Zhao, H., 2020. Brain Aromatase and the Regulation of Sexual Activity in Male Mice. *Endocrinology* 161, bqaa137. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa137>
- Brooks, D.C., Zhao, H., Yilmaz, M.B., Coon V, J.S., Bulun, S.E., 2012. Glucocorticoid-induction of hypothalamic aromatase via its brain-specific promoter. *Mol Cell Endocrinol* 362, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.012>
- Bruno, A., Aiello, F., Costantino, G., Radi, M., 2016. Homology Modeling, Validation and Dynamics of the G Protein-coupled Estrogen Receptor 1 (GPER-1). *Mol. Inf.* 35, 333–339. <https://doi.org/10.1002/minf.201501024>
- Bustos, V., Nolan, Á.M., Nijhuis, A., Harvey, H., Parker, A., Poulosom, R., McBryan, J., Thomas, W., Silver, A., Harvey, B.J., 2017. GPER mediates differential effects of estrogen on colon cancer cell proliferation and migration under normoxic and hypoxic conditions. *Oncotarget* 8, 84258–84275. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20653>
- Calinescu, A.-A., Castro, M.G., 2016. Microtubule targeting agents in glioma. *Translational Cancer Research* 5. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.06.12>
- Cao, L., Qu, D., Wang, H., Zhang, S., Jia, C., Shi, Z., Wang, Z., Zhang, J., Ma, J., 2016. Toosendanin Exerts an Anti-Cancer Effect in Glioblastoma by Inducing Estrogen Receptor  $\beta$ - and p53-Mediated Apoptosis. *Int J Mol Sci* 17, E1928. <https://doi.org/10.3390/ijms17111928>
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., Weigel, R.J., 1997. Identification of a Gene (GPR30) with Homology to the G-Protein-Coupled Receptor Superfamily

- Associated with Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer. *Genomics* 45, 607–617. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4972>
- Casaburi, I., Avena, P., De Luca, A., Sirianni, R., Rago, V., Chimento, A., Trotta, F., Campana, C., Rainey, W.E., Pezzi, V., 2017. GPER-independent inhibition of adrenocortical cancer growth by G-1 involves ROS/Egr-1/BAX pathway. *Oncotarget* 8, 115609–115619. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23314>
- Castillo Sanchez, R., Gomez, R., Perez Salazar, E., 2016. Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 285–295. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00457>
- Castillo-Sanchez, R., Ramirez-Ricardo, J., Martinez-Baeza, E., Cortes-Reynosa, P., Candanedo-Gonzales, F., Gomez, R., Salazar, E.P., 2020. Bisphenol A induces focal adhesions assembly and activation of FAK, Src and ERK2 via GPER in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro* 66, 104871. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104871>
- Castracani, C.C., Longhitano, L., Distefano, A., Anfuso, D., Kalampoka, S., La Spina, E., Astuto, M., Avola, R., Caruso, M., Nicolosi, D., Giallongo, C., Tibullo, D., Volti, G.L., 2020. Role of 17 $\beta$ -Estradiol on Cell Proliferation and Mitochondrial Fitness in Glioblastoma Cells. *J Oncol* 2020, 2314693. <https://doi.org/10.1155/2020/2314693>
- Catalano, S., Giordano, C., Panza, S., Chemi, F., Bonofiglio, D., Lanzino, M., Rizza, P., Romeo, F., Fuqua, S.A.W., Maggiolini, M., Andò, S., Barone, I., 2014. Tamoxifen through GPER upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res Treat* 146, 273–285. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3017-4>
- Chamaon, K., Stojek, J., Kanakis, D., Braeuninger, S., Kirches, E., Krause, G., Mawrin, C., Dietzmann, K., 2005. Micromolar concentrations of 2-methoxyestradiol kill glioma cells by an apoptotic mechanism, without destroying their microtubule cytoskeleton. *J Neurooncol* 72, 11–16. <https://doi.org/10.1007/s11060-004-2158-4>
- Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Mineo, C., Liu, P., German, Z., Sherman, T.S., Mendelsohn, M.E., Anderson, R.G., 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. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.11.e44>
- Chao, M., Liu, N., Sun, Z., Jiang, Y., Jiang, T., Xv, M., Jia, L., Tu, Y., Wang, L., 2021. TGF- $\beta$  Signaling Promotes Glioma Progression Through Stabilizing Sox9. *Front Immunol* 11, 592080. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.592080>
- Charlier, T.D., Harada, N., Balthazart, J., Cornil, C.A., 2011. Human and quail aromatase activity is rapidly and reversibly inhibited by phosphorylating conditions. *Endocrinology* 152, 4199–4210. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0119>
- Chen, C.-L., Weiss, N.S., Newcomb, P., Barlow, W., White, E., 2002. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. *JAMA* 287, 734–741. <https://doi.org/10.1001/jama.287.6.734>
- Chen, J.-R., Xu, H.-Z., Yao, Y., Qin, Z.-Y., 2015. Prognostic value of epidermal growth factor receptor amplification and EGFRvIII in glioblastoma: meta-analysis. *Acta Neurol Scand* 132, 310–322. <https://doi.org/10.1111/ane.12401>

- Chen, M., Li, S., Srinivasasainagendra, V., Sharma, M., Li, Z., Tiwari, H., Tollefsbol, T.O., Li, Y., 2022. Maternal soybean genistein on prevention of later-life breast cancer through inherited epigenetic regulations. *Carcinogenesis* 43, 190–202. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgac009>
- Cheng, S.-B., Dong, J., Pang, Y., LaRocca, J., Hixon, M., Thomas, P., Filardo, E.J., 2014. Anatomical location and redistribution of G protein-coupled estrogen receptor-1 during the estrus cycle in mouse kidney and specific binding to estrogens but not aldosterone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 382, 950–959. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.11.005>
- Cheng, S.-B., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Filardo, E.J., 2011. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids* S0039128X11000584. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.018>
- Cheskis, B.J., Greger, J., Cooch, N., McNally, C., Mclarney, S., Lam, H.-S., Rutledge, S., Mekonnen, B., Hauze, D., Nagpal, S., Freedman, L.P., 2008. MNAR plays an important role in ER $\alpha$  activation of Src/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *Steroids, Rapid Responses to Steroid Hormones* 73, 901–905. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.12.028>
- Chevalier, N., Paul-Bellon, R., Camparo, P., Michiels, J.-F., Chevallier, D., Fénichel, P., 2014. Genetic Variants of GPER/GPR30, a Novel Estrogen-Related G Protein Receptor, Are Associated with Human Seminoma. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 1574–1589. <https://doi.org/10.3390/ijms15011574>
- Chimento, A., Casaburi, I., Bartucci, M., Patrizii, M., Dattilo, R., Avena, P., Andò, S., Pezzi, V., Sirianni, R., 2013. Selective GPER activation decreases proliferation and activates apoptosis in tumor Leydig cells. *Cell Death Dis* 4, e747–e747. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.275>
- Christian, C.A., Mobley, J.L., Moenter, S.M., 2005. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 15682–15687. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504270102>
- Chuang, S.-C., Chen, C.-H., Chou, Y.-S., Ho, M.-L., Chang, J.-K., 2020. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Mediates Cell Proliferation through the cAMP/PKA/CREB Pathway in Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *IJMS* 21, 6490. <https://doi.org/10.3390/ijms21186490>
- Chunhe, C., Dehghani, B., Magrisso, I.J., Rick, E.A., Bonhomme, E., Cody, D.B., Elenich, L.A., Subramanian, S., Murphy, S.J., Kelly, M.J., Rosenbaum, J.S., Vandenbark, A.A., Offner, H., 2008. GPR30 Contributes to Estrogen-Induced Thymic Atrophy. *Molecular Endocrinology* 22, 636–648. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0359>
- Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., Oriente, F., 2020. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int J Mol Sci* 21, 5761. <https://doi.org/10.3390/ijms21165761>
- Claus, E.B., Black, P.M., 2006. Survival rates and patterns of care for patients diagnosed with supratentorial low-grade gliomas: data from the SEER program, 1973-2001. *Cancer* 106, 1358–1363. <https://doi.org/10.1002/cncr.21733>

- Coelingh Bennink, H.J.T., Holinka, C.F., Diczfalusy, E., 2008. Estetrol review: profile and potential clinical applications. *Climacteric* 11, 47–58. <https://doi.org/10.1080/13697130802073425>
- Coughtrie, M.W., Sharp, S., Maxwell, K., Innes, N.P., 1998. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact* 109, 3–27. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(97\)00117-8](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00117-8)
- Couldwell, W.T., Hinton, D.R., Surnock, A.A., DeGiorgio, C.M., Weiner, L.P., Apuzzo, M.L., Masri, L., Law, R.E., Weiss, M.H., 1996. Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clinical Cancer Research* 2, 619–622.
- Cui, J., Shen, Y., Li, R., 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
- Dahlberg, D., Rummel, J., Distanto, S., De Souza, G.A., Stensland, M.E., Mariussen, E., Rootwelt, H., Voie, Ø., Hassel, B., 2022. Glioblastoma microenvironment contains multiple hormonal and non-hormonal growth-stimulating factors. *Fluids and Barriers of the CNS* 19, 45. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00333-z>
- D'Arrigo, G., Gianquinto, E., Rossetti, G., Cruciani, G., Lorenzetti, S., Spyraakis, F., 2021. Binding of Androgen- and Estrogen-Like Flavonoids to Their Cognate (Non)Nuclear Receptors: A Comparison by Computational Prediction. *Molecules* 26, 1613. <https://doi.org/10.3390/molecules26061613>
- Darvishi, P., Batchala, P.P., Patrie, J.T., Poisson, L.M., Lopes, M.-B., Jain, R., Fadul, C.E., Schiff, D., Patel, S.H., 2020. Prognostic Value of Preoperative MRI Metrics for Diffuse Lower-Grade Glioma Molecular Subtypes. *AJNR Am J Neuroradiol* 41, 815–821. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A6511>
- Dave, N., Chow, L.M.L., Gudelsky, G.A., LaSance, K., Qi, X., Desai, P.B., 2015. Preclinical pharmacological evaluation of letrozole as a novel treatment for gliomas. *Mol Cancer Ther* 14, 857–864. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0743>
- Davis, K.E., Carstens, E.J., Irani, B.G., Gent, L.M., Hahner, L.M., Clegg, D.J., 2014. Sexually dimorphic role of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in modulating energy homeostasis. *Hormones and Behavior, Energy Homeostasis in Context* 66, 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.02.004>
- de Cárcer, G., Venkateswaran, S.V., Salgueiro, L., El Bakkali, A., Somogyi, K., Rowald, K., Montañés, P., Sanclemente, M., Escobar, B., de Martino, A., McGranahan, N., Malumbres, M., Sotillo, R., 2018. Plk1 overexpression induces chromosomal instability and suppresses tumor development. *Nat Commun* 9, 3012. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05429-5>
- De Francesco, E.M., Sims, A.H., Maggiolini, M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., Clarke, R.B., 2017. GPER mediates the angiocrine actions induced by IGF1 through the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway in the breast tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 19, 129. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0923-5>
- De Marco, P., Bartella, V., Vivacqua, A., Lappano, R., Santolla, M.F., Morcavallo, A., Pezzi, V., Belfiore, A., Maggiolini, M., 2013. Insulin-like growth factor-I regulates GPER expression and function in cancer cells. *Oncogene* 32, 678–688. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.97>

- Dennis, M.K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Alcon, S.N., Nayak, T.K., Bologna, C.G., Leitao, A., Brailoiu, E., Deliu, E., Dun, N.J., Sklar, L.A., Hathaway, H.J., Arterburn, J.B., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* 5, 421–427. <https://doi.org/10.1038/nchembio.168>
- Dennis, M.K., Field, A.S., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Bologna, C.G., Oprea, T.I., Yamaguchi, Y., Hayashi, S.-I., Sklar, L.A., Hathaway, H.J., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2011. Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 127, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.07.002>
- DI Cristofori, A., Carrabba, G., Lanfranchi, G., Menghetti, C., Rampini, P., Caroli, M., 2013. Continuous tamoxifen and dose-dense temozolomide in recurrent glioblastoma. *Anticancer Res* 33, 3383–3389.
- Diotel, N., Charlier, T.D., Lefebvre d'Hellencourt, C., Couret, D., Trudeau, V.L., Nicolau, J.C., Meilhac, O., Kah, O., Pellegrini, E., 2018. Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. *Frontiers in Neuroscience* 12.
- Dombret, C., Naulé, L., Trouillet, A.-C., Parmentier, C., Hardin-Pouzet, H., Mhaouty-Kodja, S., 2020. Effects of neural estrogen receptor beta deletion on social and mood-related behaviors and underlying mechanisms in male mice. *Sci Rep* 10, 6242. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63427-4>
- Drobná, Z., Henriksen, A.D., Wolstenholme, J.T., Montiel, C., Lambeth, P.S., Shang, S., Harris, E.P., Zhou, C., Flaws, J.A., Adli, M., Rissman, E.F., 2018. Transgenerational Effects of Bisphenol A on Gene Expression and DNA Methylation of Imprinted Genes in Brain. *Endocrinology* 159, 132–144. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00730>
- Du, Z.-R., Feng, X.-Q., Li, N., Qu, J.-X., Feng, L., Chen, L., Chen, W.-F., 2018. G protein-coupled estrogen receptor is involved in the anti-inflammatory effects of genistein in microglia. *Phytomedicine* 43, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.03.039>
- Duan, B., Hu, X., Zhao, H., Qin, J., Luo, J., 2013. The relationship between urinary bisphenol A levels and meningioma in Chinese adults. *Int J Clin Oncol* 18, 492–497. <https://doi.org/10.1007/s10147-012-0408-6>
- Duarte-Guterman, P., Lieblich, S.E., Chow, C., Galea, L.A.M., 2015. Estradiol and GPER Activation Differentially Affect Cell Proliferation but Not GPER Expression in the Hippocampus of Adult Female Rats. *PLoS ONE* 10, e0129880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129880>
- Dubal, D.B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S.W., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Kindy, M.S., Wise, P.M., 2001. Estrogen receptor  $\alpha$ , not  $\beta$ , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1952–1957.
- Dueñas Jiménez, J.M., Candanedo Arellano, A., Santerre, A., Orozco Suárez, S., Sandoval Sánchez, H., Feria Romero, I., López-Elizalde, R., Alonso Venegas, M., Netel, B., de la Torre Valdovinos, B., Dueñas Jiménez, S.H., 2014. Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J Neurooncol* 119, 275–284. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1509-z>
- Eckhardt, U., Schroeder, A., Stieger, B., Höchli, M., Landmann, L., Tynes, R., Meier, P.J., Hagenbuch, B., 1999. Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion

- transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells. *Am J Physiol* 276, G1037-1042. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.4.G1037>
- Ellingson, B.M., Lai, A., Harris, R.J., Selfridge, J.M., Yong, W.H., Das, K., Pope, W.B., Nghiemphu, P.L., Vinters, H.V., Liau, L.M., Mischel, P.S., Cloughesy, T.F., 2013. Probabilistic Radiographic Atlas of Glioblastoma Phenotypes. *AJNR Am J Neuroradiol* 34, 533–540. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3253>
- Fábián, M., Rencz, F., Krenács, T., Brodszky, V., Hársing, J., Németh, K., Balogh, P., Kárpáti, S., 2017. Expression of G protein-coupled oestrogen receptor in melanoma and in pregnancy-associated melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 31, 1453–1461. <https://doi.org/10.1111/jdv.14304>
- Fan, H., Dong, G., Zhao, G., Liu, F., Yao, G., Zhu, Y., Hou, Y., 2014. Gender differences of B cell signature in healthy subjects underlie disparities in incidence and course of SLE related to estrogen. *J Immunol Res* 2014, 814598. <https://doi.org/10.1155/2014/814598>
- Fan, X., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2006. Estrogen receptor  $\beta$  expression in the embryonic brain regulates development of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19338–19343. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609663103>
- Feldman, R.D., Ding, Q., Hussain, Y., Limbird, L.E., Pickering, J.G., Gros, R., 2016. Aldosterone mediates metastatic spread of renal cancer *via* the G protein-coupled estrogen receptor (GPER). *FASEB j.* 30, 2086–2096. <https://doi.org/10.1096/fj.15-275552>
- Felini, M.J., Olshan, A.F., Schroeder, J.C., Carozza, S.E., Miike, R., Rice, T., Wrensch, M., 2009. Reproductive factors and hormone use and risk of adult gliomas. *Cancer Causes Control* 20, 87–96. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9220-z>
- Feng, Y., Gregor, P., 1997. Cloning of a Novel Member of the G Protein-Coupled Receptor Family Related to Peptide Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231, 651–654. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6161>
- Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., Thomas, P., 2007. Activation of the Novel Estrogen Receptor G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) at the Plasma Membrane. *Endocrinology* 148, 3236–3245. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1605>
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., Frackelton, A.R., 2000. Estrogen-Induced Activation of Erk-1 and Erk-2 Requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and Occurs via Trans-Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor through Release of HB-EGF 14, 12.
- Forster, M.-T., Baumgarten, P., Gessler, F., Maurer, G., Senft, C., Hattingen, E., Seifert, V., Harter, P.N., Franz, K., 2019. Influence of pregnancy on glioma patients. *Acta Neurochir (Wien)* 161, 535–543. <https://doi.org/10.1007/s00701-019-03823-6>
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., Schiöth, H.B., 2003. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256–1272. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1256>
- Friese, K., Kost, B., Vattai, A., Marmé, F., Kuhn, C., Mahner, S., Dannecker, C., Jeschke, U., Heublein, S., 2018. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) may serve as a prognostic marker in early-stage cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 144, 13–19. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2510-7>

- Frye, C.A., 2009. Steroids, reproductive endocrine function, and affect. A review. *Minerva Ginecol* 61, 541–562.
- Fuentes, N., Silveyra, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Fujimoto, N., Honda, H., Kitamura, S., 2004. Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors alpha and beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.10.006>
- Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M.M., Mizukami, Y., 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346, 904–910. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.191>
- Fyllingen, E.H., Bø, L.E., Reinertsen, I., Jakola, A.S., Sagberg, L.M., Berntsen, E.M., Salvesen, Ø., Solheim, O., 2021. Survival of glioblastoma in relation to tumor location: a statistical tumor atlas of a population-based cohort. *Acta Neurochir (Wien)* 163, 1895–1905. <https://doi.org/10.1007/s00701-021-04802-6>
- Gaikwad, N.W., Murman, D., Beseler, C.L., Zahid, M., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., 2011. Imbalanced estrogen metabolism in the brain: possible relevance to the etiology of Parkinson's disease. *Biomarkers* 16, 434–444. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2011.588725>
- Gallia, G.L., Holdhoff, M., Brem, H., Joshi, A.D., Hann, C.L., Bai, R.-Y., Staedtke, V., Blakeley, J.O., Sengupta, S., Jarrell, T.C., Wollett, J., Szajna, K., Helie, N., Mattox, A.K., Ye, X., Rudek, M.A., Riggins, G.J., 2021. Mebendazole and temozolomide in patients with newly diagnosed high-grade gliomas: results of a phase 1 clinical trial. *Neurooncol Adv* 3, vdaa154. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdaa154>
- Gao, C.-H., Dong, H.-L., Tai, L., Gao, X.-M., 2018. Lactoferrin-Containing Immunocomplexes Drive the Conversion of Human Macrophages from M2- into M1-like Phenotype. *Front Immunol* 9, 37. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00037>
- Gao, F., Huang, Y., Zhang, L., Liu, W., 2019. Involvement of estrogen receptor and GPER in bisphenol A induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Toxicology in Vitro* 56, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.01.012>
- Gao, F., Ma, X., Ostmann, A.B., Das, S.K., 2011. GPR30 Activation Opposes Estrogen-Dependent Uterine Growth via Inhibition of Stromal ERK1/2 and Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ) Phosphorylation Signals. *Endocrinology* 152, 1434–1447. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1368>
- Gegenhuber, B., Wu, M.V., Bronstein, R., Tollkuhn, J., 2020. Regulation of neural gene expression by estrogen receptor alpha (preprint). *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.21.349290>
- Geurts, M., van den Bent, M.J., 2018. Timing of radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma: no need to rush? *Neuro-Oncology* 20, 868–869. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy065>
- Gibson, D.A., Saunders, P.T.K., 2012. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues - a role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol Cell Endocrinol* 348, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.026>
- Gittleman, H., Ostrom, Q.T., Stetson, L.C., Waite, K., Hodges, T.R., Wright, C.H., Wright, J., Rubin, J.B., Berens, M.E., Lathia, J., Connor, J.R., Kruchko, C., Sloan, A.E., Barnholtz-

- Sloan, J.S., 2019. Sex is an important prognostic factor for glioblastoma but not for nonglioblastoma. *Neurooncol Pract* 6, 451–462. <https://doi.org/10.1093/nop/npz019>
- Gonçalves, C.S., Le Boiteux, E., Arnaud, P., Costa, B.M., 2020. HOX gene cluster (de)regulation in brain: from neurodevelopment to malignant glial tumours. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 3797–3821. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03508-9>
- González, A., Martínez-Campa, C., Mediavilla, M.D., Alonso-González, C., Sánchez-Barceló, E.J., Cos, S., 2007. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *Br J Cancer* 97, 755–760. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603935>
- Gonzalez de Valdivia, E., Broselid, S., Kahn, R., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M.F., 2017. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1)/GPR30 increases ERK1/2 activity through PDZ motif-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 292, 9932–9943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765875>
- Gonzalez de Valdivia, E., Sandén, C., Kahn, R., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M.F., 2019. Human G protein-coupled receptor 30 is N-glycosylated and N-terminal domain asparagine 44 is required for receptor structure and activity. *Bioscience Reports* 39, BSR20182436. <https://doi.org/10.1042/BSR20182436>
- Gorowska-Wojtowicz, E., Duliban, M., Kotula-Balak, M., Bilinska, B., 2022. Modulatory Effects of Estradiol and Its Mixtures with Ligands of GPER and PPAR on MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways and Tumorigenic Factors in Mouse Testis Explants and Mouse Tumor Leydig Cells. *Biomedicines* 10, 1390. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061390>
- Grady, D., Herrington, D., Bittner, V., Blumenthal, R., Davidson, M., Hlatky, M., Hsia, J., Hulley, S., Herd, A., Khan, S., Newby, L.K., Waters, D., Vittinghoff, E., Wenger, N., HERS Research Group, 2002. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 288, 49–57. <https://doi.org/10.1001/jama.288.1.49>
- Graham, C.D., Kaza, N., Klocke, B.J., Gillespie, G.Y., Shevde, L.A., Carroll, S.L., Roth, K.A., 2016. Tamoxifen Induces Cytotoxic Autophagy in Glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 75, 946–954. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw071>
- Grech, N., Dalli, T., Mizzi, S., Meilak, L., Calleja, N., Zrinzo, A., 2020. Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.8195>
- Green, P.S., Bishop, J., Simpkins, J.W., 1997. 17 $\alpha$ -Estradiol Exerts Neuroprotective Effects on SK-N-SH Cells. *J Neurosci* 17, 511–515. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-02-00511.1997>
- Green, P.S., Gridley, K.E., Simpkins, J.W., 1996. Estradiol protects against beta-amyloid (25–35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 218, 165–168. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(96\)13148-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(96)13148-7)
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139. <https://doi.org/10.1038/320134a0>
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150–1154. <https://doi.org/10.1126/science.3753802>



- Grochans, S., Cybulska, A.M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., Baranowska-Bosiacka, I., 2022. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers (Basel)* 14, 2412. <https://doi.org/10.3390/cancers14102412>
- Grube, S., Dünisch, P., Freitag, D., Klausnitzer, M., Sakr, Y., Walter, J., Kalff, R., Ewald, C., 2014. Overexpression of fatty acid synthase in human gliomas correlates with the WHO tumor grade and inhibition with Orlistat reduces cell viability and triggers apoptosis. *J Neurooncol* 118, 277–287. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1452-z>
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C., 2002. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346, 340–352. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000471>
- Grün, F., Blumberg, B., 2009. Endocrine disruptors as obesogens. *Mol Cell Endocrinol* 304, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.018>
- Guan, B., Yan, R., Huang, J.-W., Li, F.-L., Zhong, Y.-X., Chen, Y., Liu, F.-N., Hu, B., Huang, S.-B., Yin, L.-H., 2018. Activation of G protein coupled estrogen receptor (GPER) promotes the migration of renal cell carcinoma via the PI3K/AKT/MMP-9 signals. *Cell Adhesion & Migration* 12, 109–117. <https://doi.org/10.4161/19336918.2014.990781>
- Gubbels Bupp, M.R., 2015. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell Immunol* 294, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.02.002>
- Gui, Y., Shi, Z., Wang, Z., Li, J.-J., Xu, C., Tian, R., Song, X., Walsh, M.P., Li, D., Gao, J., Zheng, X.-L., 2015. The GPER Agonist G-1 Induces Mitotic Arrest and Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells Independent of GPER: G-1 AND SMOOTH MUSCLE CELL APOPTOSIS. *J. Cell. Physiol.* 230, 885–895. <https://doi.org/10.1002/jcp.24817>
- Guo, D., Bell, E.H., Chakravarti, A., 2013. Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncol* 2, 289–299. <https://doi.org/10.2217/cns.13.20>
- Gupta, V., Su, Y.S., Wang, W., Kardosh, A., Liebes, L.F., Hofman, F.M., Schönthal, A.H., Chen, T.C., 2006. Enhancement of glioblastoma cell killing by combination treatment with temozolomide and tamoxifen or hypericin. *Neurosurgical Focus* 20, E20. <https://doi.org/10.3171/foc.2006.20.4.13>
- Haas, E., Bhattacharya, I., Brailoiu, E., Damjanović, M., Brailoiu, G.C., Gao, X., Mueller-Guerre, L., Marjon, N.A., Gut, A., Minotti, R., Meyer, M.R., Amann, K., Ammann, E., Perez-Dominguez, A., Genoni, M., Clegg, D.J., Dun, N.J., Resta, T.C., Prossnitz, E.R., Barton, M., 2009. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res* 104, 288–291. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.190892>
- Häggström, M., Richfield, D., 2014. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wiki J Med* 1. <https://doi.org/10.15347/wjm/2014.005>
- Haldosén, L.-A., Zhao, C., Dahlman-Wright, K., 2014. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 382, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.08.005>
- Hall, J.M., McDonnell, D.P., Korach, K.S., 2002. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 16, 469–486. <https://doi.org/10.1210/mend.16.3.0814>
- Han, N., Heublein, S., Jeschke, U., Kuhn, C., Hester, A., Czogalla, B., Mahner, S., Rottmann, M., Mayr, D., Schmoeckel, E., Trillsch, F., 2021. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Regulates Trimethylation of Histone H3 at Lysine 4 and Represses

- Migration and Proliferation of Ovarian Cancer Cells In Vitro. *Cells* 10, 619. <https://doi.org/10.3390/cells10030619>
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S.M., Simjee, S.U., 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 18, 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
- Harada, N., Utsumi, T., Takagi, Y., 1993. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11312–11316. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11312>
- Hardy, S., Langelier, Y., Prentki, M., 2000. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 60, 6353–6358.
- Hart, E., Odé, Z., Derieppe, M.P.P., Groenink, L., Heymans, M.W., Otten, R., Lequin, M.H., Janssens, G.O.R., Hoving, E.W., van Vuurden, D.G., 2022. Blood-brain barrier permeability following conventional photon radiotherapy – A systematic review and meta-analysis of clinical and preclinical studies. *Clinical and Translational Radiation Oncology* 35, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2022.04.013>
- Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., Gloriam, D.E., 2017. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
- Hawkins, S.M., Matzuk, M.M., 2008. The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci* 1135, 10–18. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>
- Hazell, G.G.J., Yao, S.T., Roper, J.A., Prossnitz, E.R., O'Carroll, A.-M., Lolait, S.J., 2009. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *Journal of Endocrinology* 202, 223–236. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0066>
- He, W., Liu, R., Yang, S.-H., Yuan, F., 2015. Chemotherapeutic effect of Tamoxifen on Temozolomide-Resistant Gliomas. *Anticancer Drugs* 26, 293–300. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000197>
- He, Z., Zhang, S.S., Meng, Q., Li, S., Zhu, H.H., Raquil, M.-A., Alderson, N., Zhang, H., Wu, J., Rui, L., Cai, D., Feng, G.-S., 2012. Shp2 Controls Female Body Weight and Energy Balance by Integrating Leptin and Estrogen Signals. *Mol Cell Biol* 32, 1867–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.06712-11>
- Henderson, V.W., Lobo, R.A., 2012. Hormone therapy and the risk of stroke: perspectives ten years after the Women's Health Initiative trials. *Climacteric* 15, 229–234. <https://doi.org/10.3109/13697137.2012.656254>
- Heublein, S., Mayr, D., Friese, K., Jarrin-Franco, M., Lenhard, M., Mayerhofer, A., Jeschke, U., 2014. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) in Ovarian Granulosa Cell Tumors. *IJMS* 15, 15161–15172. <https://doi.org/10.3390/ijms150915161>
- Heublein, S., Mayr, D., Vrekoussis, T., Friese, K., Hofmann, S.S., Jeschke, U., Lenhard, M., 2013. The G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) is a Gonadotropin Receptor Dependent Positive Prognosticator in Ovarian Carcinoma Patients. *PLoS ONE* 8, e71791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071791>

- Hiraku, Y., Yamashita, N., Nishiguchi, M., Kawanishi, S., 2001. Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation. *Int J Cancer* 92, 333–337. <https://doi.org/10.1002/ijc.1193>
- Hirtz, A., Rech, F., Dubois-Pot-Schneider, H., Dumond, H., 2020. Astrocytoma: A Hormone-Sensitive Tumor? *IJMS* 21, 9114. <https://doi.org/10.3390/ijms21239114>
- Honda, S., Harada, N., 2020. ARP-1 Regulates the Transcriptional Activity of the Aromatase Gene in the Mouse Brain. *Frontiers in Endocrinology* 11.
- Hönikl, L.S., Lämmer, F., Gempt, J., Meyer, B., Schlegel, J., Delbridge, C., 2020. High expression of estrogen receptor alpha and aromatase in glial tumor cells is associated with gender-independent survival benefits in glioblastoma patients. *J Neurooncol* 147, 567–575. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03467-y>
- Horne, E.A., Diaz, P., Cimino, P.J., Jung, E., Xu, C., Hamel, E., Wagenbach, M., Kumasaka, D., Wageling, N.B., Azorín, D.D., Winkler, F., Wordeman, L.G., Holland, E.C., Stella, N., 2021. A brain-penetrant microtubule-targeting agent that disrupts hallmarks of glioma tumorigenesis. *Neuro-Oncology Advances* 3, vdaa165. <https://doi.org/10.1093/noajnl/vdaa165>
- Houillier, C., Wang, X., Kaloshi, G., Mokhtari, K., Guillevin, R., Laffaire, J., Paris, S., Boisselier, B., Idbaih, A., Laigle-Donadey, F., Hoang-Xuan, K., Sanson, M., Delattre, J.-Y., 2010. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 75, 1560–1566. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f96282>
- Hsieh, Y.-C., Yu, H.-P., Frink, M., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Chaudry, I.H., 2007. G Protein-Coupled Receptor 30-Dependent Protein Kinase A Pathway Is Critical in Nongenomic Effects of Estrogen in Attenuating Liver Injury after Trauma-Hemorrhage. *The American Journal of Pathology* 170, 1210–1218. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060883>
- Hu, N., Richards, R., Jensen, R., 2016. Role of chromosomal 1p/19q co-deletion on the prognosis of oligodendrogliomas: A systematic review and meta-analysis. *Interdisciplinary Neurosurgery* 5, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.inat.2016.06.008>
- Hu, X.M., Nie, X.Y., Xu, K.L., Wang, Y., Tang, F., Du, Z.G., Xiong, J., 2022. H3K27M Mutation Doesn't Mean Worse Prognosis in Old Patients. *Front Oncol* 12, 912166. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.912166>
- Huang, Mingquan, Huang, Meizhou, Li, X., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., Yang, M., 2021. Bisphenol A induces apoptosis through GPER-dependent activation of the ROS/Ca<sup>2+</sup>-ASK1-JNK pathway in human granulosa cell line KGN. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208, 111429. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111429>
- Huang, R.P., Hossain, M.Z., Sehgal, A., Boynton, A.L., 1999. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J Surg Oncol* 70, 21–24. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9098\(199901\)70:1<21::aid-jso4>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9098(199901)70:1<21::aid-jso4>3.0.co;2-0)
- 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, 605–613. <https://doi.org/10.1001/jama.280.7.605>
- Hussain, I., Deb, P., Chini, A., Obaid, M., Bhan, A., Ansari, K.I., Mishra, B.P., Bobzean, S.A., Udden, S.M.N., Alluri, P.G., Das, H.K., Brothers, R.M., Perrotti, L.I., Mandal, S.S.,

2020. HOXA5 Expression Is Elevated in Breast Cancer and Is Transcriptionally Regulated by Estradiol. *Front Genet* 11, 592436. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.592436>
- Hwang, C.J., Yun, H.-M., Park, K.-R., Song, J.K., Seo, H.O., Hyun, B.K., Choi, D.Y., Yoo, H.-S., Oh, K.-W., Hwang, D.Y., Han, S.-B., Hong, J.T., 2015. Memory Impairment in Estrogen Receptor  $\alpha$  Knockout Mice Through Accumulation of Amyloid- $\beta$  Peptides. *Mol Neurobiol* 52, 176–186. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8853-z>
- Ignatov, T., Modl, S., Thulig, M., Weißenborn, C., Treeck, O., Ortmann, O., Zenclussen, A., Costa, S.D., Kalinski, T., Ignatov, A., 2013a. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer 10.
- Ignatov, T., Treeck, O., Kalinski, T., Ortmann, O., Ignatov, A., 2020. GPER-1 expression is associated with a decreased response rate to primary tamoxifen therapy of breast cancer patients. *Arch Gynecol Obstet* 301, 565–571. <https://doi.org/10.1007/s00404-019-05384-6>
- Ignatov, T., Weißenborn, C., Poehlmann, A., Lemke, A., Semczuk, A., Roessner, A., Costa, S.D., Kalinski, T., Ignatov, A., 2013b. GPER-1 Expression Decreases During Breast Cancer Tumorigenesis. *Cancer Investigation* 31, 309–315. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.789901>
- Imesch, P., Samartzis, E.P., Dedes, K.J., Fink, D., Fedier, A., 2013. Histone deacetylase inhibitors down-regulate G-protein-coupled estrogen receptor and the GPER-antagonist G-15 inhibits proliferation in endometriotic cells. *Fertility and Sterility* 100, 770–776. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.008>
- Inadera, H., 2015. Neurological Effects of Bisphenol A and its Analogues. *Int J Med Sci* 12, 926–936. <https://doi.org/10.7150/ijms.13267>
- Isensee, J., Meoli, L., Zazzu, V., Nabzdyk, C., Witt, H., Soewarto, D., Effertz, K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Busch, D., Adler, T., de Angelis, M.H., Irgang, M., Otto, C., Noppinger, P.R., 2009. Expression Pattern of G Protein-Coupled Receptor 30 in LacZ Reporter Mice. *Endocrinology* 150, 1722–1730. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1488>
- Izquierdo, C., Alentorn, A., Idbaih, A., Simó, M., Kaloshi, G., Ricard, D., Barritault, M., Meyronet, D., Bruna, J., Honnorat, J., Delattre, J.Y., Ducray, F., 2018. Long-term impact of temozolomide on 1p/19q-codeleted low-grade glioma growth kinetics. *J Neurooncol* 136, 533–539. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2677-4>
- Jensen, E.V., Desombre, E.R., Kawashima, T., Suzuki, T., Kyser, K., Jungblut, P.W., 1967. Estrogen-binding substances of target tissues. *Science* 158, 529–530. <https://doi.org/10.1126/science.158.3800.529-c>
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W., DeSombre, E.R., 1968. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 632–638. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.2.632>
- Jiang, H., Yu, K., Li, M., Cui, Y., Ren, X., Yang, C., Zhao, X., Lin, S., 2020. Classification of Progression Patterns in Glioblastoma: Analysis of Predictive Factors and Clinical Implications. *Front Oncol* 10, 590648. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.590648>
- Jiang, Y., Zhou, J., Zhao, J., Zhang, H., Li, L., Li, H., Chen, L., Hu, J., Zheng, W., Jing, Z., 2020. The U2AF2 /circRNA ARF1/miR-342-3p/ISL2 feedback loop regulates angiogenesis in glioma stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 39, 182. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01691-y>

- Kabat, G.C., Park, Y., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Rohan, T.E., 2011. Reproductive factors and exogenous hormone use and risk of adult glioma in women in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int J Cancer* 128, 944–950. <https://doi.org/10.1002/ijc.25413>
- Kang, L., Zhang, X., Xie, Y., Tu, Y., Wang, D., Liu, Z., Wang, Z.-Y., 2010. Involvement of Estrogen Receptor Variant ER- $\alpha$ 36, Not GPR30, in Nongenomic Estrogen Signaling. *Mol Endocrinol* 24, 709–721. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0317>
- Kastenberger, I., Schwarzer, C., 2014. GPER1 (GPR30) knockout mice display reduced anxiety and altered stress response in a sex and paradigm dependent manner. *Hormones and Behavior* 66, 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.001>
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 715–740. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4715>
- Kenealy, B.P., Keen, K.L., Garcia, J.P., Kohlenberg, L.K., Terasawa, E., 2017. Obligatory role of hypothalamic neuroestradiol during the estrogen-induced LH surge in female ovariectomized rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 13804–13809. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716097115>
- Khan, D., Ansar Ahmed, S., 2016. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00635>
- Khan, S.U., Ahemad, N., Chuah, L.-H., Naidu, R., Htar, T.T., 2019. Sequential ligand- and structure-based virtual screening approach for the identification of potential G protein-coupled estrogen receptor-1 (GPER-1) modulators. *RSC Adv.* 9, 2525–2538. <https://doi.org/10.1039/C8RA09318K>
- Khosla, S., Oursler, M.J., Monroe, D.G., 2012. Estrogen and the Skeleton. *Trends Endocrinol Metab* 23, 576–581. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.008>
- Klinge, C.M., 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905–2919. <https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>
- Kolakowski, L.F., 1994. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept Channels* 2, 1–7.
- Komarowska, M., Chrzanowski, R., Tylicka, M., Rutkowski, R., Mariak, Z., Zelazowska-Rutkowska, B., Lyson, T., Hermanowicz, A., 2022. Plasma concentration of Bisphenol A and leptin in patients with meningioma and glioma: A pilot study. *Adv Med Sci* 67, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2022.04.002>
- Komori, T., 2017. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 57, 301–311. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2017-0010>
- Koos, R.D., 2011. Minireview: Putting physiology back into estrogens' mechanism of action. *Endocrinology* 152, 4481–4488. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1449>
- Kos, M., Reid, G., Denger, S., Gannon, F., 2001. Minireview: genomic organization of the human ER $\alpha$  gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15, 2057–2063. <https://doi.org/10.1210/mend.15.12.0731>

- Krakstad, C., Trovik, J., Wik, E., Engelsen, I.B., Werner, H.M.J., Birkeland, E., Raeder, M.B., Øyan, A.M., Stefansson, I.M., Kalland, K.H., Akslen, L.A., Salvesen, H.B., 2012. Loss of GPER identifies new targets for therapy among a subgroup of ER $\alpha$ -positive endometrial cancer patients with poor outcome. *Br J Cancer* 106, 1682–1688. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.91>
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925–5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>
- Kulak, J., Ferriani, R.A., Komm, B.S., Taylor, H.S., 2013. Tissue Selective Estrogen Complexes (TSECs) Differentially Modulate Markers of Proliferation and Differentiation in Endometrial Cells. *Reprod Sci* 20, 129–137. <https://doi.org/10.1177/1933719112463251>
- Kumar, R., Zakharov, M.N., Khan, S.H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., Jasuja, R., 2011. The Dynamic Structure of the Estrogen Receptor. *Journal of Amino Acids* 2011, 1–7. <https://doi.org/10.4061/2011/812540>
- Lan, Y.-L., Wang, X., Lou, J.-C., Ma, B.-B., Xing, J.-S., Zou, S., Zhang, B., 2018. Update on the effect of exogenous hormone use on glioma risk in women: a meta-analysis of case-control and cohort studies. *J Neurooncol* 137, 357–365. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2725-0>
- Lappano, R., Mallet, C., Rizzuti, B., Grande, F., Galli, G.R., Byrne, C., Broutin, I., Boudieu, L., Eschalier, A., Jacquot, Y., Maggiolini, M., 2019. The Peptide ER $\alpha$ 17p Is a GPER Inverse Agonist that Exerts Antiproliferative Effects in Breast Cancer Cells. *Cells* 8, 590. <https://doi.org/10.3390/cells8060590>
- Lappano, R., Rosano, C., De Marco, P., De Francesco, E.M., Pezzi, V., Maggiolini, M., 2010. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 320, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.02.006>
- Lappano, R., Santolla, M.F., Pupo, M., Sinicropi, M.S., Caruso, A., Rosano, C., Maggiolini, M., 2012. MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor  $\alpha$  and GPER in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 14, R12. <https://doi.org/10.1186/bcr3096>
- Larjavaara, S., Mäntylä, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jääskeläinen, J., Auvinen, A., 2007. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol* 9, 319–325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>
- Le Boiteux, E., Court, F., Guichet, P.-O., Vaurs-Barrière, C., Vaillant, I., Chautard, E., Verrelle, P., Costa, B.M., Karayan-Tapon, L., Fogli, A., Arnaud, P., 2021. Widespread overexpression from the four DNA hypermethylated HOX clusters in aggressive (IDHwt) glioma is associated with H3K27me3 depletion and alternative promoter usage. *Molecular Oncology* 15, 1995–2010. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12944>
- Le Dily, F., Beato, M., 2018. Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space. *Int J Mol Sci* 19, E306. <https://doi.org/10.3390/ijms19020306>
- Lee, C., Fotovati, A., Triscott, J., Chen, J., Venugopal, C., Singhal, A., Dunham, C., Kerr, J.M., Verreault, M., Yip, S., Wakimoto, H., Jones, C., Jayanthan, A., Narendran, A., Singh,

- S.K., Dunn, S.E., 2012. Polo-like kinase 1 inhibition kills glioblastoma multiforme brain tumor cells in part through loss of SOX2 and delays tumor progression in mice. *Stem Cells* 30, 1064–1075. <https://doi.org/10.1002/stem.1081>
- Lee, Joo Ho, Lee, J.E., Kahng, J.Y., Kim, S.H., Park, J.S., Yoon, S.J., Um, J.-Y., Kim, W.K., Lee, J.-K., Park, J., Kim, E.H., Lee, Ji-Hyun, Lee, Joon-Hyuk, Chung, W.-S., Ju, Y.S., Park, S.-H., Chang, J.H., Kang, S.-G., Lee, Jeong Ho, 2018. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560, 243–247. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>
- Leece, R., Xu, J., Ostrom, Q.T., Chen, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2017. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. *Neuro-Oncology* 19, 1553–1564. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox091>
- Leffers, H., Naesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N.E., Jørgensen, M., 2001. Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Hum Reprod* 16, 1037–1045. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.1037>
- Li, C., Zhou, C., Wang, S., Feng, Y., Lin, W., Lin, S., Wang, Y., Huang, H., Liu, P., Mu, Y.-G., Shen, X., 2011. Sensitization of Glioma Cells to Tamoxifen-Induced Apoptosis by PI3-Kinase Inhibitor through the GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *PLOS ONE* 6, e27053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027053>
- Li, J., Liang, R., Song, C., Xiang, Y., Liu, Y., 2018. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. *Onco Targets Ther* 11, 731–742. <https://doi.org/10.2147/OTT.S155160>
- Li, L., Hisamoto, K., Kim, K.H., Haynes, M.P., Bauer, P.M., Sanjay, A., Collinge, M., Baron, R., Sessa, W.C., Bender, J.R., 2007. Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16468–16473. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704315104>
- Li, S., Wang, B., Tang, Q., Liu, J., Yang, X., 2017. Bisphenol A triggers proliferation and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via GPER mediated upregulation of IL-6. *Cell Biochem Funct* 35, 209–216. <https://doi.org/10.1002/cbf.3265>
- Li, W., Winters, A., Poteet, E., Ryou, M.-G., Lin, S., Hao, S., Wu, Z., Yuan, F., Hatanpaa, K.J., Simpkins, J.W., Yang, S.-H., 2013. Involvement of estrogen receptor  $\beta$ 5 in the progression of glioma. *Brain Research* 1503, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.02.004>
- Li, Y., Wang, J.-P., Santen, R.J., Kim, T.-H., Park, H., Fan, P., Yue, W., 2010. Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology* 151, 5146–5156. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1506>
- Liang, J., Shang, Y., 2013. Estrogen and cancer. *Annu Rev Physiol* 75, 225–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>
- Liang, S., Chen, Z., Jiang, G., Zhou, Y., Liu, Q., Su, Q., Wei, W., Du, J., Wang, H., 2017. Activation of GPER suppresses migration and angiogenesis of triple negative breast cancer via inhibition of NF- $\kappa$ B/IL-6 signals. *Cancer Letters* 386, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.003>

- Libert, C., Dejager, L., Pinheiro, I., 2010. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol* 10, 594–604. <https://doi.org/10.1038/nri2815>
- Lin, B.C., Suzawa, M., Blind, R.D., Tobias, S.C., Bulun, S.E., Scanlan, T.S., Ingraham, H.A., 2009. Stimulating the GPR30 Estrogen Receptor with a Novel Tamoxifen Analogue Activates SF-1 and Promotes Endometrial Cell Proliferation. *Cancer Research* 69, 5415–5423. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1622>
- Lindsey, S.H., Yamaleyeva, L.M., Brosnihan, K.B., Gallagher, P.E., Chappell, M.C., 2011. Estrogen Receptor GPR30 Reduces Oxidative Stress and Proteinuria in the Salt-Sensitive Female mRen2.Lewis Rat. *Hypertension* 58, 665–671. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175174>
- Lis, A., Ciesielski, M.J., Barone, T.A., Scott, B.E., Fenstermaker, R.A., Plunkett, R.J., 2004. 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation of normal and neoplastic glial cells, and induces cell death, in vitro. *Cancer Lett* 213, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.04.021>
- Listenberger, L.L., Han, X., Lewis, S.E., Cases, S., Farese, R.V., Ory, D.S., Schaffer, J.E., 2003. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 3077–3082. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630588100>
- Liu, C., Zhang, Y., Zhang, K., Bian, C., Zhao, Y., Zhang, J., 2014. Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol* 38, 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2014.03.001>
- Liu, J., Li, M., Wang, J., Wu, F., Liu, T., Pan, Y., 2014. A survey of MRI-based brain tumor segmentation methods. *Tsinghua Science and Technology* 19, 578–595. <https://doi.org/10.1109/TST.2014.6961028>
- Liu, J., Sareddy, G.R., Zhou, M., Viswanadhapalli, S., Li, X., Lai, Z., Tekmal, R.R., Brenner, A., Vadlamudi, R.K., 2018. Differential Effects of Estrogen Receptor  $\beta$  Isoforms on Glioblastoma Progression. *Cancer Res* 78, 3176–3189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3470>
- Liu, L., Liu, S., Luo, H., Chen, C., Zhang, X., He, L., Tu, G., 2021. GPR30-mediated HMGB1 upregulation in CAFs induces autophagy and tamoxifen resistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. *Aging* 13, 16178–16197. <https://doi.org/10.18632/aging.203145>
- Liu, Q., Chen, Z., Jiang, G., Zhou, Y., Yang, X., Huang, H., Liu, H., Du, J., Wang, H., 2017. Epigenetic down regulation of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) functions as a tumor suppressor in colorectal cancer. *Mol Cancer* 16, 87. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0654-3>
- Liu, T., Huang, Y., Lin, H., 2021. Estrogen disorders: Interpreting the abnormal regulation of aromatase in granulosa cells (Review). *International Journal of Molecular Medicine* 47, 1–12. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4906>
- Liu, X., Wang, Q., Liu, B., Zheng, X., Li, P., Zhao, T., Jin, X., Ye, F., Zhang, P., Chen, W., Li, Q., 2021. Genistein inhibits radiation-induced invasion and migration of glioblastoma cells by blocking the DNA-PKcs/Akt2/Rac1 signaling pathway. *Radiother Oncol* 155, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.10.026>



- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0243-4>
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Louis, D.N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D.J., Cree, I.A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H.K., Pfister, S.M., Reifenberger, G., Soffiatti, R., von Deimling, A., Ellison, D.W., 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* 23, 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Lundgaard, I., Osório, M.J., Kress, B., Sanggaard, S., Nedergaard, M., 2014. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* 0, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.050>
- Lundy, P., Domino, J., Ryken, T., Fouke, S., McCracken, D.J., Ormond, D.R., Olson, J.J., 2020. The role of imaging for the management of newly diagnosed glioblastoma in adults: a systematic review and evidence-based clinical practice guideline update. *J Neurooncol* 150, 95–120. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03597-3>
- Luo, H., Yang, G., Yu, T., Luo, S., Wu, C., Sun, Y., Liu, M., Tu, G., 2014. GPER-mediated proliferation and estradiol production in breast cancer-associated fibroblasts. *Endocrine-Related Cancer* 21, 355–369. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0237>
- Lv, X., He, C., Huang, C., Hua, G., Wang, Z., Remmenga, S.W., Rodabough, K.J., Karpf, A.R., Dong, J., Davis, J.S., Wang, C., 2017. G-1 Inhibits Breast Cancer Cell Growth via Targeting Colchicine-Binding Site of Tubulin to Interfere with Microtubule Assembly. *Molecular Cancer Therapeutics* 16, 1080–1091. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0626>
- Madak-Erdogan, Z., Kieser, K.J., Kim, S.H., Komm, B., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 2008. Nuclear and Extranuclear Pathway Inputs in the Regulation of Global Gene Expression by Estrogen Receptors. *Molecular Endocrinology* 22, 2116–2127. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0059>
- Madak-Erdogan, Z., Kim, S.-H., Gong, P., Zhao, Y.C., Zhang, H., Chambliss, K.L., Carlson, K.E., Mayne, C.G., Shaul, P.W., Korach, K.S., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 2016. Design of pathway-preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci Signal* 9, ra53. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad8170>
- Maggi, A., 2011. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1054–1060. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.05.001>
- Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A.M., Picard, D., Andò, S., 2004. The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-fos Up-regulation by 17 $\beta$ -Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 27008–27016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403588200>

- Maiolo, L., Guarino, V., Saracino, E., Convertino, A., Melucci, M., Muccini, M., Ambrosio, L., Zamboni, R., Benfenati, V., 2021. Glial Interfaces: Advanced Materials and Devices to Uncover the Role of Astroglial Cells in Brain Function and Dysfunction. *Adv Healthc Mater* 10, e2001268. <https://doi.org/10.1002/adhm.202001268>
- Maiti, K., Paul, J.W., Read, M., Chan, E.C., Riley, S.C., Nahar, P., Smith, R., 2011. G-1-Activated Membrane Estrogen Receptors Mediate Increased Contractility of the Human Myometrium. *Endocrinology* 152, 2448–2455. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0979>
- Marino, M., Acconcia, F., Bresciani, F., Weisz, A., Trentalance, A., 2002. Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* 13, 3720–3729. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-03-0153>
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P., 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7, 497–508. <https://doi.org/10.2174/138920206779315737>
- Marraudino, M., Carrillo, B., Bonaldo, B., Llorente, R., Campioli, E., Garate, I., Pinos, H., Garcia-Segura, L.M., Collado, P., Grassi, D., 2021. G Protein-Coupled Estrogen Receptor Immunoreactivity in the Rat Hypothalamus Is Widely Distributed in Neurons, Astrocytes, and Oligodendrocytes, Fluctuates during the Estrous Cycle, and Is Sexually Dimorphic. *Neuroendocrinology* 111, 660–677. <https://doi.org/10.1159/000509583>
- Mårtensson, U.E.A., Salehi, S.A., Windahl, S., Gomez, M.F., Swärd, K., Daszkiewicz-Nilsson, J., Wendt, A., Andersson, N., Hellstrand, P., Grände, P.-O., Owman, C., Rosen, C.J., Adamo, M.L., Lundquist, I., Rorsman, P., Nilsson, B.-O., Ohlsson, C., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M.F., 2009. Deletion of the G Protein-Coupled Receptor 30 Impairs Glucose Tolerance, Reduces Bone Growth, Increases Blood Pressure, and Eliminates Estradiol-Stimulated Insulin Release in Female Mice. *Endocrinology* 150, 687–698. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0623>
- Martin, S.G., Lebot, M.N., Sukkarn, B., Ball, G., Green, A.R., Rakha, E.A., Ellis, I.O., Storr, S.J., 2018. Low expression of G protein-coupled oestrogen receptor 1 (GPER) is associated with adverse survival of breast cancer patients. *Oncotarget* 9, 25946–25956. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25408>
- Marty, M.S., Carney, E.W., Rowlands, J.C., 2011. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol Sci* 120 Suppl 1, S93-108. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq329>
- McKinley, B.P., Michalek, A.M., Fenstermaker, R.A., Plunkett, R.J., 2000. The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *J Neurosurg* 93, 932–939. <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.6.0932>
- Méndez-Luna, D., Martínez-Archundia, M., Maroun, R.C., Ceballos-Reyes, G., Fragosó-Vázquez, M.J., González-Juárez, D.E., Correa-Basurto, J., 2015. Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33, 2161–2172. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.994102>
- Meyer, M.R., Fredette, N.C., Howard, T.A., Hu, C., Ramesh, C., Daniel, C., Amann, K., Arterburn, J.B., Barton, M., Prossnitz, E.R., 2014. G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. *Sci Rep* 4, 7564. <https://doi.org/10.1038/srep07564>

- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., Auricchio, F., 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15, 1292–1300.
- Milner, T.A., Ayoola, K., Drake, C.T., Herrick, S.P., Tabori, N.E., McEwen, B.S., Warriar, S., Alves, S.E., 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol* 491, 81–95. <https://doi.org/10.1002/cne.20724>
- Milner, T.A., Thompson, L.I., Wang, G., Kievits, J.A., Martin, E., Zhou, P., McEwen, B.S., Pfaff, D.W., Waters, E.M., 2010. Distribution of estrogen receptor  $\beta$  containing cells in the brains of bacterial artificial chromosome transgenic mice. *Brain Res* 1351, 74–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.038>
- Milon, A., Kaczmarczyk, M., Pawlicki, P., Bilinska, B., Duliban, M., Gorowska-Wojtowicz, E., Tworzydło, W., Kotula-Balak, M., 2019. Do estrogens regulate lipid status in testicular steroidogenic Leydig cell? *Acta Histochemica* 121, 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2019.04.012>
- Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., McEwen, B.S., Alves, S.E., 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144, 2055–2067. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221069>
- Mitterling, K.L., Spencer, J.L., Dziedzic, N., Shenoy, S., McCarthy, K., Waters, E.M., McEwen, B.S., Milner, T.A., 2010. Cellular and subcellular localization of estrogen and progesterin receptor immunoreactivities in the mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 518, 2729–2743. <https://doi.org/10.1002/cne.22361>
- Moinfar, Z., Dambach, H., Schoenebeck, B., Förster, E., Prochnow, N., Faustmann, P.M., 2016. Estradiol Receptors Regulate Differential Connexin 43 Expression in F98 and C6 Glioma Cell Lines. *PLoS ONE* 11, e0150007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150007>
- Molina, L., Bustamante, F., Ortloff, A., Ramos, I., Ehrenfeld, P., Figueroa, C.D., 2020. Continuous Exposure of Breast Cancer Cells to Tamoxifen Upregulates GPER-1 and Increases Cell Proliferation. *Front. Endocrinol.* 11, 563165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.563165>
- Molina, L., Figueroa, C.D., Bhoola, K.D., Ehrenfeld, P., 2017. GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 21, 755–766. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1350264>
- Mori, T., Ito, F., Matsushima, H., Takaoka, O., Tanaka, Y., Koshihara, A., Kusuki, I., Kitawaki, J., 2015. G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. *Fertility and Sterility* 103, 1228-1235.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.01.026>
- Muanza, T., Shenouda, G., Souhami, L., Leblanc, R., Mohr, G., Corns, R., Langleben, A., 2000. High dose tamoxifen and radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme: a phase IB study. *Can J Neurol Sci* 27, 302–306. <https://doi.org/10.1017/s0317167100001049>
- Muler, M.L., Antunes, F., Guarache, G.C., Oliveira, R.B., Ureshino, R.P., Bincoletto, C., Pereira, G.J. da S., Smaili, S.S., 2020. Effects of ICI 182,780, an ER $\alpha$  and ER $\beta$

- antagonist, and G-1, a GPER agonist, on autophagy in breast cancer cells. *Einstein (São Paulo)* 18, eAO4560. [https://doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2020AO4560](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AO4560)
- Murphy, A.J., Guyre, P.M., Wira, C.R., Pioli, P.A., 2009. Estradiol Regulates Expression of Estrogen Receptor ER $\alpha$ 46 in Human Macrophages. *PLoS One* 4, e5539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005539>
- Ng, S., Duffau, H., 2022. Factors Associated With Long-term Survival in Women Who Get Pregnant After Surgery for WHO Grade II Glioma. *Neurology* 99, e89–e97. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200523>
- Nowell, P.C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Obara, T., Blonski, M., Brzenczek, C., Mézières, S., Gaudeau, Y., Pouget, C., Gauchotte, G., Verger, A., Vogin, G., Moureaux, J.-M., Duffau, H., Rech, F., Taillandier, L., 2020. Adult Diffuse Low-Grade Gliomas: 35-Year Experience at the Nancy France Neurooncology Unit. *Front Oncol* 10, 574679. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.574679>
- O’Dowd, B.F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K.R., Heng, H.H.Q., Kolakowski, L.F., George, S.R., 1998. Discovery of Three Novel G-Protein-Coupled Receptor Genes. *Genomics* 47, 310–313. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5095>
- Oelmann, E., Kraemer, A., Serve, H., Reufi, B., Oberberg, D., Patt, S., Herbst, H., Stein, H., Thiel, E., Berdel, W.E., 1997. Autocrine interleukin-1 receptor antagonist can support malignant growth of glioblastoma by blocking growth-inhibiting autocrine loop of interleukin-1. *Int J Cancer* 71, 1066–1076. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19970611\)71:6<1066::aid-ijc25>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19970611)71:6<1066::aid-ijc25>3.0.co;2-a)
- O’Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., Hansen, U., 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 18, 1859–1875. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0044>
- O’Malley, B.W., 2005. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol* 19, 1402–1411. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0480>
- O’Reilly, É.J., Mirzaei, F., Forman, M.R., Ascherio, A., 2010. Diethylstilbestrol Exposure in Utero and Depression in Women. *Am J Epidemiol* 171, 876–882. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq023>
- Osorio, J.A., Aghi, M.K., 2014. Optimizing glioblastoma resection: intraoperative mapping and beyond. *CNS Oncol* 3, 359–366. <https://doi.org/10.2217/cns.14.36>
- Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Xu, J., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2016. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro-Oncology* 18, v1–v75. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov207>
- Ostrom, Q.T., Rubin, J.B., Lathia, J.D., Berens, M.E., Barnholtz-Sloan, J.S., 2018. Females have the survival advantage in glioblastoma. *Neuro Oncol* 20, 576–577. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy002>
- Otto, C., Fuchs, I., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Andreasen, P., Schwarz, G., Altmann, H., Klewer, M., Schoor, M., Vonk, R., Fritzscheier, K.-H., 2009. GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice. *Biology of Reproduction* 80, 34–41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071175>

- Otto, C., Rohde-Schulz, B., Schwarz, G., Fuchs, I., Klewer, M., Brittain, D., Langer, G., Bader, B., Prella, K., Nubbemeyer, R., Fritzsche, K.-H., 2008. G Protein-Coupled Receptor 30 Localizes to the Endoplasmic Reticulum and Is Not Activated by Estradiol. *Endocrinology* 149, 4846–4856. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0269>
- Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., Lolait, S.J., 1996. Cloning of Human cDNA Encoding a Novel Heptahelix Receptor Expressed in Burkitt's Lymphoma and Widely Distributed in Brain and Peripheral Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228, 285–292. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1654>
- Palczeski, K., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., 2000. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor 289, 7.
- Palczewski, K., Orban, T., 2013. From Atomic Structures to Neuronal Functions of G Protein-Coupled Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 36, 139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170313>
- Pallud, J., Llitjos, J.-F., Dhermain, F., Varlet, P., Dezamis, E., Devaux, B., Souillard-Scémama, R., Sanai, N., Koziak, M., Page, P., Schlienger, M., Daumas-Duport, C., Meder, J.-F., Oppenheim, C., Roux, F.-X., 2012. Dynamic imaging response following radiation therapy predicts long-term outcomes for diffuse low-grade gliomas. *Neuro Oncol* 14, 496–505. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos069>
- Pallud, J., Mandonnet, E., Deroulers, C., Fontaine, D., Badoual, M., Capelle, L., Guillet-May, F., Page, P., Peruzzi, P., Jouanneau, E., Frenay, M., Cartalat-Carel, S., Duffau, H., Taillandier, L., Club de Neuro-Oncologie de la Société Française de Neurochirurgie (SFNC), Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF), 2010. Pregnancy increases the growth rates of World Health Organization grade II gliomas. *Ann Neurol* 67, 398–404. <https://doi.org/10.1002/ana.21888>
- Panek, D.U., Dixon, W.R., 1986. Effect of continuous intraventricular estrogen or catechol estrogen treatment on catecholamine turnover in various brain regions. *J Pharmacol Exp Ther* 236, 646–652.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., Minutolo, F., 2014. Estrogen Receptors Alpha (ER $\alpha$ ) and Beta (ER $\beta$ ): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids* 0, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>
- Patil, V.M., Menon, N., Chatterjee, A., Tonse, R., Choudhari, A., Mahajan, A., Puranik, A.D., Epari, S., Jadhav, M., Pathak, S., Peelay, Z., Walavalkar, R., Muthuluri, H.K., Ravi Krishna, M., Chandrasekharan, A., Pande, N., Gupta, T., Banavali, S., Jalali, R., 2022. Meprobamate plus lomustine or temozolomide in patients with recurrent glioblastoma: A randomised open-label phase II trial. *eClinicalMedicine* 49, 101449. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101449>
- Pearce, S., Jordan, V., 2004. The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2003.09.003>
- Pedram, A., Razandi, M., Levin, E.R., 2006. Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Molecular Endocrinology* 20, 1996–2009. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0525>
- Peeters, S., Pagès, M., Gauchotte, G., Miquel, C., Cartalat-Carel, S., Guillamo, J.-S., Capelle, L., Delattre, J.-Y., Beauchesne, P., Debouverie, M., Fontaine, D., Jouanneau, E., Stecken, J., Menei, P., De Witte, O., Colin, P., Frappaz, D., Lesimple, T., Bauchet, L., Lopes, M., Bozec, L., Moyal, E., Deroulers, C., Varlet, P., Zanello, M., Chretien, F.,

- Oppenheim, C., Duffau, H., Taillandier, L., Pallud, J., 2018. Interactions between glioma and pregnancy: insight from a 52-case multicenter series. *J Neurosurg* 128, 3–13. <https://doi.org/10.3171/2016.10.JNS16710>
- Peng, Y., Jiang, B., Wu, H., Dai, R., Tan, L., 2012. Effects of genistein on neuronal apoptosis, and expression of Bcl-2 and Bax proteins in the hippocampus of ovariectomized rats. *Neural Regen Res* 7, 2874–2881. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.36.004>
- Pennell, L.M., Galligan, C.L., Fish, E.N., 2012. Sex affects immunity. *Journal of Autoimmunity, Special Issue: Gender, Sex Hormones, Pregnancy and Autoimmunity* 38, J282–J291. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.11.013>
- Perry, A., Wesseling, P., 2016. Chapter 5 - Histologic classification of gliomas, in: Berger, M.S., Weller, M. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology, Gliomas*. Elsevier, pp. 71–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0>
- Plunkett, R.J., Lis, A., Barone, T.A., Fronckowiak, M.D., Greenberg, S.J., 1999. Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model. *J Neurosurg* 90, 1072–1077. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.90.6.1072>
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B., 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVII. G Protein–Coupled Estrogen Receptor and Its Pharmacologic Modulators. *Pharmacol Rev* 67, 505–540. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009712>
- Prossnitz, E.R., Barton, M., 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 7, 715–726. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.122>
- Pupo, M., Bodmer, A., Berto, M., Maggiolini, M., Dietrich, P.-Y., Picard, D., 2017. A genetic polymorphism repurposes the G-protein coupled and membrane-associated estrogen receptor GPER to a transcription factor-like molecule promoting paracrine signaling between stroma and breast carcinoma cells. *Oncotarget* 8, 46728–46744. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18156>
- Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante, S., Rosano, C., Maggiolini, M., 2012. Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* 120, 1177–1182. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104526>
- Qiu, Y., Xiong, J., Fu, Q., Dong, Y., Liu, M., Peng, M., Jin, W., Zhou, L., Xu, X., Huang, X., Fu, A., Xu, G., Tu, G., Yu, T., 2021. GPER-Induced ERK Signaling Decreases Cell Viability of Hepatocellular Carcinoma. *Front. Oncol.* 11, 638171. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.638171>
- Qu, C., Ma, J., Zhang, Y., Han, C., Huang, L., Shen, L., Li, H., Wang, X., Liu, J., Zou, W., 2019. Estrogen receptor variant ER- $\alpha$ 36 promotes tamoxifen agonist activity in glioblastoma cells. *Cancer Sci* 110, 221–234. <https://doi.org/10.1111/cas.13868>
- Raftogianis, R., Creveling, C., Weinshilboum, R., Weisz, J., 2000. Estrogen metabolism by conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr* 113–124. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024234>
- Rasheed, S., Rehman, K., Akash, M.S.H., 2021. An insight into the risk factors of brain tumors and their therapeutic interventions. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 143, 112119. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112119>
- Rasmussen, S.G.F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X.,

- Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2007. Crystal structure of the human  $\beta_2$  adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383–387. <https://doi.org/10.1038/nature06325>
- Razmara, A., Sunday, L., Stirone, C., Wang, X.B., Krause, D.N., Duckles, S.P., Procaccio, V., 2008. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 782–790. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.134072>
- Recchia, A.G., De Francesco, E.M., Vivacqua, A., Sisci, D., Panno, M.L., Andò, S., Maggiolini, M., 2011. The G Protein-coupled Receptor 30 Is Up-regulated by Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in Breast Cancer Cells and Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 286, 10773–10782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172247>
- Ren, J., Guo, H., Wu, H., Tian, T., Dong, D., Zhang, Yuelang, Sui, Y., Zhang, Yong, Zhao, D., Wang, S., Li, Z., Zhang, X., Liu, R., Qian, J., Wei, H., Jiang, W., Liu, Y., Li, Y., 2015. GPER in CAFs regulates hypoxia-driven breast cancer invasion in a CTGF-dependent manner. *Oncology Reports* 33, 1929–1937. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3779>
- Rettberg, J.R., Yao, J., Brinton, R.D., 2014. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 8–30. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.08.001>
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2005. A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* 307, 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Revankar, C.M., Mitchell, H.D., Field, A.S., Burai, R., Corona, C., Ramesh, C., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., Prossnitz, E.R., 2007. Synthetic Estrogen Derivatives Demonstrate the Functionality of Intracellular GPR30. *ACS Chem. Biol.* 2, 536–544. <https://doi.org/10.1021/cb700072n>
- Robins, H.I., Won, M., Seiferheld, W.F., Schultz, C.J., Choucair, A.K., Brachman, D.G., Demas, W.F., Mehta, M.P., 2006. Phase 2 trial of radiation plus high-dose tamoxifen for glioblastoma multiforme: RTOG protocol BR-00211. *Neuro-Oncology* 8, 47–52. <https://doi.org/10.1215/S1522851705000311>
- Rochester, J.R., 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42, 132–155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- Rohlenova, K., Sachaphibulkij, K., Stursa, J., Bezawork-Geleta, A., Blecha, J., Endaya, B., Werner, L., Cerny, J., Zobalova, R., Goodwin, J., Spacek, T., Alizadeh Pesdar, E., Yan, B., Nguyen, M.N., Vondrusova, M., Sobol, M., Jezek, P., Hozak, P., Truksa, J., Rohlena, J., Dong, L.-F., Neuzil, J., 2017. Selective Disruption of Respiratory Supercomplexes as a New Strategy to Suppress Her2high Breast Cancer. *Antioxid Redox Signal* 26, 84–103. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6677>
- Ronda, A.C., Boland, R.L., 2016. Intracellular Distribution and Involvement of GPR30 in the Actions of E2 on C2C12 Cells: ROLE OF GPR30 IN C2C12 CELLS. *J. Cell. Biochem.* 117, 793–805. <https://doi.org/10.1002/jcb.25369>
- Roque, C., Mendes-Oliveira, J., Baltazar, G., 2019. G protein-coupled estrogen receptor activates cell type-specific signaling pathways in cortical cultures: relevance to the selective loss of astrocytes. *J. Neurochem.* 149, 27–40. <https://doi.org/10.1111/jnc.14648>

- Roselli, C.E., 2007. BRAIN AROMATASE: ROLES IN REPRODUCTION AND NEUROPROTECTION. *J Steroid Biochem Mol Biol* 106, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.05.014>
- Rosenfeld, C.S., Shay, D.A., Vieira-Potter, V.J., 2018. Cognitive Effects of Aromatase and Possible Role in Memory Disorders. *Frontiers in Endocrinology* 9.
- Rossetti, M.F., Cambiasso, M.J., Holschbach, M.A., Cabrera, R., 2016. Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *J Neuroendocrinol* 28. <https://doi.org/10.1111/jne.12402>
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., Kotchen, J.M., Ockene, J., Writing Group for the Women’s Health Initiative Investigators, 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. <https://doi.org/10.1001/jama.288.3.321>
- Rossouw, J.E., Prentice, R.L., Manson, J.E., Wu, L., Barad, D., Barnabei, V.M., Ko, M., LaCroix, A.Z., Margolis, K.L., Stefanick, M.L., 2007. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA* 297, 1465–1477. <https://doi.org/10.1001/jama.297.13.1465>
- Rudelius, M., Rauert-Wunderlich, H., Hartmann, E., Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Ott, G., Rosenwald, A., 2015. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER-1) contributes to the proliferation and survival of mantle cell lymphoma cells. *Haematologica* 100, e458–e461. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.127399>
- Rusthoven, C.G., Koshy, M., Sher, D.J., Ney, D.E., Gaspar, L.E., Jones, B.L., Karam, S.D., Amini, A., Ormond, D.R., Youssef, A.S., Kavanagh, B.D., 2016. Combined-Modality Therapy With Radiation and Chemotherapy for Elderly Patients With Glioblastoma in the Temozolomide Era: A National Cancer Database Analysis. *JAMA Neurol* 73, 821. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0839>
- Sakamoto, H., Matsuda, K., Hosokawa, K., Nishi, M., Morris, J.F., Prossnitz, E.R., Kawata, M., 2007. Expression of G Protein-Coupled Receptor-30, a G Protein-Coupled Membrane Estrogen Receptor, in Oxytocin Neurons of the Rat Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Endocrinology* 148, 5842–5850. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0436>
- Samartzis, E.P., Noske, A., Meisel, A., Varga, Z., Fink, D., Imesch, P., 2014. The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Is Expressed in Two Different Subcellular Localizations Reflecting Distinct Tumor Properties in Breast Cancer. *PLoS ONE* 9, e83296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083296>
- Samavat, H., Kurzer, M.S., 2015. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 356, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>
- Sanai, N., Berger, M.S., 2008. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. *Neurosurgery* 62, 753–764; discussion 264–266. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000318159.21731.cf>
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., Berger, M.S., Alvarez-Buylla, A., 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains



- neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744. <https://doi.org/10.1038/nature02301>
- Sandén, C., Broselid, S., Cornmark, L., Andersson, K., Daszkiewicz-Nilsson, J., Mårtensson, U.E.A., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M.F., 2011. G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1/G Protein-Coupled Receptor 30 Localizes in the Plasma Membrane and Traffics Intracellularly on Cytokeratin Intermediate Filaments. *Mol Pharmacol* 79, 400–410. <https://doi.org/10.1124/mol.110.069500>
- Santen, R.J., Brodie, H., Simpson, E.R., Siiteri, P.K., Brodie, A., 2009. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocr Rev* 30, 343–375. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0016>
- Sareddy, G.R., Li, X., Liu, J., Viswanadhapalli, S., Garcia, L., Gruslova, A., Cavazos, D., Garcia, M., Strom, A.M., Gustafsson, J.-A., Tekmal, R.R., Brenner, A., Vadlamudi, R.K., 2016. Selective Estrogen Receptor  $\beta$  Agonist LY500307 as a Novel Therapeutic Agent for Glioblastoma. *Sci Rep* 6, 24185. <https://doi.org/10.1038/srep24185>
- Scarabin-Carré, V., Canonico, M., Brailly-Tabard, S., Trabado, S., Ducimetière, P., Giroud, M., Ryan, J., Helmer, C., Plu-Bureau, G., Guiochon-Mantel, A., Scarabin, P.-Y., 2012. High level of plasma estradiol as a new predictor of ischemic arterial disease in older postmenopausal women: the three-city cohort study. *J Am Heart Assoc* 1, e001388. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001388>
- Scheidereit, C., Krauter, P., von der Ahe, D., Janich, S., Rabenau, O., Cato, A.C., Suske, G., Westphal, H.M., Beato, M., 1986. Mechanism of gene regulation by steroid hormones. *J Steroid Biochem* 24, 19–24. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(86\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0022-4731(86)90026-9)
- Schulster, M., Bernie, A., Ramasamy, R., 2016. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J Androl* 18, 435. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173932>
- Scott, E., Zhang, Q., Wang, R., Vadlamudi, R., Brann, D., 2012. Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front Neuroendocrinol* 33, 85–104. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.10.001>
- Sethi, S., Li, Y., Sarkar, F.H., 2013. Regulating miRNA by Natural Agents as a New Strategy for Cancer Treatment. *Curr Drug Targets* 14, 1167–1174.
- Shao, C., Tang, H., Wang, X., He, J., Wang, P., Wu, N., 2022. Oral Contraceptive and Glioma Risk: A Prospective Cohort Study and Meta-Analysis. *Frontiers in Public Health* 10.
- Sharma, G., Hu, C., Brigman, J.L., Zhu, G., Hathaway, H.J., Prossnitz, E.R., 2013. GPER Deficiency in Male Mice Results in Insulin Resistance, Dyslipidemia, and a Proinflammatory State. *Endocrinology* 154, 4136–4145. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1357>
- Sharma, G., Hu, C., Staquicini, D.I., Brigman, J.L., Liu, M., Mauvais-Jarvis, F., Pasqualini, R., Arap, W., Arterburn, J.B., Hathaway, H.J., Prossnitz, E.R., 2020a. Preclinical efficacy of the GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. *Sci. Transl. Med.* 12, eaau5956. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5956>
- Sharma, G., Hu, C., Staquicini, D.I., Brigman, J.L., Liu, M., Mauvais-Jarvis, F., Pasqualini, R., Arap, W., Arterburn, J.B., Hathaway, H.J., Prossnitz, E.R., 2020b. Preclinical efficacy of the first-in-class GPER-selective agonist G-1 in mouse models of obesity and diabetes. *Sci Transl Med* 12, eaau5956. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5956>
- Sherwin, B.B., 2003. Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev* 24, 133–151. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0016>

- Shi, Y., Liu, X., Zhu, P., Li, J., Sham, K.W.Y., Cheng, S.H., Li, S., Zhang, Y., Cheng, C.H.K., Lin, H., 2013. G-protein-coupled estrogen receptor 1 is involved in brain development during zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.130>
- Shinawi, T., Hill, V.K., Krex, D., Schackert, G., Gentle, D., Morris, M.R., Wei, W., Cruickshank, G., Maher, E.R., Latif, F., 2013. DNA methylation profiles of long- and short-term glioblastoma survivors. *Epigenetics* 8, 149–156. <https://doi.org/10.4161/epi.23398>
- Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., 2001. Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 436, 64–81.
- Shughrue, P.J., Scrimo, P.J., Merchenthaler, I., 1998. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology* 139, 5267–5270. <https://doi.org/10.1210/endo.139.12.6525>
- Sia, J., Szmyd, R., Hau, E., Gee, H.E., 2020. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front Cell Dev Biol* 8, 41. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00041>
- Simpson, E.R., Misso, M., Hewitt, K.N., Hill, R.A., Boon, W.C., Jones, M.E., Kovacic, A., Zhou, J., Clyne, C.D., 2005. Estrogen--the good, the bad, and the unexpected. *Endocr Rev* 26, 322–330. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0020>
- Simpson, E.R., Zhao, Y., Agarwal, V.R., Michael, M.D., Bulun, S.E., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Sun, T., Fisher, C.R., Qin, K., Mendelson, C.R., 1997. Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 52, 185–213; discussion 213–214.
- Singer, C.A., Rogers, K.L., Strickland, T.M., Dorsa, D.M., 1996. Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett* 212, 13–16. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12760-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12760-9)
- Singh, N., Miner, A., Hennis, L., Mittal, S., 2021. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist* 4, 17–43. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.79>
- Sjöström, M., Hartman, L., Grabau, D., Fornander, T., Malmström, P., Nordenskjöld, B., Sgroi, D.C., Skoog, L., Stål, O., Leeb-Lundberg, L.M.F., Fernö, M., 2014. Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 145, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-2936-4>
- Skrzypczak, M., Schüler, S., Lattrich, C., Ignatov, A., Ortmann, O., Treeck, O., 2013. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) expression in endometrial adenocarcinoma and effect of agonist G-1 on growth of endometrial adenocarcinoma cell lines. *Steroids* 78, 1087–1091. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.07.007>
- Smith, H.O., Arias-Pulido, H., Kuo, D.Y., Howard, T., Qualls, C.R., Lee, S.-J., Verschraegen, C.F., Hathaway, H.J., Joste, N.E., Prossnitz, E.R., 2009. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 114, 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.05.015>
- Smith, H.O., Leslie, K.K., Singh, M., Qualls, C.R., Revankar, C.M., Joste, N.E., Prossnitz, E.R., 2007. GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *American*

- Sniekers, Y.H., van Osch, G.J.V.M., Jahr, H., Weinans, H., van Leeuwen, J.P.T.M., 2010. Estrogen modulates iodoacetate-induced gene expression in bovine cartilage explants. *J Orthop Res* 28, 607–615. <https://doi.org/10.1002/jor.21042>
- Somma, T., Baiano, C., Santi, L., Sabatino, G., Della Pepa, G.M., La Rocca, G., Cappabianca, P., Olivi, A., Skrap, M., Ius, T., 2020. Diffuse low grade glioma and pregnancy: Practical considerations and clinical tips. *Clin Neurol Neurosurg* 198, 106110. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.106110>
- Song, R.X.-D., Chen, Y., Zhang, Z., Bao, Y., Yue, W., Wang, J.-P., Fan, P., Santen, R.J., 2010. Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.09.018>
- Song, R.X.-D., Zhang, Z., Chen, Y., Bao, Y., Santen, R.J., 2007. Estrogen Signaling via a Linear Pathway Involving Insulin-Like Growth Factor I Receptor, Matrix Metalloproteinases, and Epidermal Growth Factor Receptor to Activate Mitogen-Activated Protein Kinase in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 148, 4091–4101. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0240>
- Song, R.X.-D., Zhang, Z., Santen, R.J., 2005. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab* 16, 347–353. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.06.010>
- Stabellini, N., Krebs, H., Patil, N., Waite, K., Barnholtz-Sloan, J.S., 2021. Sex Differences in Time to Treat and Outcomes for Gliomas. *Frontiers in Oncology* 11.
- Steinmetz, M.O., Prota, A.E., 2018. Microtubule-Targeting Agents: Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 28, 776–792. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.05.001>
- Stensjøen, A.L., Berntsen, E.M., Jakola, A.S., Solheim, O., 2018. When did the glioblastoma start growing, and how much time can be gained from surgical resection? A model based on the pattern of glioblastoma growth in vivo. *Clin Neurol Neurosurg* 170, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.04.028>
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sun, R., Hu, Z., Curtis, C., 2018. Big Bang Tumor Growth and Clonal Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a028381. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028381>
- Tabouret, E., Nguyen, A.T., Dehais, C., Carpentier, C., Ducray, F., Idbaih, A., Mokhtari, K., Jouvet, A., Uro-Coste, E., Colin, C., Chinot, O., Loiseau, H., Moyal, E., Maurage, C.-A., Polivka, M., Lechapt-Zalcman, E., Desenclos, C., Meyronet, D., Delattre, J.-Y., Figarella-Branger, D., For POLA Network, 2016. Prognostic impact of the 2016 WHO classification of diffuse gliomas in the French POLA cohort. *Acta Neuropathol* 132, 625–634. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1611-8>
- Tabunoki, H., Saito, N., Suwanborirux, K., Charupant, K., Satoh, J., 2012. Molecular network profiling of U373MG human glioblastoma cells following induction of apoptosis by

- novel marine-derived anti-cancer 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline alkaloids. *Cancer Cell Int* 12, 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-12-14>
- Takahashi, Kayo, Hosoya, T., Onoe, K., Takashima, T., Tanaka, M., Ishii, A., Nakatomi, Y., Tazawa, S., Takahashi, Kazuhiro, Doi, H., Wada, Y., Watanabe, Y., 2018. Association between aromatase in human brains and personality traits. *Sci Rep* 8, 16841. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35065-4>
- Talia, M., De Francesco, E., Rigracciolo, D., Muoio, M., Muglia, L., Belfiore, A., Maggiolini, M., Sims, A., Lappano, R., 2020. The G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Expression Correlates with Pro-Metastatic Pathways in ER-Negative Breast Cancer: A Bioinformatics Analysis. *Cells* 9, 622. <https://doi.org/10.3390/cells9030622>
- Tang, L., Deng, L., Bai, H.X., Sun, J., Neale, N., Wu, J., Wang, Y., Chang, K., Huang, R.Y., Zhang, P.J., Li, X., Xiao, B., Cao, Y., Tao, Y., Yang, L., 2018. Reduced expression of DNA repair genes and chemosensitivity in 1p19q codeleted lower-grade gliomas. *J Neurooncol* 139, 563–571. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2915-4>
- Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., Mayeux, R., 1996. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429–432. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)03356-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)03356-9)
- Tao, B.-B., He, H., Shi, X., Wang, C., Li, W., Li, B., Dong, Y., Hu, G.-H., Hou, L.-J., Luo, C., Chen, J., Chen, H., Yu, Y., Sun, Q., Lu, Y.-C., 2013. Up-regulation of USP2a and FASN in gliomas correlates strongly with glioma grade. *Journal of Clinical Neuroscience* 20, 717–720. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.03.050>
- Tavares, C.B., Gomes-Braga, F. das C.S., Sousa, E.B., Borges, U.S., Escórcio-Dourado, C.S., Silva-Sampaio, J.P. da, Silva, B.B. da, 2018. Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 64, 1129–1133. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.12.1129>
- Thiebaut, C. (2019). Modalités de régulation d'ER $\alpha$ 36 et leurs conséquences sur la physiopathologie de la glande mammaire [PhD thesis, Université de Lorraine]. Retrieved from <https://www.theses.fr/2019LORR0090>
- Thomas, P., Dong, J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102, 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.017>
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Tian, S., Zhan, N., Li, R., Dong, W., 2019. Downregulation of G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) is Associated with Reduced Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Med Sci Monit* 25, 3115–3126. <https://doi.org/10.12659/MSM.913634>
- Tirosh, I., Venteicher, A.S., Hebert, C., Escalante, L.E., Patel, A.P., Yizhak, K., Fisher, J.M., Rodman, C., Mount, C., Filbin, M.G., Neftel, C., Desai, N., Nyman, J., Izar, B., Luo, C.C., Francis, J.M., Patel, A.A., Onozato, M.L., Riggi, N., Livak, K.J., Gennert, D., Satija, R., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., Mylvaganam, R., Iafrate, A.J., Frosch, M.P., Golub, T.R., Rivera, M.N., Getz, G., Rozenblatt-Rosen, O., Cahill, D.P., Monje, M., Bernstein, B.E., Louis, D.N., Regev, A., Suvà, M.L., 2016. Single-cell

- RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendrogloma. *Nature* 539, 309–313. <https://doi.org/10.1038/nature20123>
- Titus, L., Hatch, E.E., Palmer, J.R., Huo, D., Strohsnitter, W.C., Adam, E., Ricker, W., Hyer, M., Hoover, R.N., Troisi, R., 2019. Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Depression in Women and Men. *Epidemiology* 30, 679–686. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000001048>
- Tivnan, A., Heilinger, T., Ramsey, J.M., O'Connor, G., Pokorny, J.L., Sarkaria, J.N., Stringer, B.W., Day, B.W., Boyd, A.W., Kim, E.L., Lode, H.N., Cryan, S.-A., Prehn, J.H.M., 2017. Anti-GD2-ch14.18/CHO coated nanoparticles mediate glioblastoma (GBM)-specific delivery of the aromatase inhibitor, Letrozole, reducing proliferation, migration and chemoresistance in patient-derived GBM tumor cells. *Oncotarget* 8, 16605–16620. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15073>
- Toda, K., Yang, L.X., Shizuta, Y., 1995. Transcriptional regulation of the human aromatase cytochrome P450 gene expression in human placental cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 181–190. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00032-u](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00032-u)
- Tomasetti, C., Li, L., Vogelstein, B., 2017. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science* 355, 1330–1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>
- Torres-López, L., Olivás-Aguirre, M., Villatoro-Gómez, K., Dobrovinskaya, O., 2022. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist G-1 Inhibits Proliferation and Causes Apoptosis in Leukemia Cell Lines of T Lineage. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 811479. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.811479>
- Trenti, A., Tedesco, S., Boscaro, C., Trevisi, L., Bolego, C., Cignarella, A., 2018. Estrogen, Angiogenesis, Immunity and Cell Metabolism: Solving the Puzzle. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 859. <https://doi.org/10.3390/ijms19030859>
- Truss, M., Beato, M., 1993. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14, 459–479. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-459>
- Tseng, S.-H., Wang, C.-H., Lin, S.-M., Chen, C.-K., Huang, H.-Y., Chen, Y., 2004. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 and caspase 3 in the tamoxifen-induced apoptosis of rat glioma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 285–293. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0546-y>
- Tsuda, M.C., Yamaguchi, N., Nakata, M., Ogawa, S., 2014. Modification of female and male social behaviors in estrogen receptor beta knockout mice by neonatal maternal separation. *Frontiers in Neuroscience* 8.
- Tutzauer, J., Gonzalez de Valdivia, E., Swärd, K., Alexandrakis Eilard, I., Broselid, S., Kahn, R., Olde, B., Leeb-Lundberg, L.M.F., 2021. Ligand-Independent G Protein-Coupled Estrogen Receptor/G Protein-Coupled Receptor 30 Activity: Lack of Receptor-Dependent Effects of G-1 and 17  $\beta$  -Estradiol. *Mol Pharmacol* 100, 271–282. <https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000259>
- Ulasov, I., Yi, R., Guo, D., Sarvaiya, P., Cobbs, C., 2014. The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 1846, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.03.002>
- Uysal, D., Kowalewski, K.-F., Kriegmair, M.C., Wirtz, R., Popovic, Z.V., Erben, P., 2021. A comprehensive molecular characterization of the 8q22.2 region reveals the prognostic

- relevance of OSR2 mRNA in muscle invasive bladder cancer. *PLoS One* 16, e0248342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248342>
- Väänänen, H.K., Härkönen, P.L., 1996. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 23 Suppl, S65-69. [https://doi.org/10.1016/0378-5122\(96\)01015-8](https://doi.org/10.1016/0378-5122(96)01015-8)
- van Westrhenen, A., Senders, J.T., Martin, E., DiRisio, A.C., Broekman, M.L.D., 2018. Clinical challenges of glioma and pregnancy: a systematic review. *J Neurooncol* 139, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2851-3>
- Varshney, M.K., Yu, N.Y.-L., Katayama, S., Li, X., Liu, T., Wu, W.-F., Töhönen, V., Krjutškov, K., Kere, J., Fan, X., Inzunza, J., Gustafsson, J.-Å., Nalvarte, I., 2021. Motor Function Deficits in the Estrogen Receptor Beta Knockout Mouse: Role on Excitatory Neurotransmission and Myelination in the Motor Cortex. *NEN* 111, 27–44. <https://doi.org/10.1159/000506162>
- Venteicher, A.S., Tirosh, I., Hebert, C., Yizhak, K., Neftel, C., Filbin, M.G., Hovestadt, V., Escalante, L.E., Shaw, M.L., Rodman, C., Gillespie, S.M., Dionne, D., Luo, C.C., Ravichandran, H., Mylvaganam, R., Mount, C., Onozato, M.L., Nahed, B.V., Wakimoto, H., Curry, W.T., Iafrate, A.J., Rivera, M.N., Frosch, M.P., Golub, T.R., Brastianos, P.K., Getz, G., Patel, A.P., Monje, M., Cahill, D.P., Rozenblatt-Rosen, O., Louis, D.N., Bernstein, B.E., Regev, A., Suvà, M.L., 2017. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science* 355, eaai8478. <https://doi.org/10.1126/science.aai8478>
- Vidad, A.R., Macaspac, S., Ng, H.L., 2021. Locating ligand binding sites in G-protein coupled receptors using combined information from docking and sequence conservation. *PeerJ* 9, e12219. <https://doi.org/10.7717/peerj.12219>
- Vidad, A.R., Macaspac, S., Ng, H.L., 2016. Locating the ligand binding Sites for the G-protein coupled estrogen receptor (GPER) using combined information from docking and sequence conservation (preprint). *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/061051>
- Vivacqua, A., Lappano, R., De Marco, P., Sisci, D., Aquila, S., De Amicis, F., Fuqua, S.A.W., Andò, S., Maggiolini, M., 2009. G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Mol Endocrinol* 23, 1815–1826. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0120>
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J., 2014. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)* 24, 329–342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>
- Wan, S., Jiang, J., Zheng, C., Wang, N., Zhai, X., Fei, X., Wu, R., Jiang, X., 2018. Estrogen nuclear receptors affect cell migration by altering sublocalization of AQP2 in glioma cell lines. *Cell Death Discov* 4, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0113-y>
- Wang, C., Lv, X., He, C., Hua, G., Tsai, M.-Y., Davis, J.S., 2013. The G-protein-coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian cancer cells by blocking tubulin polymerization. *Cell Death Dis* 4, e869–e869. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.397>
- Wang, S., Wei, H., Cai, M., Lu, Y., Hou, W., Yang, Q., Dong, H., Xiong, L., 2014. Genistein Attenuates Brain Damage induced by Transient Cerebral Ischemia Through Up-regulation of ERK Activity in Ovariectomized Mice. *Int J Biol Sci* 10, 457–465. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7562>

- Wang, Z., Chen, X., Zhao, Y., Jin, Y., Zheng, J., 2019. G-protein-coupled estrogen receptor suppresses the migration of osteosarcoma cells via post-translational regulation of Snail. *J Cancer Res Clin Oncol* 145, 87–96. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2768-4>
- Wang, Z., Liu, D., Zhang, Q., Wang, J., Zhan, J., Xian, X., Du, Z., Wang, X., Hao, A., 2014. Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 92, 574–586. <https://doi.org/10.1002/jnr.23342>
- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., Deuel, T.F., 2005. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.226>
- Weiser, M.J., Foradori, C.D., Handa, R.J., 2008. Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev* 57, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.013>
- Weissenborn, C., Ignatov, T., Nass, N., Kalinski, T., Dan Costa, S., Zenclussen, A.C., Ignatov, A., 2017. *GPER* Promoter Methylation Controls *GPER* Expression in Breast Cancer Patients. *Cancer Investigation* 35, 100–107. <https://doi.org/10.1080/07357907.2016.1271886>
- Weissenborn, C., Ignatov, T., Ochel, H.-J., Costa, S.D., Zenclussen, A.C., Ignatova, Z., Ignatov, A., 2014. *GPER* functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 140, 713–723. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1620-8>
- Wharton, W., Gleason, C.E., Lorenze, K.R., Markgraf, T.S., Ries, M.L., Carlsson, C.M., Asthana, S., 2009. Potential role of estrogen in the pathobiology and prevention of Alzheimer's disease. *Am J Transl Res* 1, 131–147.
- White, R.E., 2002. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol* 38, 73–80. [https://doi.org/10.1016/s0306-3623\(02\)00129-5](https://doi.org/10.1016/s0306-3623(02)00129-5)
- Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A.A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., Campone, M., Clement, P.M., Stupp, R., Fabbro, M., Le Rhun, E., Dubois, F., Weller, M., von Deimling, A., Golfopoulos, V., Bromberg, J.C., Platten, M., Klein, M., van den Bent, M.J., 2017. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 377, 1954–1963. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal707358>
- Wilkie, T.M., Chen, Y., Gilbert, D.J., Moore, K.J., Yu, L., Simon, M.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., 1993. Identification, chromosomal location, and genome organization of mammalian G-protein-coupled receptors. *Genomics* 18, 175–184. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1452>
- Wise, A., Gearing, K., Rees, S., 2002. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discovery Today* 7, 235–246. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02131-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02131-6)
- Xiulin, J., Wang, Chunyan, Guo, J., Wang, Chenyang, Pan, C., Nie, Z., 2022. Next-generation sequencing identifies *HOXA6* as a novel oncogenic gene in low grade glioma. *Aging (Albany NY)* 14, 2819–2854. <https://doi.org/10.18632/aging.203977>
- Xu, H., Sun, Y., You, B., Huang, C.-P., Ye, D., Chang, C., 2020. Androgen receptor reverses the oncometabolite R-2-hydroxyglutarate-induced prostate cancer cell invasion via suppressing the circRNA-51217/miRNA-646/TGF $\beta$ 1/p-Smad2/3 signaling. *Cancer Lett* 472, 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.014>

- Xu, P., Cao, X., He, Y., Zhu, L., Yang, Y., Saito, K., Wang, C., Yan, X., Hinton, A.O., Zou, F., Ding, H., Xia, Y., Yan, C., Shu, G., Wu, S.-P., Yang, B., Feng, Y., Clegg, D.J., DeMarchi, R., Khan, S.A., Tsai, S.Y., DeMayo, F.J., Wu, Q., Tong, Q., Xu, Y., 2015. Estrogen receptor- $\alpha$  in medial amygdala neurons regulates body weight. *J. Clin. Invest.* 125, 2861–2876. <https://doi.org/10.1172/JCI80941>
- Yague, J.G., Garcia-Segura, L.M., Azcoitia, I., 2009. Selective transcriptional regulation of aromatase gene by vitamin D, dexamethasone, and mifepristone in human glioma cells. *Endocrine* 35, 252–261. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9134-2>
- Yang, H., Wang, C., Liao, H., Wang, Q., 2021. Activation of GPER by E2 promotes proliferation, invasion and migration of breast cancer cells by regulating the miR-124/CD151 pathway. *Oncol Lett* 21, 432. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12693>
- Yang, L., Yuan, X., Wang, J., Gu, C., Zhang, H., Yu, J., Liu, F., 2015. Radiosensitization of human glioma cells by tamoxifen is associated with the inhibition of PKC- $\iota$  activity in vitro. *Oncol Lett* 10, 473–478. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3195>
- Yang, W., Warrington, N.M., Taylor, S.J., Whitmire, P., Carrasco, E., Singleton, K.W., Wu, N., Lathia, J.D., Berens, M.E., Kim, A.H., Barnholtz-Sloan, J.S., Swanson, K.R., Luo, J., Rubin, J.B., 2019. Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Sci Transl Med* 11, eaao5253. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao5253>
- Yao, M., Li, S., Wu, X., Diao, S., Zhang, G., He, H., Bian, L., Lu, Y., 2018. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cell Mol Immunol* 15, 737–739. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.159>
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S.D., Güpür, G., Muyan, M., 2017. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol* 16, 4–20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- Yazdani, Y., Rad, M.R.S., Taghipour, M., Chenari, N., Ghaderi, A., Razmkhah, M., 2016. Genistein Suppression of Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Mesenchymal Stem Cell Like Cells Isolated from High and Low Grade Gliomas. *Asian Pac J Cancer Prev* 17, 5303–5307. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2016.17.12.5303>
- Ye, D., Guan, K.-L., Xiong, Y., 2018. Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends in Cancer* 4, 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.12.005>
- Ye, S., Xu, Y., Li, J., Zheng, S., Sun, P., Wang, T., 2019. Prognostic role of GPER/Ezrin in triple-negative breast cancer is associated with menopausal status. *Endocrine Connections* 8, 661–671. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0164>
- Ye, S., Xu, Y., Wang, L., Zhou, K., He, J., Lu, J., Huang, Q., Sun, P., Wang, T., 2020. Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Synergistically Indicate Poor Prognosis in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *OTT Volume* 13, 8887–8899. <https://doi.org/10.2147/OTT.S265372>
- Yilmaz, M.B., Wolfe, A., Cheng, Y.-H., Glidewell-Kenney, C., Jameson, J.L., Bulun, S.E., 2009. Aromatase Promoter 1f is Regulated by Estrogen Receptor Alpha (ESR1) in Mouse Hypothalamic Neuronal Cell Lines1. *Biol Reprod* 81, 956–965. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077206>



- Yilmaz, M.B., Wolfe, A., Zhao, H., Brooks, D.C., Bulun, S.E., 2011. Aromatase promoter I.f is regulated by progesterone receptor in mouse hypothalamic neuronal cell lines. *J Mol Endocrinol* 47, 69–80. <https://doi.org/10.1530/JME-10-0149>
- Yin, H., Zhu, Q., Liu, M., Tu, G., Li, Q., Yuan, J., Wen, S., Yang, G., 2017. GPER promotes tamoxifen-resistance in ER+ breast cancer cells by reduced Bim proteins through MAPK/Erk-TRIM2 signaling axis. *International Journal of Oncology* 51, 1191–1198. <https://doi.org/10.3892/ijco.2017.4117>
- Yu, T., Cheng, H., Ding, Z., Wang, Z., Zhou, L., Zhao, P., Tan, S., Xu, X., Huang, X., Liu, M., Peng, M., Qiu, Y., 2020. GPER mediates decreased chemosensitivity via regulation of ABCG2 expression and localization in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 506, 110762. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110762>
- Yuan, J., Liu, M., Yang, L., Tu, G., Zhu, Q., Chen, M., Cheng, H., Luo, H., Fu, W., Li, Z., Yang, G., 2015. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype in the tamoxifen-resistant breast cancer cell: a new role for G protein-coupled estrogen receptor in mediating tamoxifen resistance through cancer-associated fibroblast-derived fibronectin and  $\beta$ 1-integrin signaling pathway in tumor cells. *Breast Cancer Res* 17, 69. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0579-y>
- Yuan, Y., Shah, N., Almohaisin, M.I., Saha, S., Lu, F., 2021. Assessing fatty acid-induced lipotoxicity and its therapeutic potential in glioblastoma using stimulated Raman microscopy. *Sci Rep* 11, 7422. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86789-9>
- Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S.-I., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y., Li, R., 2005. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19198–19203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505203102>
- Zeitoun, K., Takayama, K., Michael, M.D., Bulun, S.E., 1999. Stimulation of Aromatase P450 Promoter (II) Activity in Endometriosis and Its Inhibition in Endometrium Are Regulated by Competitive Binding of Steroidogenic Factor-1 and Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor to the Same cis-Acting Element 13, 15.
- Zha, Z., Su, A., Huo, S., 2018. Activation of GPER suppresses the malignancy of osteosarcoma cells via down regulation of IL-6 and IL-8. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 660, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.10.018>
- Zhang, J., Deng, M., Tong, H., Xue, W., Guo, Y., Wang, J., Chen, L., Wang, S., 2020. A novel miR-7156-3p-HOXD13 axis modulates glioma progression by regulating tumor cell stemness. *Int J Biol Sci* 16, 3200–3209. <https://doi.org/10.7150/ijbs.51293>
- Zhang, K.-S., Chen, H.-Q., Chen, Y.-S., Qiu, K.-F., Zheng, X.-B., Li, G.-C., Yang, H.-D., Wen, C.-J., 2014. Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER/EGFR/ERK1/2 signal pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 68, 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.003>
- Zhang, L., Chen, D., Zhang, J., Cai, R., Xu, L., Yu, N., Zhang, S., Yan, H., Jiang, J., Du, F., Gong, A., 2020. A novel cholchicine/gadolinium-loading tubulin self-assembly nanocarrier for MR imaging and chemotherapy of glioma. *Nanotechnology* 31, 255601. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab7c48>
- Zhang, X., Ke, S., Chen, K.-H., Li, J.-H., Ma, L., Jiang, X.-W., 2015. Diethylstilbestrol affects the expression of GPER in the gubernaculum testis. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 7217–7222.

- Zhang, X.-L., Liu, N., Weng, S.-F., Wang, H.-S., 2016. Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 119, 389–395. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12591>
- Zhang, Z., Park, J.W., Ahn, I.S., Diamante, G., Sivakumar, N., Arneson, D., Yang, X., van Veen, J.E., Correa, S.M., 2021. Estrogen receptor alpha in the brain mediates tamoxifen-induced changes in physiology in mice. *eLife* 10, e63333. <https://doi.org/10.7554/eLife.63333>
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-A., 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 6, e003. <https://doi.org/10.1621/nrs.06003>
- ZHENG, J., LI, H., ZHU, H., XIAO, X., MA, Y., 2013. Genistein inhibits estradiol- and environmental endocrine disruptor-induced growth effects on neuroblastoma cells in vitro. *Oncol Lett* 5, 1583–1586. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1236>
- Zhou, M., Sareddy, G.R., Li, M., Liu, J., Luo, Y., Venkata, P.P., Viswanadhapalli, S., Tekmal, R.R., Brenner, A., Vadlamudi, R.K., 2019. Estrogen receptor beta enhances chemotherapy response of GBM cells by down regulating DNA damage response pathways. *Sci Rep* 9, 6124. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42313-8>
- Zhou, Z., Wen, L., Lai, M., Shan, C., Wang, J., Wang, R., Li, H., Chen, L., Cai, L., Zhou, M., Zhou, C., 2020. Increased M1 Macrophages Infiltration Correlated With Poor Survival Outcomes and Radiation Response in Gliomas. *Dose Response* 18, 1559325820964991. <https://doi.org/10.1177/1559325820964991>
- Zhu, B.T., Conney, A.H., 1998. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 19, 1–27. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.1.1>
- Zou, W., Fang, C., Ji, X., Liang, X., Liu, Y., Han, C., Huang, L., Zhang, Q., Li, H., Zhang, Y., Liu, Jinqiu, Liu, Jing, 2015. Estrogen Receptor (ER)- $\alpha$ 36 Is Involved in Estrogen- and Tamoxifen-Induced Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke Models. *PLOS ONE* 10, e0140660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140660>

# Annexe

---



Review

# Astrocytoma: A Hormone-Sensitive Tumor?

Alex Hirtz <sup>1</sup>, Fabien Rech <sup>1,2</sup>, Hélène Dubois-Pot-Schneider <sup>1</sup> and Hélène Dumond <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France; alex.hirtz@univ-lorraine.fr (A.H.); fabien.rech@univ-lorraine.fr (F.R.); helene.dubois-pot-schneider@univ-lorraine.fr (H.D.-P.-S.)

<sup>2</sup> Université de Lorraine, CHRU-Nancy, Service de Neurochirurgie, F-54000 Nancy, France

\* Correspondence: helene.dumond@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-372746115

Received: 29 October 2020; Accepted: 27 November 2020; Published: 30 November 2020



**Abstract:** Astrocytomas and, in particular, their most severe form, glioblastoma, are the most aggressive primary brain tumors and those with the poorest vital prognosis. Standard treatment only slightly improves patient survival. Therefore, new therapies are needed. Very few risk factors have been clearly identified but many epidemiological studies have reported a higher incidence in men than women with a sex ratio of 1:4. Based on these observations, it has been proposed that the neurosteroids and especially the estrogens found in higher concentrations in women’s brains could, in part, explain this difference. Estrogens can bind to nuclear or membrane receptors and potentially stimulate many different interconnected signaling pathways. The study of these receptors is even more complex since many isoforms are produced from each estrogen receptor encoding gene through alternative promoter usage or splicing, with each of them potentially having a specific role in the cell. The purpose of this review is to discuss recent data supporting the involvement of steroids during gliomagenesis and to focus on the potential neuroprotective role as well as the mechanisms of action of estrogens in gliomas.

**Keywords:** steroids; estrogens; receptor isoforms; signaling; astrocytoma; glioblastoma; gender; pregnancy

## 1. Glioma

### 1.1. Etiology

Gliomas are among the most frequent and aggressive primary tumors of the central nervous system (CNS) in adults. The nomenclature of gliomas depends on the glial cell of origin. Astrocytomas and glioblastomas (GBMs) refer to gliomas of astrocytic origin, oligodendrogliomas of oligodendrocytes and ependymomas of ependymal cells, respectively. In this review, we will focus on adult astrocytomas, oligodendrogliomas and GBMs that represent 90% of glioma cases. The causes of tumor emergence and development are currently unknown, since only a few risk factors have been described. For example, patients who were already exposed to ionizing radiation are twice as likely to develop a glioma. Some genetic syndromes (Cowden, Turcot, Lynch, Li-Fraumeni, Neurofibromatosis type I) are also responsible for increasing the risk of developing a glioma. However, these risk factors are very specific to few cases and do not explain the majority of brain tumors.

### 1.2. Classification

The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System [1] used morphological and immunohistochemical characteristics to establish the glioma classification (Table 1) [1]. Four grades (I to IV) were described, depending on the severity of the tumor with the highest grade (IV-GBM) corresponding to the highest severity [1]. The grade I tumors or pilocytic astrocytomas are often benign and can be resected by surgery. Grade II are also called diffuse gliomas, infiltrative or low-grade

gliomas and include astrocytoma, oligodendroglioma and oligoastrocytoma. Grade II are slow-growing tumors that will acquire a more aggressive phenotype over time. The transition from grade II to grade III is measured by assessing tumor cell density and differentiation, number of atypical nuclei and mitotic index. Grade III are anaplastic astrocytomas, oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. Grade IV-GBMs are characterized by a fast-growing phenotype with the presence of necrotic regions and vascular development [2]. Primary GBMs develop de novo whereas secondary GBMs originate from lower grade glioma.

**Table 1.** WHO 2007 classification of malignant gliomas (adapted from [1,2]).

	Histologic Class	Grade	50% Overall Survival (years)	Mean Age at Diagnosis
Low-grade glioma	Astrocytoma	II	4–10	42
	Oligodendroglioma	II	8–20	43
	Oligoastrocytoma	II	5–12	44
High-grade glioma	Anaplastic astrocytoma	III	2–5	57
	Anaplastic oligodendroglioma	III	2–10	61
	Anaplastic oligoastrocytoma	III	2–8	52
High-grade glioma	Glioblastoma	IV	1–2	45–75

Although this type of classification was useful to diagnose the severity of the disease, it remained often ineffective to drive the treatment decision and predict the patient survival. In 2016, the WHO classification was updated by including some molecular signatures (Table 2) [3]. This provided new elements to refine glioma classification and define new subtypes related to patient outcome. This new classification now includes isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation and 1p/19q codeletion [4].

**Table 2.** WHO 2016 classification of malignant gliomas (adapted from [3,4]).

Histologic Class	Molecular Subtype			Grade	50% Overall Survival (years)	Mean Age at Diagnosis
	IDH1	1p/19q	Other Genetic Alteration (Not Required for Diagnosis)			
Oligodendroglioma	mut	codeletion	TERT mut	II/III	>15/10	35–45
Diffuse astrocytoma	mut	wt	ATRX mut, p53 mut	II/III	11/9	35–45
Diffuse astrocytoma	wt	wt	p53 mut, PTEN mut, PIK3, EGFR amplification, CDKN2A/B deletion, CDK4, BRAF, ATRX mut	II/III	5/2–3	45–50
Glioblastoma	mut	wt	p53 mut	IV	2.5	50–60
	wt	wt	PTEN mut, EGFR amplification	IV	1.5	50–60

IDH proteins are involved in tricarboxylic acid cycle and catalyze the conversion of  $\alpha$ -ketoglutarate into citrate. The most common mutation of the IDH1 gene is the R132H, which triggers a tridimensional change of the enzyme structure. The mutated conformation impacts the enzymatic activity which becomes able to convert  $\alpha$ -ketoglutarate to D-2-hydroxyglutarate (D2HG). The accumulation of this oncometabolite is harmful for the cell since it induces epigenetic modifications (histone modification and DNA methylation) resulting in aberrant gene expression [5]. Indeed, D2HG acts as an inhibitor of several  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases, including histone demethylases or TET 5-methylcytosine hydroxylases, leading to an increase in repressive histone methylation marks and a global increase in 5-methylcytosine level. Interestingly, in glioma, IDH mutations are associated with a more favorable prognosis because these tumors are more sensitive to the chemotherapeutic drug, temozolomide (TMZ) [6].

In addition to IDH mutations, 1p/19q loss of heterozygosity alteration is used for classification of glioma. The chromosomal 1p/19q codeletion (hallmark of oligodendroglioma) associated with IDH mutation increases the range of response to alkylating agent chemotherapy and thus leads to an even better prognosis [7,8].

Other genetic alterations, not required for diagnosis, are currently investigated in clinics to predict the response to treatment: ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked), TERT (telomerase reverse transcriptase), EGFR (epidermal growth factor receptor), BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), histone H3K27M mutations and MGMT (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) promoter methylation (Table 2) [9]. MGMT is a DNA repair protein involved in DNA damage repair. The methylation of MGMT promoter is linked to a favorable prognosis in glioma treated by TMZ since MGMT expression is decreased, which leads to impaired DNA repair ability in tumor cells and enhances the sensitivity to alkylating agents [10].

A comparison of WHO 2007 and 2016 classifications is presented in Tables 1 and 2.

### 1.3. Current Treatment

The current treatment for gliomas is a combination of surgery, chemotherapy (mainly TMZ) and radiotherapy that results in patient outcome regarding the subtypes of gliomas (from 18 months of median overall survival in GBM to more than 15 years of median overall survival in 1p19q codeleted oligodendroglioma).

Even if the new 2016 classification is now commonly used for the diagnosis of glioma grades, a few treatments are currently on trial for precision medicine [11]. Large-scale genomic studies identified several frequently mutated genes in glioma, among which IDH1/2, p53, RB and altered receptor tyrosine kinase (RTK) signaling pathways [12]. Specific drugs targeting each pathway, especially the IDH1 or IDH2 inhibitors ivosetinib or enasidenib (clinical trial: NCT02273739), are currently tested as new therapeutic opportunities [13,14].

### 1.4. Evolution of Worldwide Incidence/Survival

A study aimed to compare the worldwide incidence rates of CNS cancers between 1990 and 2016 showed a 17.3% increase worldwide, reaching 32.5% for western Europe [15]. From a cohort of 264,241 pediatric and adult patients affected by various CNS tumors between 2003 and 2007, Leece and colleagues [16] established that the incidence was 5.57/100,000 for overall CNS tumors, and average of 2.98/100,000 for astrocytic tumors, which preferentially affected patients over 45 years of age [16]. The five-year survival was less than 3% for GBM, the highest-grade astrocytoma [17]. For patients over 40, the overall incidence rose up to 11.75/100,000 and 6.77/100,000 for astrocytic tumors [16]. Over 50 years of age, the epidemiological data collected by several teams from different countries indicated that the incidence rate depended mainly on three intrinsic parameters: age (over 40 years), ethnicity and gender [16,18–22]. Leece and colleagues [16] estimated a lower incidence rate of brain and other CNS tumors in all age groups among Asians (male: 4.0–6.5/100,000; female: 2.4–4.3/100,000) compared to Caucasians of all ages (male: 8.2–8.7/100,000; female: 5.3–5.6/100,000) [16]. For people aged over 40 years, the lowest rate was reported for East/Southeast Asia (1.91/100,000) and the highest for Australia and New Zealand (9.58/100,000) followed by the US and western Europe (8.45/100,000). Another worldwide comparative study of the incidence rate for CNS cancers in men and women (aged 0–75 years old) also showed a significant divergence: in particular, in western Europe, incidence rate in 2012 was 6.1/100,000 and 4.4/100,000 for men or women, respectively. Based on Ostrom and colleagues [23], men are 1.58-fold more likely to develop GBMs than women. Likewise, a sex ratio of around 1.30 is verified for oligodendrogliomas and other astrocytomas [23].

Recently, sex differences in the incidence of GBMs have been used to try refining the molecular-based 2016 classification of gliomas [24]. Using a computational algorithm that linked magnetic resonance imaging data, patient outcome data and transcriptomes available in the TCGA database, Yang and colleagues [24] first confirmed that women had longer overall survival than men, whatever the molecular status of GBM [24]. The IDH1 mutation conferred a survival benefit among patients from both sexes. Second, they performed gene clustering to evaluate sex-specific impact of IDH1 mutation on patient outcome. The survival benefit of the female “long survivors” was independent of IDH1 mutations whereas IDH1 status exerted a significant influence among the male

“long survivors”, suggesting that being a female (IDH1 wt or mutated) provided a better survival advantage than being an IDH1-mutated male. However, in sex-specific expression profiles associated with male or female “long survivor” clusters, no gene was directly related to hormone synthesis or signaling. Therefore, a more detailed analysis of hormone-response pathways in GBMs as well as in low-grade gliomas is needed to understand the sex-based differences in tumor development and take such data into account to further refine glioma classification.

In conclusion, the main intrinsic risk factors for CNS tumors and especially gliomas of astrocytic origin are age over 40 years, male gender and Caucasian origin, which may combine to currently unknown extrinsic factors such as fetal lifelong exposure to unknown compounds, healthcare, diet and lifestyle.

## 2. Gender Differences in Astrocytoma: The Hypothesis of Steroid Hormones

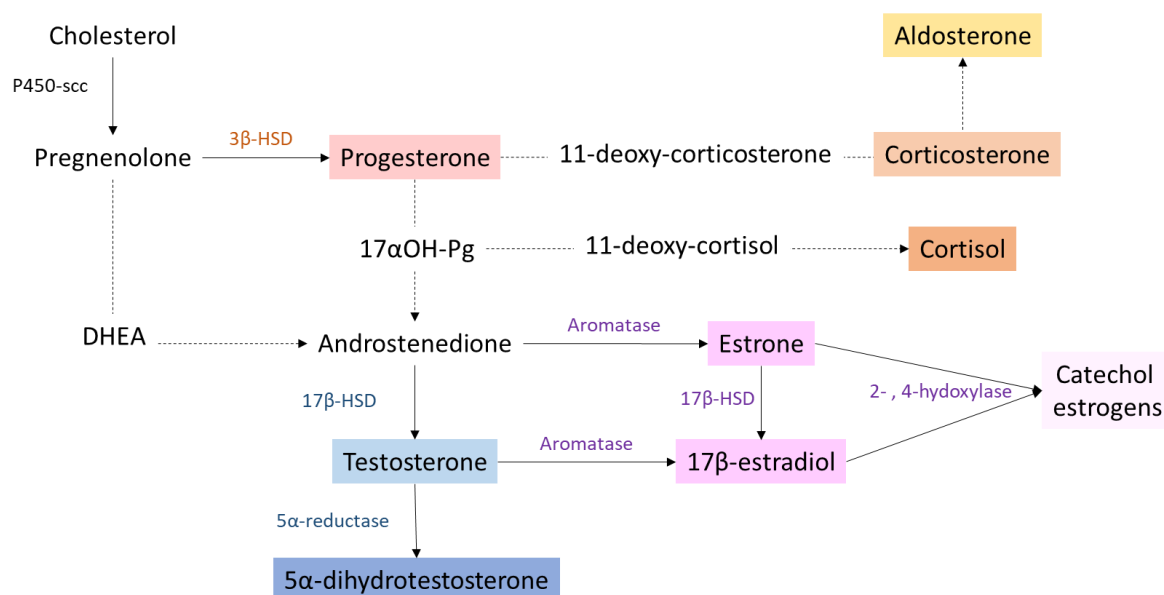
Epidemiological studies indicate that, whatever the age, ethnicity and socio-economic parameters, the incidence of glioma is higher in men than women with a sex ratio of 1.4:1, raising the question of underlying mechanisms, including the potential role of hormones in the development of these tumors.

In adults, the incidence of GBM is about 40% higher in men than in women. In the United States, the annual age-adjusted incidence rate is 7.6 per 100,000 for men and 5.4 per 100,000 in women, with a stable excess of cases in men, over time. In addition, the ratio for women vs. men begins to decline in pre-menopausal age, reaching 0.51 in people aged 50–54 years [25–28]. Subsequently, this ratio increases again and remains at a constant level of about 0.65 in parallel with the decrease in hormone levels in women [26]. These results strongly suggest that female hormones have preventive effects on gliomagenesis.

### 2.1. Steroid Biosynthesis

Steroid hormones are synthesized from cholesterol (27 carbons) via an enzymatic biosynthetic pathway that is mainly active in the ovaries and adrenal glands in premenopausal women and in placenta during pregnancy (Figure 1). When ovarian function ceases at the time of menopause, steroids are produced in smaller quantities by peripheral tissues, such as the adrenal glands, liver, brain and fat tissue. In men, steroidogenesis mainly occurs in testes. It is initiated in Leydig cells and ends with the androgen aromatization in the Sertoli cells [29,30]. There are also secondary sources of steroids, produced by brain and peripheral tissues. Immediately after their synthesis, steroids are released into the bloodstream. To allow their transport to the target tissues, these lipophilic hormones bind the SHBG (sex hormone binding globulin). They can also bind in a non-specific way to albumin or remain in free form (for example, 2–3% of circulating estradiol remains unbound).

Steroidogenesis begins with the cleavage of the cholesterol side chain by the cytochrome P450<sub>sc</sub> (side chain cleavage) enzyme located on the inner mitochondrial membrane. This first step leads to the formation of pregnenolone, which then reaches the endoplasmic reticulum where it will be transformed into progesterone under the action of the enzyme 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase). Following the intervention of two oxidoreductases and a lyase (17 $\alpha$ -hydroxylase, 17-20 lyase, 17  $\beta$ -HSD), progesterone is converted to androgens, androstenedione and testosterone, which will be transformed by the cytochrome P450 aromatase into estrogens (oestrone (E1)) and 17 $\beta$ -estradiol (E2)) or converted to 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) by 5 $\alpha$ -reductase, respectively. Estriol (E3) is obtained from E1 or E2 through the action of enzymes cytochrome P450 (CYP3A4, CYP3A5) expressed only in the liver and placenta. Finally, estetrol (E4) is synthesized from E2 and E3 in the fetal liver by the action of enzyme of 15 $\alpha$ - and 16 $\alpha$ -hydroxylases [31]. Then, 17 $\beta$ -estradiol and oestrone can be hydroxylated in the C2, C4 or C16 position by different cytochrome P450 enzymes. This leads to the synthesis of derivatives called catechol estrogens (2-,4- or 16- $\alpha$ hydroxyestrone and 16- $\alpha$ hydroxyestradiol). These compounds can then be metabolized to methoxyestrogens by the action of the enzyme, catechol-O-methyltransferase (COMT). In order to allow their elimination in urine or feces, all of these compounds (estrogens, catechol- and methoxyestrogens) may be conjugated with glucuronic acid or a sulphate group by liver enzymes: UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases [32].



**Figure 1.** Simplified scheme of steroid biosynthesis pathway. Main enzymes that convert one steroid to another are indicated with plain arrows. Dotted lines represent multiple enzymatic reactions. P450-scc: cholesterol side chain cleavage enzyme; 3 $\beta$ -HSD: 3- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase; 17 $\beta$ -HSD: 17- $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase; DHEA: dehydroepiandrosterone; 17 $\alpha$ OH-Pg: 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone.

The glucocorticoids, 11-deoxycortisol and 11-deoxycorticosterone are produced from 17-hydroxyprogesterone (17 $\alpha$ OH-Pg) and progesterone, respectively, by the action of 21-hydroxylase (CYP21A2), followed by the P450C11 (cyp11, cytochrome P450 11 $\beta$ -hydroxylase B1 and/or B2) activity.

## 2.2. Steroid Functions in Normal Brain

Even if the main number of steroids is produced in organs distant from the brain (i.e., gonads, adrenal cortex and placenta), they can cross the blood–brain barrier or be produced in situ and exert multiple roles into the CNS [33]. Steroid hormones are involved in numerous brain functions, including the development of the central and peripheral nervous system, the regulation of neurotransmitter metabolism, synaptic connectivity, dendritic branching and myelination [34].

In the human developing brain (from gestational to neonatal period), sex hormones determine apoptosis, neuronal migration, neurogenesis, axonal guidance, synaptogenesis while the estradiol/testosterone balance induces sexual differentiation of the brain, may condition neuronal stem cell survival and differentiation, and thus late onset of neurodegenerative syndromes. At the cerebral level, all the enzymes necessary for estrogen biosynthesis (mainly P450scc, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD and aromatase) are present in neurons and some populations of astrocytes and oligodendrocytes in the hypothalamus, arcuate nucleus, olfactory bulbs, pre-optic areas and certain regions of the cortex, hippocampus and thalamus [35,36]. Therefore, pregnenolone, progesterone, testosterone and 17 $\beta$ -estradiol can be synthesized de novo in normal brain [37]. Catechol estrogens formation and metabolism also occur in brain tissue, but their role and mode of action remain to be investigated [38].

Estrogens are circulating steroid hormones mainly produced by the gonads through the action of aromatase. Aromatase is also expressed in non-reproductive tissues such as the liver, heart, muscles, bones and brain, highlighting the important role of estrogens in controlling the pathophysiology of many organs and the diversity of their targets. Estrogens regulate glucose transport (GLUT transporter), aerobic glycolysis (hexokinase and pyruvate dehydrogenase activity), and mitochondrial function (aconitase and ATP synthase) to generate ATP. Estrogens also cooperate with adipokines such as leptin and ghrelin to coordinate cerebral control of the whole body's food intake/energy expenditure and reproductive function [39–41]. Estradiol has also been reported to modulate motor control, social and



cognitive behavior, mood and pain sensitivity [42]. From mid-pregnancy to birth, progesterone, originating from both maternal and fetal tissues, also participates in myelination, neuroprotection, brain sexual differentiation and neural circuits maturation [43].

How androgens work in the brain will depend on the type of androgen. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is involved in the development of cortico-amygdala and cortico-hippocampal structural networks regulating attention, working memory, reading and writing abilities. Testosterone modulates aggression, cognitive flexibility and may have a positive effect on subventricular zone cell proliferation [44,45]. Testosterone and DHEA seem to have a positive effect on newborn neuron survival [46].

Endogenous glucocorticoids—mainly cortisone and cortisol—are also essential for normal brain development. Normal levels of glucocorticoids are necessary for the proliferation, differentiation and survival of neural stem cells that express glucocorticoid receptors (GRs) in the early stages of fetal development [47]. In humans, glucocorticoids affect excitement, sleep, behavior, cognition, memory, mood and attachment [48]. In the case of stress, increase in blood glucocorticoid levels could impact the cerebral development of the fetus during gestation and promote schizophrenia in adult life [49].

### 2.3. Clinical Data: The Female Hormone Paradox

Several teams showed that the risk of developing GBM is reduced in women who have taken contraceptives or hormone replacement therapy (HRT) containing a mixture of estrogens and progestins suggesting a protective role of the female hormone, whereas other studies reported a deleterious effect of pregnancy on glioma anaplastic progression [50–52].

#### 2.3.1. Contraceptive Pills and Hormone Replacement Therapy: The Two Facets of Exogenous Hormones

In order to explain the differential incidence between men and women, many studies addressed the impact of exogenous hormone intake on glioma onset. A recent meta-analysis carried out on five patient cohorts and 11 case-control studies for a total of 8,055,027 women addressed the effect of exogenous hormone use on glioma risk [52]. The age of the patients was very variable among the selected studies preventing an age-related analysis. They compared two types of exogenous hormone intake: the use of oral contraceptives (OC) or HRT. In the case-control studies, they reported an odds ratio (OR) of 0.91 for HRT and 0.99 for OC demonstrating a very low impact of hormones. However, in the cohort studies, there was a relative cancer risk (RR) of 0.95 for HRT and 0.75 for OC showing a potential neuroprotective effect of the hormones. As the estrogen level of women varies throughout life, it would have been also interesting to group female patients according to their menopausal status. Felini and colleagues [51] also reported that post-menopausal women under HRT are less likely to develop a glioma (OR 0.56) [51].

Other studies conducted specifically in post-menopausal women did not report the beneficial effects of OC intake during reproductive age on the onset of glioma after menopause [53]. Although there were several types of contraceptive pills, those based on estrogen or progestin had no impact on the appearance of gliomas [54]. One missing point in these studies is whether the women in the cohort were still on hormonal treatment (HRT) even after menopause.

A case-control study was conducted on pre-menopausal women including 317 cases for 2126 controls in order to study the impact of contraceptive pill intake on the risk of developing glioma. The odds ratio (OR) for progestogen contraceptives alone is 2.8 which is higher than the combination of estrogen and progestogen pills (OR 1.4) [55]. The presence of estrogens in certain types of pill seemed to reduce the negative impact of progestin alone on glioma risk. This study could support the neuroprotective effect of estrogens.

Overall, these studies indicated that progesterone was more likely to cause gliomas and that estradiol might counteract these effects.

### 2.3.2. Hormone Burst During Pregnancy: A Trigger Toward Disease Progression?

The link between glioma risk, the age of first pregnancy or the number of gestations was also addressed. Two studies from Felini, Forster and colleagues [51,56] reported no correlation between these events and the appearance of gliomas [51,53,56].

Paradoxically, a study from the neuro-oncology department of Nancy hospital, involving 11 pregnant women harboring grade II gliomas (oligodendrogliomas and astrocytomas), showed in 75% cases a significantly increased in tumor growth rate and a 40% increase in seizure frequency [57]. More recently, Peeters and colleagues [58] and Van Westrhenen and colleagues [59] reported that, during pregnancy, tumor growth accelerated (87% of cases) and associated with early clinical deterioration (38% of cases) in gliomas from grade II to IV compared to the general patient population [58,59]. During pregnancy, the level of estrogen and progesterone may increase by 200-fold and is a lead to explain the harmful effect on glioma progression.

Thus, some clinical observations highlighted a potential impact of steroid hormones on gliomagenesis. In order to confirm and validate these findings, numerous *in vivo* and *in vitro* studies have been carried out.

## 2.4. Animal and In Vitro Studies

### 2.4.1. Exogenous Estrogen Exposure: A Promising Track to Modulate Tumor Hallmarks

The impact of  $17\beta$ -estradiol on tumor progression was addressed on several groups of male, female and ovariectomized female (OVX) rats, orthotopically xenografted with human GBM cells [60]. In the absence of treatment, females had a higher survival (median survival 29 days) than OVX females (median survival 22 days) and males (median survival 23 days). The OVX females once treated with physiological estrogen concentrations (12  $\mu\text{g}/\text{day}$  for 21 days) recovered their survival advantage over males. These data suggested that exogenous estradiol might be responsible for the better survival of exposed rats. However, very little information is available on the molecular mechanisms underlying these phenotypes.

A study conducted by Altioek and colleagues [61] *in vitro* showed that  $17\beta$ -estradiol inhibited the growth of T98G (human male GBM cells) and C6 rat glioma cells (IC<sub>50</sub>: 3.8  $\mu\text{M}$  and 3.5  $\mu\text{M}$ , respectively) [61]. A highest concentration of 20  $\mu\text{M}$  promoted cell apoptosis via activation of the JNK-c-jun pathway [61]. The teams of Bishop and Castracani [62,63] described opposite effects since 2 nM or 5 nM of  $17\beta$ -estradiol added to C6 and U87 (human male GBM cells) culture medium increased cell proliferation [62,63]. Taken together, these conflicting results underscored the involvement of estrogens in the control of glioma cell proliferation depending on the doses and the cell lines used.

Doses ranging from 0.1  $\mu\text{M}$  to 1 nM  $17\beta$ -estradiol also caused an increase in the migratory and invasive abilities of both human male GBM cells, U87 and T98G. This would be due to a 40–60%  $17\beta$ -estradiol-dependent decrease in aquaporin 2 (AQP2) mRNA and protein levels [64]. The  $17\beta$ -estradiol doses ranging from 10 to 100 nM increased the migratory potential of C6 cells while no significant effect was observed for the F98 rat embryonic glioma cell line, demonstrating, once again, the importance of cellular model [65].

Notably,  $17\beta$ -estradiol can be metabolized by glial cells into 2-methoxyestradiol (2-ME), whose affinity is 2000-fold less than  $17\beta$ -estradiol for estrogen nuclear receptors but 2-fold higher for the membrane g-protein coupled estrogen receptor, GPER. Concentrations ranging from 2 to 20  $\mu\text{M}$  of 2-ME caused a decrease in cell viability in multiple GBM cell lines, U87, U138 (human male GBM cell line), LN405 (human female GBM cell line) and RG-2 (rat GBM cell line) by more than 75%, associated with an increase in apoptosis [66]. Lis and colleagues [67] also reported a decrease in cell proliferation with an accumulation of U87 cells in sub-G1 and U138 cells blocked in G2/M associated with an increase in the p53 wt level after exposure to 3.3  $\mu\text{M}$  2-ME [67].

In conclusion, estrogens modulate three of the main cancer hallmarks—proliferation, migration/invasion and survival—that should be targeted for precision medicine.

#### 2.4.2. The Pro-Tumoral Role of Aromatase

Although the impact of estrogens on the progression of gliomas is still debated, the role of aromatase, the estrogen-producing enzyme was the subject of several studies. Based on 36 biopsies of astrocytomas from grade I to IV, Dueñas Jiménez and colleagues [68] concluded that the higher the grade the more aromatase was produced [68]. Since high level of aromatase was associated with a poor survival prognosis, treatment of T98G human GBM cells with vitamin D, dexamethasone and mifepristone (progesterone receptor (PR)/glucocorticoid receptor (GR) antagonist), which increased aromatase expression could trigger tumor malignancy [68,69]. Melatonin, which could have aromatase inhibitory properties, had opposite effects on C6 cells and led to a decrease in cell proliferation [70]. A concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  of nano-encapsulated letrozole, a competitive aromatase inhibitor, decreased the proliferation and migration on cells derived from patients GBM expressing aromatase [71]. Orthotopic C6 cell transplants in rats showed that a dose of 4 mg/kg letrozole resulted in a decrease in tumor volume by 75% after 8 days of treatment [72]. These different studies all tended to demonstrate that aromatase was a factor favorable for tumor progression.

In line with clinical data, exogenous estrogen supplementation could be beneficial against gliomagenesis whereas endogenous estrogen production via aromatase up-regulation stimulated tumor growth.

#### 2.4.3. Exogenous Progesterone Exposure: A Dose-Dependent Modulation of Malignancy

High concentrations of progesterone ranging from 20 to 80  $\mu\text{M}$  caused a decrease in cell viability and increased the p53 protein level in U87, U87 dEGFR (genetically modified U87 cell line which stably expressed the EGFRvIII mutant form of epidermal growth factor receptor), U118MG cells (human male GBM cell line) [73,74]. The anti-proliferative effects of high doses of progesterone would be due to a slowdown of glycolytic metabolism in these cell lines [75]. Recently, Altinoz and colleagues [76] explored the proteomic changes in U87 and A172 human GBM cells treated by 100  $\mu\text{M}$  or 300  $\mu\text{M}$  progesterone: detoxification of reactive oxygen species, cellular response to stress, glucose metabolism, and immunity-related proteins were affected by these high doses of progesterone, leading to a slowdown of cell proliferation [76].

Conversely, low concentrations of progesterone ranging from 0 to 5  $\mu\text{M}$  increased cell viability and proliferation [73]. Indeed, another study reported that 10 nM progesterone caused an increase in the mRNA level of PIBF (progesterone-induced blocking factor), a target gene for PR in U87 cells, associated with increased proliferation, migration and invasion of two human male GBM U87 and U251 cells [77]. Progesterone doses ranging from 1 nM to 10  $\mu\text{M}$  were tested on human male U373 and human female D54 cell lines, respectively, from grade III and from grade IV tumors. Only the 10 nM dose caused a significant increase in the number of U373 cells with an increase in the number of S-phase cells (61% compared to vehicle). No significant effect was observed on D54 cells, which could be explained by a difference in the expression of PR isoforms between both cell lines [78]. Another study conducted by Piña-Medina and colleagues [79] indicated that 10 nM progesterone promoted migration and invasion of D54 cells [79].

In vivo, U87 xenografted nude mice exposed to 100 or 200 mg/kg of progesterone showed a 73.61% and 60.65% decrease in tumor volume, respectively, and a 60% survival gain for both conditions. Both doses of progesterone appeared to decrease the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase (MMP) 9. Similarly, the levels of cleaved caspase-3, p53 and Bad increased and those of Bcl-2 decreased, suggesting a pro-apoptotic effect of progesterone [74]. In an orthotopic mouse model grafted with U87 cells, exposure to high doses of progesterone (100mg/kg) resulted in a 47% decrease in growth rate, a 45% reduction in tumor size and a 43% survival benefit compared to untreated mice. Notable effects were observed on the general well-being of the animals with increased travel and resting time after 4 weeks of treatment without deleterious effects on other peripheral tissues including liver and kidney. These beneficial effects of progesterone are believed to be associated with decreased cell proliferation, angiogenic ability and increased apoptosis. A similar

study was performed on rat xenografted with U87 cells into the cerebral cortex and described an opposite effect for lower dose of progesterone (4mg/kg). The effect of progesterone, mediated through PR, would be responsible for an increase in tumor area and infiltration length [80]. In an in vivo model, U373 cells were implanted in the motor cortex of rat exposed to 1mg of progesterone. This resulted in increased tumor growth and infiltration in deeper structures of the brain compared to untreated animals. Colocalization of Ki-67 and sex-determining region Y-box (SOX2) was found in 63% of the cells after progesterone treatment, demonstrating its impact on proliferation and stemness [81].

Taken together, these studies demonstrated the impact of progesterone exposure on several hallmarks of gliomagenesis, though depending on the model and doses used. Therefore, dose response co-treatment of glioma cells with  $17\beta$ -estradiol or/and progesterone might provide new insight that supports the clinical data reported above.

#### 2.4.4. Exogenous Androgen Exposure: High Levels and Increased Malignancy

High levels of circulating androgens were associated with increased glioma risk in men [82,83]. Bunevicius and colleagues [84] suggested a greater prenatal testosterone and lower prenatal estrogen exposure in brain tumor patients [84,85]. Moreover, testosterone (100 nM) and DHT (10 nM) exposed U87, U251 and D54 GBM cells displayed enhanced proliferation, migration and invasion [86,87]. In rats xenografted with GBM, experimental castration reduced the incidence of tumor development and increased the time between implantation and death [88].

DHEA levels also appeared to be present in greater amounts in the serum of GBM patients than in healthy controls and were thought to be associated with a decrease in tumor cell sensitivity to TMZ. A 5  $\mu$ M dose of DHEA counteracted the effects of TMZ on DNA damage in the male astrocytoma A172 cell lines and in primary Pt#3 cells, isolated from the GBM tissue of a male patient [89]. The action of DHEA seemed to be mediated by Sp-1, a transcriptional factor that became phosphorylated via the induction of the Lyn/Akt pathway, deacetylated by histone deacetylase (HDAC) 1/2 and further associated with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) to trigger DNA repair [89]. The effects became more complex when considering the impact of the different epimers of one hormone. The  $\Delta$ 5-androstene- $3\beta$ ,  $17\alpha$ -diol ( $17\alpha$ -AED) inhibited T98G cell proliferation by more than 90% (IC<sub>50</sub>: 14.28  $\mu$ M  $\pm$  5.25) while the  $17\beta$ -epimer had no effect. The  $17\alpha$ -AED was believed to induce autophagy of human male GBM T98G, U87, LN-Z308 cells and primary GBM6 cells as evidenced by the increase in Beclin-1 autophagic marker and the conversion of LC3-I to LC3-II [90].

In conclusion, elevated levels of endogenously produced and exogenous androgens correlated with increased tumor malignancy and resistance to treatment in vitro and in vivo.

#### 2.4.5. Exogenous Glucocorticoids Exposure: Still Incomplete and Debated Data

Among exogenous glucocorticoids, dexamethasone is the most studied, because of its extended use in clinics although controversial benefits. Patients with high-grade glioma (III and IV) may develop vasogenic edema and increased intracranial pressure. To relieve the patient, corticosteroid therapy is recommended with the use of dexamethasone. Its use is still controversial as there are few clinical trials to determine its optimal dose, frequency of use and whether it is really beneficial to the patient in the treatment of high-grade gliomas [91–93]. A recent review published by Dubinski and colleagues [94] described the impact of dexamethasone on GBM progression [94]. Two hypotheses faced each other: some researchers attributed beneficial effects to dexamethasone, while others drew the opposite conclusions. In preclinical studies, the beneficial effects described were a decrease in proliferation, motility, migration, invasion and tumor vascularization. The negative effects cited were an increase in proliferation, angiogenesis, invasion and anti-apoptotic effects. In addition, dexamethasone in combination with TMZ would decrease the efficacy of TMZ. Although preclinical studies contradicted each other, clinical studies described dexamethasone as a risk factor for poor survival (12.7 vs. 22.6 months). A recent study indicated that treatment with cortisone for 24 h resulted in a decrease in the proliferation of C6 cells in a dose-dependent manner due to the translocation of GR in the nucleus. These effects were

GR dependent since the addition of mifepristone, a GR antagonist blocked the effect of cortisone [95]. No clinical studies addressed the specific role of either GR $\alpha$  or GR $\beta$  isoforms or mineralocorticoid receptors that are both expressed in glioma cells, although this could help to understand the precise mechanism of action of dexamethasone or other corticoids.

Indeed, to establish precisely the role of steroid hormones in gliomagenesis, the relationship between the synthesis/exposure to hormones and the expression/functionality of their receptors must be investigated. For estrogens and progesterone in particular, the expression of membrane isoforms was not addressed despite their potential involvement in tumor progression through membrane non-genomic signaling pathways, as reported for numerous solid tumors.

### 3. Steroid Receptors and Downstream Signaling

Two types of receptors can mediate the effects of hormones: the membrane receptors and nuclear receptors. Nuclear receptors are mainly associated with the action of steroid hormones and other lipophilic messengers, such as vitamin D and retinoic acid, that are able to cross the plasma membrane by diffusion or facilitated transport. When activated by their ligand, these nuclear receptors act as transcription factors to directly regulate the expression of their target genes through the so-called genomic pathways [96]. Membrane receptors are more likely to be associated with the action of polypeptide hormones (growth hormone, insulin, etc.), neurotransmitters and growth factors (EGF, VEGF, insulin-like growth factor (IGF), etc.). The specific interaction of a ligand with its membrane receptor triggers a non-genomic signaling cascade involving second messengers and effectors that produce a rapid effect [97].

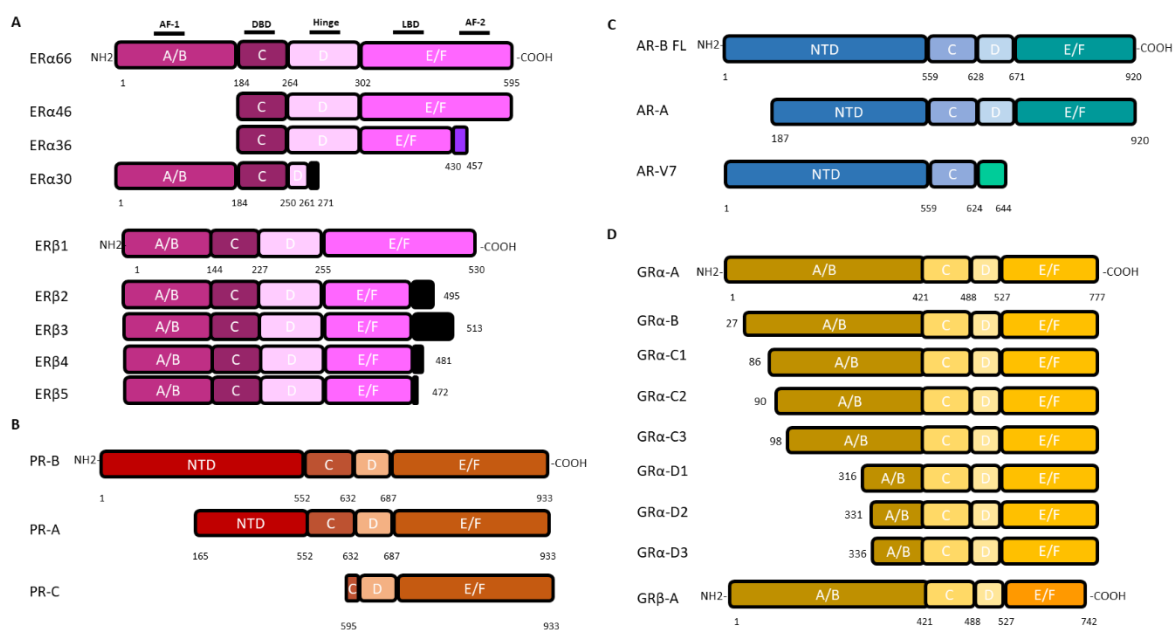
#### 3.1. Estrogen Receptors, Complex and Interconnected Signaling Pathways

Estrogen effects are mediated by nuclear estrogen receptors, ER $\alpha$  (encoded by the *ESR1* gene) or ER $\beta$  (encoded by *ESR2*) that can translocate into the nucleus and modify directly the expression of their target genes, as well as by the membrane forms of ER $\alpha$  and ER $\beta$ , or the transmembrane receptor GPER (g protein coupled estrogen receptor 1), that trigger non-genomic estrogen signaling. The *ESR1* and *ESR2* genes, respectively, encode 4 (ER $\alpha$ 66, 46, 36, 30) and 5 (ER $\beta$ 1-5) isoforms, through alternative promoters and splicers (Figure 2).

Although GPER has been detected in the hippocampus and is believed to be responsible for activation of the MAPK/ERK pathway to promote synaptic plasticity in normal brain, no information is available on its cellular location [100,101]. In addition, no data are currently available on its role in gliomagenesis.

The expression level of ER $\alpha$  and ER $\beta$  varies between healthy and tumor brain tissues but also according to the grade of the tumor. In normal brain, ER $\alpha$  is found mainly in the ventromedial hypothalamic nucleus, subfornical organ and in arcuate nucleus while ER $\beta$  is found in neurons and astrocytes of the olfactory bulb, cerebellum, paraventricular and hippocampus. This distribution into the different regions of the brain implies that each type of receptor may participate in specific neural/glial functions [102]. Recently, many isoforms of ER $\alpha$  and ER $\beta$  have been detected in normal brain and astrocytoma: the detailed cartography of these receptor localization as well as their expression level, distinctive mode of action and effect remain to be elucidated.

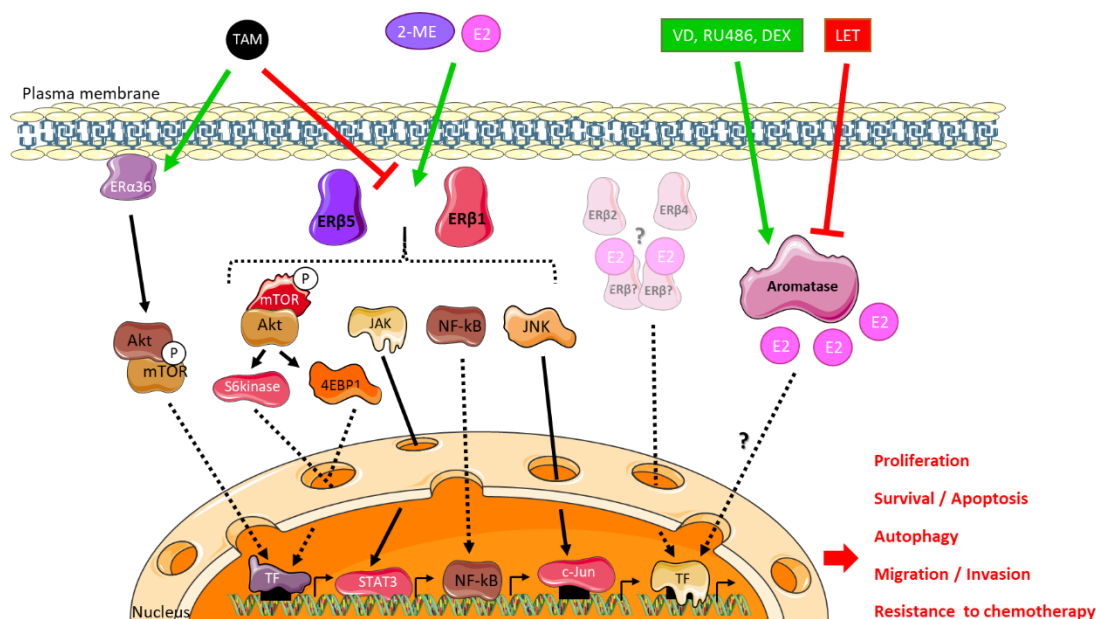
An immunohistochemical study of low- and high-grade astrocytomas sought to characterize the expression of ER $\alpha$  in these two groups using the NCL-ER-6F11 ER $\alpha$  antibody. The expression of ER $\alpha$  correlated with the grade of the tumor: unlike the low grades, the high grades no longer expressed ER $\alpha$  [103]. Conversely, two publications recently reported the high expression ER $\alpha$ 36 in U87 and U251 GBM cell lines [104,105]. ER $\alpha$ 36 was found anchored to the cytoplasmic membrane of these cells via Caveolin-1. Furthermore, its expression was stimulated by long-term tamoxifen (TAM) exposure, leading to subsequent inhibition of TAM-induced cell cycle arrest and apoptosis as well as enhanced autophagy through the modulation of Akt/mTOR pathway [105] (Figure 3). ER $\alpha$ 36 knockdown in these TAM-resistant cells restored TAM sensitivity.



**Figure 2.** Nuclear steroid receptor isoforms (not drawn to scale). Nuclear receptors are characterized by their 6-domain structure. As shown for ER $\alpha$  from the NH2 to the COOH-terminal end, (i) the A/B domain, with the AF-1 region (Activation Function 1) which allows ligand-independent transactivation, (ii) the C domain with the DNA Binding Domain (DBD), (iii) the hinged D domain, (iv) the E/F domain which has the LBD (Ligand Binding Domain) and the AF-2 (Activation Function 2) region for ligand-dependent transactivation. (A): The canonical estrogen receptors ER $\alpha$ 66 and ER $\beta$ 1 are encoded by the *ESR1* and *ESR2* genes, respectively. The ER $\alpha$  variants, ER $\alpha$ 46 and ER $\alpha$ 36, lack the A/B domain. The ER $\alpha$ 36 variant has a truncated E/F domain and a small specific C-terminal sequence of 27 amino acids (green box). The ER $\alpha$ 30 variant retains only the A/B domain, the C domain and part of a D domain with a short specific sequence of 10 amino acids (black box). The 4 variants of ER $\beta$  differ in a truncated E/F domain and a small C-terminal sequence (black box). Adapted from [98]. (B): PR isoforms are encoded by the *PGR* gene. Two alternative promoters located upstream the coding sequence trigger the transcription of the full-length PR-B and the N-terminal truncated protein PR-A whereas another downstream promoter gives rise to the PR-C encoding transcript. (C): AR isoforms are encoded by the unique *AR* gene. Among the 23 isoforms, only the full-length one (AR-FL) and the AR-V7 variant, which lack the hinge and E/F domains but have a short C-terminal specific sequence, are mentioned because of their involvement in gliomagenesis. Adapted from [99]. (D): GR isoforms are encoded by the *GR* gene through alternative splicing of exons 9 $\alpha$ /9 $\beta$ , giving rise to GR $\alpha$  or GR $\beta$  proteins, respectively, or use of different translational initiation sites that produce multiple GR $\alpha$  isoforms termed A through D (A, B, C1-C3 and D1-D3). Since GR $\alpha$  and GR $\beta$  share a common mRNA domain that contains the same translation initiation sites, the GR $\beta$  variant mRNA may also produce the B-D isoforms, although not yet biologically demonstrated.

As for ER $\alpha$ , an immunohistochemical study confirmed that high-grade tumors expressed less both ER $\alpha$  and ER $\beta$  [106]. Conversely, Liu and colleagues [106] used a pan-ER $\beta$  antibody to show that this receptor was more expressed in tumoral tissue compared to healthy one even if its expression varies from one patient to another [106]. Those who expressed a high level of ER $\beta$  seemed to have a better survival than those who expressed a low level [107].

Since the role of ER $\beta$  remained unclear, agonists such as LY500307 and Toosendanin were tested. These two molecules increased the expression of ER $\beta$ , promoted apoptosis and decreased cell proliferation. In mice implanted intracranially in the right striatum with U251 cells, a dose of 5 mg/kg/day of LY500307 for 28 days reduced tumor volume [108]. Similarly, the treatment (1 mg/kg of Toosendanin) of athymic nude mice xenografted with U87 cells decreased the size of the tumor by approximately 2-fold. The effect of Toosendanin was mediated by an increase in p53 expression [109].



**Figure 3.** Estrogen and anti-estrogen signaling in glioblastoma. Glioblastoma cells are sensitive to exogenous 17 $\beta$ -estradiol (E2) and 2-methoxyestradiol (2-ME) and the anti-estrogen tamoxifen (TAM) exposure through ER $\beta$ 1, 2, 5 and ER $\alpha$ 36 receptors that trigger non-genomic signaling. Tamoxifen-induced ER $\alpha$ 36-dependent pathway involves PI3K-Akt and mTOR signaling to enhance autophagy and resistance to anti-cancer therapy. In the presence of 17 $\beta$ -estradiol or 2-methoxyestradiol, ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 5 nuclear receptors stimulate mTOR, JAK/STAT, NF- $\kappa$ B or JNK signaling to impact cancer cell proliferation, migration/invasion, survival or resistance to chemotherapy or may directly modulate the expression of their target genes. ER $\beta$ 2 isoform is expressed in most glioblastoma cell lines or patient tumor samples but the downstream signaling remains to be determined. Endogenous production of estrogens by aromatase may be stimulated by an enhanced expression of the enzyme through vitamin D (VD), mifepristone (RU486) or dexamethasone (DEX) exposure, leading to increased tumor cell proliferation whereas the administration of letrozole (LET), a competitive inhibitor of aromatase activity, results in tumor volume reduction.

Although ER $\beta$  appeared to play an overall anti-tumoral role, estrogenic signaling is more complex and involved the expression/interaction/functionality of numerous isoforms. In C6 and F98 rat cells, ER $\alpha$ /ER $\beta$  balance modulated estrogen-dependent expression of Cx43, a gap junction protein strongly expressed in low grade but weakly expressed by high grade astrocytomas [65,110]. Further studies dedicated to unique isoforms are required to associate a function to each isoform alone or in combination. Recently, Liu and colleagues [111] explored the repertoire of ER $\beta$  isoforms in GBM tumors and cell lines [111]. They showed that GBM cells predominantly expressed ER $\beta$ 1 and ER $\beta$ 5, along with low levels of ER $\beta$ 2 and ER $\beta$ 4.

### 3.1.1. Focus on ER $\beta$ 5, an Ambivalent Receptor

ER $\beta$ 5 seemed to be the main form of ER $\beta$  in human gliomas, its expression being even induced in pathological conditions, resulting in higher levels in GBM than in low-grade astrocytoma [111,112]. In order to study the role of ER $\beta$ 5 in U87 and U251 GBM cells, Liu and colleagues [111] generated knockout (KO) cell lines for all ER $\beta$  isoforms by CRISPR/Cas9 and then complemented by ER $\beta$ 5 expression vectors into the same cells [111]. ER $\beta$ 5 enhanced migration/invasion through Akt/mTOR/4EBP1 (ErbB3-binding protein 1) pathway (Figure 3). In vivo, ER $\beta$  KO mice grafted with ER $\beta$ 5-expressing cells displayed no survival difference compared to ER $\beta$  KO [111]. Another study showed that ER $\beta$ 5 could be associated with a decrease in cell proliferation and invasive potential through reduced MMP2 activity [112].

These contradictory data may result from ER $\beta$ 5 interaction with multiple partners, depending on the cellular context and treatment. Up to now, no data are available in other CNS tumors.

### 3.1.2. Focus on ER $\beta$ 1, a Tumor Suppressor?

Liu and colleagues [111] carried out the same approach to study the role of ER $\beta$ 1 [111]. U87 and U251 GBM cells expressing ER $\beta$ 1 only triggered a decrease in cell viability through NF- $\kappa$ B downregulation, JAK/STAT and mTOR/S6kinase signaling and a lower migratory and invasive potential, due to a decrease in MMP2 activity [111,112] (Figure 3). The anti-tumor role of ER $\beta$ 1 was confirmed in an in vivo model in which the mice grafted with ER $\beta$ 1 expressing cell had a better survival rate than KO control ones [111].

Zhou and colleagues [113] explored the role of ER $\beta$ 1 in GBM cells [113]. Using RNA-sequencing, they compared the transcriptome of empty vector and ER $\beta$ 1 overexpressing U87 cells. ER $\beta$ 1 overexpression down-regulated the expression of genes linked to DNA damage checkpoint regulation, DNA damage response, DNA repair, ATM signaling pathways and upregulated those of cell cycle. ER $\beta$ 1 overexpression was also shown to potentiate TMZ and other chemotherapeutic agent treatment by promoting apoptosis and the cell cycle arrest in vitro and survival of in vivo [113].

Collectively, these results indicated that ER $\beta$  isoforms differentially modulate the mTOR, NF $\kappa$ B and JAK-STAT pathways in GBM cells, and suggested that ER $\beta$ 1, but not ER $\beta$ 5, displayed tumor-suppressing functions in GBMs.

### 3.2. Progesterone Receptors: The PR-A Isoform

Progesterone is mainly secreted by the cells of the corpus luteum of the ovaries and the placenta. It is involved in the control of embryogenesis, menstrual cycle and pregnancy. Progesterone exerts its function by interacting with its intracellular PR. PR is expressed as two major isoforms, PR-A and PR-B, but also as PR-C from alternative promoter use. PR-B is the canonical form of PR (933 amino acids) and PR-A and PR-C are N-terminus truncated isoforms (769 and 358 amino acids, respectively) (Figure 2). These isoforms have a different three-dimensional structure and therefore interact with various partners, which drive the cellular response. The nuclear forms of PR-A and PR-B are able to trigger genomic signaling, bind specific progesterone response elements (PRE) and activate progesterone target genes. PR-B is also capable of inducing non-genomic pathways initiated at the cell membrane by cell surface PRs, ion channels or cytoplasmic second messenger cascades [114,115]. PR-C retains the progesterone binding but not the DNA binding domain (Figure 2). In brain, membrane PRs are found in the forebrain, the hypothalamus and the hippocampus and trigger ERK, cAMP/PKA, PKG signaling, Ca<sup>2+</sup> influx/PKC activation, PI3K/Akt pathway [46,116]. These different mechanisms are involved in particular in the regulation of intracellular calcium, proliferation and cell viability [117].

Most studies looking at PR in astrocytomas used two cell models: U373 cells originating from grade III and D54 from grade IV tumors. Both cell lines expressed PR-A and PR-B. Estrogen (10 nM) increased PR-A and PR-B levels, and progesterone (10 nM) increased cyclin D1 levels in U373 cells [118,119]. These results suggested that progesterone signaling could depend on the grade of human astrocytoma cells and crosstalked with estrogen response.

As with ERs, it is possible that each of the PR isoforms has specific functions. Despite very few studies specific to each isoform being carried out, it appeared that in high-grade astrocytomas (III and IV), PR-B is the main isoform. All grade IV but only 83% of grade III tumors expressed PR-B [120]. Treatment with progesterone on U373 cells overexpressing PR-A tended to decrease cell proliferation [118]. This effect seemed to be confirmed on patient astrocytic tumors with a negative correlation between the level of Ki-67 and PR-A [121]. No PR-C specific data have yet been published.

### 3.3. Androgen Receptors

Androgens and androgen receptors (AR) contribute to the development and maintenance of the male sexual phenotype. Two isoforms of AR were initially discovered (Figure 2): AR-A and



AR-B. AR-B was the canonical sequence of AR (920 amino acids) whereas AR-A was lacking the first 187 amino acids (733 amino acids). Then, over 20 AR variants have been identified, among which AR-V7 has been shown to be the most abundant of the AR splice variants [122]. In the brain, ARs are expressed in neurons and in the glia of the medial amygdala, the preoptic area, the hypothalamus, the cerebellum and the dentate gyrus of the hippocampus [46].

Similar to the other nuclear receptors, there are genomic and non-genomic AR-dependent signaling pathways. Once activated by their ligands, the ARs are able to bind androgen response elements (AREs) which trigger transcription of the AR target genes. The non-genomic pathway may be activated by nuclear ARs described above, recently described transmembrane ARs (mARs) GPRC6A (G protein-coupled receptor family C group 6 member A) and ZIP9 (zinc transporter member 9), or by changes in membrane fluidity [123,124].

The first immunohistochemical analysis of low-grade and high-grade gliomas showed that AR protein expression level neither depended on tumor grade nor was a reliable indication for patient survival [125]. Recent studies seemed to provide conflicting data. Bao and colleagues [126] indicated that high grade expressed more AR than low-grade tumors [126]. Liu and colleagues [106] published the opposite results with high grades expressing less AR [106]. These divergent results make it difficult to interpret the role of AR in tumor progression. A single study has shown by Western blot that 30% of GBMs expressed the AR-V7 isoform [127].

From a functional point of view, AR seemed to promote tumor growth in glioma: an increase in cell death and an accumulation of cells in sub-G1 are observed when blocking the AR activity by specific inhibitors (bicalutamide or enzalutamide) or protein expression by siRNA in A172, U87 and T98G cells. Moreover, mice xenografted with U87 cells and treated with a dose of 20 mg/kg of enzalutamide showed a 72% decrease in tumor mass [127]. Several mechanisms were proposed to explain the oncogenic role of AR. In T98G cells, a decrease in ARA54, which is an AR co-activator, was associated with a decrease in proliferation and an accumulation of cells in G1 phase [128]. In U87 cells, inhibition of VCP/P97-interacting protein (SVIP) by AR led to an increase in proliferation and a decrease in p53 expression [126]. In the same cells, AR could bind to SMAD3 and block its activity and therefore antagonized transformation growth factor (TGF $\beta$ ) signaling, thus promoting cell growth and avoiding apoptosis [82]. In low-grade gliomas, the expression of a long non-coding RNA, called DRAIC (for downregulated RNA in cancer, inhibitor of cell invasion and migration), has been shown to be associated with better patient survival. AR could bind to the DRAIC for locus and repress its expression, thereby promoting cell migration and invasion [129].

In conclusion, it seems that AR has pro-tumor properties by promoting proliferation, migration and invasion of tumor cells. In-depth studies on the different isoforms of AR are needed to decipher their respective mechanisms of action; in particular, AR-V7 expressed in 30% of GBMs that may be used as a tumor marker.

#### 3.4. Glucocorticoid Receptors: Multiple Isoforms but Limited Data

The effects of glucocorticoids are mediated by nuclear glucocorticoid type I (i.e., mineralocorticoid receptors (MRs)) and type II (i.e., glucocorticoid receptors (GRs)) receptors. There are two GR isoforms: GR $\alpha$  and GR $\beta$  both located in the cytoplasm. The GR $\beta$  isoform (742 amino acid) results from alternative splicing of exon 9 at the C-terminal region. GR $\beta$  has no glucocorticoid-binding domain and is believed to act as a dominant negative inhibitor of GR $\alpha$ . When glucocorticoids bind to the canonical form GR $\alpha$  (777 amino acids), the complex translocates into the nucleus where it can bind to DNA. There are also seven isoforms of GR $\alpha$  and GR $\beta$  resulting from leaky scanning and ribosomal shunting that differs from the N-terminal region and could induce activation or repression of various genes (Figure 2).

GR is expressed in neurons, oligodendrocytes, astrocytes and microglia of the brain and spinal cord [130,131]. Very little information is available on the location of each isoform in the human brain, but the GR $\beta$  isoform is much less expressed than GR $\alpha$  in the hippocampus (ratio 14,500:1) [132].

Few studies on the expression of GR isoforms in astrocytoma patients have been published so far. A study of 12 GBM samples showed that they all expressed GR. The concentration of GR seemed to be higher at the periphery of the tumor compared to the center and even lower in normal brain tissue [133]. Similar studies showed different results with some tumors that did not express GR [133,134]. However, the pre-operative glucocorticoid intake was not taken into account, although it could reduce GR expression.

The regulation of the level of GR in gliomas remains poorly documented. The impact of glucose deprivation and hypoxic condition on the expression of GR was addressed in U87 cells. Only hypoxia increased the rate of GR [135,136]. Inhibition of the activity of IRE1/ERN1 (inositol requiring the enzyme 1/endoplasmic reticulum at signaling of the nucleus 1) was also responsible for an increase in the level of GR although it limited the effect of hypoxia [135].

Functional *in vitro* studies tended to show that the GR $\beta$  isoform could be involved in the progression of gliomas by participating in cell proliferation and migration. Knock down of GR $\beta$  in U118 glioma cell line resulted in a cell growth inhibition [137]. These data appeared consistent since cortisone would activate only the GR $\alpha$  isoform, described as a repressor of the GR $\beta$  pro-tumoral activity [137,138].

In conclusion, the role of GR appears to be isoform specific with GR $\beta$  described as pro-tumoral. In patients, GR is expressed in greater amounts at the periphery of the tumor, possibly participating in tumor expansion. Knowing precisely which GR isoform is present in the periphery could be used as a marker of tumor aggressiveness.

#### 4. Conclusions and Future Prospects

Glioma is, in adults, the most common brain tumor, very aggressive with a very poor prognosis. Epidemiological data show that men are more affected than women, raising the potential role of steroid hormones in gliomagenesis. Most of the studies presented in this review, from the oldest to the most recent, bring convergent findings and make it possible to conclude that gliomas and, more particularly, astrocytomas, are indeed hormone-sensitive tumors, even if the molecular subtypes currently in use at diagnosis do not account for steroid biosynthesis enzymes or receptors. To further unravel the impact of estrogens, progestogens and androgens on gliomagenesis, some teams have focused on the molecular mechanisms involved in their response pathways. However, the discovery of numerous membrane and nuclear steroid receptor isoforms and, in particular, estrogen receptors, makes this mechanistic more complex. It is now essential to characterize more precisely the role of each isoform, and the crosstalks between hormone responses to better understand the signaling pathways and characterize downstream targets impacted by steroids in astrocytomas. Ultimately, these data will contribute to a better understanding of these very poor prognosis tumors and open up new therapeutic strategies for precision medicine.

#### 5. Data Source Extraction and Management

We conducted a systematic search of the literature in PubMed and Google Scholar databases, between 1st March 2020 and 1st October 2020. The following key terms were searched in the title, abstract or keywords of the published papers: “glioma or astrocytoma or glioblastoma” and “classification”, “treatment”, “incidence”, “gender or sex”, “contraceptive pills or hormone replacement therapy”, “pregnancy”, “aromatase expression or activity”, “estrogen or estradiol or estrogen receptor”, “androgen or testosterone or dihydrotestosterone or androgen receptor”, “progesterone or progesterone receptor”, “cortisol or corticosterol or glucocorticoid receptor”. It should be noted that (i) most publications cited in this review do not distinguish between glioma, astrocytoma or oligodendroglioma, and consequently are referred to as “glioma” in the present review; (ii) the detailed reference of a sample or cell line to a particular subtype defined in the 2016 classification is usually not reported by the authors and therefore not mentioned in this review; (iii) the vast majority of studies that address the impact of

steroid hormones or receptors on glioma use IDH1 wild-type GBM cell lines for in vitro studies or for animal xenografts. Therefore, we mentioned the IDH1 status only for the mutated cell lines.

**Author Contributions:** A.H., H.D.-P.-S., H.D. conceptualization and writing. F.R. reviewing and editing the manuscript. H.D.-P.-S., F.R. and H.D. funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by The Canceropole Grand Est, Projet émergence 2020 (ProGlio) and the University of Lorraine, Projet Interdisciplinarité 2019 (ML-Brain). Alex Hirtz is the recipient of a PhD fellowship from the University of Lorraine.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvet, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol.* **2007**, *114*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Perry, A.; Wesseling, P. Histologic classification of gliomas. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 134, pp. 71–95. [[CrossRef](#)]
3. Tabouret, E.; Network, F.P.; Nguyen, A.T.; Dehais, C.; Carpentier, C.; Ducray, F.; Idbaih, A.; Mokhtari, K.; Jouvet, A.; Uro-Coste, E.; et al. Prognostic impact of the 2016 WHO classification of diffuse gliomas in the French POLA cohort. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 625–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Komori, T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol. Medico Chirur.* **2017**, *57*, 301–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ye, D.; Guan, K.-L.; Xiong, Y. Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends Cancer* **2018**, *4*, 151–165. [[CrossRef](#)]
6. Houillier, C.; Wang, X.; Kaloshi, G.; Mokhtari, K.; Guillevin, R.; Laffaire, J.; Paris, S.; Boisselier, B.; Idbaih, A.; Laigle-Donadey, F.; et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* **2010**, *75*, 1560–1566. [[CrossRef](#)]
7. Natsumeda, M.; Igarashi, H.; Nomura, T.; Ogura, R.; Tsukamoto, Y.; Kobayashi, T.; Aoki, H.; Okamoto, K.; Kakita, A.; Takahashi, H.; et al. Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: A study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy. *Acta Neuropathol. Commun.* **2014**, *2*, 158. [[CrossRef](#)]
8. Tran, A.N.; Lai, A.; Li, S.; Pope, W.B.; Teixeira, S.; Harris, R.J.; Woodworth, D.C.; Nghiemphu, P.L.; Cloughesy, T.F.; Ellingson, B.M. Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry. *Neuro Oncol.* **2014**, *16*, 414–420. [[CrossRef](#)]
9. Monga, V.; Jones, K.; Chang, S. Clinical Relevance of Molecular Markers in Gliomas. *Rev. Méd. Clin. Condes* **2017**, *28*, 343–351. [[CrossRef](#)]
10. Esteller, M.; Garcia-Foncillas, J.; Andion, E.; Goodman, S.N.; Hidalgo, O.F.; Vanaclocha, V.; Baylin, S.B.; Herman, J.G. Inactivation of the DNA-Repair Gene MGMT and the Clinical Response of Gliomas to Alkylating Agents. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 1350–1354. [[CrossRef](#)]
11. Chen, R.; Smith-Cohn, M.; Cohen, A.L.; Colman, H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 284–297. [[CrossRef](#)]
12. Lee, E.; Yong, R.L.; Paddison, P.; Zhu, J. Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, *53*, 201–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Mellinghoff, I.K.; Ellingson, B.M.; Touat, M.; Maher, E.; De La Fuente, M.I.; Holdhoff, M.; Cote, G.M.; Burris, H.; Janku, F.; Young, R.J.; et al. Ivosidenib in Isocitrate Dehydrogenase 1–Mutated Advanced Glioma. *J. Clin. Oncol.* **2020**, *38*, 3398–3406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Golub, D.; Iyengar, N.; Dogra, S.; Wong, T.; Bready, D.; Tang, K.; Modrek, A.S.; Placantonakis, D.G. Mutant Isocitrate Dehydrogenase Inhibitors as Targeted Cancer Therapeutics. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Feigin, V.L.; Nichols, E.; Alam, T.; Bannick, M.S.; Beghi, E.; Blake, N.; Culpepper, W.J.; Dorsey, E.R.; Elbaz, A.; Ellenbogen, R.G.; et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 459–480. [[CrossRef](#)]

16. Leece, R.; Xu, J.; Ostrom, Q.T.; Chen, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. *Neuro Oncol.* **2017**, *19*, 1553–1564. [[CrossRef](#)]
17. Sant, M.; Minicozzi, P.; Lagorio, S.; Johannesen, T.B.; Marcos-Gragera, R.; Francisci, S.; the EURO CARE Working Group. Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int. J. Cancer* **2011**, *131*, 173–185. [[CrossRef](#)]
18. Hemminki, K.; Ji, J.; Brandt, A.; Mousavi, S.M.; Sundquist, K. The Swedish Family-Cancer Database 2009: Prospects for histology-specific and immigrant studies. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 2259–2267. [[CrossRef](#)]
19. Hemminki, K.; Li, X. Cancer risks in second-generation immigrants to Sweden. *Int. J. Cancer* **2002**, *99*, 229–237. [[CrossRef](#)]
20. Patel, A.P.; Fisher, J.L.; Nichols, E.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; Abraha, H.N.; Agius, D.; Alahdab, F.; Alam, T.; et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 376–393. [[CrossRef](#)]
21. Dubrow, R.; Darefsky, A.S. Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992–2007. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 325. [[CrossRef](#)]
22. Cohen, A.; Modan, B. Some epidemiologic aspects of neoplastic diseases in Israeli immigrant population. III. Brain tumors. *Cancer* **1968**, *22*, 1323–1328. [[CrossRef](#)]
23. Ostrom, M.Q.T.; Gittleman, M.H.; Xu, B.J.; Kromer, M.C.; Wolinsky, P.Y.; Kruchko, B.C.; Barnholtz-Sloan, P.J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol.* **2016**, *18*, v1–v75. [[CrossRef](#)]
24. Yang, W.; Warrington, N.M.; Taylor, S.J.; Whitmire, P.; Carrasco, E.; Singleton, K.W.; Wu, N.; Lathia, J.D.; Berens, M.E.; Kim, A.H.; et al. Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaa05253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Baldi, I.; Gruber, A.; Alioum, A.; Berteaud, E.; LeBailly, P.; Huchet, A.; Tourdias, T.; Kantor, G.; Maire, J.P.; Vital, A.; et al. Descriptive epidemiology of CNS tumors in France: Results from the Gironde Registry for the period 2000–2007. *Neuro Oncol.* **2011**, *13*, 1370–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kabat, G.C.; Etgen, A.M.; Rohan, T.E. Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2010**, *19*, 2421–2427. [[CrossRef](#)]
27. Gittleman, H.; Cioffi, G.; Vecchione-Koval, T.; Ostrom, Q.T.; Kruchko, C.; Osorio, D.S.; Finlay, J.L.; Barnholtz-Sloan, J.S. Descriptive epidemiology of germ cell tumors of the central nervous system diagnosed in the United States from 2006 to 2015. *J. Neuro Oncol.* **2019**, *143*, 251–260. [[CrossRef](#)]
28. Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Stetson, L.; Virk, S.M.; Barnholtz-Sloan, J.S. Epidemiology of Gliomas. *Cancer Treat Res* **2015**, *163*, 1–14. [[CrossRef](#)]
29. Josso, N.; Rey, R. La cellule de Sertoli, une cellule endocrine. *Médecine/Sciences* **1995**, *11*, 537. [[CrossRef](#)]
30. Carreau, S.; Bois, C.; Zanatta, L.; Silva, F.; Bouraima-Lelong, H.; Delalande, C. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci.* **2011**, *89*, 584–587. [[CrossRef](#)]
31. Bennink, H.J.T.C.; Holinka, C.F.; Diczfalusy, E. Estetrol review: Profile and potential clinical applications. *Climacteric* **2008**, *11*, 47–58. [[CrossRef](#)]
32. Samavat, H.; Kurzer, M.S. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 231–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Banks, W.A. Brain Meets Body: The Blood-Brain Barrier as an Endocrine Interface. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4111–4119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Frye, C.A. Steroids, reproductive endocrine function, and affect. A review. *Minerva Ginecol.* **2009**, *61*, 541–562. [[PubMed](#)]
35. Cui, J.; Shen, Y.; Li, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 197–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Azcoitia, I.; Yagüe, J.G.; García-Segura, L.M. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience* **2011**, *191*, 139–147. [[CrossRef](#)]
37. Rossetti, M.F.; Cambiasso, M.J.; Holschbach, M.A.; Cabrera, R. Oestrogens and Progestagens: Synthesis and Action in the Brain. *J. Neuroendocr.* **2016**, *28*. [[CrossRef](#)]

38. Jellinck, P.H.; Hahn, E.F.; Norton, B.I.; Fishman, J. Catechol Estrogen Formation and Metabolism in Brain Tissue: Comparison of Tritium Release from Different Positions in Ring A of the Steroid. *Endocrinology* **1984**, *115*, 1850–1856. [[CrossRef](#)]
39. He, Z.; Zhang, S.S.; Meng, Q.; Li, S.; Zhu, H.H.; Raquil, M.-A.; Alderson, N.; Zhang, H.; Wu, J.; Rui, L.; et al. Shp2 Controls Female Body Weight and Energy Balance by Integrating Leptin and Estrogen Signals. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 1867–1878. [[CrossRef](#)]
40. Li, J.; Kang, Y.; Wei, L.; Liu, W.; Tian, Y.; Chen, B.; Lin, X.; Li, Y.; Feng, G.-S.; Lu, Z. Tyrosine Phosphatase Shp2 Mediates the Estrogen Biological Action in Breast Cancer via Interaction with the Estrogen Extranuclear Receptor. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102847. [[CrossRef](#)]
41. Rettberg, J.R.; Yao, J.; Brinton, R.D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Front. Neuroendocr.* **2014**, *35*, 8–30. [[CrossRef](#)]
42. Barakat, R.; Oakley, O.; Kim, H.; Jin, J.; Ko, C.J. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Rep.* **2016**, *49*, 488–496. [[CrossRef](#)]
43. González-Orozco, J.C.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone Actions During Central Nervous System Development. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 503. [[CrossRef](#)]
44. Nguyen, T.-V. Developmental effects of androgens in the human brain. *J. Neuroendocr.* **2018**, *30*, e12486. [[CrossRef](#)]
45. Farinetti, A.; Tomasi, S.; Foglio, B.; Ferraris, A.; Ponti, G.; Gotti, S.; Peretto, P.; Panzica, G. Testosterone and estradiol differentially affect cell proliferation in the subventricular zone of young adult gonadectomized male and female rats. *Neuroscience* **2015**, *286*, 162–170. [[CrossRef](#)]
46. Diotel, N.; Charlier, T.D.; D’Hellencourt, C.L.; Couret, D.; Trudeau, V.L.; Nicolau, J.C.; Meilhac, O.; Kah, O.; Pellegrini, E. Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 84. [[CrossRef](#)]
47. Carson, R.; Monaghan-Nichols, A.P.; DeFranco, D.B.; Rudine, A.C. Effects of antenatal glucocorticoids on the developing brain. *Steroids* **2016**, *114*, 25–32. [[CrossRef](#)]
48. Fietta, P.; Fietta, P. Glucocorticoids and brain functions. *Riv. Biol.* **2008**, *100*, 403–418.
49. Koenig, J.I.; Kirkpatrick, B.; Lee, P. Glucocorticoid Hormones and Early Brain Development in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **2002**, *27*, 309–318. [[CrossRef](#)]
50. Cowppli-Bony, A.; Bouvier, G.; Rué, M.; Loiseau, H.; Vital, A.; LeBailly, P.; Fabbro-Peray, P.; Baldi, I. Brain tumors and hormonal factors: Review of the epidemiological literature. *Cancer Causes Control* **2011**, *22*, 697–714. [[CrossRef](#)]
51. Felini, M.J.; Olshan, A.F.; Schroeder, J.C.; Carozza, S.E.; Miike, R.; Rice, T.; Wrensch, M. Reproductive factors and hormone use and risk of adult gliomas. *Cancer Causes Control* **2008**, *20*, 87–96. [[CrossRef](#)]
52. Lan, Y.-L.; Wang, X.; Lou, J.-C.; Ma, B.-B.; Xing, J.-S.; Zou, S.; Zhang, B. Update on the effect of exogenous hormone use on glioma risk in women: A meta-analysis of case-control and cohort studies. *J. Neuro Oncol.* **2017**, *137*, 357–365. [[CrossRef](#)]
53. Benson, V.S.; for the Million Women Study Collaborators; Pirie, K.; Green, J.; Casabonne, D.; Beral, V. Lifestyle factors and primary glioma and meningioma tumours in the Million Women Study cohort. *Br. J. Cancer* **2008**, *99*, 185–190. [[CrossRef](#)]
54. Kabat, G.C.; Park, Y.; Hollenbeck, A.R.; Schatzkin, A.; Rohan, T.E. Reproductive factors and exogenous hormone use and risk of adult glioma in women in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Int. J. Cancer* **2010**, *128*, 944–950. [[CrossRef](#)]
55. Andersen, L.; Friis, S.; Hallas, J.; Ravn, P.; Kristensen, B.W.; Gaist, D. Hormonal contraceptive use and risk of glioma among younger women: A nationwide case-control study. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *79*, 677–684. [[CrossRef](#)]
56. Forster, M.-T.; Baumgarten, P.; Gessler, F.; Maurer, G.; Senft, C.; Hattingen, E.; Seifert, V.; Harter, P.N.; Franz, K. Influence of pregnancy on glioma patients. *Acta Neurochir.* **2019**, *161*, 535–543. [[CrossRef](#)]
57. Pallud, J.; Mandonnet, E.; Deroulers, C.; Fontaine, D.; Badoual, M.; Capelle, L.; Guillet-May, F.; Page, P.; Peruzzi, P.; Jouanneau, E.; et al. Pregnancy increases the growth rates of WHO grade II gliomas. *Ann. Neurol.* **2009**, *67*, 398–404. [[CrossRef](#)]
58. Peeters, S.M.; Pagès, M.; Gauchotte, G.; Miquel, C.; Cartalat-Carel, S.; Guillamo, J.-S.; Capelle, L.; Delattre, J.-Y.; Beauchesne, P.; Debouverie, M.; et al. Interactions between glioma and pregnancy: Insight from a 52-case multicenter series. *J. Neurosurg.* **2018**, *128*, 3–13. [[CrossRef](#)]

59. Van Westrhenen, A.; Senders, J.T.; Martin, E.; DiRisio, A.C.; Broekman, M.L.D. Clinical challenges of glioma and pregnancy: A systematic review. *J. Neuro Oncol.* **2018**, *139*, 1–11. [[CrossRef](#)]
60. Barone, T.A.; Gorski, J.W.; Greenberg, S.J.; Plunkett, R. Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma. *J. Neuro Oncol.* **2009**, *95*, 37–48. [[CrossRef](#)]
61. Altioik, N.; Ersoz, M.; Koyuturk, M. Estradiol induces JNK-dependent apoptosis in glioblastoma cells. *Oncol. Lett.* **2011**, *2*, 1281–1285. [[CrossRef](#)]
62. Bishop, J.; Simpkins, J.W. Estradiol Treatment Increases Viability of Glioma and Neuroblastoma Cells in Vitro. *Mol. Cell. Neurosci.* **1994**, *5*, 303–308. [[CrossRef](#)]
63. Castracani, C.C.; Longhitano, L.; Distefano, A.; Anfusio, D.; Kalampoka, S.; La Spina, E.; Astuto, M.; Avola, R.; Caruso, M.; Nicolosi, D.; et al. Role of 17 $\beta$ -Estradiol on Cell Proliferation and Mitochondrial Fitness in Glioblastoma Cells. *J. Oncol.* **2020**, *2020*, 2314693. [[CrossRef](#)]
64. Wan, S.; Jiang, J.; Zheng, C.; Wang, N.; Zhai, X.; Fei, X.; Wu, R.; Jiang, X. Estrogen nuclear receptors affect cell migration by altering sublocalization of AQP2 in glioma cell lines. *Cell Death Discov.* **2018**, *4*, 1–12. [[CrossRef](#)]
65. Moinfar, Z.; Dambach, H.; Schoenebeck, B.; Förster, E.; Prochnow, N.; Faustmann, P.M. Estradiol Receptors Regulate Differential Connexin 43 Expression in F98 and C6 Glioma Cell Lines. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150007. [[CrossRef](#)]
66. Chamaon, K.; Stojek, J.; Kanakis, D.; Braeuninger, S.; Kirches, E.; Krause, G.; Mawrin, C.; Dietzmann, K. Micromolar concentrations of 2-methoxyestradiol kill glioma cells by an apoptotic mechanism, without destroying their microtubule cytoskeleton. *J. Neuro Oncol.* **2005**, *72*, 11–16. [[CrossRef](#)]
67. Lis, A.; Ciesielski, M.J.; Barone, T.A.; Scott, B.E.; Fenstermaker, R.A.; Plunkett, R.J. 2-Methoxyestradiol inhibits proliferation of normal and neoplastic glial cells, and induces cell death, in vitro. *Cancer Lett.* **2004**, *213*, 57–65. [[CrossRef](#)]
68. Jiménez, J.M.D.; Arellano, A.C.; Santerre, A.; Suárez, S.O.; Sánchez, H.S.; Romero, I.F.; López-Elizalde, R.; Venegas, M.A.; Netel, B.; Valdovinos, B.D.L.T. Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. *J. Neuro Oncol.* **2014**, *119*, 275–284. [[CrossRef](#)]
69. Yague, J.G.; Garcia-Segura, L.M.; Azcoitia, I. Selective transcriptional regulation of aromatase gene by vitamin D, dexamethasone, and mifepristone in human glioma cells. *Endocrine* **2009**, *35*, 252–261. [[CrossRef](#)]
70. Gonzalez, A.; Martínez-Campa, C.; Mediavilla, M.D.; Alonso-González, C.; Sanchez-Barcelo, E.J.; Cos, S. Inhibitory effects of pharmacological doses of melatonin on aromatase activity and expression in rat glioma cells. *Br. J. Cancer* **2007**, *97*, 755–760. [[CrossRef](#)]
71. Tivnan, A.; Heilinger, T.; Ramsey, J.M.; O'Connor, G.; Pokorny, J.L.; Sarkaria, J.N.; Stringer, B.W.; Day, B.W.; Boyd, A.W.; Kim, E.L.; et al. Anti-GD2-ch14.18/CHO coated nanoparticles mediate glioblastoma (GBM)-specific delivery of the aromatase inhibitor, Letrozole, reducing proliferation, migration and chemoresistance in patient-derived GBM tumor cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 16605–16620. [[CrossRef](#)]
72. Dave, N.; Chow, L.M.; Gudelsky, G.A.; LaSance, K.; Qi, X.; Desai, P. Preclinical pharmacological evaluation of letrozole as a novel treatment for gliomas. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 857–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Atif, F.; Patel, N.R.; Yousuf, S.; Stein, N.G. The Synergistic Effect of Combination Progesterone and Temozolomide on Human Glioblastoma Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Atif, F.; Yousuf, S.; Stein, D.G. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2015**, *146*, 62–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Atif, F.; Yousuf, S.; Espinosa-Garcia, C.; Sergeeva, E.; Stein, D.G. Progesterone Treatment Attenuates Glycolytic Metabolism and Induces Senescence in Glioblastoma. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)]
76. Altinoz, M.A.; Ucal, Y.; Yilmaz, M.C.; Kiris, I.; Ozisik, O.; Sezerman, U.; Ozpinar, A.; Elmaci, I. Progesterone at high doses reduces the growth of U87 and A172 glioblastoma cells: Proteomic changes regarding metabolism and immunity. *Cancer Med.* **2020**, *9*, 5767–5780. [[CrossRef](#)]
77. Gutiérrez-Rodríguez, A.; Hansberg-Pastor, V.; Camacho-Arroyo, I. Proliferative and Invasive Effects of Progesterone-Induced Blocking Factor in Human Glioblastoma Cells. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1295087. [[CrossRef](#)]
78. González-Agüero, G.; Gutiérrez, A.A.; González-Espinosa, D.; Solano, J.D.; Morales, R.; González-Arenas, A.; Cabrera-Muñoz, E.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* **2007**, *32*, 129–135. [[CrossRef](#)]

79. Piña-Medina, A.G.; Hansberg-Pastor, V.; González-Arenas, A.; Cerbón, M.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids* **2016**, *105*, 19–25. [[CrossRef](#)]
80. Germán-Castelán, L.; Manjarrez-Marmolejo, J.; González-Arenas, A.; Camacho-Arroyo, I. Intracellular Progesterone Receptor Mediates the Increase in Glioblastoma Growth Induced by Progesterone in the Rat Brain. *Arch. Med Res.* **2016**, *47*, 419–426. [[CrossRef](#)]
81. Germán-Castelán, L.; Manjarrez-Marmolejo, J.; González-Arenas, A.; González-Morán, M.G.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 393174. [[CrossRef](#)]
82. Yu, X.; Jiang, Y.; Wei, W.; Cong, P.; Ding, Y.; Xiang, L.; Wu, K. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 967–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Weidenfeld, J.; Schiller, H. Metabolism of Steroids by Human Brain Tumors. *Clin. Neuropharmacol.* **1984**, *7*, 395–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Bunevicius, A.; Tamašauskas, Š.; Deltuva, V.P.; Tamasauskas, A.; Sliauzys, A.; Bunevicius, R. Digit ratio (2D:4D) in primary brain tumor patients: A case-control study. *Early Hum. Dev.* **2016**, *103*, 205–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Zheng, Z.; Cohn, M.J. Developmental basis of sexually dimorphic digit ratios. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16289–16294. [[CrossRef](#)]
86. Rodríguez-Lozano, D.C.; Velázquez-Vázquez, D.E.; Del Moral-Morales, A.; Camacho-Arroyo, I. Dihydrotestosterone Induces Proliferation, Migration, and Invasion of Human Glioblastoma Cell Lines. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 8813–8823. [[CrossRef](#)]
87. Rodríguez-Lozano, D.C.; Piña-Medina, A.G.; Hansberg-Pastor, V.; Bello-Alvarez, C.; Camacho-Arroyo, I. Testosterone Promotes Glioblastoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion Through Androgen Receptor Activation. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 16. [[CrossRef](#)]
88. Hopewell, J.W. The Effects of Castration on the Induction of Experimental Gliomas in Male Rats. *Br. J. Cancer* **1970**, *24*, 187–190. [[CrossRef](#)]
89. Yang, W.-B.; Chuang, J.-Y.; Ko, C.-Y.; Chang, W.-C.; Hsu, T.-I. Dehydroepiandrosterone Induces Temozolomide Resistance Through Modulating Phosphorylation and Acetylation of Sp1 in Glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *56*, 2301–2313. [[CrossRef](#)]
90. Loria, R.M.; Graf, M.R. 17 $\alpha$ -androstenediol-mediated oncophagy of tumor cells by different mechanisms is determined by the target tumor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1262*, 127–133. [[CrossRef](#)]
91. Cenciarini, M.; Valentino, M.; Belia, S.; Sforza, L.; Rosa, P.; Ronchetti, S.; D’Adamo, M.C.; Pessia, M. Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 65. [[CrossRef](#)]
92. Kostaras, X.; Cusano, F.; Kline, G.; Roa, W.; Easaw, J. Use of dexamethasone in patients with high-grade glioma: A clinical practice guideline. *Curr. Oncol.* **2014**, *21*, 493–503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Dubinski, D.; Won, S.-Y.; Gessler, F.; Quick-Weller, J.; Behmanesh, B.; Bernatz, S.; Forster, M.-T.; Franz, K.; Plate, K.-H.; Seifert, V.; et al. Dexamethasone-induced leukocytosis is associated with poor survival in newly diagnosed glioblastoma. *J. Neuro Oncol.* **2018**, *137*, 503–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Dubinski, D.; Hattingen, E.; Senft, C.; Seifert, V.; Peters, K.G.; Reiss, Y.; Devraj, K.; Plate, K.H. Controversial roles for dexamethasone in glioblastoma—Opportunities for novel vascular targeting therapies. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *39*, 1460–1468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Nakatani, Y.; Amano, T.; Takeda, H. Corticosterone Inhibits the Proliferation of C6 Glioma Cells via the Translocation of Unphosphorylated Glucocorticoid Receptor. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, *39*, 1121–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Puzianowska-Kuznicka, M.; Pawlik-Pachucka, E.; Owczarz, M.; Budzińska, M.; Polosak, J. Small-Molecule Hormones: Molecular Mechanisms of Action. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, *2013*, 601246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Tata, J.R. One hundred years of hormones. *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 490–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Thiebaut, C.; Konan, H.-P.; Guerquin, M.-J.; Chesnel, A.; Livera, G.; Le Romancer, M.; Dumond, H. The Role of ER $\alpha$ 36 in Development and Tumor Malignancy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4116. [[CrossRef](#)]
99. Zhu, Y.; Luo, J. Regulation of androgen receptor variants in prostate cancer. *Asian J. Urol.* **2020**, *7*, 251–257. [[CrossRef](#)]

100. Toran-Allerand, C.D. Estrogen and the Brain: Beyond ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , and 17 $\beta$ -Estradiol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1052*, 136–144. [[CrossRef](#)]
101. Toran-Allerand, C.D.; Guan, X.; MacLusky, N.J.; Horvath, T.L.; Diano, S.; Singh, M.; Connolly, E.S.; Nethrapalli, I.S.; Tinnikov, A.A. ER-X: A Novel, Plasma Membrane-Associated, Putative Estrogen Receptor That Is Regulated during Development and after Ischemic Brain Injury. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 8391–8401. [[CrossRef](#)]
102. Weiser, M.J.; Foradori, C.D.; Handa, R.J. Estrogen receptor beta in the brain: From form to function. *Brain Res. Rev.* **2008**, *57*, 309–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Tavares, C.B.; Gomes-Braga, F.D.C.S.; Sousa, E.B.; Borges, U.S.; Escórcio-Dourado, C.S.; Da Silva-Sampaio, J.P.; Da Silva, B.B. Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas. *Rev. Assoc. Méd. Bras.* **2018**, *64*, 1129–1133. [[CrossRef](#)]
104. Liu, Y.; Huang, L.; Guan, X.; Li, H.; Zhang, Q.-Q.; Han, C.; Wang, Y.-J.; Wang, C.; Zhang, Y.; Qu, C.; et al. ER- $\alpha$ 36, a novel variant of ER $\alpha$ , is involved in the regulation of Tamoxifen-sensitivity of glioblastoma cells. *Steroids* **2016**, *111*, 127–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Qu, C.; Ma, J.; Zhang, Y.; Han, C.; Huang, L.; Shen, L.; Li, H.; Wang, X.; Liu, J.; Zou, W. Estrogen receptor variant ER- $\alpha$ 36 promotes tamoxifen agonist activity in glioblastoma cells. *Cancer Sci.* **2019**, *110*, 221–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Liu, C.; Zhang, Y.; Zhang, K.; Bian, C.; Zhao, Y.; Zhang, J. Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. *Cancer Epidemiol.* **2014**, *38*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Batistatou, A.; Kyzas, P.A.; Goussia, A.; Arkoumani, E.; Voulgaris, S.; Polyzoidis, K.; Agnantis, N.J.; Stefanou, D. Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours. *J. Neuro-Oncol.* **2005**, *77*, 17–23. [[CrossRef](#)]
108. Sareddy, G.R.; Li, X.; Liu, J.; Viswanadhapalli, S.; Garcia, L.; Gruslova, A.; Cavazos, D.; Garcia, M.; Strom, A.M.; Gustafsson, J.-A.; et al. Selective Estrogen Receptor  $\beta$  Agonist LY500307 as a Novel Therapeutic Agent for Glioblastoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24185. [[CrossRef](#)]
109. Cao, L.; Qu, D.; Wang, H.; Zhang, S.; Jia, C.; Shi, Z.; Wang, Z.-R.; Zhang, J.; Ma, J. Toosendanin Exerts an Anti-Cancer Effect in Glioblastoma by Inducing Estrogen Receptor  $\beta$ - and p53-Mediated Apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1928. [[CrossRef](#)]
110. Huang, R.-P.; Hossain, M.Z.; Sehgal, A.; Boynton, A.L. Reduced connexin43 expression in high-grade human brain glioma cells. *J. Surg. Oncol.* **1999**, *70*, 21–24. [[CrossRef](#)]
111. Liu, J.; Sareddy, G.R.; Zhou, M.; Viswanadhapalli, S.; Li, X.; Lai, Z.; Tekmal, R.R.; Brenner, A.J.; Vadlamudi, R.K. Differential effects of estrogen receptor beta isoforms on glioblastoma progression. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 3176–3189. [[CrossRef](#)]
112. Li, W.; Winters, A.; Poteet, E.; Ryou, M.-G.; Lin, S.; Hao, S.; Wu, Z.; Yuan, F.; Hatanpaa, K.J.; Simpkins, J.W.; et al. Involvement of estrogen receptor  $\beta$ 5 in the progression of glioma. *Brain Res.* **2013**, *1503*, 97–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zhou, M.; Sareddy, G.R.; Li, M.; Liu, J.; Luo, Y.; Venkata, P.P.; Viswanadhapalli, S.; Tekmal, R.R.; Brenner, A.; Vadlamudi, R.K. Estrogen receptor beta enhances chemotherapy response of GBM cells by down regulating DNA damage response pathways. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Proietti, C.J.; Izzo, F.; Flaqué, M.C.D.; Russo, R.C.; Venturutti, L.; Mercogliano, M.F.; De Martino, M.; Pineda, V.; Muñoz, S.; Guzmán, P.; et al. Heregulin Co-opts PR Transcriptional Action Via Stat3 Role as a Coregulator to Drive Cancer Growth. *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29*, 1468–1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Boonyaratanakornkit, V.; McGowan, E.M.; Sherman, L.; Mancini, M.A.; Cheskis, B.J.; Edwards, D.P. The Role of Extranuclear Signaling Actions of Progesterone Receptor in Mediating Progesterone Regulation of Gene Expression and the Cell Cycle. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 359–375. [[CrossRef](#)]
116. Pang, Y.; Dong, J.; Thomas, P. Characterization, Neurosteroid Binding and Brain Distribution of Human Membrane Progesterone Receptors  $\delta$  and  $\epsilon$  (mPR $\delta$  and mPR $\epsilon$ ) and mPR $\delta$  Involvement in Neurosteroid Inhibition of Apoptosis. *Endocrinology* **2013**, *154*, 283–295. [[CrossRef](#)]
117. Singh, M.; Su, C.; Ng, S. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*, 159. [[CrossRef](#)]



118. Cabrera-Muñoz, E.; González-Arenas, A.; Saqui-Salces, M.; Camacho-Arroyo, I.; Larrea, F.; García-Becerra, R.; Camacho-Arroyo, I. Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *113*, 80–84. [[CrossRef](#)]
119. Hernández-Hernández, O.T.; González-García, T.K.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *132*, 127–134. [[CrossRef](#)]
120. González-Agüero, G.; Ondarza, R.; Gamboa-Domínguez, A.; Cerbón, M.A.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res. Bull.* **2001**, *56*, 43–48. [[CrossRef](#)]
121. Inoue, T.; Akahira, J.-I.; Suzuki, T.; Darnel, A.D.; Kaneko, C.; Takahashi, K.; Hatori, M.; Shirane, R.; Kumabe, T.; Kurokawa, Y.; et al. Progesterone Production and Actions in the Human Central Nervous System and Neurogenic Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 5325–5331. [[CrossRef](#)]
122. Hu, C.; Fang, D.; Xu, H.; Wang, Q.; Xia, H. The androgen receptor expression and association with patient's survival in different cancers. *Genomics* **2020**, *112*, 1926–1940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Wang, C.; Liu, Y.; Cao, J.-M. G Protein-Coupled Receptors: Extranuclear Mediators for the Non-Genomic Actions of Steroids. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 15412–15425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Kraemer, W.J.; Ratamess, N.A.; Hymer, W.C.; Nindl, B.C.; Fragala, M.S. Growth Hormone(s), Testosterone, Insulin-Like Growth Factors, and Cortisol: Roles and Integration for Cellular Development and Growth with Exercise. *Front. Endocrinol.* **2020**, *11*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Chung, Y.G.; Kim, H.K.; Lee, H.K.; Lee, K.C. Expression of androgen receptors in astrocytoma. *J. Korean Med. Sci.* **1996**, *11*, 517–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Bao, D.; Cheng, C.; Lan, X.; Xing, R.; Chen, Z.; Zhao, H.; Sun, J.; Wang, Y.; Niu, C.; Zhang, B.; et al. Regulation of p53wt glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. *Oncotarget* **2017**, *8*, 23142–23154. [[CrossRef](#)]
127. Zalcman, N.; Canello, T.; Ovadia, H.; Charbit, H.; Zelikovitch, B.; Mordechai, A.; Fellig, Y.; Rabani, S.; Shahar, T.; Lossos, A.; et al. Androgen receptor: A potential therapeutic target for glioblastoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 19980–19993. [[CrossRef](#)]
128. Kikuchi, H.; Uchida, C.; Hattori, T.; Isobe, T.; Hiramatsu, Y.; Kitagawa, K.; Oda, T.; Konno, H.; Kitagawa, M. ARA54 is involved in transcriptional regulation of the cyclin D1 gene in human cancer cells. *Carcinog.* **2007**, *28*, 1752–1758. [[CrossRef](#)]
129. Sakurai, K.; Reon, B.J.; Anaya, J.; Dutta, A. The lncRNA DRAIC/PCAT29 Locus Constitutes a Tumor-Suppressive Nexus. *Mol. Cancer Res.* **2015**, *13*, 828–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Madalena, K.M.; Lerch, J.K. The Effect of Glucocorticoid and Glucocorticoid Receptor Interactions on Brain, Spinal Cord, and Glial Cell Plasticity. *Neural Plast.* **2017**, *2017*, 8640970. [[CrossRef](#)]
131. Meijer, O.; Buurstede, J.C.; Schaaf, M.J.M. Corticosteroid Receptors in the Brain: Transcriptional Mechanisms for Specificity and Context-Dependent Effects. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *39*, 539–549. [[CrossRef](#)]
132. DeRijk, R.H.; Schaaf, M.; Stam, F.J.; Swaab, D.F.; Ravid, R.; Vreugdenhil, E.; Cidlowski, J.A.; de Kloet, E.R.; Lucassen, P.J. Very low levels of the glucocorticoid receptor b isoform in the human hippocampus as shown by Taqman RT-PCR and immunocytochemistry. *Mol. Brain Res.* **2003**, *116*, 17–26. [[CrossRef](#)]
133. Ellemann, K.; Christensen, L.; Gjerris, F.; Briand, P.; Kruse-Larsen, C. Glucocorticoid receptors in glioblastoma multiforme: A new approach to antineoplastic glucocorticoid therapy. *Acta Neurochir.* **1988**, *93*, 6–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Poisson, M.; Pertuiset, B.F.; Hauw, J.-J.; Philippon, J.; Moguilewsky, M.; Philibert, D. Steroid hormone receptors in human meningiomas, gliomas and brain metastases. *J. Neuro-Oncol.* **1983**, *1*, 179–189. [[CrossRef](#)]
135. Minchenko, D.; Riabovol, O.; Tsymbal, D.; Ratushna, O.; Minchenko, D. Inhibition of IRE1 signaling affects the expression of genes encoded glucocorticoid receptor and some related factors and their hypoxic regulation in U87 glioma cells. *Endocr. Regul.* **2016**, *50*, 127–136. [[CrossRef](#)]
136. Riabovol, O.O.; Tsymbal, D.O.; Minchenko, D.O.; Lebid-Biletska, K.M.; Sliusar, M.Y.; Rudnytska, O.V.; Minchenko, O.H. Effect of glucose deprivation on the expression of genes encoding glucocorticoid receptor and some related factors in ERN1-knockdown U87 glioma cells. *Endocr. Regul.* **2019**, *53*, 237–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

137. Wang, Q.; Lu, P.-H.; Shi, Z.-F.; Xu, Y.-J.; Xiang, J.; Wang, Y.-X.; Deng, L.-X.; Xie, P.; Yin, Y.; Zhang, B.; et al. Glucocorticoid Receptor  $\beta$  Acts as a Co-activator of T-Cell Factor 4 and Enhances Glioma Cell Proliferation. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *52*, 1106–1118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Yin, Y.; Zhang, X.; Li, Z.; Deng, L.; Jiao, G.; Zhang, B.; Xie, P.; Mu, H.; Qiao, W.; Zou, J. Glucocorticoid receptor  $\beta$  regulates injury-mediated astrocyte activation and contributes to glioma pathogenesis via modulation of  $\beta$ -catenin/TCF transcriptional activity. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *59*, 165–176. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Résumé

**Contexte :** Les gliomes sont des tumeurs primaires du cerveau pour lesquelles la survie des patients dépend majoritairement du grade de la tumeur. La forme la plus répandue et de plus mauvais pronostic est le glioblastome. Quel que soit le grade, la quasi-totalité des patients suivront le même protocole standard de traitement comprenant une résection chirurgicale et une radiochimiothérapie (à base de témozolomide) concomitante. De nombreuses autres solutions thérapeutiques ont été testées, mais sans succès. De nouvelles données tendent à montrer que la progression et l'apparition des gliomes peuvent être influencées par une composante hormonale, en particulier par les œstrogènes. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse, dont le principal objectif était d'évaluer l'impact de l'expression des récepteurs aux œstrogènes sur la survie des patients et de décrypter leur signalisation dans les gliomes.

**Résultats :** A partir de bases de données publiques contenant les données cliniques et histo-moléculaires des patients et de leur gliome, nous avons montré qu'une forte expression des récepteurs aux œstrogènes nucléaires (*ESR1* et *ESR2*) et membranaire (*GPER1*) est respectivement négativement et positivement corrélée à la survie des patients. En particulier, l'expression de ces récepteurs est majoritairement prédictive de la survie des femmes. Afin d'étudier spécifiquement la signalisation dépendante de GPER, nous avons traité des cellules de glioblastome avec son agoniste spécifique, le G-1. Au niveau moléculaire, nous montrons que le G-1 agit via deux mécanismes distincts : l'un en stimulant le métabolisme lipidique et l'autre en perturbant la séparation des centrosomes lors de la division cellulaire. Au niveau cellulaire, nous montrons que le G-1 provoque une forte diminution de la prolifération. Ces effets sont médiés par une désorganisation du réseau microtubulaire, ce qui conduit à un arrêt des cellules en phase G2/M. La combinaison du G-1 avec le témozolomide permet de prolonger et d'accentuer ces effets. Nos résultats montrent que le niveau d'expression des récepteurs aux œstrogènes est corrélé à la survie des patients, ce qui renforce l'idée que ces tumeurs soient hormonosensibles. De plus, les propriétés anticancéreuses du G-1, seul ou en combinaison avec le témozolomide en font une thérapie prometteuse pour limiter la progression des gliomes.

**Mots-clés :** Gliome — Analyse de survie — GPER — G-1 — Microtubule

## Abstract

**Background:** Gliomas are primary brain tumors whose patient survival depend on tumor grade. The most common form and the one with the poorest prognosis is the glioblastoma. Regardless of grade, almost all patients will follow the same standard treatment protocol including a surgical resection and a concomitant radiochemotherapy (based on temozolomide). Many other treatment options have been tried, but without success. New data tend to show that the progression and appearance of gliomas can be influenced by hormones and in particular by estrogens. It is in this context that we aimed to evaluate the impact of estrogen receptor expression on patient survival and to understand their signaling in gliomas.

**Results:** From public databases containing clinical and histo-molecular data of patients and their glioma, we show that the expression of nuclear (*ESR1* and *ESR2*) and membrane (*GPER1*) estrogen receptors are respectively negatively and positively correlated with patient survival. In particular, the expression of these receptors is predominantly predictive of survival in women. To specifically study GPER-dependent signaling, we treated glioblastoma cells with its specific agonist, G-1. At the molecular scale, we show that G-1 acts via two distinct mechanisms: one by stimulating lipid metabolism and the other by disrupting centrosome separation during cell division. At the cellular scale, we show that G-1 causes a strong decrease in proliferation. These effects are mediated by the disorganization of the microtubule network, leading to cell cycle arrest in G2/M phase. The combination of G-1 with temozolomide extends and enhances these effects. Our results show that the level of estrogen receptor expression predicts patient survival, supporting the idea that these tumors are hormone-sensitive. Furthermore, the anticancer properties of G-1, alone or in combination with temozolomide, make it a promising therapeutic strategy to limit the progression of gliomas.

**Keywords:** Glioma — Survival analysis — GPER — G-1 — Microtubule