



HAL
open science

La 7β -hydroxy-épiandrostérone dans des modèles in vitro de cancer du sein : effets anti-estrogéniques et rôle des récepteurs des estrogènes

Sandra Niro

► **To cite this version:**

Sandra Niro. La 7β -hydroxy-épiandrostérone dans des modèles in vitro de cancer du sein : effets anti-estrogéniques et rôle des récepteurs des estrogènes. Biologie moléculaire. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2012. Français. NNT : 2012CNAM0805 . tel-00727277

HAL Id: tel-00727277

<https://theses.hal.science/tel-00727277>

Submitted on 3 Sep 2012

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.



Conservatoire national des Arts et Métiers

Thèse

Présentée au Conservatoire national des Arts et Métiers
En vue de l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Biologie
Ecole doctorale : ED415
Laboratoire de biologie, EA3199

Directeur de thèse : Pr Robert Morfin

La 7β -hydroxy-épiandrostérone dans des
modèles *in vitro* de cancer du sein :
effets anti-estrogéniques et rôle des récepteurs
des estrogènes

Présentée et soutenue le 29 mai 2012 par Sandra Niro

JURY

Pr C. FERROUD	Professeur des universités (cnam, Paris)	Président
Dr M. SABBAH	Directeur de recherches CNRS (Hôpital Saint-Antoine, Paris)	Rapporteur
Dr R. GUENNOUN	Chargé de recherches Inserm (Université Paris Sud, Bicêtre)	Rapporteur
Dr L. VINCENT	Sanofi (France)	Examineur
Pr R. MORFIN	Professeur émérite (cnam, Paris)	Directeur de thèse
Dr O. HENNEBERT	Maître de conférences (cnam, Paris)	Encadrant de thèse

Titre : La 7 β -hydroxy-épiandrostérone dans des modèles *in vitro* de cancer du sein : effets anti-estrogéniques et rôle des récepteurs des estrogènes.

La 7 β -hydroxy-épiandrostérone, stéroïde endogène dérivant de la DHEA, présente des propriétés anti-inflammatoires. En effet, elle module la voie des prostaglandines (PGs) en inhibant la production de la PGE2 pro-inflammatoires et en augmentant la production de la 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 cyto-protectrice *in vivo* et *in vitro*. Les faibles doses de 7 β -hydroxy-épiandrostérone (1nM, 10nM, 100nM) pour lesquelles ces effets sont observés, suggèrent une liaison à un récepteur spécifique.

L'inflammation et la production des PGs jouent un rôle important dans le développement et la prolifération des tumeurs mammaires estrogéno-dépendantes. Le 17 β -estradiol (E2), en se fixant sur les récepteurs des estrogènes (REs), induit la production de PGE2 et la prolifération cellulaire dans ces cellules tumorales. De ce fait, notre objectif était de tester les effets de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone sur la prolifération (comptage avec exclusion au bleu trypan), le cycle cellulaire et l'apoptose (cytométrie de flux) dans les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 (RE α +, RE β +, GPR30+) et MDA-MB-231 (RE α -, RE β +, GPR30+) et d'identifier une(des) cible(s) potentielle(s) dans ces cellules (transactivation) et dans des cellules négatives pour les REs nucléaires SKBr3 (GPR30+) (études de prolifération).

Cette étude a montré que la 7 β -hydroxy-épiandrostérone exerce des effets anti-estrogéniques dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 associés à une inhibition de la prolifération et un arrêt du cycle cellulaire. Les études de transactivation et de prolifération avec les agonistes spécifiques des REs ont montré une interaction avec le RE β . De plus, les résultats des études de proliférations sur les trois lignées cellulaires suggèrent que la 7 β -hydroxy-épiandrostérone pourrait également interagir avec le GPR30.

Ces résultats indiquent que ce stéroïde androgène agit comme un anti-estrogène. De plus, c'est la première fois qu'un stéroïde androgène à faible dose montre une action anti-proliférative dans des lignées de cancers du sein. Des études ultérieures restent à réaliser afin de mieux comprendre ces effets observés.

Mots clés : 7 β -hydroxy-épiandrostérone, récepteurs des estrogènes, lignées de carcinomes mammaires, prolifération, transactivation

Title : The DHEA metabolite 7 β -hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines

7 β -hydroxy-epiandrosterone, an endogenous androgenic derivative of DHEA, has previously been shown to exert anti-inflammatory action *in vitro* and *in vivo* via a shift from prostaglandin E2 (PGE2) to 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 production. This modulation in prostaglandin production was obtained with low concentrations of 7 β -hydroxy-epiandrosterone (1–100 nM) and suggested that it might act through a specific receptor. Inflammation and prostaglandin synthesis is important in the development and survival of estrogen-dependent mammary cancers. Estrogen induced PGE2 production and cell proliferation via its binding to estrogen receptors (ERs) in these tumors. Our objective was to test the effects of 7 β -hydroxy-epiandrosterone on the proliferation (by counting with trypan blue exclusion), cell cycle and cell apoptosis (by flow cytometry) of breast cancer cell lines MCF-7 (ER α +, ER β +, G-protein coupled receptor 30 : GPR30+) and MDA-MB-231 (ER α -, ER β +, GPR30+) and to identify a potential target of this steroid in these cell lineages (by transactivations) and in the nuclear ER-negative SKBr3 cells (GPR30+) (by proliferation assays). 7 β -hydroxy-epiandrosterone exerted anti-estrogenic effects in MCF-7 and MDA-MB-231 cells associated with cell proliferation inhibition and cell cycle arrest. Moreover, transactivation and proliferation with ER agonists assays indicated that 7 β -hydroxy-epiandrosterone interacted with ER β . Data from proliferation assays on the MCF-7, MDA-MB-231 and SKBr3 cell lines suggested that 7 β -hydroxy-epiandrosterone may also act through the membrane GPR30 receptor.

These results support that this androgenic steroid acts as an anti-estrogenic compound. Moreover, this is the first evidence that low doses of androgenic steroid exert antiproliferative effects in these mammary cancer cells. Further investigations are needed to improve understanding of the observed actions of endogenous 7 β -hydroxy-epiandrosterone.

Keywords : 7 β -hydroxy-epiandrosterone, estrogen receptors, breast cancer cell lines, proliferation; transactivation

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : le Pr Clotilde Ferroud, pour avoir accepté d'être président du jury, le Dr Rachida Guennoun et le Dr Michèle Sabbah, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et le Dr Loïc Vincent pour avoir accepté d'être examinateur.

Je remercie le Pr Robert Morfin et le Dr Olivier Hennebert pour m'avoir accueillie dans leur équipe durant ces trois années. Merci pour votre encadrement et pour avoir été présents quand il le fallait. Merci Olivier de m'avoir encouragée à faire de l'enseignement. Un grand merci également au Dr Marie-Agnès Pélissier pour son aide et le temps qu'elle m'a consacré lors de l'écriture de l'article et de la thèse et à Ester Pereira avec qui j'ai travaillé durant ces trois ans. Merci à mon équipe et tout les membres du laboratoire, Antonia, Martine, Irène, Marie-Irène, Philippe, Fabien, Flore, Valérie, Mirella, Dimitri Christophe et Marie, pour les discussions scientifiques mais aussi les moments de détente et de franche rigolade. Un grand merci à Claire et Khadidja pour tous les bons moments passés à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire.

Merci à l'équipe de bioinformatique, le Dr Jean-Louis Spadoni et le Dr Matthieu Montes pour leur aide en modélisation mais aussi Sigrid, Toufik et tous les autres pour leur bonne humeur.

Je tenais également à remercier l'équipe de « Transformations chimiques et pharmaceutiques » avec qui nous avons collaboré au cnam durant ma thèse. Merci au Pr Clotilde Ferroud, au Dr Gilbert Revial et Christophe Ricco pour la synthèse de notre stéroïde et nos réunions scientifiques.

Merci à tous les membres de l'UMR 944 de l'hôpital Saint-Louis, passés et présents, pour leur accueil dans leur structure tout au long de ma thèse, leur aide, leur bonne humeur, les discussions scientifiques ou non et les rigolades. Encore toutes mes excuses pour les dégâts des eaux. Dans le désordre, merci à Cécile, Anne, Ali S, Ali A, Alessia, Anne, Pascale, Guillaume, Audrey, Aurélie, Antoine, Benoit, Hassane, Hélène, Marie-Claude, Joris, Joëlle, Laurent, Rasika, Xavier, Evelyne, Marie-Lou, Michel. Une pensée particulière pour Cécile qui m'a formée à la culture cellulaire dès mon arrivée. Je tiens également à remercier la plateforme « Imagerie, tri cellulaire et génomique » pour leur aide et leur compétence, Niclas,

Christelle et Mickael pour nos longues discussions devant le cytomètre de flux pour la mise au point des manip.

Un grand merci à Marie-Edith Oblin-Rafestin et Michel Fay qui m'ont accueilli quelques temps à l'hôpital Bichat. Leur compétence et leur aide ont été très précieuses à l'accomplissement de mes travaux de recherche.

Enfin, un énorme merci à ceux qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse, ma famille de sang et de cœur et mes amis. Merci à mes parents, ma grand-mère et aux oncles et tantes pour leur amour et leur soutien toujours présents : Joëlle, Sylvie, Monique, Sonia, Patrick, Jean-Louis, Bertrand et Yves. Merci aux cousins, Titi, Julien, Paola et Stéphanie, pour votre présence et les belles nouvelles que vous m'avez apporté durant ma thèse. Merci à Claire. Merci à toute la famille Tissier, Max, Elisabeth, Djamel et Fati pour leur soutien. Merci à Bichon et Stéphane pour tous ces moments qui m'ont permis de m'évader et votre attention toujours renouvelée (Stéphane, tes séances d'ostéopathie ont été salvatrices). Merci à ma Sophie, mes week-ends à Lille sont toujours un bonheur et m'ont permis de décompresser et de me recentrer. Merci à Sébastien, tu m'as énormément apporté. Enfin, merci à Diana, Cédric, Thomas mon grand frère, Aline, Mika, Khadidja, Claire, Dhivya et Fabrice pour votre soutien, vos conseils et toutes ces soirées et vacances remplies de folie et de bonne humeur.

A ma mère,

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	6
PARTIE 1. La 7 β -hydroxy- ϵ piandrosterone	7
A. Les steroïdes	7
1. Nomenclature	7
2. Les enzymes impliquées	8
3. Steroïdogénèse et biosynthèse des androgènes et des estrogènes	8
B. Les dérivés 7-hydroxylés de la DHEA et de la testostérone	10
1. Synthèse des dérivés 7-hydroxylés.....	10
2. Synthèse de la 7 β -hydroxy- ϵ piandrosterone	13
C. 7β-hydroxy-ϵpiandrosterone et résolution de l'inflammation	13
1. Inflammation et production des prostaglandines	13
2. 7 β -hydroxy- ϵ piandrosterone et production des prostaglandines	16
3. Double compétence des androgènes et modulation de la production des PGs par les estrogènes.....	16
PARTIE 2. Les récepteurs aux estrogènes.....	18
A. Les récepteurs aux estrogènes nucléaires : REα et REβ	18
1. Structure des REs	18
a) Le domaine A/B	19
b) Le domaine C.....	19
c) Le domaine D.....	20
d) Le domaine E/F.....	20
2. Les ligands des REs.....	20
3. Rôles biologiques des REs.....	22
4. Mécanismes moléculaires d'action des REs.....	23
a) Activation génomique	23
b) Activation non génomique.....	26
5. Les partenaires de la transcription médiée par les REs	26
a) Les co-activateurs et les co-répresseurs	26
b) Influence des modifications post-traductionnelles sur l'activité du RE α	29

B. Le GPR30, un nouveau récepteur membranaire aux estrogènes	30
1. Localisation cellulaire	31
a) Réticulum endoplasmique et/ou membrane plasmique ?	31
b) Un GPR30 nucléaire ?	32
2. Le GPR30, un récepteur des estrogènes ?	33
3. Voies de signalisation du GPR30	35
4. Rôle biologique du GPR30	37
C. Les récepteurs aux estrogènes, des médiateurs de l'inflammation	37
1. Les récepteurs nucléaires aux estrogènes : REα et REβ	37
2. Le GPR30	39
D. Pharmacologie des REs	39
1. Les anti-aromatases : inhibiteurs de la biosynthèse des estrogènes	40
a) L'aminoglutéthimide (1 ^{ère} génération)	41
b) Le formestane ou 4-hydroxy-androstènedione (2 ^{ème} génération)	41
c) Le létrozole, l'anastrozole et l'exémestane (3 ^{ème} génération)	41
2. Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERMs)	42
a) Le tamoxifène, traitement de référence	43
b) Les autres SERMs	44
II. CONTEXTE DE L'ETUDE / RESULTATS	45
A. Contexte bibliographique	46
B. Objectifs	48
C. Résultats	48
III. DISCUSSION / PERSPECTIVES	50
IV. BIBLIOGRAPHIE	56
V. ANNEXES	83

LISTE DES ABREVIATIONS

15d-PGJ2	<i>15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-Prostaglandine J2</i>
AF1/2	<i>Activation Fonction</i>
AKT=PKB	<i>Protéine Kinase B</i>
AMPc	<i>Adénosine Monophosphate cyclique</i>
COX1/2	<i>Cyclooxygénase 1/2</i>
CYP	<i>Cytochromes P450</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DHEA	<i>Déhydroépiandrostérone</i>
DHEA-S	<i>Déhydroépiandrostérone-sulfate</i>
DHT	<i>Déhydrotestostérone</i>
E2	<i>17β-estradiol</i>
EAE	<i>Encéphalite Autoimmune Expérimentale</i>
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERAP 160	<i>ERα Associated Protein</i>
ERE	<i>Estrogen Responsive Element</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2</i>
FSH	<i>Hormone Folliculo-Stimulante</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HB-EGF	<i>Heparin Binding-Epidermal Growth Factor</i>
IL-6/1 β	<i>Interleukine 6/1β</i>
HSD	<i>Hydroxy-Stéroïde Déshydrogénase</i>
<i>Hsp90</i>	<i>Heat shock protein 90</i>
GPR30	<i>G Protein Receptor 30</i>
KO	<i>Knock out</i>
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>
LH	<i>Hormone Lutéinisante</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
NAD	<i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide</i>
NADP	<i>Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate</i>

NCoR	<i>Nuclear Co-Repressor</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
PG	<i>Prostaglandine</i>
PGES, PGDS, PGIS	<i>Prostaglandine Synthases</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-Kinase de type 3</i>
PPARβ/δ/γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor de type β/δ/γ</i>
RCPG	<i>Récepteur Couplé aux Protéines G</i>
RE	<i>Récepteur des Estrogènes</i>
<i>SERM</i>	<i>Selective Estrogen receptor Modulators</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor</i>
SRC-1/2/3	<i>Steroid Receptor coactivator</i>
TNFα	<i>Tumour Necrosis Factor α</i>

I. INTRODUCTION

PARTIE 1. La 7 β -hydroxy- \acute{e} piandrost \acute{e} rone

A. Les st \acute{e} roïdes

1. Nomenclature

Les hormones st \acute{e} roïdiennes d \acute{e} rivent toutes du cholest \acute{e} rol constitu \acute{e} de 27 carbones avec une cha \acute{i} ne lat \acute{e} rale (carbones 20 \acute{a} 27) li \acute{e} e au carbone 17 (*Figure 1*). Ils sont form \acute{e} s d’un squelette hydrophobe comportant trois cycles hexagonaux (A, B, C) et un cycle pentagonal (D), le st \acute{e} rane ou cyclopentano-perhydro-ph \acute{e} nanthr \acute{e} ne. Le noyau pregnane comporte 21 carbones et constitue le noyau de la pr \acute{e} gn \acute{e} nolone, de la progest \acute{e} rone, des glucocorticoides et des min \acute{e} ralocorticoides, obtenu par l’ \acute{e} limination d’une partie de la cha \acute{i} ne lat \acute{e} rale. Le noyau androstane \acute{a} 19 carbones des androg \acute{e} nes r \acute{e} sulte, quant \acute{a} lui, de la suppression de toute la cha \acute{i} ne lat \acute{e} rale. Enfin, le noyau estrane de 18 carbones des estrog \acute{e} nes d \acute{e} coule de la conversion du cycle A en une structure aromatique impliquant l’ \acute{e} limination du m \acute{e} thyle en 19.

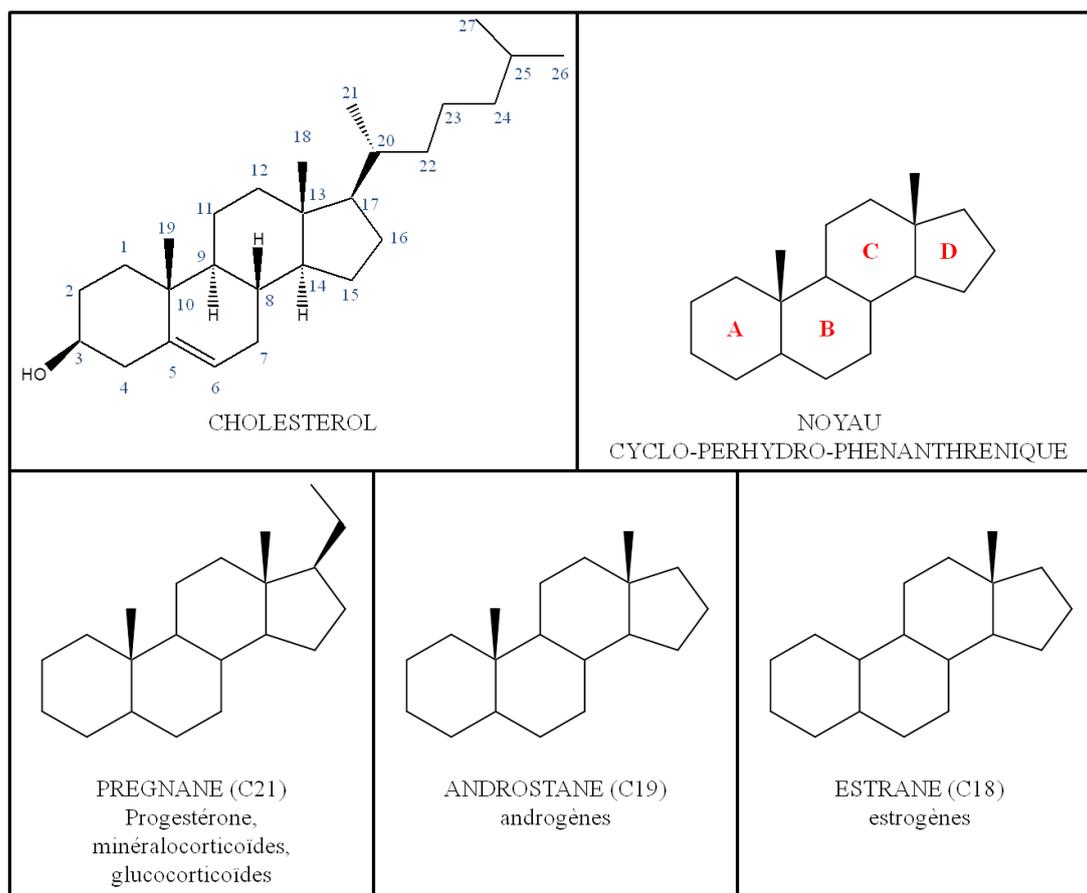


Figure 1. Nomenclature des hormones st \acute{e} roïdes. Formule et num \acute{e} rotation de la mol \acute{e} cule de cholest \acute{e} rol dont d \acute{e} rivent les st \acute{e} roïdes. Formule du noyau cyclopentano-perhydro-ph \acute{e} nanthr \acute{e} ne et des noyaux diff \acute{e} rents noyaux des hormones st \acute{e} roïdiennes.

2. Les enzymes impliquées

La transformation du cholestérol en stéroïdes nécessite de nombreuses réactions enzymatiques impliquant deux superfamilles de protéines :

- Les cytochromes P450 (CYP) (Nelson et al, 1996) catalysent des réactions d'hydroxylation suivies ou non de réactions de clivage. Ce sont des mono-oxygénases utilisant le NADPH comme donneur d'électrons pour la réduction de l'oxygène moléculaire. Ces enzymes sont mitochondriales (CYP11A1) ou microsomales (CYP7B1, CYP2A1) ;
- Les réductases et les oxydo-réductases d'alcool à chaîne courte. Ces dernières appartiennent à la famille de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD), principale HSD dans les surrénales et les gonades (Penning, 1997). Elles catalysent des réactions de réduction du stéroïde et des fonctions cétones et d'oxydation des groupements hydroxyles en présence de NADH/NAD⁺ ou de NADPH/NADP⁺.

3. Stéroïdogénèse et biosynthèse des androgènes et des estrogènes

La première étape de la stéroïdogénèse est la transformation du cholestérol en prégnérolone par le CYP11A1 localisé dans la membrane mitochondriale interne (Rone et al, 2009) qui catalyse trois réactions d'oxydation successives : deux hydroxylations en C20 et C22 suivies d'une réaction de clivage de la liaison C20-C22 (Figure 2).

La prégnérolone synthétisée est convertie en progestérone par la 3 β -HSD. Après hydroxylation en 17 α par la 17 α -hydroxylase (ou CYP17), ces deux composés vont conduire à la synthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes après l'action de trois hydroxylases et d'une synthase (Figure 2).

La déhydroépiandrostérone (DHEA) qui dérive de la transformation de la 17 α -hydroxy-prégnérolone par la 17,20-lyase est sécrétée en grandes quantités au niveau des glandes surrénales après l'adrénarchie et circule essentiellement sous sa forme sulfatée (DHEA-S). La DHEA est convertie en androgènes et estrogènes actifs dans les gonades et certains tissus périphériques.

La 3 β -HSD et la 17 β -HSD catalysent ensuite la transformation de la DHEA en testostérone qui est la forme circulante des androgènes. La 5 α -réductase convertit, dans les tissus cibles, la testostérone en un androgène actif capable de lier les récepteurs cytosoliques, la dihydrotestostérone (DHT). L'épiandrostérone est obtenue à partir de la DHT après l'action successive de la 3 β -HSD et de la 17 β -HSD.

Les estrogènes sont synthétisés à partir des androgènes par aromatisation. L'aromatase est une enzyme clé, présente dans les gonades et quelques tissus périphériques, qui convertit la testostérone et l'androstènedione respectivement en 17 β -estradiol (E2) et en estrone (*Figure 3*). Dans le placenta et le foie, ces deux estrogènes peuvent être transformés en estriol. L'E2, estrogène majoritaire, est le ligand naturel des récepteurs aux estrogènes (REs).

Les stéroïdes 3 β -hydroxylés peuvent subir une 7-hydroxylation conduisant à de nouveaux métabolites essentiels. Par exemple, l'hydroxylation en position 7 du cholestérol dans le foie est la première étape requise pour la production des acides biliaires.

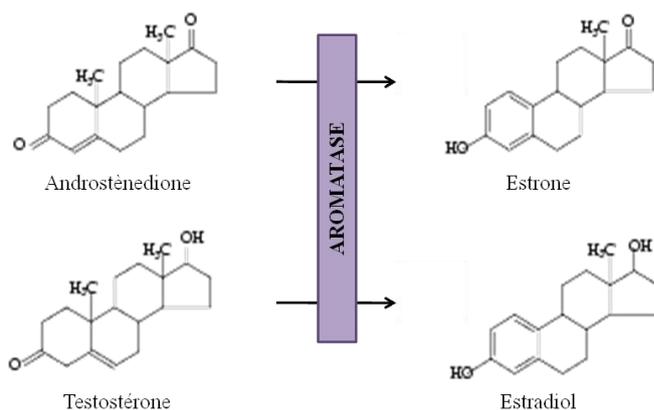


Figure 3. Conversion par l'aromatase de l'androstènedione et de la testostérone respectivement en estrone et en estradiol. L'aromatase transforme le cycle A du stéroïde en cycle aromatique par le biais d'une oxydation et de la perte d'un groupement méthyle.

B. Les dérivés 7-hydroxylés de la DHEA et de la testostérone

1. Synthèse des dérivés 7-hydroxylés

Les dérivés 7-hydroxylés de la DHEA et de ses dérivés ont longtemps été considérés comme des métabolites d'élimination. Ces 20 dernières années, un certain nombre de travaux ont montré une activité biologique de ces stéroïdes 7-hydroxylés comme des effets anti-

glucocorticoïdes (Muller et al, 2006a ; Hampl et al, 2000) ou immunomodulateurs (Sterzl et al, 2003 ; Morfin, 2002 ; Morfin et al, 2000).

Le CYP7B1, exprimé dans de nombreux tissus (Chalbot et Morfin, 2006), catalyse la 7 α -hydroxylation des 3 β -hydroxy-stéroïdes endogènes (Kim et al, 2004) (Figure 4). La 11 β -HSD1, uniquement exprimée dans le réticulum endoplasmique des tissus sensibles aux glucocorticoïdes et produite en faible quantité (Jacolot et al, 1981), est responsable de l'interconversion 7 α /7 β (Chalbot et Morfin, 2005 ; Hennebert et al, 2007, Muller et al, 2006b). Ces métabolites 7-hydroxylés, uniquement synthétisés au niveau de tissus cibles, sont détectables dans le sang de femmes et d'hommes sains et leur quantité est âge- et sexe-dépendant (Hill et al, 2005).

Le CYP2A1 catalyse la 7-hydroxylation de la testostérone (Figure 4) au niveau des testicules et de la prostate (Sonderfan et al, 1989 ; Kurose et al, 1999). La 7 α -hydroxytestostérone modulerait l'activité de la 11 β -HSD1 dans les cellules de Leydig (Hu et al, 2010) et inhiberait également celle de la 5 α -réductase et de la 3 β -HSD dans les testicules (Rosness et al, 1977). Depuis de nombreuses années, les recherches menées par le Professeur Morfin portent sur les dérivés 7-hydroxylés de la DHEA. Une action anti-oxydante de la 7 α -hydroxy-DHEA dans l'intestin (Pélissier et al, 2004 et 2006) ainsi qu'un rôle dans le contrôle de la concentration de glucocorticoïdes via son interaction avec la 11 β -HSD1 (Muller et al, 2006b ; Hennebert et al, 2007) ont été mis en évidence. De plus, ce stéroïde également produit au niveau de l'hippocampe par le CYP7B1 pourrait jouer un rôle dans la maladie d'Alzheimer. En effet, une diminution de l'activité du CYPB1 et, par conséquent du taux de 7 α -hydroxy-DHEA, contribuerait au développement de la maladie (Yau et al, 2003 ; Jellinck et al, 2005).

Partant de ces observations, les travaux du laboratoire ont été orientés vers d'autres métabolites de la DHEA, les dérivés 7-hydroxylés de l'épiandrosterone. Son dérivé 7 α -hydroxylé est un substrat de la 11 β -HSD1 et module l'activité de cette enzyme (Hennebert et al, 2007). La 7 β -hydroxy-épiandrosterone, quant à elle, exerce une action neuroprotectrice dans des modèles d'ischémie cérébrale (Pringle et al, 2003) et de la maladie d'Alzheimer (Dudas et al, 2004) chez la souris. Elle présente également des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* (Le Mée et al, 2008 ; Davidson et al, 2008) et *in vivo* (Hennebert et al, 2008).

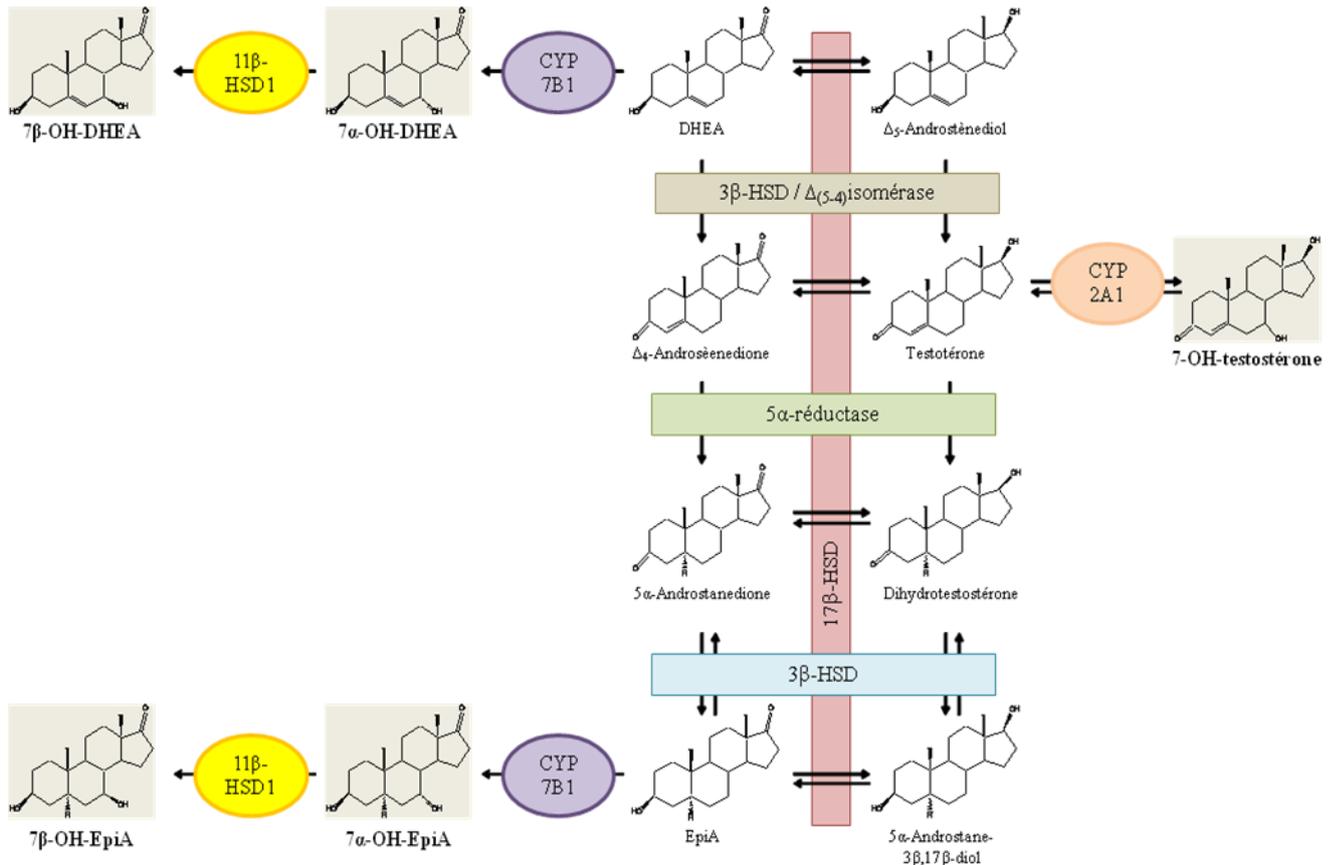


Figure 4. Biosynthèse des dérivés de la DHEA et de la testostérone. L'obtention des différents dérivés nécessite l'action de diverses enzymes : des cytochromes P450 (CYP), des réductases et oxydo-réductases d'alcool à chaîne courte (HSD), des isomérases et des réductases.

$7\alpha/\beta$ -OH-DHEA : $7\alpha/\beta$ -hydroxy-DHEA ; 7 -OH-testostérone : 7-hydroxytestostérone ; EpiA : épiandrostérone ; $7\alpha/\beta$ -OH-EpiA : $7\alpha/\beta$ -hydroxy-épiandrostérone.

2. Synthèse de la 7 β -hydroxy-épiandrosterone

La 11 β -HSD1 responsable de la 7 β -épipimérisation est exprimée uniquement dans le réticulum endoplasmique des tissus sensibles aux glucocorticoïdes (*Jacolot et al, 1981*). De ce fait, la 7 β -hydroxy-épiandrosterone n'est produite qu'au niveau de tissus cibles. Les concentrations faibles et, par conséquent, un seuil de rendement d'extraction trop faible de ce stéroïde a nécessité le développement de techniques de synthèse.

La première approche développée a été une synthèse biochimique à partir de la DHT. La DHT est en premier lieu transformée en épiandrosterone par des bactéries *E. Coli* transformées pour exprimer les enzymes essentielles à cette synthèse. La conversion de l'épiandrosterone extraite en 7 β -hydroxy-épiandrosterone est ensuite réalisée grâce au *rhizopus nigricans*. Cette moisissure exprime les enzymes nécessaires à la mono-hydroxylation de l'épiandrosterone (*Chambers et al, 1973*). Cette technique permet l'obtention de la 7 β -hydroxy-épiandrosterone avec un rendement maximal de 48%. D'autres métabolites (7 α - et 6 α/β -hydroxy-épiandrosterone) sont également synthétisés, nécessitant une séparation des différents produits. Le faible rendement de 7 β -hydroxy-épiandrosterone obtenu nécessite l'utilisation d'une grande quantité de solvant pour l'extraction.

Le mauvais rendement de la synthèse biochimique a conduit au développement d'une méthode chimique pour une production pondérale. Pour cela, notre équipe a collaboré avec le laboratoire de transformations chimiques et pharmaceutiques dirigé par la Professeure C. Ferroud au Cnam pour élaborer une synthèse chimique stéréosélective et reproductible (*Ricco et al, 2011*). Cette synthèse se fait en cinq étapes et permet l'obtention à partir de la DHEA d'une quantité de 7 β -hydroxy-épiandrosterone de l'ordre du gramme avec un rendement de 63%.

C. 7 β -hydroxy-épiandrosterone et résolution de l'inflammation

1. Inflammation et production des prostaglandines

La production tissulaire de prostaglandines (PGs) est déclenchée lors de l'inflammation. La synthèse des PGs implique la libération de l'acide arachidonique incorporé dans les phospholipides membranaires sous l'action de la phospholipase A2 cytosolique (*Figure 5*). La cyclooxygénase 1 (COX1) constitutive et la COX2 induite en réponse à un stress cellulaire oxydent l'acide arachidonique en PGG2 qui est par la suite convertie par peroxydation en PGH2, un intermédiaire oxygéné instable (*Simmons et al, 2004*).

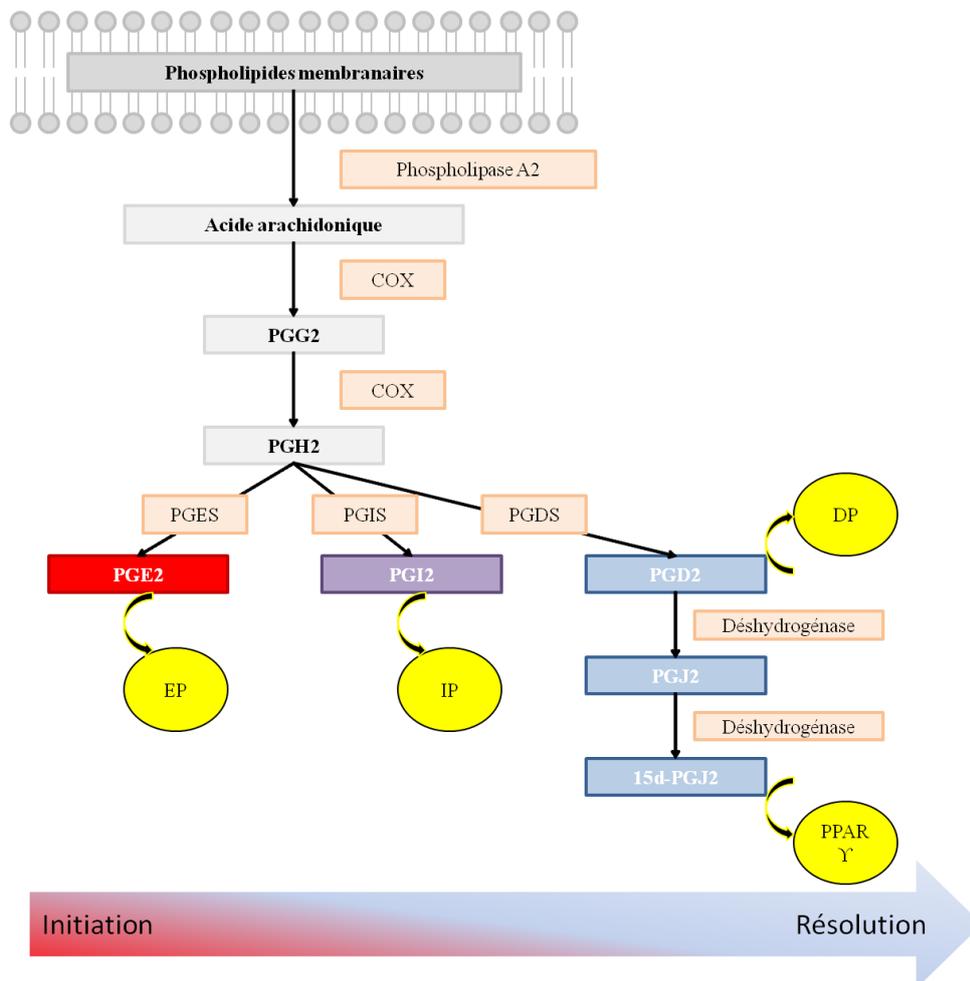


Figure 5. Production des prostaglandines : de l'initiation à la résolution de l'inflammation.

Les cyclooxygénases (COX : la COX1 constitutive et la COX2 induite en réponse à un stress cellulaire) catalysent l'oxydation de l'acide arachidonique en PGG2 puis la conversion de la PGG2 en PGH2, un intermédiaire oxygéné instable. La PGH2 va pouvoir être transformée en trois PGs (PGE2, PGI2 ou prostacycline, PGD2) par l'action des PG synthases (PGES, PGIS, PGDS). La PGD2, possédant une durée de vie courte, subit une déshydratation spontanée conduisant à la formation de prostaglandines de la série J2 incluant la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15d-PGJ2). La PGE2, la PGI2, la PGD2 et 15d-PGJ2 vont agir en se liant à leurs récepteurs (respectivement, les EPs, l'IP, le DP et le PPAR γ).

La PGH2 est ensuite transformée en thromboxane A2 par la thromboxane synthase, essentielle à l'agrégation plaquettaire, ou en prostaglandines PGE2 et PGD2 et PGI2 ou prostacycline par l'action d'enzymes spécifiques, les PG synthases (PGES, PGDS, PGIS) (*Simmons et al, 2004 ; Hata et Breyer, 2004*).

La PGE2, produite au début de l'inflammation, est responsable des effets pro-inflammatoires par sa liaison à ces récepteurs membranaires EP (1-4). Elle entraîne notamment une augmentation de la perméabilité vasculaire, une vasodilatation, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et la formation d'un oedème en présence d'autres médiateurs de l'inflammation (histamine, bradykinine) (*Davies et al, 1984*). Elle va également participer à la mise en place et à la stimulation de la réponse immunitaire (*Chizzolini et Brembilla, 2009 ; Yao et al, 2009 ; Qian et al, 2011 ; Oshima et al, 2011*).

La PGI2 ou prostacycline est un anti-agrégant plaquettaire et un vasodilatateur (*Mitchell et al, 2008*). Elle se fixe sur deux types de récepteurs : son récepteur membranaire, IP, et les *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* de type β ou δ (PPAR β/δ) intracellulaires. Ces deux récepteurs agiraient en synergie pour inhiber l'agrégation plaquettaire (*Ali et al, 2006*). La PGD2, en se fixant sur son récepteur membranaire DP, induit aussi une vasodilatation et une inhibition de l'agrégation plaquettaire (*Whittle et al, 1983 ; Narumiya et Toda, 1985*). Cette prostaglandine a cependant une durée de vie courte et va subir une déshydratation spontanée conduisant à la formation de prostaglandines de la série J2 (*Rajakariar et al, 2007*). Cette série inclut la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15d-PGJ2) ligand endogène de PPAR γ , facteur de transcription nucléaire ligand-dépendant impliqué dans la résolution de l'inflammation (*Jiang et al, 1998 ; Ricote et al, 1998*). La 15d-PGJ2 va inhiber l'expression de gènes de l'inflammation tels que ceux de la m-PGES, de l'oxyde nitrique synthétase, du *Tumour Necrosis Factor α* (TNF α) dépendamment de sa liaison à PPAR γ ou de *Nuclear Factor kappa B* (NF κ B) par des mécanismes indépendants de PPAR γ (*Jiang et al, 1998 ; Ricote et al, 1998 ; Straus et al, 2000*). Cette prostaglandine va jouer un rôle majeur lors de la phase de résolution de l'inflammation en régulant la réponse inflammatoire (*Rajakariar et al, 2007 ; Haworth et Buckley, 2007, pour revue*) (*Figure 5*).

Le rapport PGE2/PGD2 va déterminer le maintien ou la résolution de l'inflammation. Un déséquilibre dans la production de ces PGs est observé dans les maladies inflammatoires chroniques. Ainsi, une molécule favorisant la production de PGD2 et, par conséquent, de 15d-PGJ2 cytoprotectrice permettraient de protéger les tissus.

2. 7 β -hydroxy-épiandrostérone et production des prostaglandines

La 7 β -hydroxy-épiandrostérone a tout d'abord été testée dans des modèles animaux d'ischémie (*Pringle et al, 2003*) et de la maladie d'Alzheimer (*Dudas et al, 2004*) où elle exerce une neuroprotection. Cependant, les mécanismes d'action de ce stéroïde n'ont pas été approfondis.

Notre équipe a étudié les effets de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone dans des modèles d'inflammation *in vitro* et *in vivo* dans lesquels une modulation de la production des prostaglandines a été observée. En effet, de manière concomitante, ce stéroïde diminue la production de PGE2 pro-inflammatoire et augmente la synthèse de 15d-PGJ2 cytoprotectrice dans un modèle de monocytes stimulés au TNF- α (*Le Mée et al, 2008*) et dans un modèle de colite induite par le dextran sulfate de sodium chez le rat (*Hennebert et al, 2008*). Ce changement dans la production des prostaglandines est en partie médiée par une diminution de l'ARNm de la m-PGES.

Ces effets cytoprotecteurs obtenus pour de faibles doses (1-100nM) suggèrent que l'action de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone passerait par un récepteur spécifique (*Niro et al, 2010, revue en annexe*).

3. Double compétence des androgènes et modulation de la production des PGs par les estrogènes

Des effets estrogéniques dépendants des REs et médiés par des stéroïdes non estrogéniques ont été décrits. C'est le cas de la DHEA qui, à faible dose (500nM), induit une prolifération de cellules cancéreuses mammaires estrogéno-dépendantes (*Boccuzzi et al, 1992*) alors qu'elle inhibe la prolifération cellulaire à des doses pharmacologiques (10-100 μ M) (*Lopez-Marure et al, 2011*). Le Δ_5 -androstène-3 β ,17 β -diol, androgène dérivant de la DHEA, stimule également la prolifération de ces cellules à faible dose (2nM) (*Boccuzzi et al, 1992*). Le Δ_5 -androstène-3 β ,17 β -diol présente une action estrogénique *in vitro* indépendamment du récepteur des androgènes qui serait associée à une liaison au RE β (*Chen et al, 2005 ; Martin et al, 2004*). Elles pourraient moduler l'activité des REs *in vivo* en parallèle de l'E2. Cependant, ces études restent essentiellement descriptives et les mécanismes moléculaires de la double compétence du Δ_5 -androstène-3 β ,17 β -diol peu connu.

De manière plus générale, l'E2 module l'inflammation en se fixant sur le RE α et le RE β (*Straub, 2007, pour revue*). Chez la souris, l'E2 en se liant au RE β réduit l'expression de COX-2 et la formation de la PGE2 et diminue l'inflammation microgliale (*Baker et al, 2004 ; Vegeto et al, 2001*). Dans des modèles de monocytes similaires à celui développé au sein de notre laboratoire, l'E2 exerce également des effets anti-inflammatoires via la liaison aux REs exprimés par ce type cellulaire (*Phiel et al, 2005*) en modulant la production de NF κ B, de chimiokines (*Harkonen et Vaananen, 2006 ; Janis et al, 2004*) et en diminuant la production de PGE2 (*Miyagi et al, 1993*).

Dans des lignées cellulaires de carcinome mammaire estrogéno-sensible, l'E2 par sa liaison au RE α induit la transcription de la m-PGES pro-inflammatoire et entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire (*Frasor et al, 2003 et 2008*). Ces résultats sont en accord avec une diminution de la prolifération de ces cellules par l'ajout de 15d-PGJ2 dans les cultures cellulaires (*Diers et al, 2010*). De plus, il a été montré que le gène de la L-PGDS est régulé par le RE β (*Devidze et al, 2010 ; Otsuki et al, 2003*).

PARTIE 2. Les récepteurs des estrogènes

A. Les récepteurs des estrogènes nucléaires : RE α et RE β

Les REs sont des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription, médiateurs des hormones estrogéniques. Il en existe deux types : le RE α et le RE β .

Le gène codant le RE α fut cloné pour la première fois à partir de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Walter *et al*, 1985) et séquencé un an plus tard (Greene *et al*, 1986). Le RE β a été découvert 10 ans après, chez le rat tout d'abord (Kuiper *et al*, 1996) puis chez l'homme (Mosselman *et al*, 1996).

Les gènes codant le RE α et le RE β sont organisés en 8 exons et 7 introns. Le gène du RE α , nommé ESR1, est localisé sur le chromosome 6 au locus q25. Celui du RE β , nommé ESR2, est situé sur le chromosome 14 au locus q23.2.

1. Structure des REs

Le RE α est une protéine de 66 kDa (595 acides aminés) et le RE β une protéine d'environ 60 kDa (530 acides aminés). Pour ces deux récepteurs, des variants résultant d'un épissage alternatif ont été identifiés. Ces récepteurs présentent une structure générale commune à tous les récepteurs nucléaires (Figure 6) et possèdent une homologie de séquence importante (Figure 7).

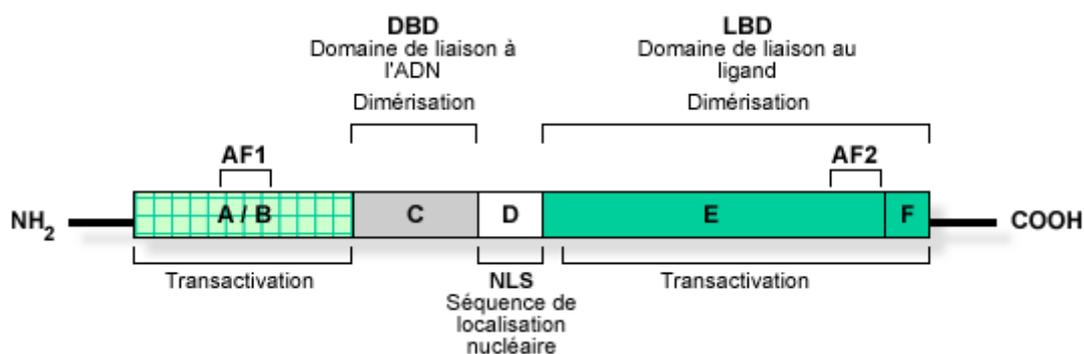


Figure 6. Structure commune aux récepteurs nucléaires (Aranda *et Pascual*, 2001). Tous les récepteurs nucléaires possèdent 5 domaines essentiels à leur fonction.

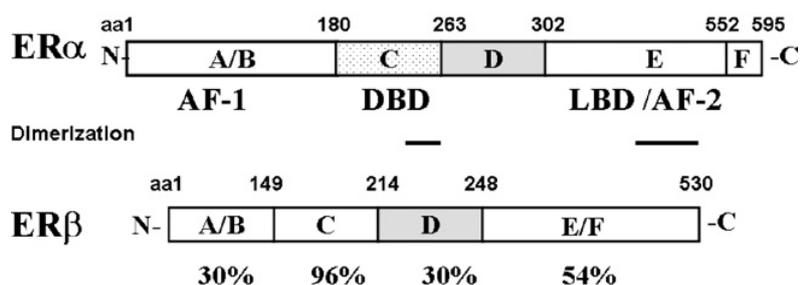


Figure 7. Structure et homologie des différents domaines du RE α et du RE β . (Fox et al, 2008)

a) Le domaine A/B

Le domaine A/B est la région la plus variable en termes de taille et de séquence protéique. Il contient la fonction d'activation de la transcription AF1 indépendante de la liaison du ligand (Gronemeyer, 1991 ; Tora et al, 1989). Ce domaine est le moins conservé entre le RE α et le RE β avec 30% d'homologie. La région N-terminale AF-1 est similaire à 18% entre ces deux récepteurs. L'activité du domaine AF1 du RE β est négligeable comparée à celle du RE α expliquant en partie les différences de réponse observées entre le RE α et le RE β (Cowley et Parker, 1999 ; Zwart et al, 2010).

b) Le domaine C

Le domaine C ou DBD (*DNA Binding Domain*) correspond au domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation. C'est le plus conservé des domaines avec 96% d'homologie de séquence entre le RE α et le RE β (Mosselman et al, 1996). Il est composé de 66 à 68 acides aminés dont 9 résidus cystéine parfaitement conservés.

Ce domaine présente 2 séquences riches en acides aminés cystéine, lysine et arginine, dont la structure en forme de doigt contenant un ion zinc est globulaire. La cristallographie aux rayons X (Schwabe et al, 1993a et b) révèle que ces deux motifs de liaison du zinc sont organisés pour former une seule unité structurale. Celle-ci les différencie des motifs à doigts de zinc structurés indépendamment les uns des autres présents dans les autres récepteurs nucléaires.

Ce domaine va permettre la liaison des REs au niveau de leurs séquences spécifiques d'ADN, les éléments de réponse aux estrogènes (EREs) (Kumar et al, 1986). Sa dimérisation permet de stabiliser sa liaison à son ERE (Kuntz et Shapiro, 1997).

c) Le domaine D

Le domaine D ou NLS (*Nuclear Localization Sequence*) est une région charnière non structurée (*Gronemeyer et Laudet, 1995*) peu conservée entre les différents REs. Il permet la rotation du DBD et l'adaptation de différentes conformations du DBD et du LBD (*Ligand Binding Domain*). Il contient également les signaux de localisation nucléaire (*Ylikomi et al, 1992*) permettant au récepteur de transloquer dans le compartiment nucléaire.

d) Le domaine E/F

Le domaine E/F ou LBD (*Ligand Binding Domain*) en C-terminal est le domaine de liaison au ligand et de dimérisation qui contient le domaine AF2 essentiel à la transactivation dépendante de la fixation du ligand.

Le domaine E permet la reconnaissance de l'hormone et assure la sélectivité de la réponse physiologique. Cette région est impliquée dans l'association avec la protéine chaperonne *heat shock protein 90* (hsp90) (*Chambraud et al, 1990*), la dimérisation du récepteur (*Kumar et Chambon, 1988 ; Tamrazi et al, 2002*) et l'interaction avec les coactivateurs transcriptionnels (*Henttu et al, 1997 ; White et al, 1997*). Il contient, dans sa partie C-terminale, l'hélice 12 qui, après fixation du ligand, se replie de façon à fermer la poche de liaison du ligand. Le repliement de cette hélice génère une fonction d'activation AF-2 compétente et un motif protéique capable d'interagir avec les co-activateurs transcriptionnels. Lors de la liaison d'un antagoniste, l'hélice 12 ne peut se positionner correctement au dessus de la cavité ce qui empêche la formation d'un domaine AF-2 compétent (*Nichols et al, 1998 ; Shiao et al, 1998*). La fonction du domaine F reste encore mal définie mais de par sa position par rapport à l'hélice 12, il est probablement impliqué dans les mécanismes d'action des antagonistes (*Montano et al, 1995; Nichols et al, 1998; Schwartz et al, 2002*). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que ce domaine est capable de moduler l'activité agoniste/antagoniste du tamoxifène (*Schwartz et al, 2002*).

2. Les ligands des REs

Le domaine de liaison du ligand est conservé à 54% entre le RE α et le RE β . Ces deux récepteurs possèdent de ce fait de nombreux ligands communs.

L'E2, ligand naturel principalement synthétisée dans l'ovaire chez la femme et par les testicules chez l'homme, se fixe de manière spécifique et avec une affinité forte et similaire

pour le RE α et le RE β ($K_d=0,1\text{nM}$ et $0,4\text{nM}$, respectivement) (Kuiper et al, 1997). L'estrone et l'estriol, autres estrogènes endogènes, peuvent également lier les deux récepteurs avec une moins bonne affinité que l'E2.

Des estrogènes de synthèse (diéthylstilbestrol, hexestrol et dienestrol) possèdent une affinité identique à celle de l'E2 ($K_d=0,07\text{nM}$ à $0,2\text{nM}$) pour les deux récepteurs (Kuiper et al, 1997). Des anti-estrogènes ont également été synthétisés et sont utilisés dans le traitement du cancer du sein estrogéno-dépendant. Ils ne présentent pas obligatoirement un noyau cyclo-pentano-phénanthrénique et ciblent plus particulièrement le RE α responsable de l'effet prolifératif dans ce type de tumeurs. Ils possèdent une affinité égale (raloxifène) voire 20 fois plus faible (tamoxifène) que celle de l'E2 pour le RE α . De ce fait, ces composés présentent une affinité plus forte pour le RE α (Kuiper et al, 1997) que pour le RE β . On distingue les agonistes partiels (tamoxifène, raloxifène) des antagonistes purs (ICI 182,780) du RE α . Ils peuvent cependant se lier au RE β . C'est le cas du tamoxifène et du raloxifène respectivement antagoniste et agoniste du RE β (Paech et al, 1997 ; Ball et al, 2009 ; Deroo et Buensuceso, 2010, pour revue).

D'autres hormones stéroïdes non estrogéniques peuvent également se fixer sur ces récepteurs avec une affinité inférieure à celle des dérivés estrogéniques et anti-estrogéniques. La DHEA et la 7α -hydroxy-DHEA (Chen et al, 2005 ; Martin et al, 2004) ainsi que certains dérivés androgéniques tels que le $\Delta 5$ -androstène- $3\beta,17\beta$ -diol ou le $\Delta 5$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol (Adams et al, 1981 ; Boccuzzi et al, 1992 ; Boccuzzi et al, 1994 ; Guerini et al, 2005) lient le RE β . La DHEA et le $\Delta 5$ -androstène- $3\beta,17\beta$ -diol exercent des effets agonistes à faibles doses (respectivement 500nM et 2nM). Enfin, un autre groupe de molécules a été décrit comme ligands des REs, les phyto-estrogènes, composés non stéroïdiens présents dans les végétaux. Ils possèdent la structure aromatique commune aux estrogènes et vont mimer leur action avec une affinité pour les REs 100 à 1000 fois moins importante que les estrogènes. Ce sont des perturbateurs endocriniens et ne présentent donc pas d'intérêt en clinique. Cependant, l'apigénine (Mak et al, 2006) et la ginstéine (Marik et al, 2011 ; Orlando et al, 2011) inhiberaient la croissance de cellules cancéreuses mammaires *in vitro* via leur interaction respectivement avec le RE β ou le RE α .

3. Rôles biologiques des REs

Le RE α et le RE β sont exprimés dans de nombreux tissus tels que l'appareil reproducteur féminin (sein et utérus) et masculin (prostate), le système cardio-vasculaire, l'os ou le cerveau (Enmark et al, 1997 ; Kuiper et al, 1997 ; Taylor et Al-Azzawi, 2000). Ils peuvent être présents dans un même tissu mais avec des localisations spécifiques. C'est le cas dans l'ovaire où le RE α est largement exprimé dans les cellules de la thèque et les cellules interstitielles quand l'expression du RE β prédomine dans les cellules de la granulosa (Hiroi et al, 1999 ; Sar et Welsch, 1999). Le RE α est exprimé de manière prédominante dans l'utérus, la prostate (stroma), les cellules de la thèque, les cellules de Leydig, l'épididyme, l'os, le sein, le tissu adipeux et diverses régions du cerveau. Le RE β , quant à lui, est exprimé plus fortement dans le côlon, l'épithélium prostatique, la moelle osseuse, les glandes salivaires, l'endothélium vasculaire, les poumons, la vessie et plusieurs régions du cerveau (Ascenzi, 2006, pour revue ; Nilsson et Gustaffson, 2011, pour revue).

De nombreux modèles et plus particulièrement de souris knock out ont permis de mettre en évidence un rôle physiologique et pathologique de ces récepteurs dans la glande mammaire, l'os, le cœur ou la prostate (Tableau 1) où le ratio RE α /RE β va influencer la réponse aux estrogènes de ces différents types cellulaires (Nilsson et al, 2002 ; Antal et al, 2008 ; Förster et al, 2004 ; Wang et al, 2001).

Tableau 1. Rôles physiologiques et « physio-pathologiques » des REs

Tissu	Rôle physiologique	Pathologie
Os	<ul style="list-style-type: none"> • Maintien de la balance résorption / formation osseuse (Khosla, 2008; Smith et al, 2008) • Maturation de l'os / croissance osseuse à la puberté (Zirilli et al, 2008) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéoporose (Khosla, 2008; Smith et al, 2008)
Cœur	<ul style="list-style-type: none"> • Métabolisme glucidique / métabolisme lipidique 	<ul style="list-style-type: none"> • Athérosclérose / Risque d'infarctus (Hodgin et Maeda, 2002)
Foie	<ul style="list-style-type: none"> • Métabolisme lipidique 	<ul style="list-style-type: none"> • Stéatose (Zirilli et al, 2008; Maffei et al, 2004)
Sein	<ul style="list-style-type: none"> • Développement de la glande mammaire (REα) (Nilsson et Gustaffson, 2002 et 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cancer du sein hormono-dépendant protection par le REβ (Bardin et al, 2004) • rôle pro-prolifératif du REα (Lazennec et al, 2001)
Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> • Apprentissage, mémoire, comportement, reproduction, neurogenèse, plasticité synaptique, protection neuronale (Gillies et McArthur, 2010) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie d'Alzheimer (Carroll et Picke, 2008) protection par REα dans l'hippocampe et l'amygdale protection par REβ dans le cortex frontal et l'amygdale • Maladie de Parkinson protection par REα (Brann et 2007; Gillies et McArthur, 2010) • Sclérose multiple protection par REα (Vegeto et al, 2008) protection par REβ (Tiwari-Woodruff, 2009)
Appareil reproducteur	<ul style="list-style-type: none"> • Croissance utérine, fonction ovarienne, ovulation (femelle) (Hegele-Hartung et al, 2004) • Réabsorption des fluides dans les canaux efférents (mâles) 	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilité des femelles et des mâles KO pour le REα (Dupont et al, 2000; Nilsson et Gustaffson, 2011)
Prostate	<ul style="list-style-type: none"> • Croissance, développement et maintien 	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperplasie et cancer protection par REβ (McPherson et al, 2010)

4. Mécanismes moléculaires d'action des REs

En absence de ligand, les REs sont séquestrés dans le cytosol et associés à des complexes multiprotéiques comprenant la protéine chaperonne hsp90 (*Segnitz et Gehring, 1995*) qui stabilise les récepteurs dans une conformation non active (*Johnson et Toft, 1994*). L'inhibition de la liaison de la hsp90 entraîne une dégradation des REs par le protéasome (*Roe et al, 1999 ; Maloney et Workman, 2002 ; Gougelet et al, 2005*).

a) Activation génomique

La liaison du ligand entraîne le repliement de l'hélice 12 (LBD) permettant le passage à une forme transcriptionnellement active. Cette hélice va former un « couvercle » au-dessus de la poche maintenant le ligand dans un environnement hydrophobe (*Figure 8*). Les ligands tels que l'E2 et les *Selective Estrogen receptor Modulators* (SERMs) comme le raloxifène forment des contacts avec des acides aminés différents de la poche hydrophobe du RE α (*Figure 9*) (*Brzozowski et al, 1997 ; Picke et al, 2000*). L'hélice 12 est essentielle à la fonction AF-2 (*Danielian et al, 1992*) et au recrutement des co-activateurs (*Beato et al, 1996 ; Horwitz et al, 1996 ; Mc Kenna et al, 1999*). En effet, la liaison de l'E2 permettrait l'interaction avec des co-activateurs du RE α quand celle-ci serait impossible lors de la liaison d'antagonistes tels que le raloxifène (*Brzozowski et al, 1997 ; Picke et al, 2000*).

La liaison du ligand entraîne la dimérisation du récepteur indispensable à sa liaison sur son ERE (*Kumar et Chambon, 1988 ; Schwabe et al, 1993b ; Wang et al, 1995*). Le RE existerait également sous forme de dimère en absence de ligand (*Salomonsson et al, 1994*) mais la liaison d'un ligand serait indispensable à la stabilisation du dimère (*Tamrazi et al, 2002*).

Les homodimères RE α /RE α et RE β /RE β présentent une fonction opposée dans la prolifération cellulaire notamment dans l'épithélium mammaire (*Helguero et al, 2005*). La formation d'hétérodimères aurait également un impact important sur l'activité transcriptionnelle et la croissance cellulaire *in vivo* (*Monroe et al, 2005 ; Pettersson et al, 2000 ; Tremblay et al, 1999*). Ces hétérodimères lient l'ADN avec la même affinité que les homodimères RE α et une meilleure affinité que les homodimères RE β *in vitro* (*Cheung et al, 2003 ; Hall et McDonnell, 1999 ; McInerney et al, 1998a ; Cowley et al, 1997*). De nombreuses études *in vitro* suggèrent que le RE β régulerait négativement l'activité du RE α (*Nilsson et al, 2001 ; Pettersson et al, 2000 ; Omoto et al, 2003 ; Buteau-Lozano et al, 2002 ; Powell et Xu, 2008*) et altérerait le recrutement des oncogènes c-Fos et c-Jun par le RE α et du

RE α sur ses EREs (*Matthews et al, 2006*). Les deux REs contribueraient à cette hétérodimérisation avec un rôle dominant du ligand liant le RE α (*Powell et Xu, 2008*).

Le RE dimérisé va transloquer dans le noyau et se fixer sur son ERE. Une séquence consensus palindromique de 13 paires de bases, organisées en deux hexamères et séparées par 3 nucléotides, a été définie (5'-GGTCA NNN TGACC-3') (*Klein-Hitpass et al, 1986 ; Anolik et al, 1993*). Cependant, la plupart des gènes régulés par les estrogènes contiennent des EREs incomplets ou non palindromiques (*Anolik et al, 1995 ; Driscoll et al, 1998 ; Berry et al, 1989 ; Augereau et al, 1994*). C'est la nature du ligand qui va définir la conformation du récepteur et la liaison ou non aux différents EREs (*Ramsey et Klinge, 2001; Wood et al, 1998; Wood et al, 2001*). Les REs vont aussi adopter des conformations différentes en fonction de la structure de l'ERE fixé (*Ramsey et Klinge, 2001; Wood et al, 1998; Wood et al, 2001*).

Il a également été montré que les REs présentent la même affinité pour l'ERE après liaison d'un agoniste ou d'un antagoniste (*Cheskis et al, 1997*). Le RE n'ayant fixé aucun ligand est également capable de se fixer à l'ERE *in vivo* (*Reid et al, 2003*). Cependant, le RE α présente une activité transcriptionnelle supérieure à celle du RE β (perte de fonction de son AF-1). Ceci préviendrait la synergie entre l'AF1 et l'AF2 (*Zwart et al, 2010*).

Les REs peuvent également activer la transcription en s'associant à des facteurs de transcription liant l'ADN. Parmi ces derniers ont été décrits le complexe AP-1 et la protéine Sp1 (*Klinge, 2000; Safe, 2001; Neo et al, 2009*).

b) Activation non génomique

L'E2 exerce également une action rapide (quelques secondes à quelques minutes) par voies non génomiques et médiée par une population minoritaire de RE α localisée à la membrane plasmique. Une palmitoylation sur la cystéine 447 du LBD du RE α est pré-requise pour l'ancrage à la membrane plasmique (Acconcia *et al*, 2005) et à l'activité non génomique du RE α (Poulard *et al*, 2010). Ce récepteur localisé à la membrane va pouvoir interagir avec de nombreuses protéines adaptatrices ou partenaires telles que Shc, Src ou des protéines G (Zhang *et al*, 2004 ; Le Romancer *et al*, 2008) (Figure 10). La liaison de l'E2 à ces récepteurs active des protéines G et induit les voies ERK/MAPK et PI3K/AKT (Marino *et al*, 2006).

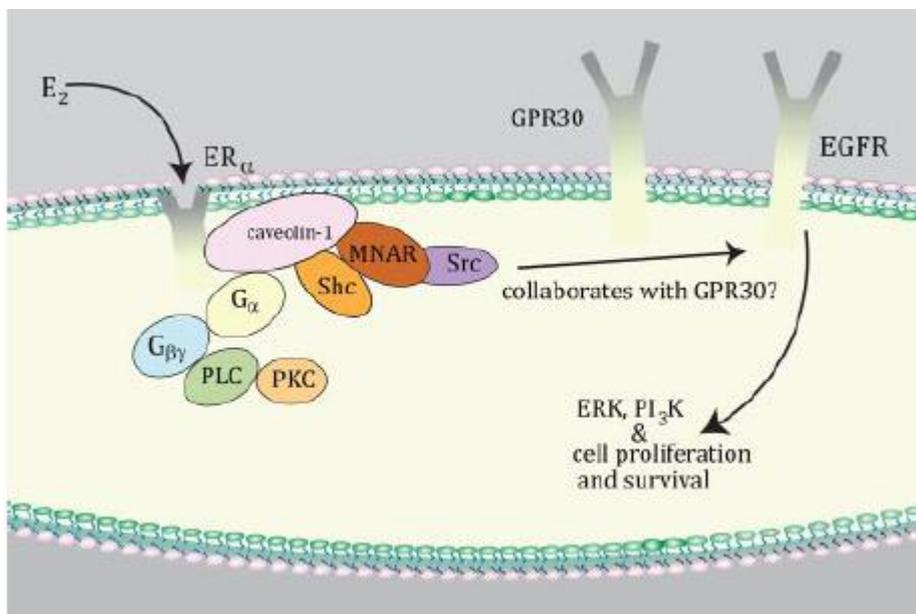


Figure 10. Le RE α : voies non génomiques. Le RE α localisé à la membrane interagit avec de nombreuses protéines et coopérerait avec le GPR30 pour activer l'EGFR (Langer *et al*, 2010).

5. Les partenaires de la transcription médiée par les REs

a) Les co-activateurs et les co-répresseurs

Les co-activateurs et les co-répresseurs des REs sont communs aux autres récepteurs des hormones stéroïdiennes et leur expression est limitée dans la cellule. La surexpression d'un récepteur nucléaire pourrait de ce fait inhiber l'activation de la transcription médiée par les différents récepteurs aux hormones stéroïdiennes (squelching) : ces récepteurs entrent en compétition pour le recrutement de ces co-facteurs qui deviennent limitants (Meyer *et al*, 1989). De ce fait, l'activité transcriptionnelle des REs est tissu-spécifique pour un même

ligand comme pour le tamoxifène antagoniste dans le sein et agoniste dans l'utérus (*Lindahl et al, 2008*).

Les co-activateurs ont une activité histone acétyltransférase qui permet un remodelage plus aisé de la chromatine des gènes cibles (*McDonnell et Norris, 2002*). Les premiers identifiés sont les « ER α Associated Protein » (ERAP 160) (*Halachmi et al, 1994*) contenant SRC-1, SRC-2, SRC-3 et AIB1 (*Klinge, 2000 ; Anzick et al, 1997*). Ils n'interagissent qu'avec le RE α lié à E2 ou au tamoxifène (*Halachmi et al, 1994*). Cette interaction se fait au niveau du domaine AF2 via un motif de 5 acides aminés riche en leucine LXXLL nécessaire et suffisant (*Horwitz et al, 1996 ; Ding et al, 1998*). Les variations de ce motif vont contribuer à la spécificité d'interaction avec ses différents partenaires (*Hong et al, 1999 ; McInerney et al, 1998b*).

Le SRC-1, le premier cloné (*Onate et al, 1995*), stimule la transcription médiée par l'E2 et le 4-hydroxy-tamoxifène (*Smith et al, 1997*). Le SRC-2 et le SRC-3 serait impliqué dans la transcription de gènes de survie et du cycle cellulaires *in vitro* dans le cancer du sein (*Karmakar et al, 2011*). Certains co-activateurs tels que SRC-1 (*Webb et al, 1998*) augmentent l'activité AF1 du RE α (*Lanz et al, 1999 ; Chooniedass-Kothari et al, 2010*) sans augmenter celle du RE β qui présente un domaine AF1 non fonctionnel.

Enfin, des co-activateurs indirects existent. La liaison de ces co-activateurs au niveau des domaines AF1 et AF2 permet le recrutement d'autres acteurs de la transcription et potentialise l'activité transcriptionnelle des REs (*McKenna et al, 1999 ; Shibata et al, 1997*) (*Tableau 2*).

Tableau 2. Liste non exhaustive de co-activateurs et de co-répresseurs du RE.

co-facteurs		fonctions	type d'interaction avec le RE
co-activateur	SRC1/2/3	<i>Steroid Receptor Co-activator 1/2/3</i>	histone acétyl transférase
	CBP/p300	<i>CREB binding protein / binding protein p300</i>	histone acétyl transférase
	ASC1/2	<i>Activating Signal Cointegrator 1/2</i>	liaison des histone acétyl transférases
	SRA	<i>Steroid Receptor Activator</i>	épissage
	p68	<i>p68 RNA helicase</i>	ARN hélicase
	CARM1	<i>Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1</i>	arginine histone méthyl transférase
	PRMT1	<i>Protein Methyltransferase 1</i>	arginine histone méthyl transférase
	E6-AP	<i>E6-Associated Protein</i>	ubiquitine ligase
	RPF1	<i>Receptor Potentiating Factor 1</i>	ubiquitine ligase
CAPER- α/β	<i>Coactivator of AP1 and Estrogen Receptor</i>	potentialisation de l'activité du RE	association indirecte via la liaison à ASC2
co-répresseur	NCoR	<i>NCoR Nuclear receptor Co-Repressor</i>	histone désacétylase
	SMRT	<i>SMRT Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptor</i>	histone désacétylase
	RIP140	<i>RIP140 Receptor Interacting Protein of 140kDa</i>	compétition avec les co-activateurs pour la liaison au domaine AF2,
	REA	<i>REA Repressor of Estrogen Receptor Activity</i>	interférence avec SRC1 pour la liaison
	RTA	<i>Repressor of Tamoxifen transcriptional Activity</i>	interférence avec SRC1 pour la liaison, activité de liaison à l'ARN

Les co-répresseurs sont également essentiels à une modulation fine de l'activité transcriptionnelle des REs (Tableau 2). Leur rôle premier est le recrutement d'histone désacétylases (Castet et al, 2004; Wei et al, 2000) permettant la compaction de l'ADN. Un motif commun à ces co-répresseurs présente des ressemblances avec le motif LXXLL de liaison aux récepteurs nucléaires des co-activateurs (Edwards, 2000). Les co-répresseurs se fixeraient sur la même région que les co-activateurs. En présence d'un antagoniste, les hélices impliquées dans la liaison des co-activateurs au domaine AF2, orientées différemment, constitueraient un domaine d'interaction plus large permettant la liaison de co-répresseurs (Xu et al, 2002 ; Baniahmad, 2005). Ceci expliquerait le recrutement spécifique de co-répresseurs lors de la liaison d'antagonistes au récepteur. Peuvent être cités NCoR (*Nuclear Co-Repressor*) et SMRT (*Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor*) interagissant avec le RE lié aux anti-estrogènes et acteurs de l'inhibition de la transcription par le 4-hydroxy-tamoxifène et le raloxifène (Shang et Brown, 2002; Shang et al, 2000 ; Lavinsky et al, 1998). La liaison de ces co-répresseurs va être stabilisée par les antagonistes (Moehren et al, 2004 ; Edwards, 2000). Certains co-répresseurs peuvent également fixer un RE lié à un agoniste et en diminuer l'activité transcriptionnelle (Delage-Mourroux et al, 2000).

b) Influence des modifications post-traductionnelles sur l'activité du RE α

Le RE α peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles dynamiques permettant de réguler l'assemblage et le désassemblage des complexes transcriptionnels et, par conséquent, l'activité transcriptionnelle du RE α (Figure 11).

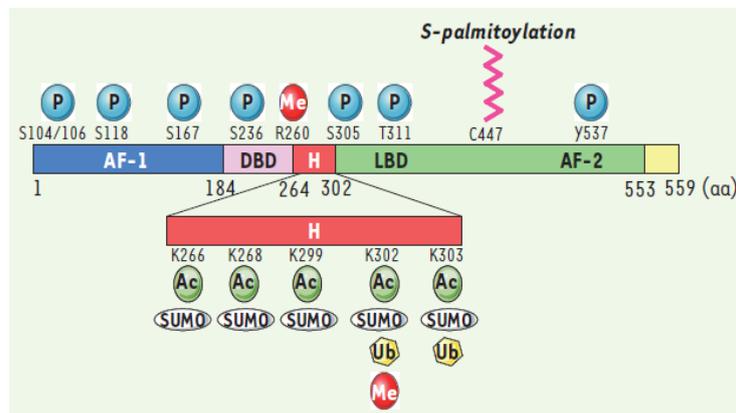


Figure 11. Les modifications post-traductionnelles du RE α . Le RE α peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles sur divers sites. P : phosphorylation ; Me : méthylation ; Ac : acétylation ; Sumo : sumoylation ; Ub : ubiquitinylation (Poulard et al, 2010).

Il comporte de nombreux sites de phosphorylations en réponse aux estrogènes, à des hormones ou des facteurs de croissance. Les sites majeurs de phosphorylation sont localisés au niveau du domaine AF1. Plusieurs sérines, la tyrosine 537 et la thréonine 311 peuvent être phosphorylées par différentes kinases. Ces phosphorylations vont réguler la transcription, la dimérisation, l'export nucléaire ou la fixation du ligand (Tableau 3) (Poulard et al, 2010). Le RE α qui peut être phosphorylé sur sa sérine 118 en présence ou en absence de ligand (Cheng et al, 2000 ; Kato et al, 1995 ; Bunone et al, 1996 ; Gonzalez et al, 2009) est retrouvé dans le noyau (Weitsman et al, 2006). Le RE α peut également être acétylé, polyubiquitinylé, sumoylé et méthylé au niveau de lysines permettant la modulation de l'activité de ce récepteur (Tableau 3) (Poulard et al, 2010).

Tableau 3. Modifications post-traductionnelles du RE α .

Modification	sites de modification	activation	enzyme	fonctions
PHOSPHORYLATION	S104-106	non déterminé	Cdk2/cycline A	activation de la transcription
		estrogènes	GSK3	
	S118	estrogènes	Cdk7	activation de la transcription
		estrogènes	IKK α , GSK3	
		estrogènes	MAPK	
		EGF et IGF-1	MAPK	
	S167	prolactine	non déterminé	activation de la transcription
		insuline	S6K1	
	S236	absence du ligand	PKA	inhibition de la dimérisation
	S305	non déterminé	Pak1	activation de la transcription
non déterminé		PKA	activation de la transcription en présence de tamoxifène	
T311	estrogènes	p38-MAPK	inhibition de l'export nucléaire	
Y537	basale	p56lck, p60c-src	régulation de la fixation d'E2	
ACETYLATION	K266-268	absence du ligand	acétyltransférase p300	activation de la transcription via l'induction de la liaison du RE α à l'ADN
	K299-302-303	estrogènes	acétyltransférase p300	répression de la transcription
POLYUBIQUITINYLATION	K302-303	estrogènes	ubiquitine-ligase	stabilisation du récepteur activation de la transcription
SUMOYLATION	K266-268-299-302-303	estrogènes	ligase	activation de la transcription
METHYLATION	K302	estrogènes	méthyltransférase SET7	stabilisation du récepteur recrutement au niveau du promoteur
			méthyltransférase PRMT1	activation de la transcription
R260	estrogènes	méthyltransférase PRMT1	localisation à la membrane plasmique	
PALMITOYLATION	447	absence du ligand	palmitoyl acyl-transférase	formation du complexe RE α /Src/PI3K/FAK

Tous ces facteurs décrits précédemment permettent la régulation fine de l'activité transcriptionnelle des REs. Il faut également tenir compte des modifications post-traductionnelles que subissent également les co-régulateurs tels que les SRCs ou p300/CBP (Rowan *et al*, 2000 ; Vo *et Goodman*, 2001 ; Yuan *et Gambiae*, 2000). Il est donc nécessaire de tenir compte de toutes les combinaisons possibles dans l'élaboration de nouvelles approches.

B. Le GPR30, un nouveau récepteur membranaire des estrogènes

Le GPR30 est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) à sept hélices transmembranaires. De 1996 à 1998, le GPR30 a été cloné par différents groupes (Owman *et al*, 1996 ; Kvingedal *et Smeland*, 1997 ; O'Dowd *et al*, 1998 ; Takada *et al*, 1997 ; Feng *et Gregor*, 1997 ; Carmeci *et al*, 1997). L'ARNm du GPR30 a été détecté dans de nombreux tissus humains tels le cœur, les poumons, le placenta, le système lymphoïde, le foie, le muscle squelettique et le pancréas (Owman *et al*, 1996 ; Kvingedal *et Smeland*, 1997 ; O'Dowd *et al*, 1998 ; Takada *et al*, 1997 ; Feng *et Gregor*, 1997).

Le GPR30 a finalement été cloné et identifié dans des lignées de carcinome mammaire RE-positif (MCF-7) et RE-négatif (MDA-MB-231) (Carmeci *et al*, 1997). Le gène du GPR30 est localisé sur le chromosome au locus 7p22 (Carmeci *et al*, 1997). L'expression protéique du GPR30 est importante dans la lignée MCF-7 et plus faible dans les cellules MDA-MB-231.

Le GPR30 a été identifié comme récepteur membranaire aux estrogènes en 2000 (*Filardo et al, 2000*). La voie d'activation rapide de ERK1/2 par les estrogènes était jusqu'alors inconnue. Dans cette étude, le traitement avec de l'E2 entraîne une augmentation rapide de la quantité de protéine ERK phosphorylée. De plus, le signal induit par l'E2 dépend de la transactivation de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) via la libération de l'*Heparin Binding-Epidermal Growth Factor* (HB-EGF) (*Filardo et al, 2000*).

1. Localisation cellulaire

a) Réticulum endoplasmique et/ou membrane plasmique ?

La localisation cellulaire du GPR30 reste controversée (*Langer et al, 2010*). La transfection d'un GPR30 marqué à la *Green Fluorescent Protein* (GFP) (*Revankar et al, 2005 ; Otto et al, 2008*) et un fractionnement cellulaire (*Filardo et al, 2007*) ont permis de localiser ce récepteur au niveau du réticulum endoplasmique. Des dérivés synthétiques de l'estradiol capables ou non de passer la membrane plasmique et possédant une affinité similaire à celle de l'E2 pour le GPR30 ont également permis de mettre en évidence une localisation subcellulaire du GPR30 (*Revankar et al, 2007*). Ces travaux confirment tous une présence intracellulaire du GPR30 sans localisation à la membrane plasmique (*Tableau 4*). Cependant, le couplage à la GFP peut empêcher la translocation de certains RCPGs au niveau de la membrane plasmique (*Brothers et al, 2003*), ce qui pourrait expliquer l'absence de GPR30 au niveau de la membrane plasmique dans certaines de ces études.

Des approches similaires avec un GPR30 couplé à une molécule fluorescente ont également permis de montrer une localisation du GPR30 à la membrane plasmique (*Thomas et al, 2005 ; Filardo et al, 2007 ; Funakoshi et al, 2006*) (*Tableau 4*).

Enfin, une étude récente conclut à une expression dans le réticulum endoplasmique majoritaire du GPR30 avec également une expression à la membrane plasmique (*Cheng et al, 2011*). Les RCPGs, après activation et fixation d'un ligand, peuvent être internalisés conduisant à un recyclage rapide à la membrane plasmique ou à une dégradation dans les lysosomes (*Oakley et al, 1999 ; Marchese et al, 2008*). L'hypothèse d'une « endocytose constitutive » du GPR30 indépendante de la présence de ligand entraînerait une accumulation périnucléaire du GPR30 expliquant que le GPR30 n'est pas toujours détecté au niveau de la membrane plasmique (*Cheng et al, 2011*).

Tableau 4. Localisation cellulaire du GPR30. Récapitulatif des différentes études réalisées.

Localisation	Cellules	Expression du GPR30	Techniques de détection	Référence
réticulum endoplasmique	COS-7	transfection transitoire du GPR30 marqué avec la GFP à l'extrémité C-terminal	immunofluorescence	<i>Revankar et al, 2005</i>
	COS-7	transfection transitoire du GPR30 marqué avec la GFP	mobilisation du calcium intracellulaire activation PI3K	<i>Revankar et al, 2007</i>
	SKBr3	non transfectées	immunofluorescence	
	COS-7	transfection transitoire du GPR30 marqué avec la GFP à l'extrémité C-terminal transfection transitoire du GPR30 marqué à la GFP à l'extrémité N-terminale	immunofluorescence	<i>Otto et al, 2008</i>
	COS-7 / HEK293	transfection transitoire du GPR30 non marqué	immunofluorescence	
	IEC-50 / MDA-MB-23	non transfectées	immunofluorescence	
	HEK293	transfection stable du GPR30 couplé à l'hémagglutinine à l'extrémité N-terminale	fractionnement cellulaire western blot	<i>Filardo et al, 2007</i>
membrane plasmique	Hela	avec la protéine FLAG à l'extrémité N-	immunofluorescence	<i>Funakoshi et al, 2006</i>
	SKBr3	non transfectées	fractionnement cellulaire	<i>Thomas et al, 2005</i>
	HEK293	transfection stable du GPR30 non marqué	western blot	
	HEK293	transfection stable du GPR30 couplé à l'hémagglutinine à l'extrémité N-terminale	immunofluorescence	<i>Filardo et al, 2007</i>
	SKBr3	non transfectées	fractionnement cellulaire western blot	
noyau	CAFs (tumeurs mammaires)	expression propre	immunofluorescence immunoprécipitation	<i>Madeo et Maggiolini, 2010</i>

b) Un GPR30 nucléaire ?

Des travaux récents décrivent un GPR30 nucléaire (*Madeo et Maggiolini, 2010*) identifié dans des fibroblastes associés aux tumeurs (*Cancer Associated Fibroblasts, CAFs*) et jouant un rôle dans la progression tumorale (*Kalluri et Zeisberg, 2006 ; Chang et al, 2005*). Dans ce modèle, 1nM d'E2 entraîne une phosphorylation de ERK1/2 médiée par le GPR30. De plus, 1nM d'E2 ou 1µM de G1, agoniste spécifique du GPR30 (*Bologa et al, 2006*), induit l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire. Le blocage du GPR30 ou de l'EGFR, connu pour être activé par le GPR30, abolit la surexpression de ces gènes. Ces résultats suggèrent que ces gènes sont régulés par le GPR30 et nécessite l'EGFR (*Madeo et Maggiolini, 2010*) (*Figure 12*). Des immunoprécipitations montrent aussi que la localisation nucléaire du GPR30 est associée à une interaction avec l'EGFR (*Tableau 4*).

L'interaction entre le GPR30 et l'EGFR ne s'observe que dans le noyau (*Madeo et Maggiolini, 2010*). Cependant, cette étude reste la seule à montrer une localisation nucléaire du GPR30 ainsi qu'une interaction avec l'EGFR de ce récepteur.

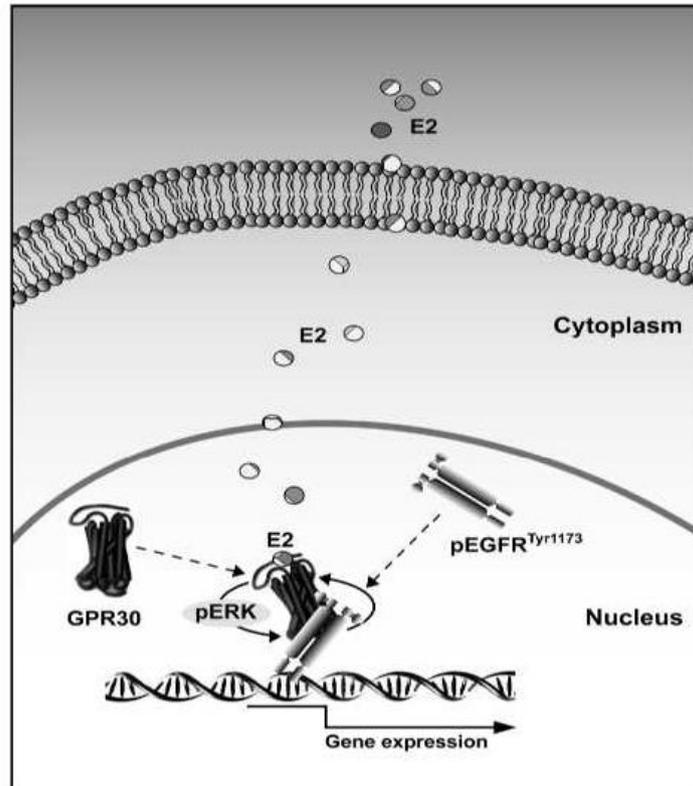


Figure 12. Représentation schématique du mécanisme d'activation de la transcription par le complexe GPR30-EGFR proposé par Madeo et Maggiolini. Le GPR30 et l'EGFR formeraient un complexe dans le noyau qui interagirait avec l'ADN et entraînerait l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire (*Madeo et Maggiolini, 2010*).

2. Le GPR30, un récepteur des estrogènes ?

Le GPR30 a été identifié comme récepteur membranaire des estrogènes en 2000 (*Filardo et al, 2000*). Cependant, la liaison de l'E2 au GPR30 reste controversée. Plusieurs études *in vitro* montrent que cette liaison serait faible (*Thomas et al, 2005*) voire inexistante (*Otto et al, 2008*). Aucune liaison spécifique ou augmentation de l'AMPc, de Erk ou de PI3K en réponse à l'E2 n'a été observée chez des souris déficientes pour le RE α et le RE β malgré l'expression du GPR30 (*Pedram et al, 2006*). Enfin, les effets rapides extranucléaires dans les cellules MCF-7 seraient uniquement médiés par la liaison de l'E2 au RE α classiques (*Madak-Erdogan et al, 2008*).

Une nouvelle hypothèse face à ces données divergentes a été formulée (*Langer et al, 2010*) : le GPR30 pourrait agir partiellement en collaboration avec le RE α (voir *Figure 10*). En effet, la signalisation membranaire du RE α nécessite un ensemble de protéines différentes ou « signalosome » (*Levin, 2008*) dans lequel le GPR30 pourrait jouer un rôle particulier. Dans les cellules MCF-7, l'activation de Erk et l'expression de Fos par l'E2 ne serait possible qu'en présence du RE α et du GPR30 (*Albanito et al, 2007*) sans connaître le mécanisme de cette interaction. Le RE α membranaire lie et active diverses sous-unités Ga et G β/γ requises pour la transduction du signal (*Razandi et al, 1999 ; Wyckoff et al, 2001 ; Kumar et al, 2007*).

L'expression membranaire du domaine E des REs inséré dans la membrane chez des souris n'exprimant pas les REs classiques suffirait à récupérer l'activation de Erk et PI3K perdue chez les souris invalidées pour le récepteur complet (*Kumar et al, 2007*).

Le GPR30, en tant que récepteur aux estrogènes, lierait la plupart des ligands des REs nucléaires classiques. L'E2, le tamoxifène et l'ICI 182,780 présentent tous une action agoniste sur le GPR30 quand l'ICI 182,780 et le tamoxifène sont respectivement un antagoniste pur et un agoniste partiel du RE α (*Revankar et al, 2005 ; Thomas et al, 2005 ; Filardo et al, 2000*).

L'estriol serait, quant à lui, un antagoniste du GPR30 (*Lappano et al, 2010*).

Des ligands spécifiques du GPR30 ont été récemment développés. Le G-1 (*Bologa et al, 2006*), agoniste spécifique, puis le G-15 (*Dennis et al, 2009*), antagoniste spécifique ont été synthétisés. Le G-15 antagonise la mobilisation intracellulaire de calcium et l'activation de la PI3K induites par le G-1 (*Dennis et al, 2009*). Ces deux composés ne se lient ni au RE α ni au RE β .

3. Voies de signalisation du GPR30

Le GPR30 est associé à une protéine G composés des sous-unités *Gas* (Filardo et al, 2000) et $G\beta/\gamma$ (Thomas et al, 2005). Les différentes voies de signalisation et l'action du GPR30 ont déjà été bien décrites (Maggiolini et Picard, 2010 ; Mizukami, 2010).

La liaison de l'E2 induit, via la sous-unité $G\beta/\gamma$, une activation de la tyrosine kinase Src qui va phosphoryler la protéine adaptatrice Shc permettant l'activation d'une métalloprotéase matricielle (Quinn et al, 2009) et le relargage du HB-EGF. La stimulation de l'EGFR par le HB-EGF va activer des voies PI3K/PKA et Erk (Figure 13). La voie PI3K entraîne une accumulation de PIP3 et, ainsi, l'activation d'une kinase avec une action anti-apoptotique et pro-proliférative, la kinase Akt.

La sous-unité *Gas*, quant à elle, va activer l'adénylate cyclase, résultant en la production d'AMPC (Filardo et al, 2002 ; Filardo et al, 2007 ; Thomas et al, 2005 ; Kanda et Watanabe, 2003a ; Kanda et Watanabe, 2003b).

Enfin, une augmentation rapide du taux de calcium intracellulaire en réponse à l'activation du GPR30 a également été montrée (Revankar et al, 2005 ; Bologna et al, 2006 ; Filardo et al, 2007). Celle-ci peut être bloquée par le G-15, antagoniste spécifique du GPR30 (Dennis et al, 2009). Cependant, la PLC ne semble pas impliquée dans ce processus (Revankar et al, 2005). Une autre phospholipase ou une action dépendante du type cellulaire peuvent être invoquées. L'activation de ces différentes voies de signalisation induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire et la migration (Prossnitz et Maggiolini, 2009). Les gènes régulés par ces différentes voies dépendraient du type cellulaire.

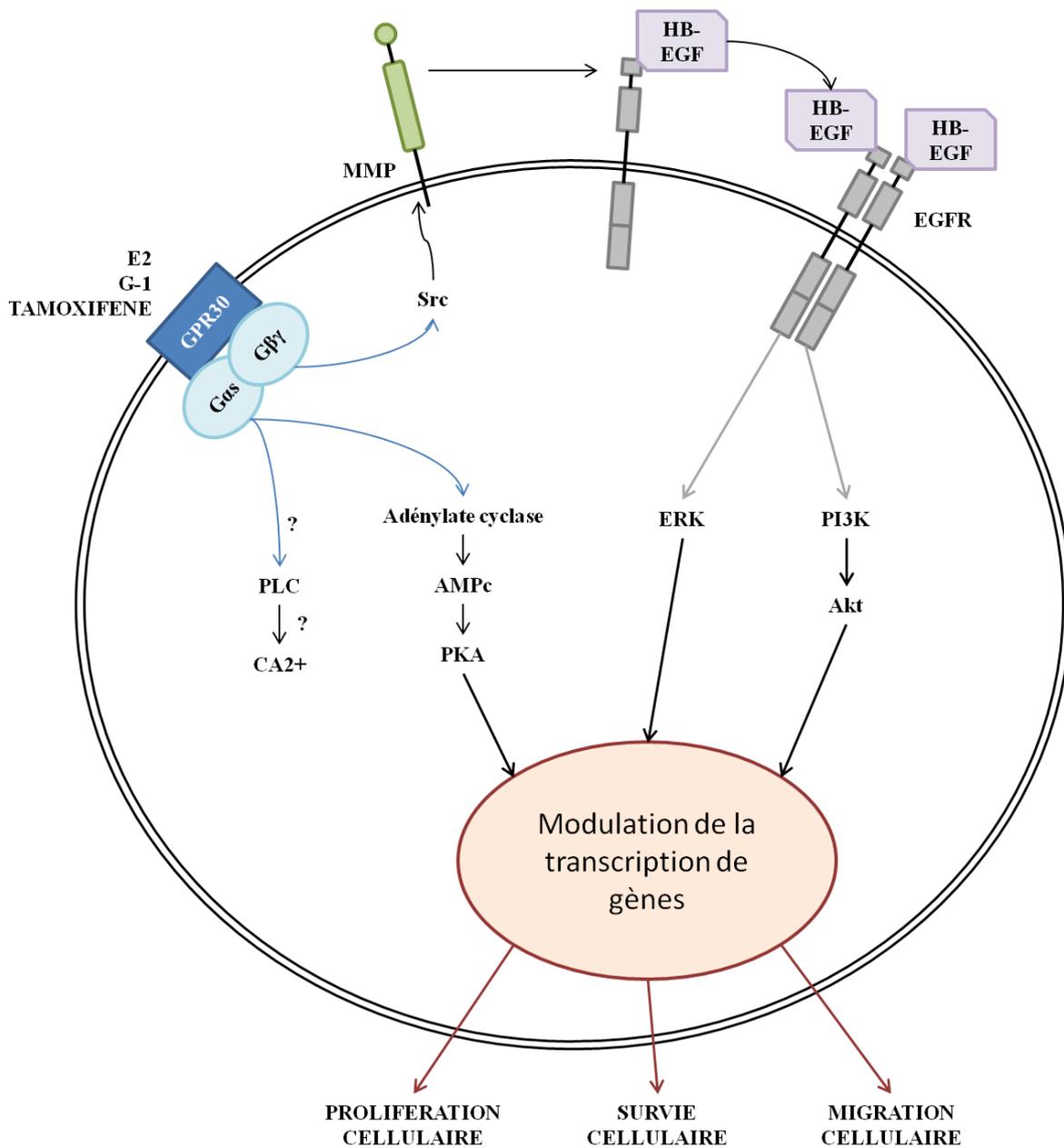


Figure 13. Les différentes voies de signalisation médiées par l'activation du GPR30. L'activation du GPR30 va induire diverses voies de signalisation et permettre la modulation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la migration et la survie cellulaires.

4. Rôle biologique du GPR30

Le GPR30 a été étudié dans divers modèles *in vitro* et *in vivo* depuis sa découverte. Il est exprimé et semble jouer un rôle physiologique dans de nombreux tissus. Il serait requis dans l'apoptose thymocytaire (Wang *et al*, 2008) et modulerait l'activité des lymphocytes T régulateurs dans des modèles animaux de sclérose et d'encéphalomyélite (Blasko *et al*, 2009 ; Wang *et al*, 2009). Il jouerait également un rôle dans l'homéostasie du glucose (Nadal *et al*, 2011 ; Martensson *et al*, 2009). Il est aussi retrouvé dans l'endothélium des vaisseaux périphériques (Isensee *et al*, 2009) et serait impliqué dans la réduction de la pression artérielle (Lindsey *et al*, 2009 ; Haas *et al*, 2009). Une perte de fonction du ventricule gauche chez les souris KO mâles a été observée (Delbeck *et al*, 2011) suggérant un rôle protecteur de ce récepteur dans le cœur *in vivo* (Weil *et al*, 2010).

De manière surprenante, l'inactivation du gène du GPR30 n'entraîne pas d'anomalies anatomiques des organes reproducteurs (utérus, glande mammaire) ou d'infertilité (Otto *et al*, 2009 ; Windahl *et al*, 2009) contrairement au RE α et au RE β (Dupont *et al*, 2000).

Son activation stimule la prolifération cellulaire dans diverses lignées cancéreuses (Vivacqua *et al*, 2006a et 2006b ; Albanito *et al*, 2007 ; Lin *et al*, 2009) d'où son implication potentielle dans la carcinogénèse. L'effet agoniste du tamoxifène sur ce récepteur pourrait intervenir dans les phénomènes de résistance (Maggiolini *et al*, 2004 ; Thomas *et al*, 2005 ; Pandey *et al*, 2009) et les effets indésirables au niveau de l'utérus (Henic *et al*, 2009 ; Vivacqua *et al*, 2006b) observés chez les patientes avec un cancer du sein. De ce fait, son expression dans des tumeurs mammaires de patientes traitées au tamoxifène serait un facteur de mauvais pronostic (Ignatov *et al*, 2011).

C. Les récepteurs aux estrogènes, des médiateurs de l'inflammation

1. Les récepteurs nucléaires aux estrogènes : RE α et RE β

Les estrogènes jouent un rôle complexe dans l'inflammation *in vitro* et *in vivo* (Straub, 2007, pour revue ; Cvoro *et al*, 2008).

Le ratio RE α /RE β jouerait un rôle important dans la résolution de l'inflammation. Une surexpression du RE β a été observée chez des animaux soumis à un trauma et une hémorragie, contexte inflammatoire généralisé, parallèlement à une diminution de la quantité de RE α (Schneider *et al*, 2000). Un stress oxydatif augmente aussi l'expression du RE β dans des cellules endothéliales et des macrophages activés (Tamir *et al*, 2002) quand il induit une

dégradation du RE α dans des cellules cancéreuses mammaires (*Kurebayashi et al, 2001 ; Stoner et al, 2002*).

Bien que les REs soient des acteurs essentiels de l'inflammation, le RE α et le RE β semble différemment impliqués dans sa modulation. Les estrogènes diminuent l'inflammation induite par le TNF α dans le muscle lisse aortique chez le rat via le RE β (*Xing et al, 2007*).

L'utilisation d'agonistes spécifiques du RE β dans des modèles de maladies chroniques inflammatoires de l'intestin réduit les symptômes et l'inflammation (*Mewshaw et al, 2005 ; Harris et al, 2003; Harnish et al, 2004*). Les estrogènes ont également montré une action bénéfique dans de nombreux modèles d'inflammation cérébrale (*Straub, 2007, pour revue*). Ils auraient une action protectrice dans un modèle d'ischémie globale chez la souris (*Carswell et al, 2004*) et réduiraient le taux de médiateurs inflammatoires microgliaux tels que COX-2 et PGE2 via leur interaction avec le RE β (*Baker et al, 2004; Vegeto et al, 2001*). A l'opposé, Tiwari-Woodruff et coll. ont montré que les deux REs étaient neuroprotecteurs quand seul le RE α réduirait l'inflammation dans le système nerveux central (*Tiwari-Woodruff et al, 2007*). L'effet protecteur de l'E2 chez des souris présentant une Encéphalite Autoimmune Expérimentale (EAE) (*Polanczyk et al, 2003 ; Liu et al, 2003*) ou un accident vasculaire cérébral (*Dubal et al, 1998*) est aboli chez des souris déficientes en RE α quand il est préservé chez des souris déficientes en RE β . Le traitement avec un agoniste du RE α avant induction d'une EAE supprimerait aussi les symptômes de la maladie (*Elloso et al, 2005*). L'effet protecteur des estrogènes largement démontré pourrait cependant être médié par le RE α et/ou le RE β en fonction du tissu.

Des études sur l'impact des estrogènes dans le cancer du sein ont été réalisées. Dans des lignées cancéreuses mammaires, il a été décrit que l'E2 régulerait la transcription de la m-PGES qui permet la formation de la PGE2 pro-inflammatoire (*Frasor et al, 2003 ; Frasor et al, 2008*). Cette prostaglandine favorise notamment la croissance tumorale (*Chang et al, 2005*) et la survenue de métastases (*Ma et al, 2006*). Il a également été montré qu'il existe une corrélation entre l'expression de COX2 et du RE α dans des carcinomes mammaires ductaux (*Barisik et al, 2010*). Une surexpression de COX2 induirait une augmentation de l'expression et de l'activité de l'aromatase *in vivo* dans des tissus mammaires (*Subbaramaiah et al, 2006 ; Muller-Decker et al, 2005*). L'augmentation de la synthèse locale d'estrogènes par la COX2 contribuerait à la croissance cellulaire médiée par le RE α et au maintien d'un environnement inflammatoire par l'expression de la PGES. L'effet anti-prolifératif des agonistes du RE β et

des antagonistes du RE α ainsi que la régulation de la transcription du gène de la PGDS par le RE β (Devidze et al, 2010; Otsuki et al, 2003) suggèrent que l'action anti-inflammatoire serait médiée par le RE β dans les tumeurs mammaires.

2. Le GPR30

Peu de données existent concernant l'impact du GPR30 sur l'inflammation. Le GPR30 régulerait la transcription de nombreux gènes dont celui du TNF α (Maggiolini et Picard, 2010). Dans un modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde, un effet protecteur du GPR30 associé à une diminution des taux de TNF α , d'IL-6 et d'IL-1 β a été montré (Weil et al, 2010). Une augmentation de l'expression du GPR30 lors de l'induction d'une inflammation du muscle masseter *in vivo* a aussi été observée (Liverman et al, 2009). L'effet bénéfique sur l'inflammation induit par les estrogènes pourrait être en partie médié par le GPR30. Le rôle de ce récepteur dans la modulation de l'inflammation reste encore à explorer.

D. Pharmacologie des REs

Les REs sont impliqués dans diverses pathologies (Tableau 1, page 22). Leurs rôles respectifs ont particulièrement été étudiés dans le cancer du sein où un changement du ratio RE α /RE β intervient dans le processus de tumorigénèse (Leygue et al, 1998). L'expression protéique du RE α augmentée dans les tumeurs est responsable de la croissance induite par les estrogènes (Lazennec et al, 2001). L'expression du RE β est, quant à elle, diminuée (Roger et al, 2001 ; Jarvinen et al, 2000). Le RE β régulerait négativement l'activité transcriptionnelle du RE α responsable de la croissance tumorale (Pettersson et al, 2000) et posséderait une action anti-tumorale (Rody et al, 2005 ; Bardin et al, 2004). Son expression dans les tumeurs serait donc facteur de bon pronostic (Fox et al, 2008).

Un feedback positif entre l'action des estrogènes sur le RE α et l'inflammation contribuant à la croissance des tumeurs mammaires hormono-dépendantes (Frasor et al, 2008) existerait également. En effet, la m-PGES serait surexprimée dans des lignées de carcinomes mammaires estrogéno-dépendantes en présence d'E2 (Frasor et al, 2003). L'état inflammatoire et la surexpression de la m-PGES entraînerait une augmentation de l'expression de l'aromatase et de la production locale d'E2 dans le sein (Brueggemeier et al, 2001 ; Richards et al, 2003 ; Singh et al, 1999 ; Karuppu et al, 2002).

De ce fait, de nombreux traitements ciblant le RE α ont été développés. L'hormonothérapie est envisagée pour des tumeurs hormono-dépendantes, exprimant le RE α . Les molécules développées sont des anti-hormones ou des inhibiteurs de synthèse d'hormones (*Figure 14*).

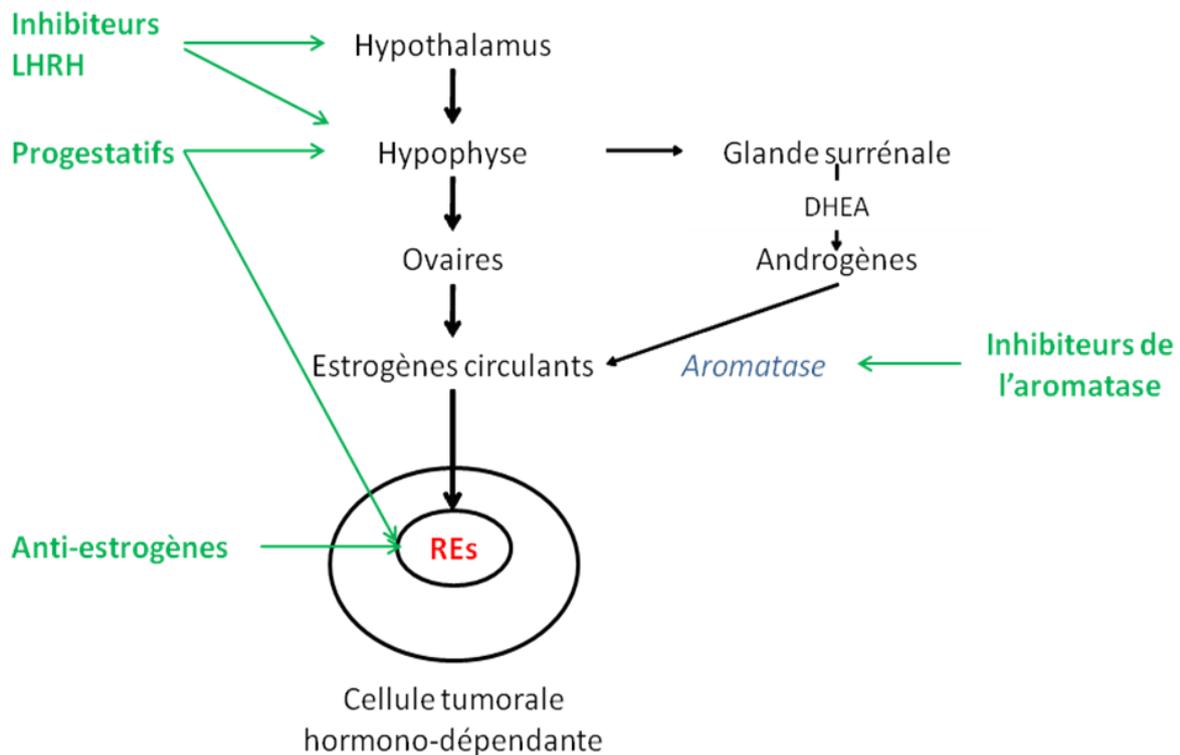


Figure 14. L'hormonothérapie : les différents types de molécules dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant.

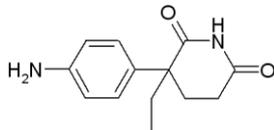
1. Les anti-aromatases : inhibiteurs de la biosynthèse des estrogènes

L'aromatase, enzyme clé dans le cancer du sein (*Suzuki et al, 2008*), catalyse l'aromatation de la testostérone et de l'androstènedione et son action nécessite la présence d'un cytochrome P450 pour le transfert d'électrons au cours de l'élimination du méthyle en 19. L'inhibition de cette enzyme se fait soit par compétition avec le substrat au niveau du site de liaison soit par interférence avec le noyau hémunique du cytochrome P450.

Les anti-aromatases ne sont prescrits que chez les femmes ménopausées ou ovariectomisées afin de supprimer la production d'estrogènes résiduelle essentiellement extra-ovarienne (tissu adipeux, foie, peau, muscle, tissu tumoral) (*Labrie, 2007 ; Mattenberg et al, 2005*). En effet, si les ovaires sont encore fonctionnels, l'inhibition de l'aromatase fait chuter la quantité d'estrogènes supprimant le rétrocontrôle hypophysaire et provoquant ainsi une libération

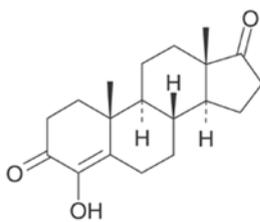
accrue de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) qui stimulent l'ovaire et donc la production d'estrogènes. Trois générations d'inhibiteurs d'aromatase ont déjà été développées.

a) L'aminoglutéthimide (1^{ère} génération)



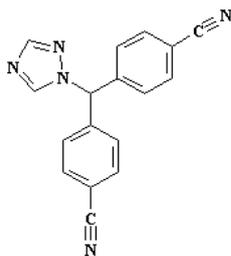
L'aminoglutéthimide a été, en premier lieu, commercialisé comme anticonvulsivant. Il inhibe la synthèse du cortisol et la transformation du cholestérol en prégnénolone. Sa non-spécificité, responsable de nombreux effets secondaires, a orienté la recherche vers d'autres applications dans les années 60 (*Hughss et Burley, 1970*) et, plus particulièrement dans le traitement du cancer du sein métastatique à un stade avancé (*Hall et al, 1969*).

b) Le formestane ou 4-hydroxy-androstènedione (2^{ème} génération)

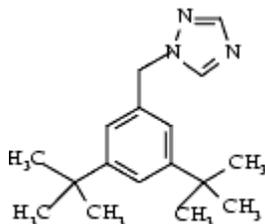


C'est un inhibiteur spécifique de l'aromatase de type stéroïdien décrit dans les années 80 (*Brodie et Santen, 1986 ; Brodie et al, 1986*). Il présente une structure proche de l'androstènedione et est uniquement utilisé pour le traitement du cancer du sein à un stade avancé, après échec ou intolérance au tamoxifène.

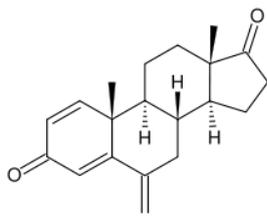
c) Le létrozole, l'anastrozole et l'exémestane (3^{ème} génération)



Le létrozole, inhibiteur spécifique de l'aromatase de type non stéroïdien (*Bhatnagar, 2007 ; Ellis et al, 2008*), se fixe sur la partie héminique de l'aromatase et abaisse la concentration plasmatique et intra tumorale d'estrogènes. Il est prescrit dans le traitement du cancer du sein à un stade avancé (*Pérez et Borja, 1992*).



L'anastrozole est aussi un inhibiteur non stéroïdien de l'aromatase utilisé dans le traitement du cancer du sein à un stade avancé (*Plourde et al, 1994*).



L'exémestane est un inhibiteur stéroïdien irréversible de l'aromatase utilisé dans le traitement du cancer du sein avancé (*Giudici et al, 1988 ; Evans et al, 1992*). Sa structure est apparentée à celle de l'androstènedione, substrat de l'aromatase.

2. Les modulateurs sélectifs des récepteurs des estrogènes (SERMs)

Les SERMs vont moduler l'activité des REs et bloquer l'action des estrogènes en prenant leur place au niveau des récepteurs (*Figure 15*).

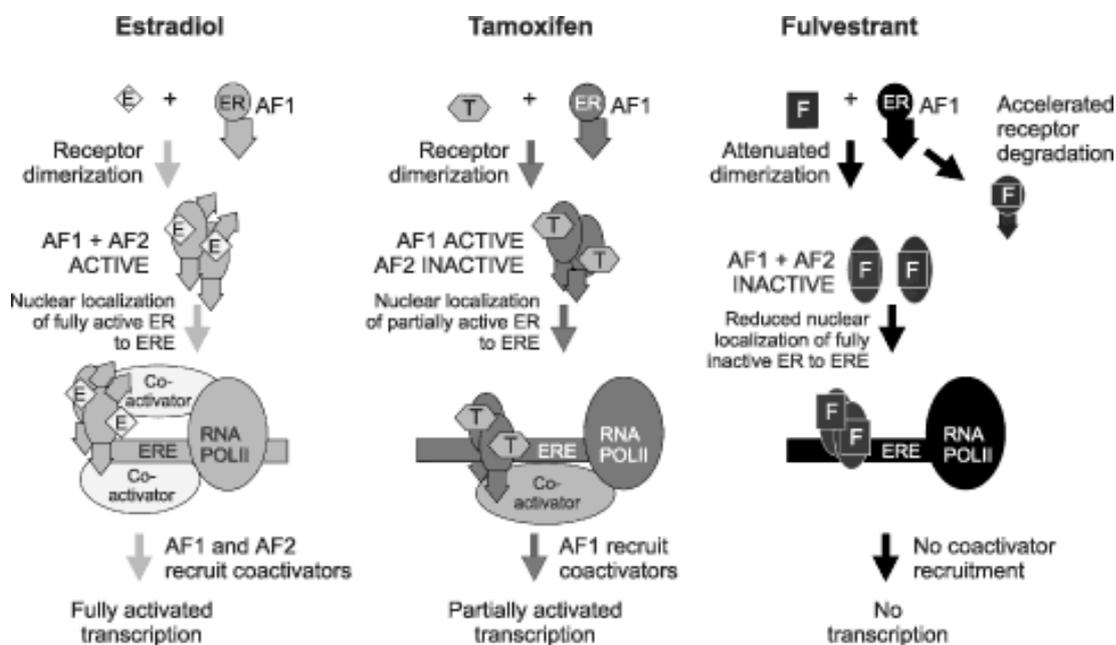
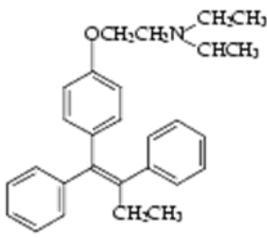


Figure 15. Mode d'actions de l'estradiol du tamoxifène et du fulvestrant (*Buzdar, 2004*).

La fixation d'E2, agoniste naturel du RE α , entraîne la dimérisation du RE α et génère une fonction AF1 et une fonction AF-2 actives. Le complexe E2-RE α transloque dans le noyau, se fixe sur son ERE permettant le recrutement de co-activateurs et l'activation de la transcription. Le tamoxifène, agoniste partiel (antagoniste dans le sein et agoniste dans l'utérus), quant à lui, ne peut induire une fonction AF-2 active. La fonction AF-1 active explique le recrutement de co-activateurs et l'activation partielle de la transcription observée avec le tamoxifène. Enfin, le fulvestrant, antagoniste compétitif, réduit la dimérisation du RE α induisant une dégradation accrue du récepteur. Cette molécule ne permet pas de générer des fonctions AFs actives et, de ce fait, le recrutement de co-activateurs et l'activation de la transcription.

a) Le tamoxifène, traitement de référence



C'est le traitement de référence du cancer du sein estrogéno-dépendant.

Le tamoxifène est métabolisé au niveau du foie en 4-hydroxytamoxifène qui possède une très grande affinité pour les REs. Il est antagoniste des REs dans le sein. C'est le traitement

hormonal le plus efficace depuis 30 ans.

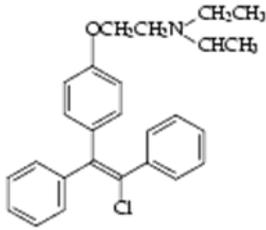
Cependant, il est agoniste au niveau de l'endomètre et responsable d'une augmentation du risque de cancers secondaires utérins (*Lindalh et al, 2008 ; Polin et Ascher, 2008*). De plus, l'apparition de phénotypes tumoraux résistants au tamoxifène reste un des problèmes majeurs de cette molécule.

Les causes de cette résistance sont nombreuses et complexes (*Al Saleh et al, 2011*). Elles ont été et restent largement étudiées. Une des plus fréquentes est la perte d'expression ou de fonction du RE α (*Massarweh et al, 2006*). La réduction du taux de co-répresseurs essentiels à l'effet antagoniste du tamoxifène (*Normanno et al, 2005 ; Jackson et al, 1997 ; Ketchart et al, 2011*) et l'implication de certains coactivateurs responsables de l'effet agoniste du tamoxifène (*Ring et Dowsett, 2004 ; Osborne et al, 2003*) ont été avancées.

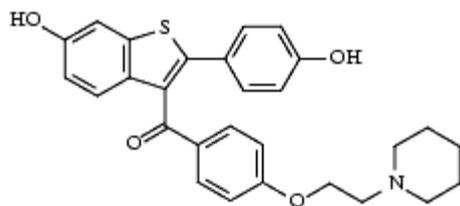
La présence du GPR30 a également été reportée comme une cause potentielle de ces résistances (*Ignatov et al, 2011*). En effet, le tamoxifène est un agoniste du GPR30 et induit l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire.

De nouveaux axes de recherche reposent sur la réversion de cette résistance acquise. Une étude a montré qu'un inhibiteur du doigt de zinc des REs bloque la croissance de cellules résistantes au tamoxifène *in vitro* et *in vivo* (*Wang et al, 2006*). Cette molécule faciliterait la dissociation du RE α de son coactivateur et son association avec un corépresseur (*Wang et al, 2006*). Le co-traitement de cellules avec le tamoxifène et le dasatinib, un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase, pourrait aussi abolir cette résistance (*Martinez-Outschoorn et al, 2011*).

b) Les autres SERMs

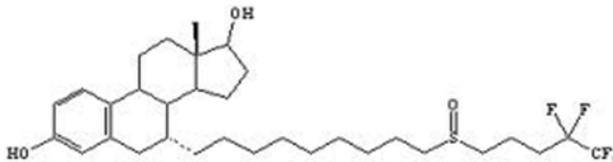


Le clomifène, mélange racémique cis et trans pour le chlore, présente une structure relativement proche de celle du tamoxifène. Il exerce des effets estrogéniques et anti-estrogéniques. Il inhibe le rétrocontrôle hypothalamo-hypophysaire assuré par l'estradiol. Son action entraîne une décharge de FSH, puis de LH, susceptible de déclencher une ovulation après quelques jours de traitement.



Le raloxifène possède un effet anti-estrogénique au niveau du sein et de l'endomètre et une action estrogénique dans l'os ce qui réduit la perte osseuse.

Le fulvestrant ou ICI 182,780 est un antagoniste compétitif des récepteurs aux estrogènes. C'est un anti-estrogène pur indiqué dans le traitement du cancer du sein estrogéno-dépendant de la femme ménopausée. Il est bien toléré avec peu d'effets indésirables au niveau de l'endomètre ou de l'os (*Croxtall et McKeage, 2011*).



II. CONTEXTE DE L'ETUDE / RESULTATS

A. Contexte bibliographique

Les dérivés 7-hydroxylés de la DHEA, longtemps considérés comme inactifs ont suscité un intérêt grandissant et plus particulièrement la molécule étudiée au cours de cette recherche, la 7 β -hydroxy-épiandrostérone. En effet, notre laboratoire a récemment montré que la 7 β -hydroxy-épiandrostérone, métabolite de la DHEA, exerce des effets anti-inflammatoires dans deux modèles d'inflammation *in vivo* dans un modèle de colite chez le rat (*Hennebert et al, 2008*) et *in vitro* dans des monocytes humains traités avec du TNF- α (*Le Mée et al, 2008*). Ce stéroïde endogène conduit à la résolution de l'inflammation en favorisant la formation de la 15d-PGJ2 cytoprotectrice parallèlement à une diminution de la PGE2 pro-inflammatoire (*Figure 16*). Cette modulation de la production des PGs obtenue pour de faibles concentrations de 7 β -hydroxy-épiandrostérone (1-100nM) suggère que cette action passerait par la liaison à un récepteur spécifique.

La double compétence de certains précurseurs stéroïdiens a également été montrée. En effet, à faible dose, la DHEA (500nM) et son dérivé le Δ 5-Androstène-3 β ,17 β -diol (2nM), présentent des effets estrogéniques sur les cellules de carcinome mammaire MCF-7 (*Adams et al, 1981 ; Boccuzzi et al, 1992 ; Boccuzzi et al, 1994 ; Guerini et al, 2005*) en interagissant avec les REs. Les groupements hydroxyles et cétones portés respectivement en C3 et C17 pourraient expliquer cette liaison aux REs.

Enfin, les REs sont impliqués dans la modulation de la transcription des gènes de l'inflammation et, plus particulièrement, de la m-PGES (*Frasor et al, 2008*) et de la L-PGDS (*Otsuki, 2003*) respectivement par les RE α et le RE β .

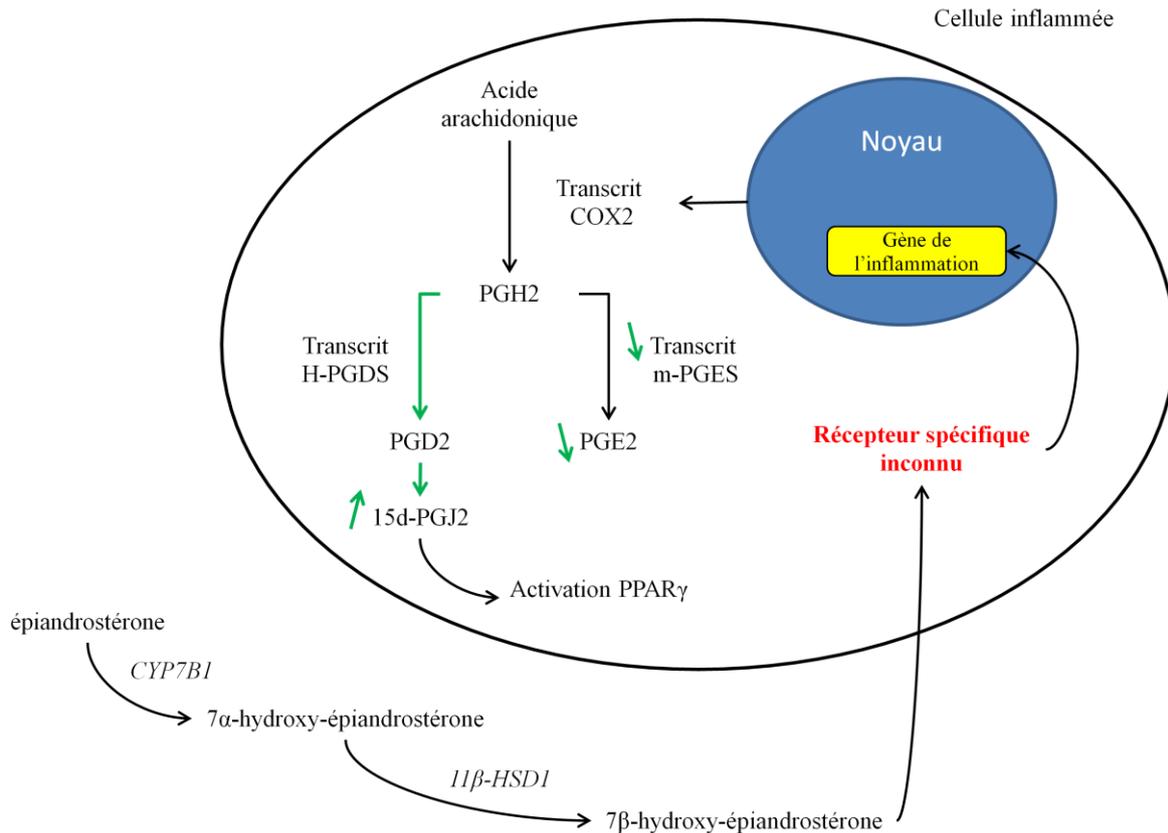


Figure 16. Proposition de mécanisme d'action et de prévention anti-inflammatoire de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone d'après les travaux menés précédemment au sein du laboratoire (Hennebert *et al*, 2008 ; Le Mée *et al*, 2008). La 7 β -hydroxy-épiandrostérone entraîne une diminution du transcrit de la m-PGES, responsable de la transformation de la PGH2 en PGE2 pro-inflammatoire. En parallèle, elle augmente la production de 15d-PGJ2 cytoprotectrice. Son action passerait par la liaison à un récepteur spécifique et la modulation de la transcription de certains gènes de l'inflammation.

B. Objectifs

L'objectif premier repose sur l'étude des réponses cellulaires à la 7 β -hydroxy-épiandrosterone dans des lignées cellulaires de cancer du sein présentant une expression différente des trois REs. Pour cela, l'effet de ce stéroïde a été testé sur la prolifération, l'apoptose et le cycle cellulaire dans les cellules MCF-7 (RE α +, RE β + et GPR30+) et MDA-MB-231 (RE α -, RE β + et GPR30+).

Le deuxième objectif concerne l'identification du RE impliqué dans les effets observés lors des expérimentations citées ci-dessus. Les réponses cellulaires ainsi obtenues dans les lignées cellulaires de notre étude, nous ont conduit à identifier certaines cibles de ce stéroïde. Nous avons donc réalisé des transactivations du RE α et du RE β respectivement dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Nous avons aussi évalué la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 cultivées en présence d'agonistes spécifiques du RE α et du RE β . De plus afin de rechercher une possible interaction de la 7 β -hydroxy-épiandrosterone avec le GPR30, une autre lignée cellulaire de carcinome mammaire, les cellules SKBr3 n'exprimant que le GPR30, ont aussi été testées avec la 7 β -hydroxy-épiandrosterone dans des expériences de prolifération cellulaire.

C. Résultats

La 7 β -hydroxy-épiandrosterone ne possède pas d'effet propre sur la prolifération des cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Cependant, une inhibition significative de la croissance cellulaire en présence d'E2 (10nM) et de 7 β -hydroxy-épiandrosterone (1nM, 10nM et 100nM) a été observée dans les deux lignées cellulaires après 72h de culture avec un pourcentage d'inhibition de la prolifération induite par E2 identique à celui obtenu avec 1 μ M de tamoxifène dans les cellules MCF-7 estrogéno-dépendantes.

Le traitement avec la 7 β -hydroxy-épiandrosterone ou le tamoxifène n'induit pas de mort cellulaire. L'E2, quant à lui, protège les cellules MCF-7 de l'apoptose. Quand ces cellules sont traitées avec l'E2 et la 7 β -hydroxy-épiandrosterone ou l'E2 et le tamoxifène, une diminution de la protection conférée par l'E2 a pu être montrée.

La 7 β -hydroxy-épiandrosterone comme le tamoxifène induit également un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 dans nos modèles cellulaires.

La 7 β -hydroxy-épiandrosterone exerce des effets anti-estrogéniques « tamoxifène-like » sur la prolifération, l'apoptose et le cycle cellulaire des trois lignées cellulaires. L'effet le plus net est obtenu avec les cellules MCF-7 qui expriment le RE α et le RE β ainsi que le GPR30.

De plus, les études de transactivations ont permis de montrer que la 7 β -hydroxy-épiandrosterone interagissait avec le RE β . La 7 β -hydroxy-épiandrosterone ne module pas la transactivation du RE α , seule ou en présence d'E2 contrairement au tamoxifène alors qu'elle inhibe de 25% de la transactivation du RE β induite par E2. L'utilisation d'agonistes spécifiques du RE α et du RE β en présence de la 7 β -hydroxy-épiandrosterone (1nM, 10nM et 100nM) a confirmé que l'inhibition de la prolifération observée avec l'E2 résultait d'une interaction de la 7 β -hydroxy-épiandrosterone avec le RE β dans nos modèles cellulaires.

Cette approche ne pouvait être envisagée pour le GPR30 qui est un récepteur membranaire. Cependant, nous avons mis en évidence une interaction probable de la 7 β -hydroxy-épiandrosterone avec le GPR30 par des expériences de prolifération. Dans les cellules SKBr3, le traitement avec l'agoniste spécifique du GPR30, le G-1 (200nM), augmente la prolifération cellulaire alors que l'antagoniste spécifique du GPR30, le G-15 (1 μ M), la bloque à 72h. La 7 β -hydroxy-épiandrosterone (1nM, 10nM, 100nM) ne paraît pas influencer la prolifération de ces cellules.

Néanmoins, la 7 β -hydroxy-épiandrosterone inhibe la croissance cellulaire des SKBr3 induite par le G-1, avec une efficacité similaire à celle du G-15. Des résultats similaires ont été obtenus dans la lignée de carcinome mammaire MCF-7.

Article : The DHEA metabolite 7 β -hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines. *Niro S*, Pereira E, Pélissier MA, Morfin R, Hennebert O. Steroids. 2012 Apr;77(5):542-51



The DHEA metabolite 7 β -hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines

Niro Sandra^a, Pereira Ester^a, Pélissier Marie-Agnès^a, Morfin Robert^a, Hennebert Olivier^{b,c,*}

^aLaboratoire de Biologie, EA3199, Conservatoire national des arts et métiers, 75003 Paris, France

^bDépartement CASER, Conservatoire national des arts et métiers, 75003 Paris, France

^cInserm U676, Robert Debré Hospital, 75019 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2011

Received in revised form 28 January 2012

Accepted 30 January 2012

Available online 11 February 2012

Keywords:

7 β -Hydroxy-epiandrosterone

Estrogen receptors

Breast cancer cell lines

Proliferation

Transactivation

ABSTRACT

7 β -Hydroxy-epiandrosterone (7 β -OH-EpiA), an endogenous androgenic derivative of dehydroepiandrosterone, has previously been shown to exert anti-inflammatory action *in vitro* and *in vivo* via a shift from prostaglandin E2 (PGE2) to 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 production. This modulation in prostaglandin production was obtained with low concentrations of 7 β -OH-EpiA (1–100 nM) and suggested that it might act through a specific receptor. Inflammation and prostaglandin synthesis is important in the development and survival of estrogen-dependent mammary cancers. Estrogen induced PGE2 production and cell proliferation via its binding to estrogen receptors (ERs) in these tumors. Our objective was to test the effects of 7 β -OH-EpiA on the proliferation (by counting with trypan blue exclusion), cell cycle and cell apoptosis (by flow cytometry) of breast cancer cell lines MCF-7 (ER α +, ER β +, G-protein coupled receptor 30: GPR30+) and MDA-MB-231 (ER α –, ER β +, GPR30+) and to identify a potential target of this steroid in these cell lineages (by transactivations) and in the nuclear ER-negative SKBr3 cells (GPR30+) (by proliferation assays). 7 β -OH-EpiA exerted anti-estrogenic effects in MCF-7 and MDA-MB-231 cells associated with cell proliferation inhibition and cell cycle arrest. Moreover, transactivation and proliferation with ER agonists assays indicated that 7 β -OH-EpiA interacted with ER β . Data from proliferation assays on the MCF-7, MDA-MB-231 and SKBr3 cell lines suggested that 7 β -OH-EpiA may also act through the membrane GPR30 receptor.

These results support that this androgenic steroid acts as an anti-estrogenic compound. Moreover, this is the first evidence that low doses of androgenic steroid exert antiproliferative effects in these mammary cancer cells. Further investigations are needed to improve understanding of the observed actions of endogenous 7 β -OH-EpiA.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Previous data from our laboratory focused on the effects of epiandrosterone (EpiA), a derivative of dehydroepiandrosterone (DHEA). This androgenic steroid is converted into 7 α -hydroxylated metabolite by cytochrome P450 7B1 (CYP7B1) [1]. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD1) was responsible for converting 7 α -hydroxy-EpiA (7 α -OH-EpiA) into 7 β -OH-EpiA [2,3] (Fig. 1), which is readily produced in small quantities in human tissues [4]. It has been reported that 7 β -OH-EpiA confers neuroprotective effects in two different models of brain ischemia [5] and Alzheimer's disease [6]. We have recently shown that 7 β -OH-EpiA has anti-inflammatory properties in dextran sulfate sodium-induced

colitis in rats [7]. 7 β -OH-EpiA modulated the production of prostaglandins (PGs) via conversion of arachidonic acid in PGH2 by cyclooxygenase 2 (COX-2). This steroid decreased PGE2 synthesis, responsible for pro-inflammatory effects. A concomitant increase in PGD2 production which is converted in the cytoprotective 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 (15d-PGJ2) was observed. This switch in PG production was also observed *in vitro* in a model of TNF- α -stimulated human peripheral blood monocytes with all used concentrations of 7 β -OH-EpiA (1–100 nM) [8]. These low doses suggested that 7 β -OH-EpiA might act through a specific receptor.

Previous reports in similar monocyte/macrophage models have shown that 17 β -estradiol (E2), the major estrogen, exerts anti-inflammatory effects notably via modulation of NF κ B, chemokine production [9,10] and also via a decrease of PGE2 synthesis [11]. These responses are mediated through estrogen receptors (ERs) that are expressed in monocytes [12]. E2 modulates inflammation which involves COX-2 induction and PG production via ER α and

* Corresponding author at: Inserm U676, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France. Tel.: +33 1 4003 2934; fax: +33 1 4003 1995.

E-mail addresses: olivier.hennebert@cnam.fr, olivier.hennebert@inserm.fr (H. Olivier).

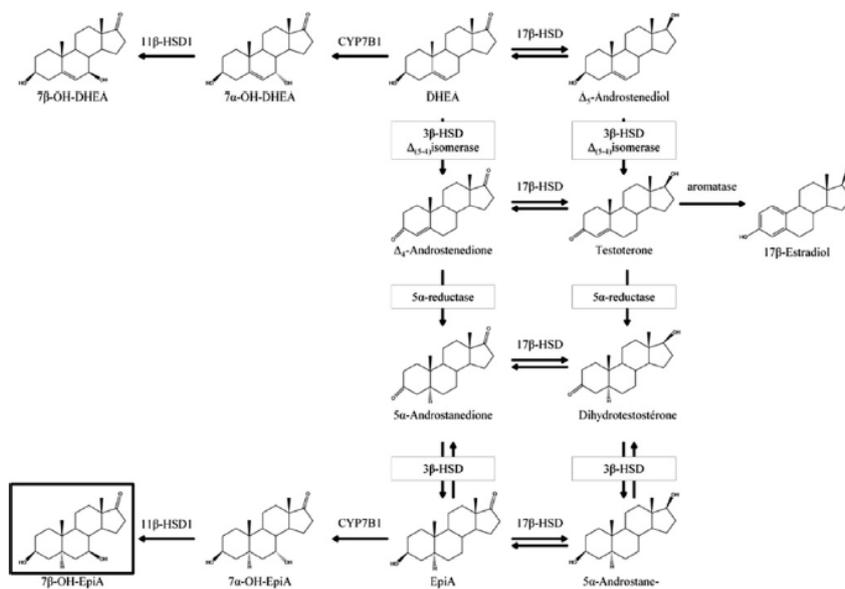


Fig. 1. Metabolism from DHEA to 7 β -OH-EpiA. 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (3 β -HSD); 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1); 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD1); cytochrome P450 7B1 (CYP7B1); dehydroepiandrosterone (DHEA); 7 β /7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone (7 β /7 α -OH-DHEA); epiandrosterone (EpiA); 7 β /7 α -hydroxy-epiandrosterone (7 β /7 α -OH-EpiA).

ER β binding [13]. In murine microglia, E2 also reduces COX-2 expression and inflammatory mediator PGE2 formation which is associated with ER β targeting [14,15]. However, in mammary carcinoma cells, E2 enhanced microsomal PGE synthase (m-PGES) gene transcription, responsible for the conversion of PGH2 to PGE2, and induced cell proliferation [16,17] through ER α binding. Furthermore, 15 d-PGJ2 inhibited ER α -positive MCF-7 cell proliferation [18] and induced apoptosis in ER β -positive breast cancer cells MDA-MB-231 [19]. It was also demonstrated that lipocalin-type PGD2 synthase (L-PGDS) gene transcription is regulated by ER β [20,21].

It has been described previously that non-estrogenic steroid exerts estrogenic effect, dependently to ERs. Notably, low doses of DHEA induce cell growth of mammary carcinoma cells [22] while pharmacological concentrations of DHEA inhibit proliferation [23]. Δ_5 - androstene-3 β , 17 β -diol (Adiol), derived from DHEA, also increases breast cancer cell proliferation at low doses [22]. These androgenic hormones display estrogenic effects *in vitro*, independently of androgen receptor. This action can be related to the binding

of these compounds to ER β [24,25]. Another ER, the membrane G-protein coupled receptor 30 (GPR30), has been shown to modulate both rapid non-genomic and genomic transcriptional events of E2 action [26]. This receptor could also be implicated in the cellular response to E2. All these data suggested that anti-inflammatory effects of 7 β -OH-EpiA could be linked to an interaction with nuclear ERs and the modulation of PG inflammatory gene transcription.

Therefore, to test this hypothesis, we evaluated the effects of different doses of 7 β -OH-EpiA on proliferation, apoptosis and cell cycle on three breast cancer cell lines with different ER expressions as models: MCF-7 (ER α +, ER β +, GPR30+), MDA-MB-231 (ER α -, ER β +, GPR30+). Quantification of m-RNAs coding for COX-2, m-PGES, L-PGDS and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) were carried out to assess whether this molecule potentially modulates inflammatory gene transcription in these models. Transactivation experiments for classical ERs and proliferation assays on GPR30-positive SKBR3 cells were also performed to investigate the potential 7 β -OH-EpiA interaction with nuclear and membrane ERs.

Table 1

Oligonucleotide primer sequences for real time PCR.

Gene	5'-3' Primer sequence	Amplicon (pb)	Ref.
GAPDH	f: TGCACCACCAAC TGC TTAGC r: GGCATGGACTGTGGTCATGAG	87	[28] Gene ID: 2597 / NM 002046.3 ^a
COX-2	f: GCTCAACATGATGTTGCATTC r: GCTGGCCCTCGCTTATGA	79	[8] Gene ID: 5743 / NM 000963.2 ^a
PPAR- γ	f: AAGTCAATGCACTGGAATTAGATGA r: TGTAGCAGGTGTCTTGAATGTCTTC	128	[8] Gene ID: 5468 /NM 138711.3, NM 015869.4, NM 138712.3, NM 005037.5 ^a
LPGDS	f: AGAAGAAGGCGGCGTGT r: TCAGGTTGAGGCCACCATC	69	[8] Gene ID: 5730 / NM 000954.5 ^a
m-PGES	f: GAAGAAGCCCTTGCACAC r: GGAAGACCAGGAAGTGACATC	200	[8] Gene ID: 9536 / NM 004878.4 ^a

f: forward primer; r: reverse primer / ^aGenbank accession number.

2. Material and methods

2.1. Steroids and reagents

7 β -OH-EpiA was synthesized in our laboratory as previously described [27]. Culture medium components and antibiotics were purchased from Eurobio (Courtabeuf, France). 17 β -estradiol (E2) and tamoxifen (TAM) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Specific GPR30 agonist G-1 and antagonist G-15, the specific ER α agonist 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT) and the specific ER β agonist 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (Diarylpropionitrile DPN) were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). MCF-7, MDA-MB-231 and SKBr3 cells were a gift from Saint-Louis hospital (Paris, France).

2.2. Cell culture

MCF-7, MDA-MB-231 and SKBr3, human breast carcinoma cell lines, were maintained in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS), 100 UI/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine. For experiments, cells were grown in phenol red-free RPMI 1640 supplemented with 10% FCS treated with dextran charcoal-coated (DCC-FCS). For transactivation assays, cells were grown with 5% DCC-FCS. All cells were incubated at 37 °C, in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

2.3. Cell proliferation

Cells were seeded at a concentration of 1×10^5 cells/well in a 24-well plate. Then, after 24 h, MCF-7 and MDA-MB-231 adherent cells were incubated in 1 mL of growth medium supplemented with vehicle (1% ethanol) alone for control or E2 (10 nM) or TAM (1 μ M) or with different concentrations of 7 β -OH-EpiA (1, 10 and 100 nM). Cells were also incubated with E2 (10 nM), either in the presence of TAM (1 μ M) or with different concentrations of 7 β -OH-EpiA (1, 10 and 100 nM). Cells were trypsinized and counted at different times after treatments (0, 9, 24, 48 and 72 h) with trypan blue exclusion.

SKBr3 and MCF-7 adherent cells were incubated in 1 mL of growth medium supplemented with either G-1 (200 nM) or G-15 (1 μ M) or with different concentrations of 7 β -OH-EpiA (1, 10 and 100 nM) or with vehicle alone for control. Cells were also incubated with G-1 (200 nM), either in the presence of G-15 (1 μ M) or with different concentrations of 7 β -OH-EpiA (1, 10 and 100 nM). As described above, cells were counted 72 h after treatments.

MCF-7 and MDA-MB-231 adherent cells were incubated in 1 mL of growth medium supplemented with E2 (10 nM) or PPT (10 nM) or DPN (10 nM) or 7 β -OH-EpiA for control. Cells were also incubated with 7 β -OH-EpiA in the presence of E2 (10 nM) or PPT (10 nM) or DPN (10 nM). As described above, cells were counted 72 h after treatments.

2.4. Real-time reverse transcriptase PCR

MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were seeded at a concentration of 5×10^5 /well in a 6-well plate. After 24 h, cells were incubated as described above for 24 h. Cells were harvested for total RNA isolation using Trizol reagent (Invitrogen, Fisher Bioblock, France). cDNA was synthesized using the superscript first strand synthesis system kit (Invitrogen). Real time PCR amplification mixtures (25 μ L) contained $2.5 \times$ RealMaster Mix/20 \times SYBR solution (11.25 μ L) (Eppendorf, Le Pecq, France) and 200 nM forward and reverse primers except PPAR- γ primers at 300 nM [8]. Reactions

were run on a RealPlex ep gradient S mastercycler (Eppendorf). The cycling conditions were 10 min at 95 °C and 45 cycles at 95 °C, 55 °C and 68 °C for 15, 30 and 45 s respectively. GAPDH housekeeping gene was used for quantification [28]. All oligonucleotide primers (Table 1) were synthesized by Genecust/Distribio (Belgium). The specificity of the amplified product was monitored by examining the melting curve of the product and confirmed by analysis on agarose gel electrophoresis.

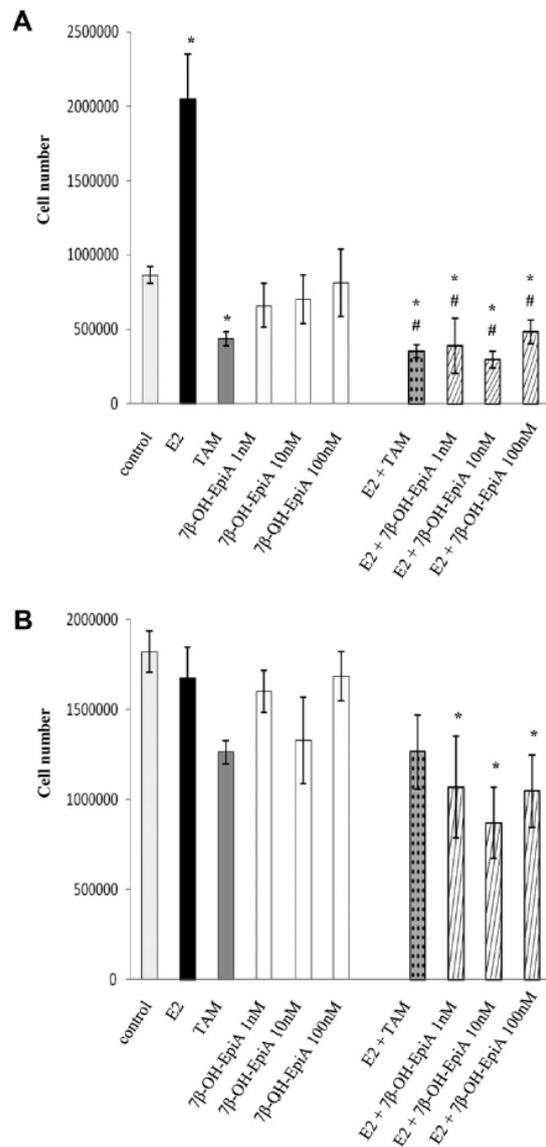


Fig. 2. 7 β -OH-EpiA inhibited MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) proliferation in the presence of E2 at 72 h. Cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to 17 β estradiol (E2; 10 nM) or to Tamoxifen (TAM; 1 μ M) or to three different concentrations of 7 β -hydroxy-epiandrosterone (7 β -OH-EpiA; 1, 10, 100 nM) only or in presence of E2 (10 nM). Cells were counted with trypan blue exclusion after 72 h of treatment. The data are representative of at least three independent experiments (*, # $p < 0.05$ vs. control and vs. E2 respectively).

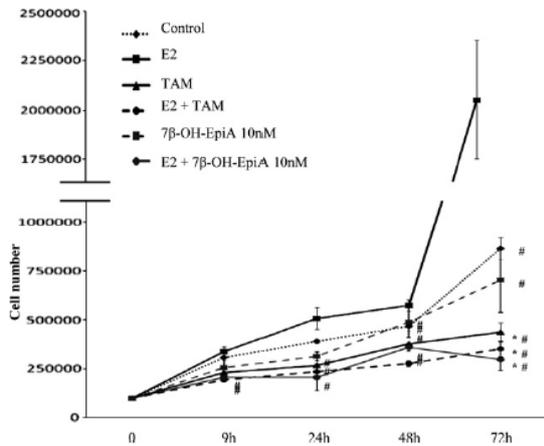


Fig. 3. Course (from 0 to 72 h) of MCF-7 proliferation: effect of 7β-OH-EpiA in the presence of E2. Cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to 17βestradiol (E2; 10 nM) or to Tamoxifen (TAM; 1 μM) or to three different concentrations of 7β-hydroxy-epiandrosterone (7β-OH-EpiA; 1, 10, 100 nM) only or in presence of E2 (10nM). Cells were counted with trypan blue exclusion after 0, 9 h, 24 h, 48 h and 72 h of treatment. Only the dose of 7β-OH-EpiA 10 nM was represented. The data are representative of at least three independent experiments (*, # *p* < 0.05 vs. control and vs. E2 respectively).

2.5. Cytometry assays

All acquisitions were realized on LSRII cytometer (Becton Dickinson) using Cell quest Pro software (Becton Dickinson).

2.5.1. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was carried out on non-fixed cells. Cells were cultured in T25 flasks at an initial concentration of 1 × 10⁶ cells/

flask for MCF-7 and 6 × 10⁵ cells/flask for MDA-MB-231 and treated as previously described for 48 h. Adherent cells were trypsinized and washed with RPMI + 10% DCC-FCS. Pellets were washed twice with cold 0.1 M phosphate buffered saline (Sigma–Aldrich). Cells were resuspended in 450 μL of hypotonic buffer (sodium citrate 0.1 mg/mL, triton ×–100 0.03%, 2 μg/mL RNase A in H₂O) and stained with 50 μL of propidium iodide 500 μg/mL (Sigma Aldrich) and kept on ice in the dark. 5 × 10⁴ events were acquired in a maximum of 60 min. Each sample was analyzed for cell cycle with Modfit LT software (Verity Software House).

2.5.2. Cell death analysis

Cells were plated at 3 × 10⁵ cells/well in a 6 well-plate and incubated as previously described for 48 h. An apoptotic cell death control was induced with 60 μM hydrogen peroxide (Sigma–Aldrich) for 16 h. Cells were then stained with propidium iodide and Annexin-V according to “Apoptosis Annexin-V kit I” (Becton Dickinson) protocol. 1 × 10⁴ Events were analyzed. In the end, apoptotic cells were determined as positive cells for Annexin.

2.6. Transactivation assays

Cells were cultured in RPMI 1640 without phenol red and supplemented with 5% DCC-FCS, 100 UI/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin and 2nM L-glutamine 4 days before the experiment. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated in a 24-well plate in 500 μL of growth medium at a density of 1 × 10⁵ and 1.5 × 10⁵ cells per well respectively. Transfections were performed with Fugene HD (Promega). MCF-7 cells were transfected with pSG5-ERE-TK-LUC plasmid, pCDNA3-β-galactosidase plasmid and empty pCDNA3 plasmid. MDA-MB-231 cells were transfected with pSG5-ERE-TK-LUC plasmid, pCDNA3-β-galactosidase plasmid and pSG5-ERβ plasmid for a higher expression of ERβ. After transfection, cells were incubated for 24 h with different treatments: 0.1% ethanol (control), E2 (1 nM), TAM (1 μM), three doses of 7β-OH-EpiA (10 nM,

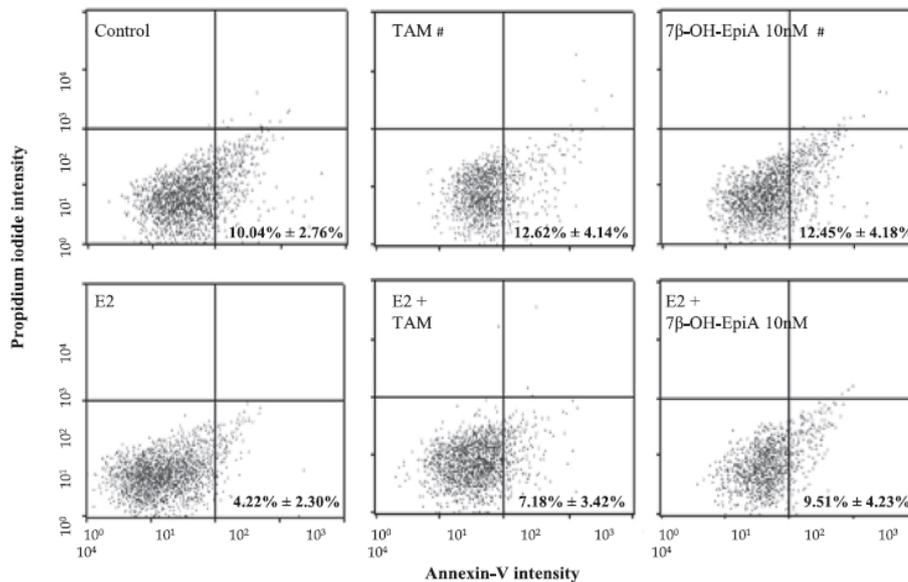


Fig. 4. Effect of 7β-OH-EpiA on MCF-7 breast carcinoma cell apoptosis. Cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to 17βestradiol (E2; 10 nM) or to Tamoxifen (TAM; 1 μM) or to three different concentrations of 7β-hydroxy-epiandrosterone (7β-OH-EpiA; 1, 10, 100 nM) only or in presence of E2 (10 nM). After 48 h of treatment, cells were stained with Annexin V and iodide propidium according to “Apoptotic Annexin-V kit” protocol. Acquisition of apoptotic cells were shown only for 10 nM 7β-OH-EpiA in this figure. The data are representative of at least three independent experiments (* *p* < 0.05 vs. E2).

100 nM, 1 μM), E2 (1 nM) + TAM (1 μM), or E2 (1 nM) + three doses of 7β-OH-EpiA (10 nM, 100 nM, 1 μM). Bioluminescence and transfection efficiency were measured with the Fluostar Optima (BMG Labtech, France).

2.7. Statistical analysis

All assays were carried out in three independent trials and results were plotted as mean ± S.E.M. All experiments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's

multiple range tests. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of 7β-OH-EpiA on MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation

MCF-7 and MDA-MB-231 were cultured with E2 (10nM), TAM (1 μM) or three doses of 7β-OH-EpiA (1, 10 and 100 nM). Cells were

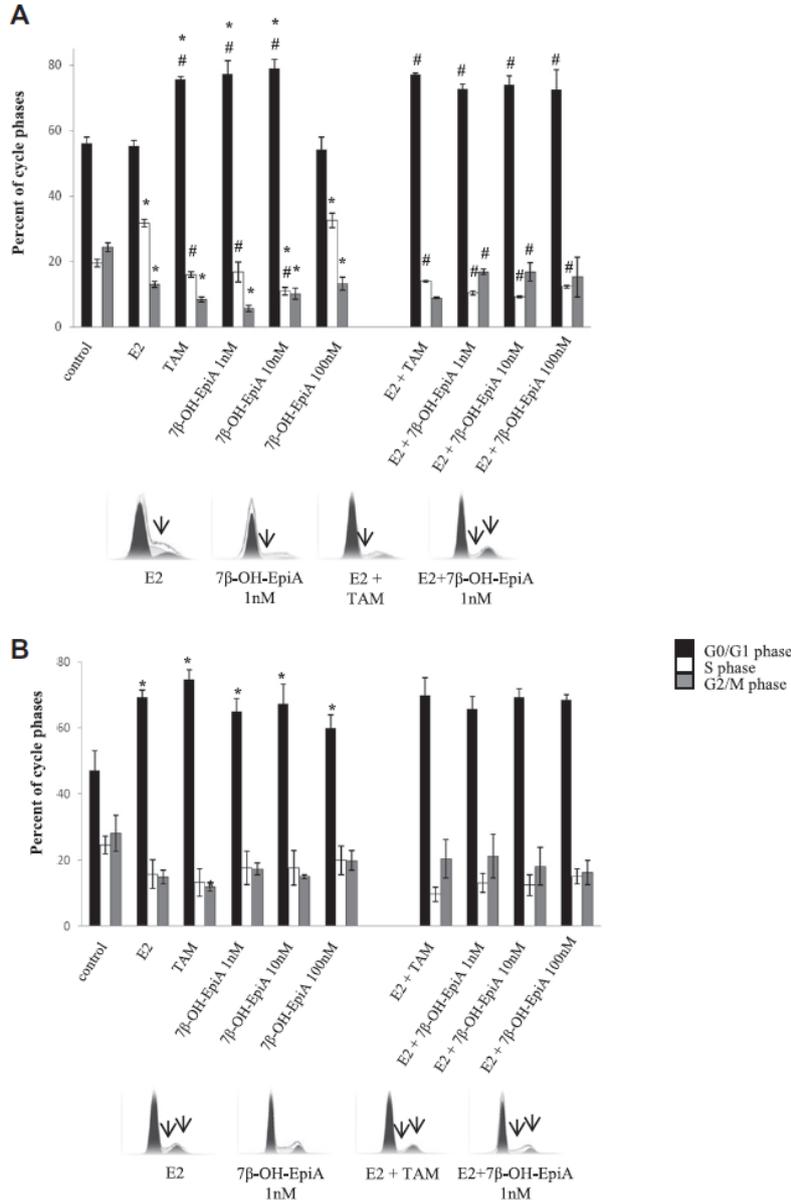


Fig. 5. 7β-OH-EpiA treatment led to a G0/G1 cell cycle arrest in human MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) breast carcinoma cells. Cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to 17βestradiol (E2; 10 nM) or to Tamoxifen (TAM; 1 μM) or to three different concentrations of 7β-hydroxy-epiandrosterone (7β-OH-EpiA; 1, 10, 100 nM) only or in presence of E2 (10 nM). After 48 h of treatment, cells were stained with propidium and the percent of cells in the G0/G1, G2/M and S phases were determined (*, #, ≠ $p < 0.05$ vs. control, vs. E2 and vs. E2 + TAM respectively). FACS profiles illustrate the effects of treatments on each cell cycle phase. Arrows indicate profile differences.

also incubated with E2 either in the presence of TAM or 7 β -OH-EpiA and proliferation was evaluated at 72 h.

E2 (10 nM) caused the expected increase of MCF-7 cell proliferation (+138%) compared to control ($p < 0.05$) while TAM (1 μ M) significantly decreased cell proliferation (–50%). Supplementation with three different concentrations of 7 β -OH-EpiA did not induce proliferation at 72 h (Fig. 2A).

In the presence of E2, TAM and 7 β -OH-EpiA significantly blocked the E2-induced cell proliferation at 72 h (–80%) when compared to E2 ($p < 0.05$) (Fig. 2A).

In MDA-MB-231 cells, E2 and the three doses of 7 β -OH-EpiA exerted no effect on cell proliferation whereas TAM alone (–31%) or in the presence of E2 (–25%) lowered proliferation at 72 h (Fig. 2B). In the presence of E2, all doses of 7 β -OH-EpiA significantly decreased cell growth at 72 h (–40% average) ($p < 0.05$) (Fig. 2B).

A time course study was performed at different times (9, 24, 48 and 72 h) to determine if the effects of 7 β -OH-EpiA (1 to 100 nM) could be induced at shorter times (Fig. 3). In MCF-7 cells, weak inhibition of cell proliferation was observed from 9 h to 48 h for all doses of the steroid when compared to control (only 10 nM dose was plotted in Fig. 3). The inhibition of cell E2-induced proliferation by TAM and 7 β -OH-EpiA started at 9 h and was maintained until 72 h (Fig. 3).

In MDA-MB-231 cells, all treatments inhibited E2-cell-induced proliferation from 48 h to 72 h (data not shown).

3.2. Effect of 7 β -OH-EpiA on cell death

Cells were treated as described above for 48 h, and a cytometric analysis study was carried out according to the Becton Dickinson apoptosis cell detection kit using propidium iodide and Annexin V-FITC antibody. 10^4 events were acquired and cells were apoptotic when positively marked by Annexin V.

7 β -OH-EpiA and TAM did not induce MCF-7 cell apoptosis while E2 (10 nM) protected them from cell death compared to control ($p < 0.05$). TAM or 7 β -OH-EpiA in presence of E2 increased cell apoptosis compared to E2 (Fig. 4). In contrast to MCF-7, in MDA-MB-231 cells, all treatments induced apoptosis compared to control (data not shown).

3.3. Effects of 7 β -OH-EpiA on the cell cycle phases

To determine if the antiproliferative effect of 7 β -OH-EpiA on proliferation was associated with an alteration of cell cycle, cells were treated as described above for 48 h and stained with propidium iodide. Cytometric analysis was carried out with acquisition of 5×10^4 events and analysis of DNA content for determination of cell cycle phases.

In MCF-7 cells, E2 (10 nM) increased by 15% the proportion of cells in the S phase compared to control ($p < 0.05$). No change in the G0/G1 phase was seen whereas a significant decrease of cells in the G2/M phase was observed (Fig. 5A). TAM (1 μ M), 7 β -OH-EpiA (1 nM and 10nM) significantly augmented the proportion of cells in the G0/G1 phase and significantly lowered it in the S and G2/M phases compared to control and E2 (Fig. 5A). Nevertheless, the highest dose of 7 β -OH-EpiA (100 nM) exerted the same effects as E2 on the cell cycle (Fig. 5A).

In the presence of E2, TAM and the three concentrations of 7 β -OH-EpiA (1, 10, 100 nM) induced an increase in cells in the G0/G1 phase and a diminution of cells in the S and G2/M phases (Fig. 5A).

In MDA-MB-231 cells, all treatments led to an increase in cells in the G0/G1 phase with a concomitant decrease in cells in the S and G2/M phases (Fig. 5B).

Table 2

L-PGDS, m-PGES and PPAR γ genes transcription in MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells.

	L-PGDS	m-PGES	PPAR γ
MCF-7			
Control	1	1	1
E2	0.63 \pm 0.08	6.02 \pm 3.03	1.26 \pm 0.51
TAM	0.91 \pm 0.11	2.63 \pm 0.94	3.28 \pm 0.49
7 β -OH-EpiA 10 nM	1.39 \pm 0.29	4.57 \pm 2.3	1.58 \pm 0.63
E2 + TAM	0.63 \pm 0.28	5.53 \pm 0.92	2.25 \pm 0.87
E2 + 7 β -OH-EpiA 10 nM	2.55 \pm 0.73	4.61 \pm 1.70	2.00 \pm 0.50
MDA-MB-231			
Control	1	1	1
E2	0.68 \pm 0.13	0.83 \pm 0.16	1.07 \pm 0.14
TAM	0.94 \pm 0.08	1.07 \pm 0.13	1.42 \pm 0.13
7 β -OH-EpiA 10 nM	0.74 \pm 0.40	0.37 \pm 0.19	0.54 \pm 0.23
E2 + TAM	1.12 \pm 0.53	1.18 \pm 0.01	1.28 \pm 0.27
E2 + 7 β -OH-EpiA 10 nM	0.53 \pm 0.09	0.71 \pm 0.54	0.60 \pm 0.19

The relative m-RNA expression was normalized with control expression for treatment with E2, TAM and 7 β -OH-EpiA only and with E2 expression for co-treatments.

3.4. Effects of 7 β -OH-EpiA on transcription of four inflammatory genes

Cells were treated as described above for proliferation assays for 24 h. Total RNA was extracted using Trizol reagent. qPCR was then performed with cDNAs. The expression of four inflammatory genes was studied: COX2, responsible for arachidonic acid transformation to PGH2; L-PGDS and m-PGES, converting PGH2 to PGD2 and PGE2 respectively; PPAR γ , the receptor of the cytoprotective 15d-PGJ2. The results were presented in Table 2.

In MCF-7 and MDA-MB-231 cells, no modulation of COX-2 gene transcription was observed (data not shown). In MCF-7 cells, a single treatment with E2 only lowered L-PGDS m-RNA level whereas 10 nM 7 β -OH-EpiA in the presence of E2 increased L-PGDS m-RNA level when compared to the E2 level. An increase of m-PGES m-RNA was observed after treatment with E2, TAM and 10nM 7 β -OH-EpiA compared to control. Co-treatment with 7 β -OH-EpiA and E2 did not alter m-PGES transcription compared to E2 alone. In the end, TAM only increased PPAR γ transcription. In the MDA-MB-231 cell line, no treatment altered the transcription of these inflammatory genes.

3.5. Effects of 7 β -OH-EpiA on ER α and ER β transactivation

In order to evaluate if 7 β -OH-EpiA interacts with one of the two ERs, MCF-7 cells were transfected with pSG5-ERE-TK-LUC for ER α assays and MDA-MB-231 with pSG5-ERE-TK-LUC and pSG5-ER β for ER β studies.

Preliminary assays were performed to determine the minimum concentration of E2 for a maximal induction of ER transactivation in the two cell lineages. Three doses of E2 were tested (0.1, 1 and 10 nM). The 1nM E2 dose was used for co-treatment in transactivation assays. To validate each experiment, cells were always treated with the 3 concentrations of E2 (data not shown). Bioluminescence was normalized with transfection efficiency and expressed as percent of E2 (1 nM).

In MCF-7 cells, E2 (1 nM) induced a strong and significant increase of ER α transactivation ($\times 26$ versus control, $p < 0.05$) whereas TAM and 7 β -OH-EpiA (10, 100 and 1 μ M) had no effect on ER α transactivation (Fig. 6A). When cells were treated with E2 and TAM, the E2-induced transactivation was reduced by 48%. During concomitant treatment with E2 and 7 β -OH-EpiA, no difference in transactivation was observed compared to E2 alone. Therefore, 7 β -OH-EpiA did not bind to ER α (Fig. 6A).

In MDA-MB-231 cells, the induction level of transactivation of ER β by 1 nM E2 was less than that observed for ER α in MCF-7 cells

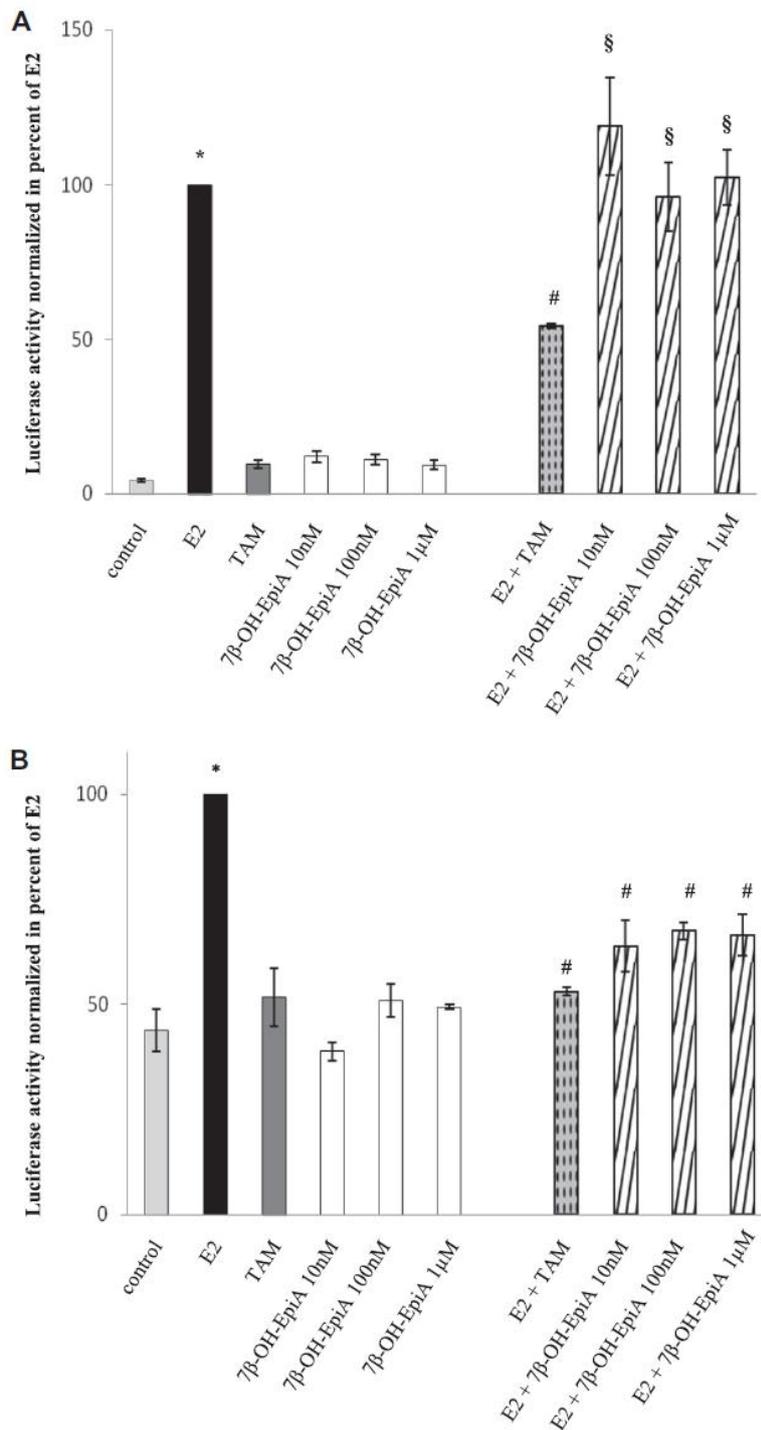


Fig. 6. 7β-OH-EpiA interaction with ERβ. (A) MCF-7 cells were transfected pSG5-ERE-TK-LUC, empty pCDNA3 and pCDNA3-β-galactosidase. (B) MDA-MB-231 were transfected with pSG5-ERE-TK-LUC, empty pCDNA3 and pCDNA3-β-galactosidase. Cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to 17β-estradiol (E2; 10 nM) or to Tamoxifen (TAM; 1 μM) or to three different concentrations of 7β-hydroxy-epiandrosterone (7β-OH-EpiA; 1, 10, 100 nM) only or in presence of E2 (10 nM) for 24 h. The results were normalized with transfection efficiency and represented as percent of E2. The data are representative of at least three independent experiments. (*, #, \$ $p < 0.05$ vs. control, E2 and vs. E2 + TAM respectively).

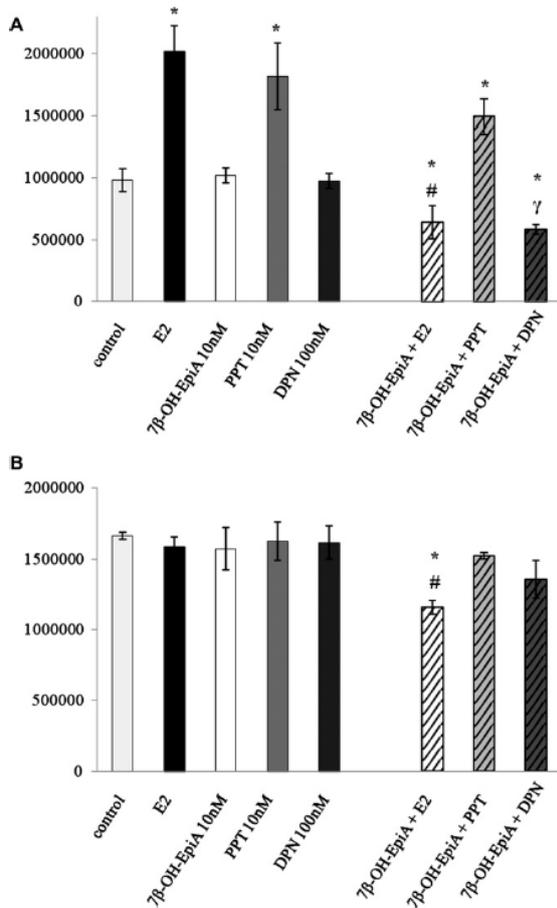


Fig. 7. 7β-OH-EpiA could interact with the ERβ. (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to E2 (10 nM) or to specific ERα agonist PPT (10 nM) or to specific ERβ agonist DPN (10 nM) or to 7β-hydroxy-epiandrosterone (7β-OH-EpiA; 10 nM). Cells were also treated with 7β-OH-EpiA in the presence of E2 (10 nM) or PPT (10 nM) or DPN (10 nM). Cells were counted with trypan blue exclusion after 72 h of treatment. The data are representative of at least three independent experiments (*, #, γ *p* < 0.05 differences vs. control, E2 and DPN respectively).

(×2.3 versus control) (Fig. 6B). Like for ERα, TAM and 7β-OH-EpiA alone (10, 100 and 1 μM) did not induce ERβ transactivation. In the presence of E2, TAM inhibited the transactivation induced by E2 (−47%, *p* < 0.05). When cells were treated with E2 and 7β-OH-EpiA (10, 100 or 1 μM), a significant decrease in transactivation was also observed (−26%, −22.5% and −23.5% respectively) (Fig. 6B). This result suggested that 7β-OH-EpiA could bind to ERβ.

3.6. Effects of 7β-OH-EpiA and specific agonists of ERα and ERβ on MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation

Proliferation assays were performed with specific agonists of ERα or ERβ at 72 h.

E2 (10 nM) and the specific ERα agonist PPT caused the expected increase of MCF-7 cell proliferation (+106% and +85% respectively, *p* < 0.05). Supplementation with specific ERβ agonist (10 nM) or 7β-OH-EpiA (10 nM) did not influence proliferation at 72 h (Fig. 7A).

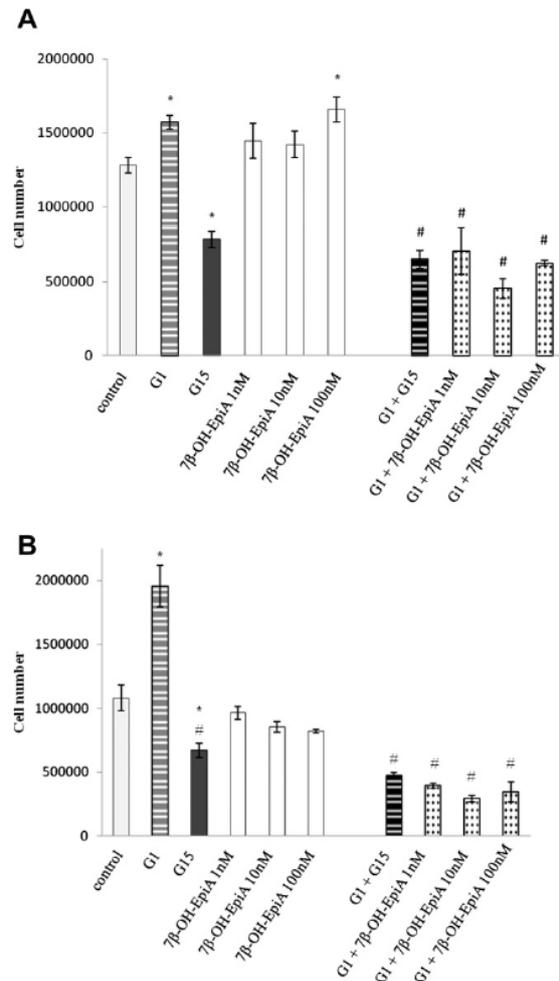


Fig. 8. 7β-OH-EpiA could also interact with the membrane estrogen receptor, the GPR30. (A) SKBR3 and (B) MCF-7 cells were treated with 1% ethanol for control or exposed to G-1 (200 nM) or to G-15 (1 μM) or to three different concentrations of 7β-hydroxy-epiandrosterone (7β-OH-EpiA; 1, 10, 100 nM) only or in presence of G-1 (200 nM). Cells were counted with trypan blue exclusion after 72 h of treatment. The data are representative of at least three independent experiments (*, # *p* < 0.05 differences vs. control and G-1 respectively).

In the presence of E2, 7β-OH-EpiA significantly blocked the E2-induced cell proliferation at 72 h (−70%) when compared to E2 (*p* < 0.05) (Fig. 7A). In the presence of DPN, 7β-OH-EpiA also significantly decreased cell growth (40.5%) compared to DPN (*p* < 0.05). Co-treatment with 7β-OH-EpiA and PPT did not decrease cell proliferation compared to PPT (*p* < 0.05).

In MDA-MB-231 cells, E2 (10 nM), 7β-OH-EpiA (10 nM), PPT (10 nM) and DPN (10 nM) exerted no effect on cell proliferation. In the presence of E2, 7β-OH-EpiA significantly lowered cell growth at 72 h (*p* < 0.05) (Fig. 7B). No decrease of cell proliferation was observed with PPT in the presence of 7β-OH-EpiA whereas DPN in the presence of 7β-OH-EpiA weakly reduced cell growth.

3.7. Effects of 7β-OH-EpiA on GPR30

Proliferation assays were realized on GPR30-positive and nuclear ERs-negative SKBr3, and MCF-7 (ERα+, ERβ+, GPR30+) mammary

carcinoma cell lines. Cells were cultured with G-1 (10 nM), G-15 (1 μ M) or three doses of 7 β -OH-EpiA (1, 10 and 100 nM) for 72 h. Cells were also incubated with G-1 in the presence of G-15 or the three doses of 7 β -OH-EpiA.

As shown in Fig. 8A and B, G-1 increased SKBr3 (22%) and MCF-7 (80%) cell growth and G-15 blocked it at 72 h (40% and 41% respectively) compared to control ($p < 0.05$). 100 nM 7 β -OH-EpiA only induced a significant proliferation of SKBr3 cells (+30%, $p < 0.05$). However, a significant inhibition of G-1-induced cell proliferation by 7 β -OH-EpiA was observed in these two cell lineages (–60% and –80% respectively, $p < 0.05$). The same effect was obtained in the presence of G-15.

These results raised the possibility that 7 β -OH-EpiA interacts with GPR30 and thus suppresses G-1 agonist activity.

4. Discussion

In this study, we demonstrated that the three doses of 7 β -OH-EpiA, a DHEA metabolite, had no effect *per se* on MCF-7 (ER α +, ER β +, GPR30+) and MDA-MB-231 (ER α –, ER β +, GPR30+) cell proliferation. Some studies have shown that 500 nM DHEA and 2 nM of Adiol promote breast cancer cell growth [22]. The ketone and hydroxyl groups and the isomerization on these androgenic steroids could play an important role in estrogenic and anti-estrogenic proliferative effects. For the first time, we observed that 7 β -OH-EpiA (1, 10 and 100 nM) decreased the E2-induced proliferation of both cell lines, involving far lower concentrations than TAM (1 μ M), the main drug used in breast cancer treatment in women. The percent of growth inhibition produced by TAM was consistent with previous results [29].

7 β -OH-EpiA also exhibited TAM-like effects on cell apoptosis and cell cycle. First, in this work, neither 7 β -OH-EpiA nor TAM induced cell death in MCF-7 cells whereas E2 protected these cells from apoptosis. However, 7 β -OH-EpiA and TAM reduced the protection exerted by E2. Some studies reported an induction of apoptosis by 1 μ M TAM in the MCF-7 cells after 48 h [30] while others did not detect cell death [31]. In ER α -negative MDA-MB-231 cells, all treatments induced apoptosis and no protection of E2 was observed. Recently, an apoptotic ER-independent mechanism in MDA-MB-231 cells via oxidative stress induction and glutathione (major water soluble antioxidant) synthesis inhibition [32] was reported. Second, 1 and 10 nM 7 β -OH-EpiA and 1 μ M TAM alone also induced a G0/G1 cell cycle arrest. In the presence of E2, this cell cycle inhibition was observed for all doses of 7 β -OH-EpiA and TAM. This G0/G1 cell cycle arrest was found for TAM in other studies [29,33] when no decrease in G2/M phase was observed in cell cultures in the presence of E2 alone [33].

All the effects observed with 7 β -OH-EpiA were similar to those produced by TAM in the presence of E2. The efficiency of the concentrations used (1–100 nM) suggests that 7 β -OH-EpiA binds to some specific receptor(s). Docking modeling suggested that 7 β -OH-EpiA could bind to ERs. This steroid could enter the ligand pocket and interact with amino acids of the pocket with incomplete replacement of helix 12 (data not shown). Transactivation assays confirmed that 7 β -OH-EpiA interacts with ER β . 7 β -OH-EpiA inhibited ER β E2-induced transactivation from 25% to 37% at 10 nM and 100 nM respectively. ER β antagonist activity was previously reported for other compounds that inhibited transactivation induced by E2 at 25–30% inhibition without effect *per se* on transactivation of either ER [34–36], which is consistent with our results. The reduced E2-mediated transactivation of ER β compared to that of ER α is due to the lack of AF-1 capacity to interact with SRC-1 co-activator, which prevents hinge-mediated synergy between AF-1 and AF-2 [37]. However, 7 β -OH-EpiA action on ER β transcription cannot explain its action on cell proliferation and cell

cycle arrest. Indeed, ER β has been shown to exhibit a beneficial effect against breast cancer through its re-expression and over-expression in MCF-7 and other mammary carcinoma cell lines by inducing a decrease in cell proliferation [38,39].

In this study, 7 β -OH-EpiA did not reduce the pro-inflammatory effect induced by E2 in breast cancer cell lines. The decrease in PGE2 synthesis or m-PGES expression previously shown in TNF α -stimulated monocytes [40,8] was not observed in MCF-7 and MDA-MB-231. It has been suggested that, in the same breast cancer cells, pro-inflammatory cytokines (TNF α) and E2 response could have individual and/or independent effects [17]. Taken together the effects of 7 β -OH-EpiA could not be related to the nuclear ERs signaling pathway. Another receptor could potentially be implicated in this action.

In MCF-7 and MDA-MB-231 cells, similar but lower cell proliferation decrease was observed with 7 β -OH-EpiA in the presence of specific ER β agonist than in the presence of E2 whereas 7 β -OH-EpiA in the presence of ER α agonist did not reduce cell growth. These results suggest that the action of 7 β -OH-EpiA is related in part to an interaction with the ER β . In SKBr3 GPR30-positive and nuclear ERs-negative mammary carcinoma cell line, 7 β -OH-EpiA inhibited GPR30 agonist G-1-induced cell proliferation. The similar effect was observed in MCF-7 cell line. GPR30, the membrane ER, modulates both rapid non-genomic and genomic transcriptional events of estrogen and promoted the progress of estrogen-related tumors [26,41]. GPR30 could also be a potential target of 7 β -OH-EpiA and explain in part its action on cell proliferation inhibition.

In conclusion, the androgen-derived 7 β -OH-EpiA exerted anti-estrogenic effects on mammary carcinoma cells in the presence of ER agonist through G0/G1 cell cycle arrest which are similar to those produced by TAM. In addition, transactivation, ER-proliferation and GPR30-proliferation assays suggest that an interaction with ER β and/or GPR30 could be involved in these steroid effects. These data demonstrated estrogenic effect of this androgenic steroid. Other androgens exert a similar effect. Moreover, it is the first evidence that low doses of androgen-derived steroid exert antiproliferative effects in these mammary cancer cells. Further investigations are needed to improve understanding of the observed actions of endogenous 7 β -OH-EpiA.

Acknowledgments

We are grateful to Cecile Chopin for providing human cancer cell lines (Saint-Louis hospital) and technical support. We thank Dr Marie-Edith Oblin-Rafestin and Michel Fay for the gift of plasmids and their assistance (Bichat hospital). This work was supported by a French Research ministry grant to SN.

References

- [1] Kim SB, Chalbot S, Pompon D, Jo DH, Morfin R. The human cytochrome P4507B1: catalytic activity studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:383–9.
- [2] Chalbot S, Morfin R. Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug Metab Dispos* 2005;33:563–9.
- [3] Hennebert O, Pernelle C, Ferroud C, Morfin R. 7 α - and 7 β -hydroxyepiandrosterone as substrates and inhibitors for the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007.
- [4] Jacolot F, Berthou F, Dreano Y, Bercovici JP, Floch HH. In vivo metabolism of 14C-labelled 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol. *J Steroid Biochem* 1981;14:663–9.
- [5] Pringle AK, Schmidt W, Deans JK, Wulfert E, Reymann KG, Sundstrom LE. 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci* 2003;18:117–24.
- [6] Dudas B, Hanin I, Rose M, Wulfert E. Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7 β -hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid. *Neurobiol Dis* 2004;15:262–8.
- [7] Hennebert O, Pelissier MA, Le Mee S, Wulfert E, Morfin R. Anti-inflammatory effects and changes in prostaglandin patterns induced by 7 β -hydroxyepiandrosterone in rats with colitis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;110:255–62.

- [8] Le Mee S, Hennebert O, Ferrec C, Wulfert E, Morfin R. 7beta-Hydroxy-epiandrosterone-mediated regulation of the prostaglandin synthesis pathway in human peripheral blood monocytes. *Steroids* 2008;73:1148–59.
- [9] Harkonen PL, Vaananen HK. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:218–27.
- [10] Janis K, Hoeltke J, Nazareth M, Fanti P, Poppenberg K, Aronica SM. Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:22–31.
- [11] Miyagi M, Morishita M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 1993;64:1075–8.
- [12] Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 2005;97:107–13.
- [13] Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87:905–31.
- [14] Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 2004;145:5021–32.
- [15] Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 2001;21:1809–18.
- [16] Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 2003;144:4562–74.
- [17] Frasor J, Weaver AE, Pradhan M, Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008;149:6272–9.
- [18] Diers AR, Dranka BP, Ricart KC, Oh JY, Johnson MS, Zhou F, Pallero MA, Bodenstine TM, Murphy-Ullrich JE, Welch DR, Landar A. Modulation of mammary cancer cell migration by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2): implications for anti-metastatic therapy. *Biochem J* 2010;430:69–78.
- [19] Gucci A, Gianferretti P, Piva R, Guyot T, Snape TJ, Roberts SM, Santoro MG. Induction of apoptosis in estrogen receptor-negative breast cancer cells by natural and synthetic cyclopentenones: role of the I-kappaB kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Mol Pharmacol* 2006;70:1812–21.
- [20] Devidze N, Fujimori K, Urade Y, Pfaff DW, Mong JA. Estradiol regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase promoter activity: evidence for direct and indirect mechanisms. *Neurosci Lett* 2010;474:17–21.
- [21] Otsuki M, Gao H, Dahlman-Wright K, Ohlsson C, Eguchi N, Urade Y, Gustafsson JA. Specific regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart by estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 2003;17:1844–55.
- [22] Bocuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, Forte C, Leonardi L, Pizzini A. Influence of dehydroepiandrosterone and 5-en-androstene-3beta, 17beta-diol on the growth of MCF-7 human breast cancer cells induced by 17beta-estradiol. *Anticancer Res* 1992;12:799–803.
- [23] Lopez-Marure R, Contreras PG, Dillon JS. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2011;660:268–74.
- [24] Chen F, Knecht K, Birzin E, Fisher J, Wilkinson H, Mojena M, Moreno CT, Schmidt A, Harada S, Freedman LP, Reszka AA. Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* 2005;146:4568–76.
- [25] Martin C, Ross M, Chapman KE, Andrew R, Bollina P, Seckl JR, Habib FK. CYP7B generates a selective estrogen receptor beta agonist in human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2928–35.
- [26] Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol* 2009;308:32–8.
- [27] Ricco C, Revial G, Ferroud C, Hennebert O, Morfin R. Synthesis of 7beta-hydroxy-epiandrosterone. *Steroids* 2011;76:28–30.
- [28] Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, Yang X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol* 2011;13:310–6.
- [29] Cover CM, Hsieh SJ, Cram EJ, Hong C, Riby JE, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1244–51.
- [30] de Medina P, Silvente-Poirot S, Poirot M. Tamoxifen and AEBIS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation. *Autophagy* 2009;5:1066–7.
- [31] Nigam M, Ranjan V, Srivastava S, Sharma R, Balapure AK. Centchroman induces G0/G1 arrest and caspase-dependent apoptosis involving mitochondrial membrane depolarization in MCF-7 and MDA MB-231 human breast cancer cells. *Life Sci* 2008;82:577–90.
- [32] Todorova VK, Kaufmann Y, Luo S, Klimberg VS. Tamoxifen and raloxifene suppress the proliferation of estrogen receptor-negative cells through inhibition of glutamine uptake. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67:285–91.
- [33] Salazar MD, Ratnam M, Patki M, Kisovic I, Trumbly R, Iman M, Ratnam M. During hormone depletion or tamoxifen treatment of breast cancer cells the estrogen receptor apoprotein supports cell cycling through the retinoic acid receptor alpha 1 apoprotein. *Breast Cancer Res* 2011;13:R18.
- [34] Compton DR, Sheng S, Carlson KE, Reback NA, Lee IY, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Pyrazolo [1,5-a] pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *J Med Chem* 2004;47:5872–93.
- [35] Jeanes HL, Tabor C, Black D, Ederveen A, Gray GA. Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ERbeta antagonist. *J Endocrinol* 2008;197:493–501.
- [36] Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Meyer R, Vetter H, Grohe C. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett* 2001;502:103–8.
- [37] Zwart W, de Leeuw R, Rondaji M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci* 2010;123:1253–61.
- [38] Behrens D, Gill JH, Fichtner I. Loss of tumorigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2007;274:19–29.
- [39] Panuthiyil S, Pamar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64:423–8.
- [40] Davidon J, Wulfert E, Rotondo D. 7beta-hydroxy-epiandrosterone modulation of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2, prostaglandin D2 and prostaglandin E2 production from human mononuclear cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;112:220–7.
- [41] Wang D, Hu L, Zhang G, Zhang L, Chen C. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine* 2010;38:29–37.

III. DISCUSSION / PERSPECTIVES

La 7 β -hydroxy-épiandrostérone exerce des effets inhibiteurs sur la prolifération des lignées de carcinomes mammaires estrogéno-dépendantes et –indépendantes en présence d'E2. La DHEA dont dérive la 7 β -hydroxy-épiandrostérone a déjà été décrite comme agent anti-prolifératif dans les mêmes lignées que celles de notre étude (*Lopez-Marure et al, 2011*) et dans des lignées de cancer de l'intestin (*Yoshida et al, 2006*). La 7 α -hydroxy-DHEA (*Yoshida et al, 2006*), l'épiandrostérone (*Yoshida et al, 2006*) et le Δ 5-Androstène-3 β ,17 β -diol (*Adams et al, 1981 ; Boccuzzi et al, 1992 ; Boccuzzi et al, 1994 ; Guerini et al, 2005*), trois autres dérivés de la DHEA, présentent des capacités similaires d'inhibition de la prolifération de cellules tumorales *in vitro*. Les groupements hydroxyles et cétones en C3, C7 et C17 de ces stéroïdes androgènes pourraient être responsables de cette action. Notre étude a également montré que la 7 β -hydroxy-épiandrostérone diminuait la protection conférée par l'E2 dans les cellules MCF-7 estrogéno-sensibles et un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Ce stéroïde présenterait donc des propriétés intéressantes dans le cancer du sein *in vitro*.

Les effets anti-estrogéniques observés aux doses étudiées (1nM, 10nM, 100nM) suggéraient une possible liaison à un ou plusieurs récepteurs aux estrogènes. Les expériences de transactivation et de prolifération avec les agonistes spécifiques des REs ont permis d'observer une interaction avec le RE β . La 7 β -hydroxy-épiandrostérone inhibe d'environ 25% la transactivation du RE β induite par l'E2, résultat cohérent avec une fonction antagoniste sur ce récepteur (*Compton et al, 2004 ; Nuedling et al, 2001 ; Jeanes et al, 2008*). Au cours d'expériences menées *in vitro*, la DHEA, la 7 α -hydroxy-DHEA et le 5 α -Androstène-3 β ,17 β -diol lieraient également le RE β (*Chen et al, 2005; Martin et al, 2004 ; Guerini V, 2005*) confirmant l'importance des positions des fonctions hydroxyles et cétones des stéroïdes.

Notre étude a permis de mettre en évidence une nouvelle interaction d'un dérivé de la DHEA avec un RE. Cette double compétence des androgènes déjà montrée reste toutefois peu explorée. La 7 β -hydroxy-épiandrostérone pourrait se lier au RE β et empêcher le repliement correct de l'hélice 12 bloquant ainsi son activité transcriptionnelle. Cependant, cette liaison ne peut expliquer l'action anti-proliférative de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone puisque le RE β régule négativement l'activité du RE α et que sa surexpression ou sa réexpression inhiberait la croissance cellulaire (*Paruthiyild et al, 2004; Behrens et al, 2007*).

Des expériences de prolifération avec l'antagoniste et l'agoniste spécifique du GPR30 ont montré que la 7 β -hydroxy-épiandrostérone pourrait également interagir avec le GPR30. Cette

interaction avec le GPR30 impliqué dans la croissance cellulaire de ces lignées pourrait expliquer l'inhibition de la prolifération cellulaire observée. En effet, l'implication du GPR30 dans la croissance cellulaire et l'antagonisme de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone sur le RE β allant à l'encontre des effets observés dans les cellules MCF-7 suggèrent un rôle prépondérant du GPR30 dans l'action de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone.

Par ailleurs, dans les cellules MCF-7, une augmentation de la transcription du gène de la L-PGDS lors du traitement avec la 7 β -hydroxy-épiandrostérone et l'E2 pourrait expliquer en partie son effet sur la prolifération. Cependant, le gène de la L-PGDS est régulé par le RE β (Otsuki *et al*, 2003 ; Devidze *et al*, 2010) allant à l'encontre de nos résultats. L'action de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone sur le GPR30 pourrait expliquer cette régulation de l'expression du gène de la L-PGDS. En effet, l'activation du GPR30 régule la transcription de plusieurs gènes dont ceux impliqués dans la croissance cellulaire ou la migration. Cependant, aucune régulation du gène de la L-PGDS par le GPR30 n'est connue à ce jour. Des recherches complémentaires concernant le mode d'action de ce récepteur sur la modulation de la transcription des gènes de l'inflammation demeurent nécessaires.

La 7 β -hydroxy-épiandrostérone exerce des effets antiprolifératifs et anti-estrogéniques sur les modèles de cellules cancéreuses. Les effets précédemment observés sur la production des PGs ont été évalués après induction d'une inflammation *in vivo* (DSS) comme *in vitro* (TNF α) et n'ont pas été retrouvés dans nos modèles. Cela peut s'expliquer en partie par le fait que nos modèles cellulaires ne sont pas des cellules inflammatoires. Les kits RIA ne nous ont pas permis de doser la PGE2.

De plus, la 7 α -hydroxylation apparaît ou augmente lors de l'inflammation (Dulos *et al* 2005) ou de contacts cellulaires accrus (Akwa *et al* 1993). L'expression du CYP7B1 responsable de la 7 α -hydroxylation dans les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SKBr3 n'a pas été étudiée. Cependant, lors d'incubation des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 avec de la DHEA radiomarquée, aucune production de dérivés 7-hydroxylés n'a été mise en évidence dans nos conditions expérimentales. La capacité de ces cellules à produire des dérivés 7-hydroxylés reste à explorer.

La 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone exerce des effets anti-inflammatoires *in vivo* et *in vitro* (Hennebert et al, 2008 ; Le Mée et al, 2008 ; Davidson et al, 2008) et anti-estrogéniques dans des lignées cancéreuses mammaires.

En premier lieu, il serait nécessaire de confirmer la liaison de la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone au RE β et au GPR30. Des colonnes greffées avec la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone sont en cours d'élaboration au sein du laboratoire. Couplées à un séquençage protéique, ces expérimentations permettraient de définir définitivement la(es) cible(s) de ce stéroïde. De même, des études de liaison et de compétition avec de l'E2 radiomarqué et de la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone froide confirmeraient ou non sa liaison au RE α et au RE β .

Par la suite, un approfondissement de l'étude des voies génomiques et non génomiques modulées par la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone au moyen d'analyses de biologie moléculaire reste indispensable. Pour cela, l'exploration des voies de signalisation activées par le GPR30 ainsi que la réalisation de puces à ADN semble la meilleure approche pour mieux comprendre l'action de ce stéroïde. Cette étude devra être réalisée dans des contextes physiologiques et inflammatoires. De même, une exploration devra être conduite dans différents types cellulaires en prenant en compte le niveau d'expression protéique et le rôle différents des REs dans les divers tissus.

En parallèle, la mise au point de la production d'anticorps dirigés contre la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone et la création de tests de détection sensibles et rapides de type ELISA reste essentielle, le dosage de ce stéroïde n'étant pas réalisable à ce jour. J'ai déjà effectué au sein du laboratoire un couplage de la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone à des protéines d'ovalbumine en vue d'une immunisation chez le lapin pour la production d'anticorps polyclonaux. Ces anticorps permettraient le dosage de la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone chez l'homme. Des études sur sa production en fonction du sexe et de l'âge ainsi que sa disponibilité dans les différents organes pourront être menées. Son dosage dans les différents tissus humains permettrait de mieux comprendre son rôle biologique dans un contexte physiologique et pathologique.

Enfin, à plus long terme, son action anti-proliférative sur le cancer du sein devrait être confirmée *in vivo* dans des modèles de tumeurs implantées telles les souris KO pour les récepteurs nucléaires classiques et membranaire aux estrogènes permettant ainsi de confirmer l'importance de l'interaction de la 7 β -hydroxy- ϵ piandrostérone avec les différents REs décrite dans mes travaux et de mieux en étudier son impact. Des co-traitements mettant en jeu la 7 β -

hydroxy-épiandrostérone et des agents chimiothérapeutiques pourront également être envisagés. Si ce stéroïde s'avère efficace dans ces modèles animaux, une étude chez des patientes atteintes de cancers du sein à un stade avancé exprimant le GPR30 pourra être menée. En effet, cette molécule pourrait présenter un avantage par rapport au tamoxifène dans des tumeurs exprimant le RE α et le GPR30 puisque le tamoxifène est un agoniste du GPR30 et que son activation serait impliquée dans les phénomènes de résistance au tamoxifène (Maggiolini et al, 2004 ; Thomas et al, 2005 ; Pandey et al, 2009).

De même, l'action de ce dérivé 7-hydroxylé dans de nombreuses pathologies inflammatoires pourra être explorée. En effet, la 7 β -hydroxy-épiandrostérone augmente la production de 15d-PGJ2 cytoprotectrice et diminue de manière concomitante la production de PGE2 pro-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* dans des modèles inflammatoires (Hennebert et al, 2008 ; Le Mée et al, 2008 ; Davidson et al, 2008). Notamment, ce stéroïde présente une action protectrice dans un modèle de colite induite chez le rat (Hennebert et al, 2008) en modulant la synthèse des PGs. Sur ces bases, l'action de la 7 β -hydroxy-épiandrostérone pourra être étudiée dans les maladies inflammatoires affectant l'intestin (colite) et les articulations (arthrite rhumatoïde).

Enfin, au vu de ses effets anti-prolifératifs dans les lignées de carcinome mammaire et des récepteurs avec lesquels ce stéroïde interagit, il serait également intéressant de tester son action dans d'autres types de cancers hormonaux-dépendants. Notamment, une action pourra être recherchée dans le cancer de la prostate où l'activation du RE β jouerait un rôle important dans la carcinogénèse (Gallo et al, 2012) et où l'activité 7 α -hydroxylase a été montrée, permettant la métabolisation de la DHEA en 7 α -hydroxy-DHEA par le CYP7B1 et l'activation du RE β (Martin et al, 2004).

En conclusion, la 7 β -hydroxy-épiandrostérone présente des propriétés neuroprotectrices (*in vivo* et *in vitro*) (Dudas et al, 2004 ; Pringle et al, 2003) et anti-inflammatoires (*in vivo* et *in vitro*) (Hennebert et al, 2008 ; Le Mée et al, 2008 ; Davidson et al, 2008). D'ores et déjà, la 7 β -hydroxy-épiandrostérone a été inclus dans un programme d'essai clinique de phase II chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et son utilisation dans les maladies inflammatoires de l'intestin a été brevetée. Mon travail a montré des effets anti-estrogéniques et anti-prolifératifs dans des modèles *in vitro* de cancer du sein (*in vitro*) (Niro et al, 2012). Cependant, des études *in vivo* complémentaires restent encore à réaliser. Ces recherches

pourraient aboutir à développer une nouvelle application clinique pour ce stéroïde en cancérologie. De plus, ce stéroïde dérivant de la testostérone interagissant avec les REs permettrait également de mieux comprendre la double compétence des androgènes.

IV. BIBLIOGRAPHIE

A

Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 2005;16:231-37.

Adams J, Garcia M, Rochefort H. Estrogenic effects of physiological concentrations of 5-androstene-3 beta, 17 beta-diol and its metabolism in MCF7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1981;41:4720-26.

Akwa Y, Sananes N, Gouezou M, Robel P, Baulieu EE, Le Goascogne C. Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *J Cell Biol* 1993;121:135-43.

Al Saleh S, Sharaf LH, Luqmani YA. Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). *Int J Oncol* 2011;38:1197-217.

Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S, Maggiolini M. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1859-66.

Ali FY, Davidson SJ, Moraes LA, Traves SL, Paul-Clark M, Bishop-Bailey D, Warner TD, Mitchell JA. Role of nuclear receptor signaling in platelets: antithrombotic effects of PPARbeta. *FASEB J* 2006;20:326-28.

Anolik JH, Klinge CM, Bambara RA, Hilf R. Differential impact of flanking sequences on estradiol- vs 4-hydroxytamoxifen-liganded estrogen receptor binding to estrogen responsive element DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:713-30.

Anolik JH, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. *Biochemistry* 1995;34:2511-20.

Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2433-38.

Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277:965-68.

Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001;81:1269-304.

Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 2006;27:299-402.

Augereau P, Miralles F, Cavailles V, Gaudelet C, Parker M, Rochefort H. Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Mol Endocrinol* 1994;8:693-703.

B

Baker AE, Brautigam VM, Watters JJ. Estrogen modulates microglial inflammatory mediator production via interactions with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 2004;145:5021-32.

Ball LJ, Levy N, Zhao X, Griffin C, Tagliaferri M, Cohen I, Ricke WA, Speed TP, Firestone GL, Leitman DC. Cell type- and estrogen receptor-subtype specific regulation of selective estrogen receptor modulator regulatory elements. *Mol Cell Endocrinol* 2009;299:204-11.

Baniahmad A. Nuclear hormone receptor co-repressors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:89-97.

Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:537-51.

Barisik NO, Keser SH, Gul AE, Sensu S, Kandemir NO, Kucuk HF, Gumus M, Karadayi N. The value of COX-2 expression in the prognostic parameters of invasive ductal carcinoma of the breast
2. *Med Oncol* 2010;

Beato M, Candau R, Chavez S, Mows C, Truss M. Interaction of steroid hormone receptors with transcription factors involves chromatin remodelling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;56:47-59.

Behrens D, Gill JH, Fichtner I. Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2007;274:19-29.

Berry M, Nunez AM, Chambon P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:1218-22.

Bhatnagar AS. The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast Cancer Res Treat* 2007;105 Suppl 1:7-17.

Blasko E, Haskell CA, Leung S, Gualtieri G, Halks-Miller M, Mahmoudi M, Dennis MK, Prossnitz ER, Karpus WJ, Horuk R. Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;214:67-77.

Boccuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, Forte C, Leonardi L, Pizzini A. Influence of dehydroepiandrosterone and 5-en-androstene-3 beta, 17 beta-diol on the growth of MCF-7 human breast cancer cells induced by 17 beta-estradiol. *Anticancer Res* 1992;12:799-803.

Boccuzzi G, Brignardello E, Di Monaco M, Gatto V, Leonardi L, Pizzini A, Gallo M. 5-En-androstene-3 beta,17 beta-diol inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells when oestrogen receptors are blocked by oestradiol. *Br J Cancer* 1994;70:1035-39.

Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2006;2:207-12.

Boron WF, Boulpaep EL. *Medical Physiology : A Cellular and Molecular Approach*. 1st edition ed. Philadelphia, PA : WB Saunders, 2003.

Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids* 2007;72:381-405.

Brodie AM, Santen RJ. Aromatase in breast cancer and the role of aminoglutethimide and other aromatase inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1986;5:361-96.

Brodie AM, Wing LY, Goss P, Dowsett M, Coombes RC. Aromatase inhibitors and the treatment of breast cancer. *J Steroid Biochem* 1986;24:91-97.

Brothers SP, Janovick JA, Conn PM. Unexpected effects of epitope and chimeric tags on gonadotropin-releasing hormone receptors: implications for understanding the molecular etiology of hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:6107-12.

Brueggemeier RW, Richards JA, Joomprabutra S, Bhat AS, Whetstone JL. Molecular pharmacology of aromatase and its regulation by endogenous and exogenous agents. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;79:75-84.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997;389:753-58.

Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996;15:2174-83.

Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Applanat M. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res* 2002;62:4977-84.

Buzdar AU. Fulvestrant: a new type of estrogen receptor antagonist for the treatment of advanced breast cancer. *Drugs Today (Barc)* 2004;40:751-64.

C

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 1997;45:607-17.

Carroll JC, Pike CJ. Selective estrogen receptor modulators differentially regulate Alzheimer-like changes in female 3xTg-AD mice. *Endocrinology* 2008;149:2607-11.

- Carswell HV, Macrae IM, Gallagher L, Harrop E, Horsburgh KJ. Neuroprotection by a selective estrogen receptor beta agonist in a mouse model of global ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H1501-H1504.
- Castet A, Boulahtouf A, Versini G, Bonnet S, Augereau P, Vignon F, Khochbin S, Jalaguier S, Cavailles V. Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1957-66.
- Chalbot S, Morfin R. Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug Metab Dispos* 2005;33:563-69.
- Chalbot S, Morfin R. Dehydroepiandrosterone metabolites and their interactions in humans. *Drug Metabol Drug Interact* 2006;22:1-23.
- Chambers VE, Denny WA, Evans JM, Jones ER, Kasal A, Meakins GD, Pragnell J. Microbiological hydroxylation of steroids. 8. The pattern of monohydroxylation of diketones and keto-alcohols derived from 5 alpha-androstane with cultures of the fungus, *Rhizopus nigricans*. *J Chem Soc Perkin 1* 1973;14:1500-11.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990;265:20686-91.
- Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sorlie T, Dai H, He YD, van't Veer LJ, Bartelink H, van de RM, Brown PO, van de Vijver MJ. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3738-43.
- Chang SH, Ai Y, Breyer RM, Lane TF, Hla T. The prostaglandin E2 receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia. *Cancer Res* 2005;65:4496-99.
- Chen F, Knecht K, Birzin E, Fisher J, Wilkinson H, Mojena M, Moreno CT, Schmidt A, Harada S, Freedman LP, Reszka AA. Direct agonist/antagonist functions of dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* 2005;146:4568-76.
- Cheng SB, Quinn JA, Graeber CT, Filardo EJ. Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway. *J Biol Chem* 2011;286:22441-55.
- Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* 2000;39:11609-20.
- Cheskis BJ, Karathanasis S, Lyttle CR. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J Biol Chem* 1997;272:11384-91.
- Cheung E, Schwabish MA, Kraus WL. Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors alpha and beta. *EMBO J* 2003;22:600-11.
- Chizzolini C, Brembilla NC. Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunol Cell Biol* 2009;87:510-11.

Chooniedass-Kothari S, Vincett D, Yan Y, Cooper C, Hamedani MK, Myal Y, Leygue E. The protein encoded by the functional steroid receptor RNA activator is a new modulator of ER alpha transcriptional activity. *FEBS Lett* 2010;584:1174-80.

Compton DR, Sheng S, Carlson KE, Rebacz NA, Lee IY, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *J Med Chem* 2004;47:5872-93.

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 1997;272:19858-62.

Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69:165-75.

Croxtall JD, McKeage K. Fulvestrant: a review of its use in the management of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women. *Drugs* 2011;71:363-80.

Cvoro A, Tatomer D, Tee MK, Zogovic T, Harris HA, Leitman DC. Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes. *J Immunol* 2008;180:630-36.

D

Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 1992;11:1025-33.

Davidson J, Wulfert E, Rotondo D. 7beta-hydroxy-epiandrosterone modulation of 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, prostaglandin D2 and prostaglandin E2 production from human mononuclear cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;112:220-27.

Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 1984;2:335-57.

Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem* 2000;275:35848-56.

Delbeck M, Golz S, Vonk R, Janssen W, Hucho T, Isensee J, Schafer S, Otto C. Impaired left-ventricular cardiac function in male GPR30-deficient mice. *Mol Med Report* 2011;4:37-40.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* 2009;5:421-27.

Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol* 2010;24:1703-14.

Devidze N, Fujimori K, Urade Y, Pfaff DW, Mong JA. Estradiol regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase promoter activity: evidence for direct and indirect mechanisms 3. *Neurosci Lett* 2010;474:17-21.

Diers AR, Dranka BP, Ricart KC, Oh JY, Johnson MS, Zhou F, Pallero MA, Bodenshteyn TM, Murphy-Ullrich JE, Welch DR, Landar A. Modulation of mammary cancer cell migration by 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2): implications for anti-metastatic therapy. *Biochem J* 2010;430:69-78.

Ding XF, Anderson CM, Ma H, Hong H, Uht RM, Kushner PJ, Stallcup MR. Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol Endocrinol* 1998;12:302-13.

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* 1998;273:29321-30.

Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1253-58.

Dudas B, Hanin I, Rose M, Wulfert E. Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7beta-hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid. *Neurobiol Dis* 2004;15:262-68.

Dulos J, van der Vleuten MA, Kavelaars A, Heijnen CJ, Boots AM. CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines. *Arthritis Rheum* 2005;52:770-78.

Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 2000;127:4277-91.

E

Edwards DP. The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000;5:307-24.

Ellis MJ, Tao Y, Luo J, A'Hern R, Evans DB, Bhatnagar AS, Chaudri Ross HA, von Kameke A, Miller WR, Smith I, Eiermann W, Dowsett M. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1380-88.

Elloso MM, Phiel K, Henderson RA, Harris HA, Adelman SJ. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis using estrogen receptor-selective ligands. *J Endocrinol* 2005;185:243-52.

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258-65.

Evans TR, di Salle E, Ornati G, Lassus M, Benedetti MS, Pianezzola E, Coombes RC. Phase I and endocrine study of exemestane (FCE 24304), a new aromatase inhibitor, in postmenopausal women. *Cancer Res* 1992;52:5933-39.

F

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;231:651-54.

Filardo E, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 2007;148:3236-45.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. 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;14:1649-60.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16:70-84.

Forster C, Kietz S, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA. Characterization of the ERbeta/- mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14234-39.

Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids* 2008;73:1039-51.

Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 2003;144:4562-74.

Frasor J, Weaver AE, Pradhan M, Mehta K. Synergistic up-regulation of prostaglandin E synthase expression in breast cancer cells by 17beta-estradiol and proinflammatory cytokines. *Endocrinology* 2008;149:6272-79.

Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:904-10.

G

Gallo D, De S, I, Prisco MG, Scambia G, Ferrandina G. Estrogen Receptor Beta in Cancer: an Attractive Target for Therapy. *Curr Pharm Des* 2012.

Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev* 2010;62:155-98.

Giudici D, Ornati G, Briatico G, Buzzetti F, Lombardi P, di Salle E. 6-Methylenandrosta-1,4-diene-3,17-dione (FCE 24304): a new irreversible aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem* 1988;30:391-94.

Gonzalez L, Zambrano A, Lazaro-Trueba I, Lopez E, Gonzalez JJ, Martin-Perez J, Aranda A. Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28:1298-308.

Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM. Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:71-81.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986;231:1150-54.

Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* 1991;25:89-123.

Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 1995;2:1173-308.

Guerini V, Sau D, Scaccianoce E, Rusmini P, Ciana P, Maggi A, Martini PG, Katzenellenbogen BS, Martini L, Motta M, Poletti A. The androgen derivative 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype. *Cancer Res* 2005;65:5445-53.

H

Haas E, Bhattacharya I, Brailoiu E, Damjanovic M, Brailoiu GC, Gao X, Mueller-Guerre L, Marjon NA, Gut A, Minotti R, Meyer MR, Amann K, Ammann E, Perez-Dominguez A, Genoni M, Clegg DJ, Dun NJ, Resta TC, Prossnitz ER, Barton M. Regulatory role of G protein-coupled estrogen receptor for vascular function and obesity. *Circ Res* 2009;104:288-91.

Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 1994;264:1455-58.

Hall T. Treatment of metastatic breast cancer with aminoglutethimide. Barlow J, Griffiths C, Saba Z, editors. *Clinical Research* 17, 402. 1969.

Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;140:5566-78.

HAMPL R, Lapcik O, Hill M, Klak J, Kasal A, Novacek A, Sterzl I, Sterzl J, Starka L. 7-Hydroxydehydroepiandrosterone--a natural antiglyucocorticoid and a candidate for steroid replacement therapy? *Physiol Res* 2000;49 Suppl 1:S107-S112.

- Harkonen PL, Vaananen HK. Monocyte-macrophage system as a target for estrogen and selective estrogen receptor modulators. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1089:218-27.
- Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, Kasaian M, Keith JC, Jr. Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G118-G125.
- Harris HA, Albert LM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, Kharode YP, Marzolf J, Komm BS, Winneker RC, Frail DE, Henderson RA, Zhu Y, Keith JC, Jr. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 2003;144:4241-49.
- Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004;103:147-66.
- Haworth O, Buckley CD. Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20647-48.
- Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Muller G, Hillisch A, Walter A, Kraetzschmar J, Fritzscheier KH. Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5129-34.
- Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson JA, Haldosen LA. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 2005;24:6605-16.
- Henic E, Noskova V, Hoyer-Hansen G, Hansson S, Casslen B. Estradiol attenuates EGF-induced rapid uPAR mobilization and cell migration via the G-protein-coupled receptor 30 in ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19:214-22.
- Hennebert O, Pernelle C, Ferroud C, Morfin R. 7alpha- and 7beta-hydroxy-epiandrosterone as substrates and inhibitors for the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;105:159-65.
- Hennebert O, Pelissier MA, Le Mee S, Wulfert E, Morfin R. Anti-inflammatory effects and changes in prostaglandin patterns induced by 7beta-hydroxy-epiandrosterone in rats with colitis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;110:255-62.
- Henttu PM, Kalkhoven E, Parker MG. AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 1997;17:1832-39.
- Hill M, Havlikova H, Vrbikova J, Kancheva R, Kancheva L, Pouzar V et al. The identification and simultaneous quantification of 7-hydroxylated metabolites of pregnenolone, dehydroepiandrosterone, 3beta,17beta-androstenediol, and testosterone in human serum using gas chromatography-mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 96(2):187-200.

Hiroi H, Inoue S, Watanabe T, Goto W, Orimo A, Momoeda M, Tsutsumi O, Taketani Y, Muramatsu M. Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *J Mol Endocrinol* 1999;22:37-44.

Hodgin JB, Maeda N. Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis. *Endocrinology* 2002;143:4495-501.

Hong H, Darimont BD, Ma H, Yang L, Yamamoto KR, Stallcup MR. An additional region of coactivator GRIP1 required for interaction with the hormone-binding domains of a subset of nuclear receptors. *J Biol Chem* 1999;274:3496-502.

Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L. Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* 1996;10:1167-77.

Hu GX, Lian QQ, Chen BB, Prasad PV, Kumar N, Zheng ZQ, Ge RS. 7alpha-hydroxytestosterone affects 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 17 direction in rat Leydig cells. *Endocrinology* 2010;151:748-54.

Hughes SW, Burley DM. Aminoglutethimide: a "side-effect" turned to therapeutic advantage. *Postgrad Med J* 1970;46:409-16.

I

Ignatov A, Ignatov T, Weissenborn C, Eggemann H, Bischoff J, Semczuk A, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:457-66.

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 MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology* 2009;150:1722-30.

J

Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 1997;11:693-705.

Jacolot F, Berthou F, Dreano Y, Bercovici JP, Floch HH. In vivo metabolism of 14C-labelled 5 alpha-androstane-3 beta, 17 beta-diol. *J Steroid Biochem* 1981;14:663-69.

Janis K, Hoeltke J, Nazareth M, Fanti P, Poppenberg K, Aronica SM. Estrogen decreases expression of chemokine receptors, and suppresses chemokine bioactivity in murine monocytes. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:22-31.

Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000;156:29-35.

Jeanes HL, Tabor C, Black D, Ederveen A, Gray GA. Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER)alpha agonist and unaffected by an ER beta antagonist. *J Endocrinol* 2008;197:493-501.

Jellinck PH, Croft G, McEwen BS, Gottfried-Blackmore A, Jones G, Byford V, Bulloch K. Metabolism of dehydroepiandrosterone by rodent brain cell lines: relationship between 7-hydroxylation and aromatization. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;93:81-86.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-86.

Johnson JL, Toft DO. A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J Biol Chem* 1994;269:24989-93.

K

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392-401.

Kanda N, Watanabe S. 17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Invest Dermatol* 2003;121:771-80.

Kanda N, Watanabe S. 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol* 2003;121:1500-09.

Karmakar S, Foster EA, Blackmore JK, Smith CL. Distinctive functions of p160 steroid receptor coactivators in proliferation of an estrogen-independent, tamoxifen-resistant breast cancer cell line. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:113-27.

Karuppu D, Kalus A, Simpson ER, Clyne C. Aromatase and prostaglandin inter-relationships in breast adipose tissue: significance for breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat* 2002;76:103-09.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270:1491-94.

Ketchart W, Ogba N, Kresak A, Albert JM, Pink JJ, Montano MM. HEXIM1 is a critical determinant of the response to tamoxifen. *Oncogene* 2011;30:3563-69.

Khosla S. Estrogen and bone: insights from estrogen-resistant, aromatase-deficient, and normal men. *Bone* 2008;43:414-17.

Kim SB, Chalbot S, Pompon D, Jo DH, Morfin R. The human cytochrome P4507B1: catalytic activity studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:383-89.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986;46:1053-61.

- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000;65:227-51.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5925-30.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.
- Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, Tall GG, Shaul PW. Direct Interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 2007;21:1370-80.
- Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J* 1986;5:2231-36.
- Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988;55:145-56.
- Kuntz MA, Shapiro DJ. Dimerizing the estrogen receptor DNA binding domain enhances binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* 1997;272:27949-56.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1093-101.
- Kurose K, Isozaki E, Tohkin M, Fukuhara M. Cloning and expression analysis of a new member of the cytochrome P450, CYP2A15 from the Chinese hamster, encoding testosterone 7alpha-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 1999;371:270-76.
- Kvingedal AM, Smeland EB. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS Lett* 1997;407:59-62.

L

- Labrie F. Drug insight: breast cancer prevention and tissue-targeted hormone replacement therapy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3:584-93.
- Langer G, Bader B, Meoli L, Isensee J, Delbeck M, Noppinger PR, Otto C. A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research
1. *Steroids* 2010;75:603-10.
- Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 1999;97:17-27.
- Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M. Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2010;320:162-70.

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2920-25.

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 2001;142:4120-30.

Le Mee S, Hennebert O, Ferrec C, Wulfert E, Morfin R. 7beta-Hydroxy-epiandrosterone-mediated regulation of the prostaglandin synthesis pathway in human peripheral blood monocytes. *Steroids* 2008;73:100:1148-59.

Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008;31:212-21.

Levin ER. Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:R1425-R1430.

Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998;58:3197-201.

Lin BC, Suzawa M, Blind RD, Tobias SC, Bulun SE, Scanlan TS, Ingraham HA. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation. *Cancer Res* 2009;69:5415-23.

Lindahl B, Andolf E, Ingvar C, Ranstam J, Willen R. Adjuvant tamoxifen in breast cancer patients affects the endometrium by time, an effect remaining years after end of treatment and results in an increased frequency of endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28:1259-62.

Lindsey SH, Cohen JA, Brosnihan KB, Gallagher PE, Chappell MC. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Endocrinology* 2009;150:3753-58.

Liu HB, Loo KK, Palaszynski K, Ashouri J, Lubahn DB, Voskuhl RR. Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *J Immunol* 2003;171:6936-40.

Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, McCarson KE, Berman NE. Role of the oestrogen receptors GPR30 and ERalpha in peripheral sensitization: relevance to trigeminal pain disorders in women. *Cephalalgia* 2009;29:729-41.

Lopez-Marure R, Contreras PG, Dillon JS. Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation, migration, and death of breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2011;660:268-74.

M

Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2006;66:2923-27.

Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2008;22:2116-27.

Madeo A, Maggiolini M. Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2010;70:6036-46.

Maffei L, Murata Y, Rochira V, Tubert G, Aranda C, Vazquez M, Clyne CD, Davis S, Simpson ER, Carani C. Dysmetabolic syndrome in a man with a novel mutation of the aromatase gene: effects of testosterone, alendronate, and estradiol treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:61-70.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:27008-16.

Maggiolini M, Picard D. The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol* 2010;204:105-14.

Mak P, Leung YK, Tang WY, Harwood C, Ho SM. Apigenin suppresses cancer cell growth through ERbeta. *Neoplasia* 2006;8:896-904.

Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2:3-24.

Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:601-29.

Marik R, Allu M, Anchoori R, Stearns V, Umbricht CB, Khan S. Potent genistein derivatives as inhibitors of estrogen receptor alpha-positive breast cancer. *Cancer Biol Ther* 2011;11:883-92.

Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 2006;7:497-508.

Martensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz-Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grande PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM. 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;150:687-98.

- Martin C, Ross M, Chapman KE, Andrew R, Bollina P, Seckl JR, Habib FK. CYP7B generates a selective estrogen receptor beta agonist in human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2928-35.
- Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ko YH, Goldberg AF, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Understanding the metabolic basis of drug resistance: Therapeutic induction of the Warburg effect kills cancer cells. *Cell Cycle* 2011;10:2521-28.
- Massarweh S, Osborne CK, Jiang S, Wakeling AE, Rimawi M, Mohsin SK, Hilsenbeck S, Schiff R. Mechanisms of tumor regression and resistance to estrogen deprivation and fulvestrant in a model of estrogen receptor-positive, HER-2/neu-positive breast cancer. *Cancer Res* 2006;66:8266-73.
- Mattenberg C, Fondop JJ, Romoscanu I, Luyet C, Bianchi-Demicheli F, de Ziegler D. [Use of aromatase inhibitors in infertile women]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:348-55.
- Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol* 2006;20:534-43.
- McDonnell DP, Norris JD. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 2002;296:1642-44.
- McInerney EM, Weis KE, Sun J, Mosselman S, Katzenellenbogen BS. Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* 1998;139:4513-22.
- McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG. Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 1998;12:3357-68.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20:321-44.
- McPherson SJ, Hussain S, Balanathan P, Hedwards SL, Niranjan B, Grant M, Chandrasiri UP, Toivanen R, Wang Y, Taylor RA, Risbridger GP. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:3123-28.
- Mewshaw RE, Edsall RJ, Jr., Yang C, Manas ES, Xu ZB, Henderson RA, Keith JC, Jr., Harris HA. ERbeta ligands. 3. Exploiting two binding orientations of the 2-phenyl-naphthalene scaffold to achieve ERbeta selectivity. *J Med Chem* 2005;48:3953-79.
- Meyer ME, Gronemeyer H, Turcotte B, Bocquel MT, Tasset D, Chambon P. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 1989;57:433-42.
- Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol* 2008;93:141-47.

Miyagi M, Morishita M, Iwamoto Y. Effects of sex hormones on production of prostaglandin E2 by human peripheral monocytes. *J Periodontol* 1993;64:1075-78.

Mizukami Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J* 2010;57:101-07.

Moehren U, Eckey M, Baniahmad A. Gene repression by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem* 2004;40:89-104.

Monroe DG, Secreto FJ, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Spelsberg TC. Estrogen receptor alpha and beta heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol* 2005;19:1555-68.

Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 1995;9:814-25.

Morfin R, Lafaye P, Cotillon AC, Nato F, Chmielewski V, Pompon D. 7 alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone and immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:971-82.

Morfin R. Involvement of steroids and cytochromes P(450) species in the triggering of immune defenses. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:273-90.

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

Muller-Decker K, Berger I, Ackermann K, Ehemann V, Zoubova S, Aulmann S, Pyerin W, Furstenberger G. Cystic duct dilatations and proliferative epithelial lesions in mouse mammary glands upon keratin 5 promoter-driven overexpression of cyclooxygenase-2. *Am J Pathol* 2005;166:575-84.

Muller C, Hennebert O, Morfin R. The native anti-glucocorticoid paradigm. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;100:95-105.

Muller C, Pompon D, Urban P, Morfin R. Inter-conversion of 7alpha- and 7beta-hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;99:215-22.

N

Nadal A, Alonso-Magdalena P, Soriano S, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I, Ropero AB. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells. *Front Biosci* 2011;16:251-60.

Narumiya S, Toda N. Different responsiveness of prostaglandin D2-sensitive systems to prostaglandin D2 and its analogues. *Br J Pharmacol* 1985;85:367-75.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42.

Neo SJ, Su X, Thomsen JS. Surface plasmon resonance study of cooperative interactions of estrogen receptor alpha and transcriptional factor Sp1 with composite DNA elements. *Anal Chem* 2009;81:3344-49.

Nichols M, Rientjes JM, Stewart AF. Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J* 1998;17:765-73.

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

Nilsson S, Gustafsson JA. Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;37:1-28.

Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:44-55.

Niro S, Hennebert O, Morfin R. A native steroid hormone derivative triggers the resolution of inflammation. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2010;1(1):11-19.

Niro S, Pereira E, Pelissier MA, Morfin R, Hennebert O. The DHEA metabolite 7beta-hydroxy-epiandrosterone exerts anti-estrogenic effects on breast cancer cell lines. *Steroids* 2012;77:542-51.

Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, de Matteis A, Giordano A, Perrone F. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:721-47.

Nuedling S, Karas RH, Mendelsohn ME, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Meyer R, Vetter H, Grohe C. Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett* 2001;502:103-08.

O

O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF, Jr., George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* 1998;47:310-13.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 1999;274:32248-57.

Omoto Y, Eguchi H, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene* 2003;22:5011-20.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995;270:1354-57.

Orlando L, Schiavone P, Cinieri S. Genistein: the future of prevention and treatment of breast cancer? *Cancer Biol Ther* 2011;11:918-20.

Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:353-61.

Oshima H, Hioki K, Popivanova BK, Oguma K, Van Rooijen N, Ishikawa TO, Oshima M. Prostaglandin E signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology* 2011;140:596-607.

Otsuki M, Gao H, Dahlman-Wright K, Ohlsson C, Eguchi N, Urade Y, Gustafsson JA. Specific regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase in mouse heart by estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 2003;17:1844-55.

Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, Fuchs I, Klewer M, Brittain D, Langer G, Bader B, Prella K, Nubbemeyer R, Fritzsche KH. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* 2008;149:4846-56.

Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzsche KH. GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 2009;80:34-41.

Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. 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;228:285-92.

P

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

Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J* 2009;28:523-32.

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004;64:423-28.

Pedram A, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2006;20:1996-2009.

Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids* 2004;69:137-44.

Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R. Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 2006;71:240-48.

Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 1997;18:281-305.

Perez N, Borja J. Aromatase inhibitors: clinical pharmacology and therapeutic implications in breast cancer. *J Int Med Res* 1992;20:303-12.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 2000;19:4970-78.

Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 2005;97:107-13.

Pike AC, Brzozowski AM, Walton J, Hubbard RE, Bonn T, Gustafsson JA, Carlquist M. Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochem Soc Trans* 2000;28:396-400.

Plourde PV, Dyroff M, Dukes M. Arimidex: a potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor. *Breast Cancer Res Treat* 1994;30:103-11.

Polanczyk M, Zamora A, Subramanian S, Matejuk A, Hess DL, Blankenhorn EP, Teuscher C, Vandembark AA, Offner H. The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *Am J Pathol* 2003;163:1599-605.

Polin SA, Ascher SM. The effect of tamoxifen on the genital tract. *Cancer Imaging* 2008;8:135-45.

Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L, Le Romancer M. [Post-translational modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors]. *Med Sci (Paris)* 2010;26:636-40.

Powell E, Xu W. Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:19012-17.

Pringle AK, Schmidt W, Deans JK, Wulfert E, Reymann KG, Sundstrom LE. 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci* 2003;18:117-24.

Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol Cell Endocrinol* 2009;308:32-38.

Q

Qian X, Zhang J, Liu J. Tumor-secreted PGE2 inhibits CCL5 production in activated macrophages through cAMP/PKA signaling pathway. *J Biol Chem* 2011;286:2111-20.

Quinn JA, Graeber CT, Frackelton AR, Jr., Kim M, Schwarzbauer JE, Filardo EJ. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30. *Mol Endocrinol* 2009;23:1052-64.

R

Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, Trivedi S, Colville-Nash P, Bellingan G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW. Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxyDelta12 14 PGJ2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20979-84.

Ramsey TL, Klinge CM. Estrogen response element binding induces alterations in estrogen receptor-alpha conformation as revealed by susceptibility to partial proteolysis. *J Mol Endocrinol* 2001;27:275-92.

Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999;13:307-19.

Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 2003;11:695-707.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005;307:1625-30.

Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, Ramesh C, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol* 2007;2:536-44.

Ricco C, Revial G, Ferroud C, Hennebert O, Morfin R. Synthesis of 7beta-hydroxy-epiandrosterone. *Steroids* 2011;76 100:28-30.

Richards JA, Brueggemeier RW. Prostaglandin E2 regulates aromatase activity and expression in human adipose stromal cells via two distinct receptor subtypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2810-16.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.

Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:643-58.

Rody A, Holtrich U, Solbach C, Kourtis K, von Minckwitz G, Engels K, Kissler S, Gatje R, Karn T, Kaufmann M. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:903-16.

Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 1999;42:260-66.

Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61:2537-41.

Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:646-58.

Rosness PA, Sunde A, Eik-Nes KB. Production and effects of 7 alpha-hydroxytestosterone on testosterone and dihydrotestosterone metabolism in rat testis. *Biochim Biophys Acta* 1977;488:55-68.

Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275:4475-83.

S

Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 2001;62:231-52.

Salomonsson M, Haggblad J, O'Malley BW, Sitbon GM. The human estrogen receptor hormone binding domain dimerizes independently of ligand activation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994;48:447-52.

Sar M, Welsch F. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* 1999;140:963-71.

Schneider CP, Nickel EA, Samy TS, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. The aromatase inhibitor, 4-hydroxyandrostenedione, restores immune responses following trauma-hemorrhage in males and decreases mortality from subsequent sepsis. *Shock* 2000;14:347-53.

Schwabe JW, Fairall L, Chapman L, Finch JT, Dutnall RN, Rhodes D. The cocrystal structures of two zinc-stabilized DNA-binding domains illustrate different ways of achieving sequence-specific DNA recognition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1993;58:141-47.

Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993;75:567-78.

Schwartz JA, Zhong L, Deighton-Collins S, Zhao C, Skafar DF. Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor- α alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J Biol Chem* 2002;277:13202-09.

Segnitz B, Gehring U. Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2179-83.

Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 2000;103:843-52.

Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295:2465-68.

Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998;95:927-37.

Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* 1997;52:141-64.

Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56:387-437.

Singh A, Purohit A, Ghilchik MW, Reed MJ. The regulation of aromatase activity in breast fibroblasts: the role of interleukin-6 and prostaglandin E2. *Endocr Relat Cancer* 1999;6:139-47.

Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 1997;11:657-66.

Smith EP, Specker B, Bachrach BE, Kimbro KS, Li XJ, Young MF, Fedarko NS, Abuzzahab MJ, Frank GR, Cohen RM, Lubahn DB, Korach KS. Impact on bone of an estrogen receptor- α gene loss of function mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3088-96.

Sonderfan AJ, Arlotto MP, Parkinson A. Identification of the cytochrome P-450 isozymes responsible for testosterone oxidation in rat lung, kidney, and testis: evidence that cytochrome P-450a (P450IIA1) is the physiologically important testosterone 7 α -hydroxylase in rat testis. *Endocrinology* 1989;125:857-66.

Sterzl I, Hampl R, Hill M, Hrda P, Matucha P. Immunomodulatory cytokines in human seminal plasma correlate with immunomodulatory steroids. *Steroids* 2003;68:725-31.

Stoner M, Saville B, Wormke M, Dean D, Burghardt R, Safe S. Hypoxia induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha in ZR-75 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2002;16:2231-42.

Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007;28:521-74.

Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:4844-49.

Subbaramaiah K, Howe LR, Port ER, Brogi E, Fishman J, Liu CH, Hla T, Hudis C, Dannenberg AJ. HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Res* 2006;66:5504-11.

Suzuki T, Miki Y, Akahira J, Moriya T, Ohuchi N, Sasano H. Aromatase in human breast carcinoma as a key regulator of intratumoral sex steroid concentrations. *Endocr J* 2008;55:455-63.

T

Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:737-41.

Tamir S, Izrael S, Vaya J. The effect of oxidative stress on ERalpha and ERbeta expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;81:327-32.

Tamrazi A, Carlson KE, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol Endocrinol* 2002;16:2706-19.

Taylor AH, Al Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000;24:145-55.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005;146:624-32.

Tiwari-Woodruff S, Morales LB, Lee R, Voskuhl RR. Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta ligand treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14813-18.

Tiwari-Woodruff S, Voskuhl RR. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of estrogen receptor ligand treatment in mice. *J Neurol Sci* 2009;286:81-85.

Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 1989;59:477-87.

Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V. Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol* 1999;19:1919-27.

V

Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 2001;21:1809-18.

Vegeto E, Benedusi V, Maggi A. Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:507-19.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Albanito L, Madeo A, Rago V, Carpino A, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M. 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 2006;70:1414-23.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 2006;20:631-46.

Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001;276:13505-08.

W

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, . Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7889-93.

Wang C, Dehghani B, Magrisso IJ, Rick EA, Bonhomme E, Cody DB, Elenich LA, Subramanian S, Murphy SJ, Kelly MJ, Rosenbaum JS, Vandembark AA, Offner H. GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *Mol Endocrinol* 2008;22:636-48.

Wang C, Dehghani B, Li Y, Kaler LJ, Proctor T, Vandembark AA, Offner H. Membrane estrogen receptor regulates experimental autoimmune encephalomyelitis through up-regulation of programmed death 1. *J Immunol* 2009;182:3294-303.

Wang H, Peters GA, Zeng X, Tang M, Ip W, Khan SA. Yeast two-hybrid system demonstrates that estrogen receptor dimerization is ligand-dependent in vivo. *J Biol Chem* 1995;270:23322-29.

Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2792-96.

Wang LH, Yang XY, Zhang X, An P, Kim HJ, Huang J, Clarke R, Osborne CK, Inman JK, Appella E, Farrar WL. Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell* 2006;10:487-99.

Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang SM, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol* 1998;12:1605-18.

Wei LN, Hu X, Chandra D, Seto E, Farooqui M. Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem* 2000;275:40782-87.

Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, Wang Y, Abarbanell AM, Poynter JA, Meldrum DR. Signaling via GPR30 protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Surgery* 2010;148:436-43.

Weitsman GE, Li L, Skliris GP, Davie JR, Ung K, Niu Y, Curtis-Snell L, Tomes L, Watson PH, Murphy LC. Estrogen receptor- α phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res* 2006;66:10162-70.

White R, Sjöberg M, Kalkhoven E, Parker MG. Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J* 1997;16:1427-35.

Whittle BJ, Moncada S, Mullane K, Vane JR. Platelet and cardiovascular activity of the hydantoin BW245C, a potent prostaglandin analogue. *Prostaglandins* 1983;25:205-23.

Windahl SH, Andersson N, Chagin AS, Martensson UE, Carlsten H, Olde B, Swanson C, Moverare-Skrtic S, Savendahl L, Lagerquist MK, Leeb-Lundberg LM, Ohlsson C. The role of the G protein-coupled receptor GPR30 in the effects of estrogen in ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E490-E496.

Wood JR, Greene GL, Nardulli AM. Estrogen response elements function as allosteric modulators of estrogen receptor conformation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1927-34.

Wood JR, Likhite VS, Loven MA, Nardulli AM. Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 2001;15:1114-26.

Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J Biol Chem* 2001;276:27071-76.

X

Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature* 2002;415:813-17.

Y

Yao C, Sakata D, Esaki Y, Li Y, Matsuoka T, Kuroiwa K, Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* 2009;15:633-40.

Yau JL, Rasmuson S, Andrew R, Graham M, Noble J, Olsson T, Fuchs E, Lathe R, Seckl JR. Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2003;121:307-14.

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 1992;11:3681-94.

Yoshida S, Honda A, Matsuzaki Y, Fukushima S, Tanaka N, Takagiwa A, Fujimoto Y, Miyazaki H, Salen G. Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines. *Steroids* 2003;68:73-83.

Yuan LW, Gambée JE. Phosphorylation of p300 at serine 89 by protein kinase C. *J Biol Chem* 2000;275:40946-51.

Z

Zhang Z, Kumar R, Santen RJ, Song RX. The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action. *Steroids* 2004;69:523-29.

Zirilli L, Rochira V, Diazzi C, Caffagni G, Carani C. Human models of aromatase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:212-18.

Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci* 2010;123:1253-61.

V. ANNEXES

Review

A native steroid hormone derivative triggers the resolution of inflammation

Sandra Niro, Olivier Hennebert and Robert Morfin*

Laboratoire de Biotechnologie, EA 3199, Conservatoire national des arts et métiers, 2 rue Conté, Paris, France

Abstract

Inflamed tissues produce both prostaglandins (PGs) and 7α -hydroxylated derivatives of native circulating 3β -hydroxysteroids. These 7α -hydroxysteroids are in turn transformed into 7β -hydroxylated epimers by 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the tissue. 7β -Hydroxy-epiandrosterone (7β -hydroxy-EpiA) affects PG production in two models of inflammation, dextran sodium sulfate-induced colitis in the rat and TNF- α -induced activation of PG production and PG synthase expression in cultured human peripheral blood monocytes (hPBMC). Treatment with 7β -hydroxy-EpiA led to a shift from high to low colonic PGE₂ levels and from low to high 15-deoxy- Δ^{12-14} -PGJ₂ (15d-PGJ₂) levels, together with changes in the expression of the respective PG synthases and resolution of colonic inflammation. Addition of 7β -hydroxy-EpiA to hPBMC also changed the expression of PG synthases and decreased PGE₂ while increasing 15d-PGJ₂ production. These effects were only observed with 7β -hydroxy-EpiA and not with 7α -hydroxy- or 7β -hydroxy-dehydroepiandrosterone (7α -hydroxy-DHEA and 7β -hydroxy-DHEA). 15d-PGJ₂, which is the native ligand for peroxisome proliferator-activated receptor subtype γ , contributes to cell protection and to the resolution of inflammation. Our results therefore suggest that 7β -hydroxy-EpiA may facilitate inflammatory resolution by shifting PG production from PGE₂ to PGD₂ and 15d-PGJ₂. The finding that 7β -hydroxy-EpiA was effective at nM concentrations, whereas the two structurally closely related hydroxysteroids 7α -hydroxy-DHEA and 7β -hydroxy-DHEA were inactive suggests that the effects of 7β -hydroxy-EpiA are specific to this steroid and may be mediated by a specific receptor.

Keywords: prostaglandin; 11β -HSD1; P4507B1; PGE₂; PGD₂; 15d-PGJ₂; PPAR- γ .

*Corresponding author: Robert Morfin, Biotechnologie, CNAM, 2 rue Conté, 75003 Paris, France
Phone: +33-140272572, Fax: +33-140272380,
E-mail: morfin@cnam.fr
Received March 24, 2009; accepted April 27, 2009;
previously published online August 11, 2009

Introduction

At the onset of inflammation, arachidonic acid is metabolized to produce eicosanoids including prostaglandins (PGs), thromboxanes, and leucotrienes (1) which help to establish the inflammatory infiltrate. Among inflammatory signals, interleukin-1 β (IL-1 β) is transported to the hypothalamus where it triggers CRh release, resulting in increased ACTH-mediated production of anti-inflammatory corticosteroids (corticosterone, cortisol) (2) by the adrenals. In addition, IL-1 β is involved in altering steroid metabolism in the inflamed tissue through increased expression of cytochrome P₄₅₀-7B1 (CYP7B1) causing enhanced production of 7α -hydroxylated dehydroepiandrosterone (DHEA) derivatives (3, 4). The 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β -HSD1) is an ubiquitous NADPH-dependent dehydrogenase responsible for the conversion of cortisone to cortisol. Recent in vitro studies showed that 7α -hydroxy-DHEA can be converted to 7β -hydroxy-DHEA (5) by 11β -HSD1. This finding suggests that 7 -hydroxysteroids, such as 7α -hydroxy-DHEA, may inhibit the conversion of cortisone to cortisol through substrate competition (6), and hence reduce cortisol production in inflamed tissue. The first step in the set up of the immune response through antigen presentation and T-cell activation occurs when inflammation results from the introduction of xenobiotics such as in infection. Active glucocorticoids, such as cortisol, are known to both suppress inflammation and to severely impede the immune response. Reduced production of cortisol via inhibition of 11β -HSD1 by 7 -oxygenated DHEA derivatives might therefore be expected to enhance antigen presentation and hence an appropriate immune response. However, resolution of the inflammatory response must occur for tissue homeostasis to take place. Inflammation is characterized by an early burst in the production of PGE₂, whereas resolution of inflammation is associated with decreased release of PGE₂ and increased production of PGD₂. PGD₂ is an unstable PG which is rapidly transformed into 15-deoxy- Δ^{12-14} -PGJ₂ (15d-PGJ₂), an endogenous agonist of peroxisome proliferator-activated receptor subtype γ (PPAR- γ) (7). Both PGD₂ and 15-d-PGJ₂ are cytoprotective and activate inflammatory resolution (8, 9).

7 -Hydroxysteroids may therefore participate both in enhancing the immune response and triggering the resolution of inflammation. Immune activation by 7 -hydroxy-DHEA derivatives was reported previously. However, the findings that certain 7 -hydroxysteroids, such as 7β -hydroxy-epian-

drosterone (7 β -hydroxy-EpiA), may be involved in triggering inflammatory resolution is a novel finding which will be developed in the following sections.

Occurrence of 7 β -hydroxy-EpiA

Testosterone, the male hormone, is produced both in the testis and the ovaries where it is a precursor for estradiol following aromatization. Testosterone is also produced in other tissues from DHEA through an intracrine process (10). Testosterone metabolism proceeds first through reduction of the Δ^{4-5} double bond to 5 α -dihydrotestosterone (DHT) by microsomal 5 α -reductase. DHT is the sole native ligand for the androgen receptor. Several enzymatic steps are involved in determining tissue DHT levels. Most of these enzymes are specific hydroxysteroid dehydrogenases (HSD), namely 17 β -HSD, 3 α -HSD, and 3 β -HSD (Figure 1). Thus, epiandrosterone (EpiA) formation results from androsterone epimerization and from 17 β -oxidation of 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol and from 3 β -reduction of 5 α -androstan-3,17-dione. CYP7B1 is the enzyme responsible for 7 α -hydroxylation of oxysterols (11) including all 3 β -hydroxysteroids bearing an oxygen in the side chain or in the 17-position, such as pregnenolone, DHEA, EpiA, and 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol (12, 13). Thus, 7 α -hydroxy-EpiA is produced from EpiA via CYP7B1 in tissues, such as brain, liver, skin, and joints, where the hydroxylase is expressed (6, 14–16) (Figure 1). These tissues also contain NADP(H)-dependent 11 β -HSD1 (6) which converts 7 α -hydroxysteroids to the corresponding 7 β -hydroxysteroids. This conversion has been observed in humans by characterizing 7 α - and 7 β -hydroxy-EpiA metabolites in urine after injection of radio-labeled 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol (17).

Thus, 7 β -hydroxy-EpiA is produced in man and is found in both sulfated and glucuronidated forms in the urine (17).

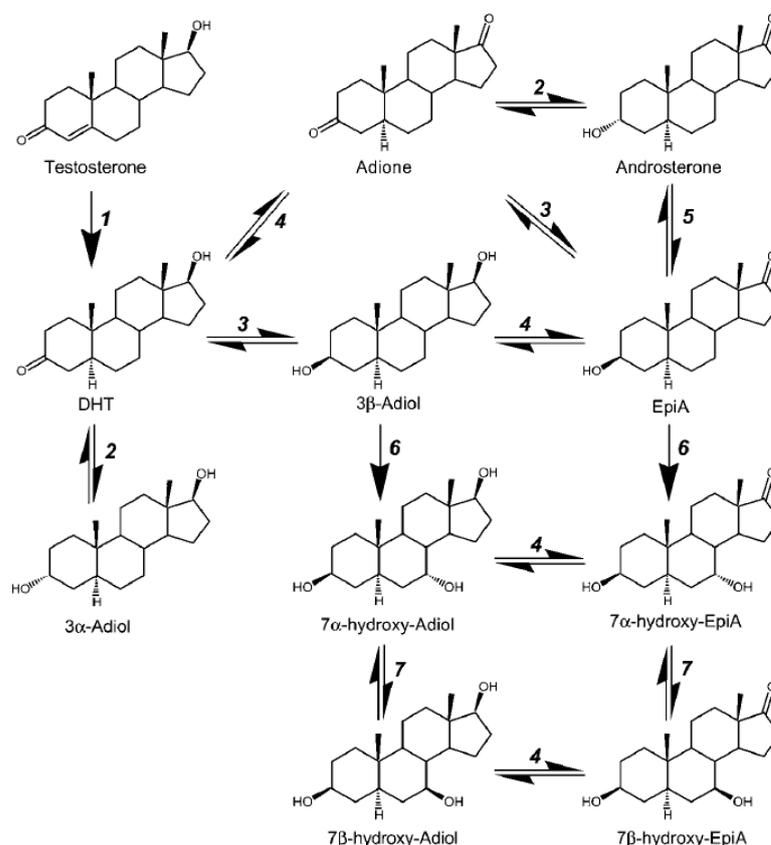


Figure 1 Epiandrosterone (EpiA) derives from testosterone and is a substrate for CYP7B1 (6) producing 7 α -hydroxy-EpiA which is then inter-converted into 7 β -hydroxy-EpiA by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (7).

Other enzymes are: 5 α -reductase (1), 3 α -HSD (2), 3 β -HSD (3), 17 β -HSD (4), 17 β -HSD VI (3 α -hydroxysteroid epimerase) (5). Steroids are: 5 α -dihydrotestosterone (DHT), 5 α -androstan-3,17-dione (Adione), 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (3 α -Adiol), 5 α -androstan-3 β ,17 β -diol (3 β -Adiol), 5 α -androstan-3 β ,7 α ,17 β -triol (7 α -hydroxy-Adiol), 5 α -androstan-3 β ,7 β ,17 β -diol (7 β -hydroxy-Adiol).

The small quantities obtained may explain why little interest has arisen for this steroid. Indeed, EpiA as well as 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol are generally considered as minor steroids when compared to androsterone and 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol which are not substrates for CYP7B1 and can only be oxidized into 5 α -androstane-3,17-dione and DHT, respectively (Figure 1).

Prostaglandin formation in inflammation

The biogenesis of PGs (also referred to as prostanoids) is initiated through the release of arachidonic acid (AA) from cell membranes, a reaction catalyzed by phospholipase A2. Released AA is converted to an unstable oxygenated intermediate (PGH₂) by cyclooxygenase (COX) (18). Once formed, the PGH₂ intermediate is converted into various PGs, including PGI₂ (prostacyclin), PGE₂, and PGD₂, by a range of specific enzymes called PG synthases (e.g., PGE synthase or PGES, PGD synthase or PGDS) (18, 19). Three isoforms of COX are expressed in tissues (18) and COX-2 is generally induced in response to proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, and stress. The prime PG released at the onset of inflammation is PGE₂ and is responsible for adverse proinflammatory effects. Therefore, inhibition of COX-2 has been considered as a prime target in developing drugs for the treatment of inflammatory diseases. Clinical trials have revealed that long-term treatment with COX-2 inhibitors increase the incidence of stroke and myocardial infarction (20, 21). Selective inhibition of COX-2, which results in preferential decrease in prostacyclin production over thromboxane A₂, also leads to a decrease in PGD₂ production. The increase in the incidence of stroke and myocardial infarction observed with COX-2 inhibitors might therefore be due to inhibition of the synthesis of both PGI₂ and PGD₂. In peripheral tissues, PGD₂ promotes vasodilation and inhibits platelets aggregation (22, 23). In the brain, it is the most abundant PG (24), and a recent study shows that PGD₂ mediates neuroprotective effects in hippocampal neurons (25). However, PGD₂ is very short lived and undergoes dehydration both in vivo and in vitro (8) to yield biologically active PGs of the J2 series, including 15d-PGJ₂. This PG has a high affinity for PPAR- γ (7, 8), a ligand-dependent nuclear transcription factor which has been implicated in a broad range of cellular functions, including anti-inflammatory actions (26, 27). 15d-PGJ₂ inhibits the expression of several inflammatory genes, such as nitric oxide synthase, PGES, and TNF- α , through PPAR- γ -dependent as well as PPAR- γ -independent mechanisms (26–31).

Regardless of the mechanism, 15d-PGJ₂ is present in vivo during the resolution phase of inflammation where it functions as a feedback regulator of the inflammatory response (8, 9, 32) (Figure 2). Administration of 15d-PGJ₂ has also been shown to reduce the development of experimental colitis in the rat, a model of inflammatory bowel disease (33),

and to protect against myocardial infarction and brain damage following ischemia (34–37).

Agents and conditions that tip the balance of PG production in favor of PGD₂ and 15d-PGJ₂ would therefore be expected to protect against tissue damage and inflammation in degenerative inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, and Alzheimer disease.

Effects of 7 β -hydroxy-EpiA on prostaglandin formation and inflammation

Experimental colitis in the rat is a well-accepted model for the study of inflammatory bowel diseases. We have used this model in order to assess the effects of 7 β -hydroxy-EpiA on dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in rats (38). Histological and inflammation patterns and PG formation were examined after i.p. administration of 7 β -hydroxy-EpiA (0.01, 0.1 and 1 mg/kg once a day for 7 days) to rats. Thereafter, colitis was induced by administration of 5% DSS in drinking water for 7 days. Severity of colitis was assessed at various times on the basis of colon length, myeloperoxidase (MPO) activity, histology, and oxidative stress parameters (38). Levels of the PGs and the expression of COX-2 and PG synthases were assessed during the course of the experiment. Administration of 7 β -hydroxy-EpiA caused a transient increase in COX-2 and PGE synthase expression within 6 h–15 h and augmented colonic tissue levels of 15d-PGJ₂ levels starting at day 2. Treatment with DSS resulted in shortened colon length, depleted mucus in goblet cells and increased MPO activity and oxidative stress (Figure 3). COX-2 and mPGES-1 synthase expression were enhanced and accompanied by increased PGE₂, D₂, and 15d-PGJ₂ production (Figure 4). Although all dose levels of 7 β -hydroxy-EpiA reduced PGE₂ production and increased 15d-PGJ₂ levels, the lowest dose (0.01 mg/kg) of the steroid was most effective in preventing colitis damage and tissue inflammation. These data indicate that 7 β -hydroxy-EpiA pre-treatment prevents the occurrence of DSS-induced colitis through a shift from PGE₂ to PGD₂ and 15d-PGJ₂ production, associated with an early but transient increase in COX-2 expression and a sustained increase in the production of the anti-inflammatory PG 15d-PGJ₂ (38).

To determine whether 7 β -hydroxy-EpiA might produce similar effects in man, human peripheral blood monocytes (hPBMC) were cultured for 4 h and 24 h in the presence of 7 β -hydroxy-EpiA (1 nM–100 nM), with and without addition of TNF- α (10 ng/mL) (39). Levels of PGE₂, PGD₂, and 15d-PGJ₂ were measured in the incubation medium, and cell content of mRNA of cyclooxygenase (COX-2), and PGE and PGD synthases (m-PGES1, H-PGDS, L-PGDS), and PPAR- γ was assessed by quantitative RT-PCR. Addition of TNF- α resulted in elevated production of all PGs at 24 h. The effects of TNF- α on COX-2 and m-PGES1 expression followed a different time course. COX-2 mRNA was most pronounced at 4 h and tended to decrease thereafter, whereas m-PGES1 expression was only slightly increased at 4 h, but

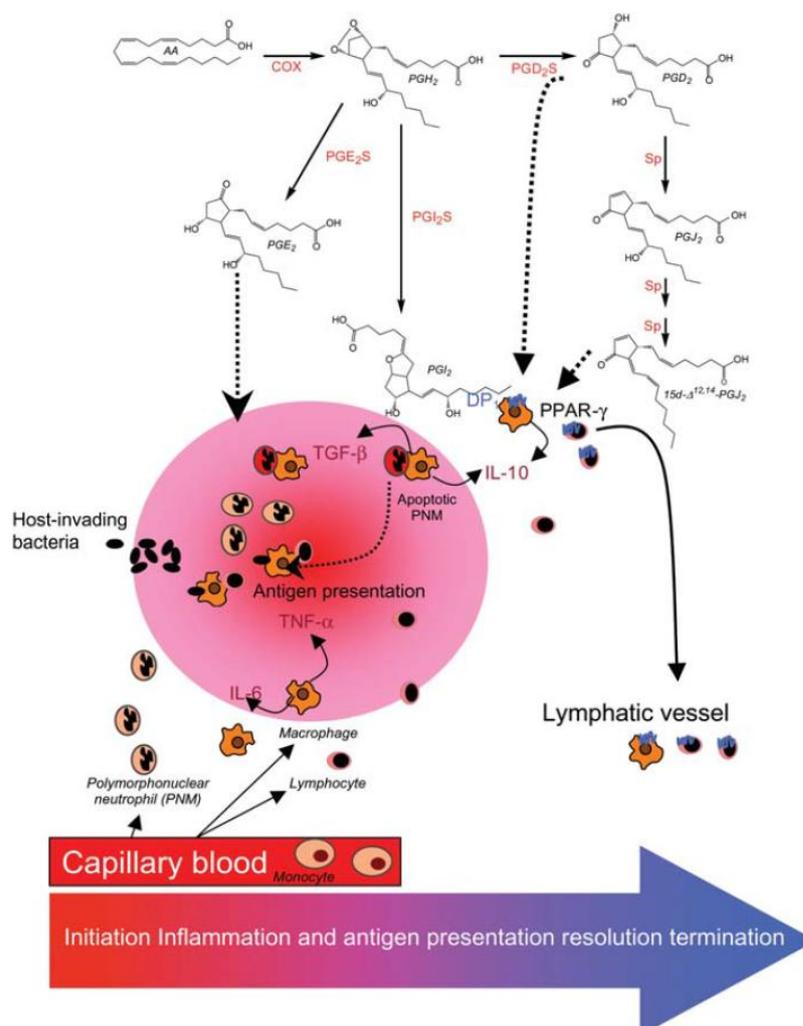


Figure 2 At the onset of inflammatory response and through macrophage-released proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α), arachidonic acid (AA) is converted to PGH₂ via COX.

In turn, PGE₂, PGI₂, and PGD₂ are produced from PGH₂ by synthases (PGE₂S, PGI₂S, PGD₂S). PGD₂ is metabolized non-enzymatically (Sp) to 15d-PGJ₂ which interacts with PPAR- γ . PGD₂ acts on the DP1 receptor expressed on macrophages and lymphocytes. Working in tandem, PGD₂ and 15d-PGJ₂ contribute to the resolution of inflammation by decreasing proinflammatory cytokines and increasing anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β) and promoting egress of macrophages and lymphocytes to the draining lymphatics. Non PPAR- γ -mediated action of 15d-PGJ₂ are not shown.

showed a further and dramatic increase at 24 h. Addition of 7 β -hydroxy-EpiA tended to slightly increase TNF- α -induced changes in COX-2 and m-PGES1 expression, while markedly decreasing PGE₂ and increasing 15d-PGJ₂ production at 24 h. These effects of 7 β -hydroxy-EpiA were obtained at all concentrations studied (1 nM–100 nM) (Figure 5). In contrast, incubation with 1 nM–100 nM 7 α -hydroxy-DHEA and 7 β -hydroxy-DHEA, two structurally related 7-hydroxysteroids, was ineffective, indicating that the effects observed must be specific for 7 β -hydroxy-EpiA (39).

7 β -Hydroxy-EpiA effects: receptor-mediated process?

Our results suggest that 7 β -hydroxy-EpiA is a native trigger of cellular protection through simultaneous activation of 15d-PGJ₂ production and depression of PGE₂ synthesis. The finding that 7 β -hydroxy-EpiA was effective at nM concentrations, whereas two structurally closely related 7-hydroxysteroids, 7 α -hydroxy-DHEA and 7 β -hydroxy-DHEA, were inactive suggests that these effects are mediated by activation

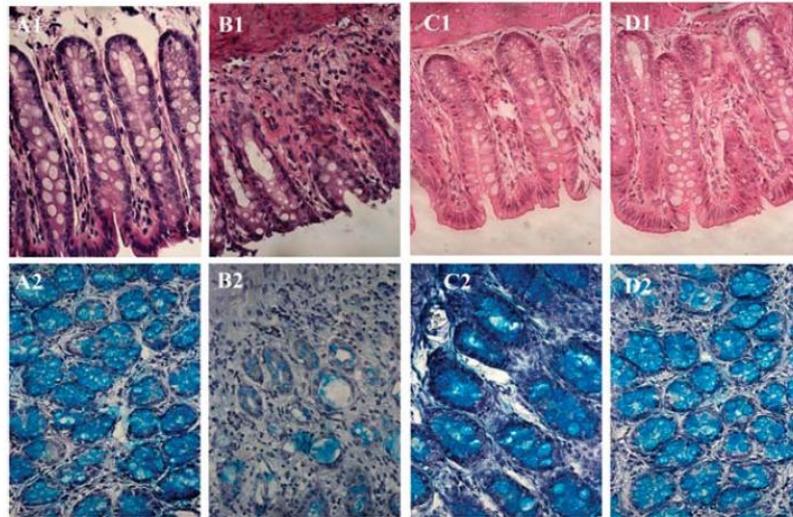


Figure 3 Histological examination of rat colon after DSS-induced colitis.

7 β -hydroxy-EpiA effect on colon injury. Histological appearance of rat colonic mucosa after hematoxylin/eosin (A1–D1) or Alcian blue for goblet cell staining (A2–D2) at day 13 and day 14: sham with no DSS (A1–A2) and DSS-treated (B1–B2) at day 13; sham with no DSS (C1–C2), and DSS-treated and 0.01 mg/kg 7 β -hydroxy-EpiA at day 14 (D1–D2). No histological modification was present in sham animals (A, C) at days 13 and 14. Mucosal injury in DSS-induced colitis rats starting at day 13 (B) was more pronounced at day 14 (not shown) and was characterized by necrosis of the epithelium, focal ulceration, infiltration of inflammatory cells, and mucin goblet cell depletion. Treatment with 0.01 mg/kg 7 β -hydroxy-EpiA completely prevented colitis damage (38).

of a putative receptor specific for 7 β -hydroxy-EpiA. The fact that 7 β -hydroxy-EpiA is generated from 7 α -hydroxy-EpiA by 11 β -HSD1 and cannot be converted back to the α -epimer should also be considered. In addition, 17-oxosteroids, such as 7 β -hydroxy-EpiA, are not transformed into 17 β -hydroxysteroids because of the overwhelming presence of NAD⁺ necessary for activity of NAD⁺-dependent 17 β -HSD. Thus, administration of 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol to human results in the formation of 17-oxo-steroids (17). The key condition determining the production of 7 β -hydroxy-EpiA are: i) the level of circulating EpiA, ii) the presence and tissue levels of CYP7B1 required for 7 α -hydroxylation of EpiA, iii) the presence and tissue levels of 11 β -HSD1 required for epimerization of 7 α -hydroxy-EpiA into 7 β -hydroxy-EpiA. Each of these points has been documented. Inflammatory diseases occur predominantly in the elderly. IL-1 β induces the expression of CYP7B1 (3, 4), and 11 β -HSD1 is present in all tissues subject to inflammation suggesting that 7 β -hydroxy-EpiA production is increased during inflammation. However, EpiA levels are generally lower in older people due to decreased androgen precursor levels. These findings may therefore suggest that decreased tissue production of 7 β -hydroxy-EpiA could play a role in the prevalence of inflammatory diseases with increasing age.

7 β -Hydroxy-EpiA levels have not been measured in normal or inflamed tissues due to lack of a sufficiently sensitive method. However, physiological tissue concentrations of the

steroid would be expected to be very low as 7 β -hydroxy-EpiA was found to be effective at 1 nM.

In conclusion, the data discussed above suggest that 7 β -hydroxy-EpiA enhances inflammatory resolution through increased production of 15d-PGJ₂, and that this paracrine mode of action of the steroid might be mediated through activation of an unknown nuclear receptor.

7 β -Hydroxy-EpiA metabolism and disposition

Provided that 7 β -hydroxy-EpiA is administered per os, the intestine would be the first organ involved in absorption and metabolism of the steroid. Metabolism of 7 β -hydroxy-EpiA was therefore investigated using human intestine microsomes in vitro (15). The results obtained indicated NADH-dependent production of 5 α -androstane-3 β ,7 β ,17 β -triol and cofactor-independent production of 7 α -hydroxy-EpiA. However, these findings may not apply to an in vivo situation where concentrations of NAD⁺ largely exceed those of NADH. After intestinal absorption, 7 β -hydroxy-EpiA may reach the liver through portal blood circulation. Metabolism of 7 β -hydroxy-EpiA was therefore studied in human liver S9 fractions in vitro (14). Again, as shown when using human intestine microsomes, both 5 α -androstane-3 β ,7 β ,17 β -triol and 7 α -hydroxy-EpiA were produced, the former under conditions of high concentrations of NADH, the latter when the

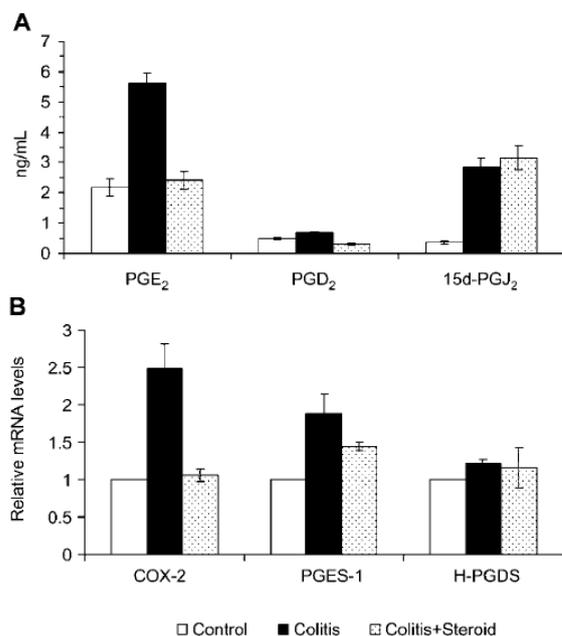


Figure 4 Effect of 7 β -hydroxy-EpiA (0.01 mg/kg) on colonic synthesis of PGs (38).

(A) Synthesis was significantly altered at the end of DSS treatment ($p < 0.05$) with reduced PGE₂ synthesis and increased 15d-PGJ₂ levels resulting from PGD₂. (B) Colitis led to a significantly increased COX-2 mRNA synthesis resulting into PGES-1 increase at the end of DSS treatment. Increased H-PGDS was also observed. A return to levels approaching that of basal controls was obtained after treatment with 7 β -hydroxy-EpiA (0.01 mg/kg). All assays were carried out in triplicate and results were plotted as means \pm SEM. One-way analysis of variance was performed followed by Duncan's multiple range tests in order to compare differences between groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

incubation medium was supplemented with all cofactors. Interestingly, incubation with 7 α -hydroxy-EpiA led to cofactor-independent production of 6%–14% 7 β -hydroxy-EpiA. The putative formation of sulfated and glucuronide derivatives was not investigated. Although these data may not be applicable to an in vivo situation, it is interesting that administration of ¹⁴C-labelled 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, a precursor of 7 β -hydroxy-EpiA, to man and identification of its urinary metabolites showed recovery of ¹⁴C-7 α -hydroxy-EpiA after 1 day both in sulfate (0.55%) and glucuronide (0.36%) fractions, with radio-purities of 87% and 76%, respectively. Because the chromatographic system used at the time did not allow for separation of 7 α -hydroxy-EpiA and 7 β -hydroxy-EpiA, one cannot exclude that the sulfate and glucuronide fractions contained 13% and 24% 7 β -hydroxy-EpiA, respectively. In any case, inter-conversion of 7 α - and 7 β -hydroxy-EpiA in humans is catalyzed by 11 β -HSD1. This inter-conversion has also been demonstrated using the recombinant enzyme and mass spectrometric analysis of the products (40). However, whereas 7 α -hydroxy-EpiA was readily converted to 7 β -hydroxy-EpiA with a K_M of 8.1 μ M

and a V_{max}/K_M ratio of 0.9, incubation with 7 β -hydroxy-EpiA did not produce detectable amounts of 7 α -hydroxy-EpiA. When radio-labeled 7 β -hydroxy-EpiA (41) was used as substrate in order to measure trace amounts of 7 α -hydroxy-EpiA, <1% conversion could be demonstrated. This indicates that once formed, 7 β -hydroxy-EpiA may not be converted back to 7 α -hydroxy-EpiA. The sole metabolic alternative is conversion into sulfate and glucuronide derivatives readily excreted in the urine. Reduction of 7 β -hydroxy-EpiA to 5 α -androstane-3 β ,7 β ,17 β -triol by 17-hydroxy-steroid dehydrogenases may be considered. Both NAD(H)- and NADP(H)-dependent isoforms exist and are distributed in tissues. However, only the NADP(H)-dependent enzyme may carry out the reaction because of tissue availability of NADPH. In summary, 7 β -hydroxy-EpiA is produced irreversibly from 7 α -hydroxy-EpiA and is disposed through action of second phase liver enzymes, such as sulfotransferases and glucuronyl transferases.

Therapeutic opportunities and concluding remarks

15d-PGJ₂ is present in vivo during the resolution phase of inflammation, suggesting that it may function as a feedback regulator of the inflammatory response (9, 32). Increasing 15d-PGJ₂ production to activate resolution of the inflammation process is an appealing novel drug discovery and development target. 15d-PGJ₂ is the native ligand for PPAR- γ which, once activated, plays important roles in cellular protection (34, 42–44). 15d-PGJ₂ has both cardioprotective and neuroprotective effects. Blockade of 15d-PGJ₂ formation may contribute to the increase in the incidence of stroke and myocardial infarction observed in clinical trials with COX-2 inhibitors (21). 15d-PGJ₂ has been shown to protect against inflammation in experimental models of rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. Thus, 15d-PGJ₂ inhibited IL-1 β -induced PGE₂ synthesis in rheumatoid arthritis synovial cells (35), and almost completely reduced cytokine-stimulated PGE₂ synthesis and PGES expression in rat chondrocytes in vitro (30, 31). 15d-PGJ₂ has been shown to reduce the development of experimental colitis in the rat (33), and we have recently shown that 7 β -hydroxy-EpiA-induced recovery from colitis was associated with increased levels of 15d-PGJ₂ in colonic tissue (38). In neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple sclerosis, but also in stroke, spinal cord injury, and brain trauma, brain damage is associated with excessive microglial activation. Microglia, the resident innate immune cells of the central nervous system play a major role in the inflammatory process through release of toxic inflammatory cytokines, nitric oxide, PGE₂, and superoxide. The large quantities of PGD₂ produced in the normal as well as in the injured brain result in elevated production of 15d-PGJ₂ which may be effective in preventing brain damage (45). In animals, administration of 15d-PGJ₂ has been shown to reduce the severity of experimental autoimmune encephalitis (46), to reduce neuronal loss after intra-cerebral hemorrhage

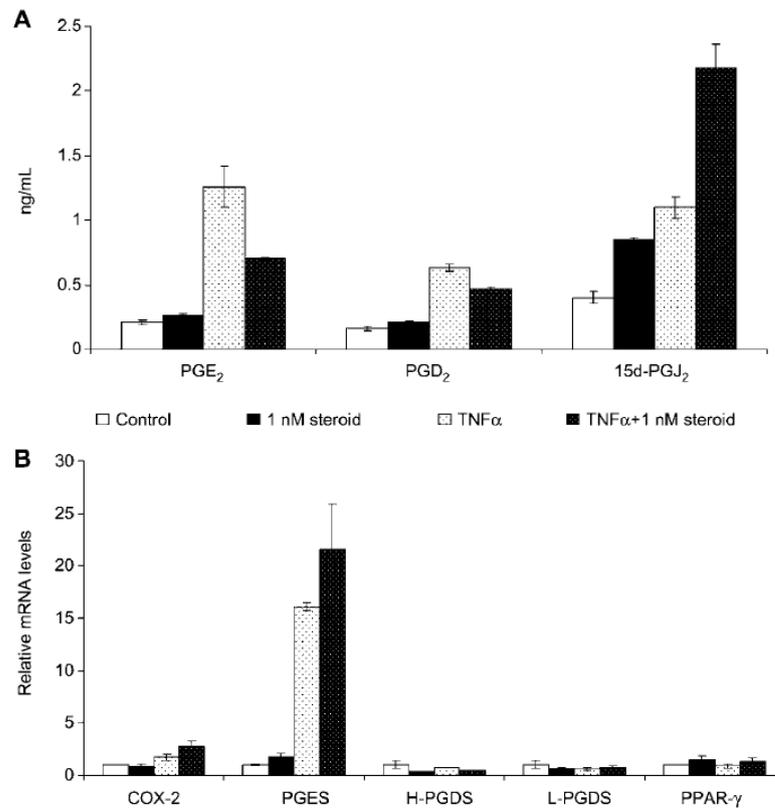


Figure 5 Effect of 1 nM 7 β -hydroxy-EpiA (steroid) on PG levels (A) and gene expression (B) in hPBMC cultured with and without 10 ng/mL TNF- α (TNF α) for 24 h.

COX-2, cyclooxygenase type 2; PGES, prostaglandin E synthase; H-PGDS, hematopoietic prostaglandin D synthase; L-PGDS, lipocalin-type prostaglandin D synthase; PPAR- γ , peroxisome proliferator activated receptor, subtype γ . All assays were carried out in triplicate and results were plotted as means \pm SEM. One-way analysis of variance was performed followed by Duncan's multiple range tests in order to compare differences between groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ (39).

(47), and to protect the brain from ischemia-reperfusion injury in experimental stroke (36, 37, 45). Furthermore, a recent clinical study showed that patients with acute ischemic stroke had higher plasma levels of 15d-PGJ₂ than normal subjects and that these increased levels were associated with better early and late neurological outcome (48).

Therefore, agents and conditions that shift the balance of PG production in favor of 15d-PGJ₂ would be expected to have beneficial effects in inflammatory bowel diseases, rheumatoid arthritis, chronic neurodegenerative disorders, and in acute conditions, such as stroke, spinal cord injury, and traumatic brain injury.

Data from our work show that 7 β -hydroxy-EpiA may be the native trigger shifting PG production from PGE₂ towards PGD₂ and 15d-PGJ₂. Whether 7 β -hydroxy-EpiA is also responsible for shifting PG production towards 15d-PGJ₂ during inflammatory resolution remains to be established. Altogether, the impressive activity of very low doses and the absence of any conversion of the steroid into other hormones make it an attractive pharmacological agent. Plasma and tissue levels of 7 β -hydroxy-EpiA need to be determined both

in normal and pathological conditions. The exact molecular mode of action will truly rely on identification of the specific receptor that mediates 7 β -hydroxy-EpiA effects.

References

1. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871–5.
2. van der Meer MJ, Sweep CG, Pesman GJ, Tilders FJ, Hermus AR. Chronic stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in rats by interleukin 1 β : central and peripheral mechanisms. *Cytokine* 1996;8:910–9.
3. Dulos J, Verbraak E, Bagchus WM, Boots AM, Kaptein A. Severity of murine collagen-induced arthritis correlates with increased CYP7B activity: enhancement of dehydroepiandrosterone metabolism by interleukin-1 β . *Arthritis Rheum* 2004;50:3346–53.
4. Dulos J, van der Vleuten MA, Kavelaars A, Heijnen CJ, Boots AM. CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines. *Arthritis Rheum* 2005;52:770–8.

5. Muller C, Pompon D, Urban P, Morfin R. Inter-conversion of 7 α - and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone by the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;99:215–22.
6. Hennebert O, Chalbot S, Alran S, Morfin R. Dehydroepiandrosterone 7 α -hydroxylation in human tissues: possible interference with type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-mediated processes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;104:326–33.
7. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy- δ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995;83:803–12.
8. Rajakariar R, Hilliard M, Lawrence T, Trivedi S, Colville-Nash P, Bellingan G, Fitzgerald D, Yaqoob MM, Gilroy DW. Hematopoietic prostaglandin D2 synthase controls the onset and resolution of acute inflammation through PGD2 and 15-deoxy- Δ^{12-14} -PGJ2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20979–84.
9. Haworth O, Buckley CD. Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20647–8.
10. Labrie F, Luuthe V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:185–212.
11. Schwarz M, Lund EG, Lathe R, Bjorkhem I, Russell DW. Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 α -hydroxylase cDNA. *J Biol Chem* 1997;272:23995–4001.
12. Rose KA, Stapleton G, Dott K, Kieny MP, Best R, Schwarz M, Russell DW, Bjorkhem I, Seckl J, Lathe R. Cyp7b, a novel brain cytochrome p450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy pregnenolone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4925–30.
13. Kim SB, Chalbot S, Pompon D, Jo DH, Morfin R. The human cytochrome P4507B1: catalytic activity studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;92:383–9.
14. Chalbot S, Morfin R. Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug Metab Dispos* 2005;33:563–9.
15. Chalbot S, Morfin R. Neurosteroids: metabolism in human intestine microsomes. *Steroids* 2005;70:319–26.
16. Trap C, Nato F, Chalbot S, Kim SB, Lafaye P, Morfin R. Immunohistochemical detection of the human cytochrome P4507B1: production of a monoclonal antibody after cDNA immunization. *J Neuroimmunol* 2005;159:41–7.
17. Jacolot F, Berthou F, Dreano Y, Bercovici JP, Floch HH. In vivo metabolism of ¹⁴C-labelled 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol. *J Steroid Biochem* 1981;14:663–9.
18. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56:387–437.
19. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004;103:147–66.
20. Topol EJ. Failing the public health – rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med* 2004;351:1707–9.
21. Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation* 2005;112:759–70.
22. Whittle BJ, Moncada S, Mullane K, Vane JR. Platelet and cardiovascular activity of the hydantoin BW245C, a potent prostaglandin analogue. *Prostaglandins* 1983;25:205–23.
23. Narumiya S, Toda N. Different responsiveness of prostaglandin D2-sensitive systems to prostaglandin D2 and its analogues. *Br J Pharmacol* 1985;85:367–75.
24. Hertz G, Seregi A. Formation and function of eicosanoids in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1989;559:84–99.
25. Liang X, Wu L, Hand T, Andreasson K. Prostaglandin D2 mediates neuronal protection via the DP1 receptor. *J Neurochem* 2005;92:477–86.
26. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82–6.
27. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79–82.
28. Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 2000;403:103–8.
29. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4844–9.
30. Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, Koufany M, Galteau MM, Netter P, Terlain B, Jouzeau JY. Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) γ agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1 β -stimulated rat chondrocytes: evidence for PPAR γ -independent inhibition by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1325–37.
31. Moulin D, Poleni PE, Kirchmeyer M, Sebillaud S, Koufany M, Netter P, Terlain B, Bianchi A, Jouzeau JY. Effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ agonists on prostaglandins cascade in joint cells. *Biorheology* 2006;43:561–75.
32. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999;5:698–701.
33. Cuzzocrea S, Ianaro A, Wayman NS, Mazzon E, Pisano B, Dugo L, Serraino I, Di Paola R, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 attenuates the development of colon injury caused by dinitrobenzene sulphonic acid in the rat. *Br J Pharmacol* 2003;138:678–88.
34. Wayman NS, Hattori Y, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Pisano B, Chatterjee PK, Thiemermann C. Ligands of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ and PPAR- α) reduce myocardial infarct size. *FASEB J* 2002;16:1027–40.
35. Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, Sano H. Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:750–5.
36. Pereira MP, Hurtado O, Cardenas A, Bosca L, Castillo J, Davalos A, Vivancos J, Serena J, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA. Rosiglitazone and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 cause potent neuroprotection after experimental stroke through non-completely overlapping mechanisms. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:218–29.
37. Ou Z, Zhao X, Labiche LA, Strong R, Grotta JC, Herrmann O, Aronowski J. Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) and 15d-prostaglandin J2-mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 2006;1096:196–203.
38. Hennebert O, Pelissier MA, Le Mee S, Wulfert E, Morfin R. Anti-inflammatory effects and changes in prostaglandin patterns induced by 7 β -hydroxy-epiandrosterone in rats with colitis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;110:255–62.
39. Le Mee S, Hennebert O, Ferrec C, Wulfert E, Morfin R. 7 β -Hydroxy-epiandrosterone-mediated regulation of the prostaglan-

- din synthesis pathway in human peripheral blood monocytes. *Steroids* 2008;73:1148–59.
40. Hennebert O, Pernelle C, Ferroud C, Morfin R. 7 α - and 7 β -hydroxy-epiandrosterone as substrates and inhibitors for the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;105:159–65.
 41. Chalbot S, Trap C, Monin JP, Morfin R. Use of bioconversion for the preparation of [4-14C]-labeled 7 α - and 7 β -hydroxylated derivatives of dehydroepiandrosterone and epiandrosterone. *Steroids* 2002;67:1121–7.
 42. Ito H, Nakano A, Kinoshita M, Matsumori A. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Lab Invest* 2003;83:1715–21.
 43. Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ , inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 2002;51:1507–14.
 44. Yue TI TL, Chen J, Bao W, Narayanan PK, Bril A, Jiang W, Lysko PG, Gu JL, Boyce R, Zimmerman DM, Hart TK, Buckingham RE, Ohlstein EH. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone. *Circulation* 2001;104:2588–94.
 45. Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Chen JJ, Liou JY, Shyue SK, Wu KK. 15d-Prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:481–7.
 46. Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist 15-deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J(2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002;168:2508–15.
 47. Zhao X, Zhang Y, Strong R, Grotta JC, Aronowski J. 15d-Prostaglandin J2 activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ , promotes expression of catalase, and reduces inflammation, behavioral dysfunction, and neuronal loss after intracerebral hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:811–20.
 48. Blanco M, Moro MA, Davalos A, Leira R, Castellanos M, Serena J, Vivancos J, Rodriguez-Yanez M, Lizasoain I, Castillo J. Increased plasma levels of 15-deoxy Δ prostaglandin J2 are associated with good outcome in acute atherothrombotic ischemic stroke. *Stroke* 2005;36:1189–94.