



HAL
open science

Impact d'une invalidation de $LXR\alpha$ sur la physiologie prostatique : un dialogue avec la signalisation androgénique

Emilie Viennois

► **To cite this version:**

Emilie Viennois. Impact d'une invalidation de $LXR\alpha$ sur la physiologie prostatique : un dialogue avec la signalisation androgénique. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22185 . tel-00841380

HAL Id: tel-00841380

<https://theses.hal.science/tel-00841380>

Submitted on 4 Jul 2013

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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 562

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires
(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement
par

Emilie VIENNOIS

le 06 Décembre 2011

**Impact d'une invalidation de LXR α sur la physiologie prostatique :
un dialogue avec la signalisation androgénique**

Président : Pr. Laurent GUY, Service d'urologie, CHU Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Pr. Frank CLAESSENS, Laboratory of Molecular Endocrinology, Leuven
Dr. Marc POIROT, INSERM U563 ICR, Toulouse

Examineurs : Dr. Hervé GUILLOU, UMR 1331 INRA, Toulouse
Dr. Jocelyn CERALINE, EA4438, Strasbourg
Dr. Silvère BARON, UMR GReD, Clermont-Fd

Directeurs de thèse : Pr. Jean-Marc LOBACCARO et Pr. Laurent MOREL, UMR GReD, Clermont-Fd

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 562

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires
(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement
par

Emilie VIENNOIS

le 06 Décembre 2011

**Impact d'une invalidation de LXR α sur la physiologie prostatique :
un dialogue avec la signalisation androgénique**

Président : Pr. Laurent GUY, Service d'urologie, CHU Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Pr. Frank CLAESSENS, Laboratory of Molecular Endocrinology, Leuven
Dr. Marc POIROT, INSERM U563 ICR, Toulouse

Examineurs : Dr. Hervé GUILLOU, UMR 1331 INRA, Toulouse
Dr. Jocelyn CERALINE, EA4438, Strasbourg
Dr. Silvère BARON, UMR GReD, Clermont-Fd

Directeurs de thèse : Pr. Jean-Marc LOBACCARO et Pr. Laurent MOREL, UMR GReD, Clermont-Fd

A Benoit

A mes Parents

Remerciements

Je remercie très sincèrement le Professeur Franck Claessens, et le Docteur Marc Poirot d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse et d'avoir consacré du temps à la lecture de ce manuscrit. Je tiens à remercier le Docteur Jocelyn Céraline et le Docteur Hervé Guillou d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse et le Professeur Laurent Guy de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement mes directeurs de thèse les Professeurs Laurent Morel et Jean-Marc Lobaccaro et mon encadrant pendant ces trois années, le Docteur Silvère Baron.

Jean-Marc, merci infiniment pour tout : merci de la confiance que tu m'as accordé pour ce projet, merci pour ton incroyable réactivité, merci pour ton optimisme à toute épreuve. Tu incarnes selon moi le chef idéal. Merci également pour ton hospitalité Rue de Luc où les barbecues et repas furent toujours conviviaux et festifs ! Et merci pour les milliers de M&M's distribués !!!

Laurent, tu comptes parmi les professeurs, qui ont su éveiller en moi un intérêt grandissant pour la biologie en général et la physiologie animale en particulier. Merci d'avoir contribué à ce à quoi je suis parvenue, merci pour tes lumières scientifiques, ta pertinence, ta gentillesse et pour les multiples discussions toujours très enrichissantes.

Silvère, merci pour ton enthousiasme sans faille et tellement important dans les moments de doute et de découragement. Merci de ne pas avoir montré tes inquiétudes quand moi j'en avais. Je sais bien que ça a pu être le cas, pour la « manip de la mort » par exemple mais nous sommes allés jusqu'au bout. Merci d'avoir su trouver les mots pour me re-booste. Merci pour ton extraordinaire optimisme. Merci d'avoir su me donner confiance. Ton dynamisme et ta passion pour la recherche sont tellement communicatifs. Merci pour ton implication et ton investissement dans ce projet et ta quête perpétuelle de la perfection : grâce à toi, j'ai appris toutes les bonnes manières de laboratoire !!!! Je suis maintenant parée pour l'avenir Papa Silvère !

Merci à tous les membres de l'équipe LXR, David, Françoise, Amalia, Hugues, Marine, Julie, Salwan. Quel plaisir d'aller en réunion avec vous.

Françoise, je te remercie de m'avoir permis de faire mes premiers vrais pas dans la recherche. Merci infiniment pour ta présence féminine de l'époque des débuts mais aussi actuelle, et enfin pour ta relecture très consciencieuse de ce manuscrit.

Pierre, je te remercie de t'être impliqué, d'avoir toujours été disponible pour discuter science et manips, et de ton aide en général pour tout un tas de petites choses qui font le quotidien d'un laboratoire. Bref, il n'est vraiment pas venu le temps où tu te reconvertiras en vendeur à la Fnac, tu manquerais bien trop au labo et à la recherche. Merci aussi à Pradeep pour la relecture de mes écrits dans la langue de Shakespeare, son aide m'a été précieuse.

Merci à Angélique pour ton aide bactériologique, Jean-Paul pour ton aide en Western et Christelle pour ton aide en histo, et merci à vous trois pour votre gentillesse.

Merci au grand George pour l'intérêt que vous avez toujours montré pour ce projet de thèse. Un jour, vous m'avez dit, qu'il s'agissait d'un « vrai » sujet de physiologie, je suis fière d'avoir pu le mener jusqu'au bout.

Georges A., je n'oublie pas ton soutien quotidien durant ma première année de thèse lorsque tu faisais encore partie de la « LXR team ». Grâce à toi, je suis devenue experte de la qPCR, j'ai pu être formée à la dissection de prostate et j'ai pu établir les lignées de MPE ! Et merci pour ton humour... heu... subtil... Mais qui m'a quand même fait beaucoup rire !

Les filles du bureau, Annabel, Coralie, Fanny, Julie, merci d'avoir partagé le quotidien, la recherche, les rires, un peu de pleurs parfois, les problèmes de manips, les potins (beaucoup), les résultats encourageants, les conseils techniques, les discussions futiles, les Kinder Bueno, M&Ms et confiseries en tout genre... Fanny, merci de m'avoir accompagné dans mes premiers pas d'enseignante ! Anna, je te remercie pour ton écoute quotidienne, et aussi pour nous avoir fait voyager (en Irlande, aux USA côte est et côte ouest) avec tes soirées photos.

Julie (alias Angelina), ma copine LXR, pendant 3 ans tu as été mon soutien au quotidien. Merci d'avoir été là, en tant que collègue, confidente, amie, alliée, colocataire de bureau et de chambre (en congrès)... Merci d'avoir été là pour partager avec moi le quotidien de la recherche, joie, peur, enthousiasme, larmes, rire (ton rire... sonore me manquera), déception, motivation, jubilation, angoisse, excitation, enfin tout autant d'émotions liées à ce travail. Merci d'avoir été présente jusqu'au bout, j'aurai aimé t'accompagner dans la dernière ligne droite. Mais ne baisse pas les bras, tu verras cette dernière année sera peut-être la plus difficile mais surtout la plus enrichissante, celle de l'aboutissement. Je te souhaite toute la réussite et le bonheur possible dans tes projets professionnels et personnels, dont je tiens à être informée depuis ma ville lointaine. Enfin, merci de nous avoir permis de travailler quotidiennement en la présence de Brad, qu'est-ce qu'il a dû nous supporter, le pauvre !

Les filles, Gaëlle et Emilie, quel plaisir de partager nos repas de 11h30... tapante ! Ah le RU, quel plaisir aussi... ou pas toujours ! Gaëlle, je te souhaite tout pleins de belles choses pour la suite, ton avenir professionnel et personnel ! Emilie, je suis heureuse de t'avoir eu comme collègue pour ma dernière année de monitorat, nous aurons bien rit n'est-ce pas ? Merci pour tes expressions farfelues qui me manqueront ! Pour avoir des news du labo, c'est vers toi que je me tournerai pour rester au cœur de l'info !

Les étudiants et post-doc, passés ou présents dans le laboratoire, Abdel, Aurélien, Cameron, Cécile, Jean-André, Jean-Jo, Jérôme, Kévin, Sabrina, Salwan, Sarah, Sylvain, Thomas P. Merci d'avoir partagé avec moi la vie de la recherche.

Aux jeunes doctorants, Rafik, Marine, Coralie, je vous souhaite toute la réussite pour cette grande aventure qu'est la thèse. Et si parfois, vous rencontrez quelques coups durs, pas trop de stress (facile à dire)... de toute façon toutes les histoires finissent bien !

Merci à tous les membres du laboratoire pour votre bonne humeur de tous les jours. Ce fut un réel plaisir de partager tout cela avec vous.

Merci à Lucie, Jenny, Jérémy et Amélie, vous êtes trop chouettes ! Merci de vous occuper de mon Ben au labo. Nous avons besoin de gens comme vous dans notre environnement professionnel et dans nos vies. Amélie, une pensée pour nos échanges de volants, rien de tel pour se défouler après le labo.

Je remercie toutes les personnes avec lesquelles nous avons collaboré, Dr. Stephane Fabre (INRA-Tours) pour les dosages de testostérone plasmatique, Christophe Chambon (INRA-St Genès-Champagnelle) pour l'analyse de spectrométrie de masse, Dr. Geoffroy Marceau pour les dosages de PSA, Christelle Blavignac et Claire Szczepaniak (CICS) pour leur assistance technique à la

l'analyse par microscopie électronique. Je remercie particulièrement le Dr. Martin Thomsen pour les 2 jours de cours intensifs de dissection/recombinaison/réimplantation de prostates embryonnaires. Cette manip est devenue celle dont je suis le plus fière.

Merci aux filles de l'animalerie, Christine et Sandrine, de vous être occupé de mes petites bêtes. Merci à Keridine, d'avoir assuré la gestion des souris Nude.

Et merci aux souris, sans elles, rien ne serait !

A mes amis, qui me sont si chers :

Elo, ta présence quotidienne a égayé mes journées. Merci d'avoir tout partagé avec moi depuis notre M2, la recherche mais aussi tout pleins d'autres choses : concerts, tartine & gourmandise (on s'en refait au moins un dernier, rien que toute les 2, promis ?), shopping, after work, soliday's, confidences, discussions futiles, soirées ciné, repas gastro (ou moins gastro...): crêpes, galettes frangipane, curry verts, cosmo... et nos longues discussions (très sérieuses) dans la voiture en bas de chez toi (moteur allumé). Elles vont me manquer. La fin de la thèse marque aussi malheureusement la fin de nos déjeunés quotidiens ensemble mais pas la fin de notre amitié. Loin des yeux mais pas du cœur !

Sandra, tu nous as manqué tu sais pendant tes 8 mois en Belgique ! Tu es revenue pour la dernière ligne droite, ça aurait été différent sans toi ! Merci d'être là ! Merci pour nos parties de fou-rire, nos virées shopping, nos soirées entre filles et nos moments de détente sportive. Merci de nous faire tant rire, notre petite tête en l'air préférée !

Merci à mes amies d'enfance, Cynthia, Mehtap, Mélodie qui ne m'auront que très peu vue durant ces années. Cynthia, encore félicitations pour tes deux petits anges Jules et Emile. J'aurai aimé venir vous voir à Dijon, le temps passe si vite. Merci d'avoir suivi mon parcours avec attention. Mélo, on se voit si peu souvent, mais je sais que l'on ne s'oublie pas, toutes nos histoires d'enfance et d'adolescence, c'est gravé. Mehtap, quel bonheur de te voir à chaque fois et ce fut si réconfortant de te savoir à Clermont pas loin de moi durant ces nombreuses années d'études.

Eric et Elo, Priscilla et Bruno, merci d'avoir partagé avec nous tous ces bons moments d'amitiés, ces joyeuses soirées, dîners et barbecues à Aydat. Eric, tu as magnifiquement ouvert la danse, merci pour cela. Elo, merci pour ta compréhension et pour t'être si bien occupé de nous quand le temps nous manquait.

Merci aux amis avec lesquels tout à commencé, Besso, Pascal, Julie...

Pascalou, merci pour le week-end en Ardèche et Besso pour le mémorable week-end à Lavoine. Que de bons moments ! Besso, je n'oublie pas ta période PCE, toujours au petit soin !

A eux qui sont là pour la vie :

Ce travail est l'aboutissement de nombreuses années d'études durant lesquelles vous n'avez cessé d'avoir confiance en moi. C'est votre soutien inconditionnel et votre amour qui m'ont permis d'aller au bout. C'est donc le moment pour moi de vous témoigner, papa et maman toute ma reconnaissance. Tout cela c'est grâce à vous !

Merci à mon petit frère, Loïc, pour ces jolis moments d'enfance. Merci d'avoir suivi avec tant d'attention mon parcours. Ceci est aussi l'occasion pour moi de te féliciter pour tes brillantes études tout juste achevées, je suis fière de toi et fière d'être ta grande sœur ! Bon courage à toi pour ta toute nouvelle entrée dans le monde des grands.

Fanny, toi qui est là depuis toujours. Tu es : mes souvenirs d'enfance, d'adolescence, de toute ma vie. Merci d'avoir toujours été présente quelque-soit les circonstances. Merci d'avoir cru en moi plus fort qu'en quiconque ! Merci pour ses moments de fou-rire et de joie, tu as été d'un tel réconfort pour moi ! Tous les moments passés avec toi sont pur bonheur : une pensée nostalgique pour nos cours à l'Atelier des Chefs (nous sommes des habituées maintenant). C'est maintenant à mon tour de te souhaiter tout l'épanouissement possible dans ton futur et magnifique métier.

Merci à Papy Paul et Mamie Dédé, Papy Gaby et Mamie Titie d'avoir suivie avec tant d'intérêt mon parcours universitaire depuis le début. Vous êtes mes piliers, mon réconfort, mon soutien, mon bonheur. Tant de souvenirs construits grâce à vous. J'aurai aimé venir vous voir plus souvent pendant ces trois années. Malheureusement cela aura compté parmi les difficiles concessions faites durant ces années de thèse.

Merci à tous mes oncles et tantes, vous m'êtes si chers : Frank tonton de Londres, Michel, Claire, Tata Odile, Jean-Claude. Merci à tata Monique, tonton Rabat, vous qui m'avez transmis tant de valeurs essentielles.

Merci à mes cousins et cousines, Mathieu, Lucas, Noémie et Sarah. Que j'ai de la chance de vous avoir.

Merci aux parents de Benoit, pour votre compréhension et votre soutien. Merci de me l'avoir laissé (ainsi qu'à la recherche). Mathieu et Karine, merci d'avoir été là, de nous avoir compris. Nous avons tellement hâte que petite princesse arrive. Merci à elle d'où elle est encore, d'avoir apporté tant de joie pendant cette période de fin de thèse.

Benoit, comment exprimer avec simplicité, l'importance que tu as eu pour moi tout au long de cette expérience. C'est ta présence quotidienne qui m'a permis d'avancer un peu plus loin chaque jour. Tu as toujours su me comprendre, me conseiller, m'épauler, me conforter dans mes choix et surtout me donner confiance en moi. Ce fut un bonheur de partager la vie d'un thésard comme toi. Tout a commencé avec toi, a été réalisé à tes côtés et continuera avec toi. Merci pour tout cela et bien plus encore.

Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès ou conférence avec comité de lecture :

28^{ème} congrès de la société française d'endocrinologie, Clermont-Fd, Octobre 2011 :
Le récepteur nucléaire LXR alpha régule l'activité du récepteur des androgènes dans la prostate.

1^{ères} Journées régionales en cancérologie, Clermont-Fd, Janvier 2011 :
Physiopathologie de la prostate : un dialogue entre les androgènes et LXR.

Androgens 2010, Leuven, Belgique, Novembre 2010 :
Androgens and Liver-X-Receptor interact in prostate.

5^{ème} Journée scientifique du CLARA, Lyon, Mars 2010 :
Physiology and pathology of the prostate: Androgen receptor and liver-X-receptor interactions.

Communications affichées :

EMBO Nuclear Receptor, Barcelone, Espagne, septembre 2011 :
Liver-X-Receptor α and Androgen Receptor are connected in vivo in prostate.
Viennois E, Pommier A, Dufour J, Caira F, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A

9^e world congress on urological research, Innsbruck, Autriche, Septembre 2011 :
Liver-X-Receptor α modulates Androgen Receptor activity in prostate in vivo.
Viennois E, Pommier A, Dufour J, Caira F, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A.

6^{ème} Journée scientifique du CLARA. Lyon, Mars 2011 :
Liver-X-Receptor modulates AR activity in prostate.
Viennois E, Pommier A, Alves G, Dufour J, Caira F, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A.

Androgens 2010, Leuven, Belgique, Novembre 2010 :
Androgen and Liver-X-receptors interact in prostate
Viennois E, Pommier A, Alves G, Dufour J, Caira F, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A.

3^{ème} Journée scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Fd, Novembre 2010 :
Androgens and Liver-X-receptors interact to maintain prostate integrity.
Viennois E, Pommier A, Alves G, Dufour J, Caira F, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A.

Journées de L'Ecole Doctorale, Clermont-Fd, Mai 2010 :
Physiopathologie de la glande prostatique : interaction entre le récepteur des androgènes et les récepteurs des oxystérols.
Viennois E, Pommier A, Alves G, Dufour J, Caira F, Fabre F, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A.

5^{ème} Journée scientifique du CLARA, Lyon, Mars 2010.
Physiology and pathology of the prostate: Androgen receptor and liver-X-receptor interactions.
Viennois E, Pommier A, Alves G, Dufour J, Caira F, Fabre S, Baron S, Morel L, Lobaccaro JM.A.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles publiés ou en cours de publication :

Viennois E. *et al.*

LXR α regulates androgen response in prostate epithelium. En préparation. **(Article 1)**

Les articles suivants sont présentés en annexe :

Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JM.A.

Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2011 Feb;15(2):219-32. Review **(Article 2)**

Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM.A., Baron S.

Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? Molecular and Cellular Endocrinology. 2011 Sep 1. Review **(Article 3)**

Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM.A.

Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. Oncogene. 2010 May 6;29(18): 2712-23. **(Article 4)**

Pommier AJ, Dufour J, Alves G, Viennois E, Trousson A, Volle D, Caira F, Val P, Manin M, Arnaud P, Lobaccaro JM.A and Baron S.

*Diet-induced intracellular cholesterol overload initiates prostate cancer development in *lxr*^{-/-} mice.* En préparation. **(Article 5)**

El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, Caira F, Drevet JR, Volle DH, Baron S, Saez F, Lobaccaro JM.A.

Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. Biochimica et Biophysica Acta. 2011 Aug; 1812(8): 974-81. Review **(Article 6)**

Mouzat K, Alves G, Pommier A, Viennois E, Pihen T, Caira F, Baron S, A Lobaccaro JM.A.

Rôles des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction. Médecine Science. 2009 Feb;25(2): 141-4. Review **(Article 7)**

Résumé

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est une pathologie qui affecte 50% des hommes dès l'âge de 60 ans et qui conduit à des troubles de la miction. L'HBP se caractérise par une hypertrophie exclusive ou composite de plusieurs compartiments tissulaires de la prostate que sont l'épithélium, le stroma et les fibres musculaires qui définissent respectivement les composantes glandulaire, fibreuse et musculaire de cette pathologie. Il a récemment été montré que les souris dépourvues en récepteurs nucléaires LXR (*Liver-X-receptor*) α (souris *lxra*^{-/-}) développent une hypertrophie de la prostate dont les signes histologiques évoquent une HBP de type fibreuse. Par ailleurs, un des traitements de l'HBP, vise à éteindre la signalisation androgénique en inhibant la conversion de la testostérone en son métabolite actif, la dihydrotestostérone (DHT). Le phénotype d'hypertrophie de la prostate pourrait donc également s'expliquer par une altération de la signalisation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-}.

Dans ce contexte, notre projet de recherche a été centré sur l'étude du rôle des LXR dans l'apparition de l'HBP dans sa composante glandulaire et l'analyse des relations moléculaires associant les signalisations dépendantes de LXR α et du récepteur des androgènes (AR) au sein de la prostate.

Le phénotype d'HBP observé dans les souris *lxra*^{-/-} résulte d'altérations importantes de l'homéostasie de l'épithélium qui miment la composante glandulaire : 1) une activité sécrétoire accrue ; 2) une altération des processus de sécrétion associée à une altération de l'expression des gènes codant des protéines du transport vésiculaire ; 3) une réponse altérée de certains gènes androgéno-dépendants associée à une hypersensibilité aux androgènes ; 4) des modifications du réseau paracrine reliant le stroma et l'épithélium.

Au final, ces travaux définissent LXR α comme un acteur clé de l'homéostasie prostatique et ouvrent des pistes intéressantes pour la compréhension de l'étiologie de l'HBP chez l'homme. Ces résultats montrent qu'il est possible de moduler la réponse androgénique de la prostate en ciblant LXR α . Ainsi, à plus long terme, l'activation pharmacologique de LXR α constitue une piste potentielle dans le traitement de l'HBP.

Mot clés : Prostate, androgènes, LXR, Hypertrophie bénigne de la prostate, SBP

Abstract

Benign prostate hyperplasia (BPH) is a very common prostatic disorder that affects 50% of men after 60 years. In BPH, prostate enlargement causes urinary disorders. BPH is characterized by a hypertrophy of several tissue compartments such as the epithelium, stroma and/or muscle fibers. Hence, three main forms of BPH have been described: glandular, fibrous and muscular form. It has been recently shown that LXR (Liver-X-receptor) α (*lxra*^{-/-}) mice develop a prostate enlargement with histological signs of fibrous BPH. Inhibition of testosterone conversion into DHT is one the most effective pharmacological treatment of BPH. Thus, the *lxra*^{-/-} prostate phenotype could be in part due to an alteration of androgen signaling.

In this context, the aim of this work was to study the role of LXR in glandular BPH development and to understand the relationships between LXR α and the androgen receptor (AR) dependent signaling pathway in prostate.

The prostate enlargement observed in *lxra*^{-/-} mice results from major alterations in epithelium homeostasis mimicking the glandular alteration of BPH: 1) increase of secretory activity; 2) alteration of the secretory process associated with altered expression of vesicular transport protein encoding genes; 3) a disruption in the response of androgen-dependent genes associated with androgen hypersensitivity; 4) changes in the paracrine network between stroma and epithelium.

Finally, this work defines LXR α as a key player in prostate homeostasis and opens interesting way to the understanding of BPH etiology. These results show that targeting LXR α modulate the prostate androgenic response. Thus, pharmacological activation of LXR α could constitute a new option for the treatment of BPH.

Key words : Prostate, androgens, LXR, Benign prostatic hypertrophy, SBP

Abréviations

3 β -HSD	<i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
17 β -HSD	<i>17β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
ABC	<i>ATP binding cassettes</i>
ACC	<i>acetyl CoA carboxylase</i>
ACPP	<i>acid phosphatase, prostate</i>
ACTH	<i>adreno corticotropic hormone</i>
AMH	<i>anti-mullerian hormone</i>
AMPc	<i>adenosine monophosphate cyclique</i>
AR	<i>androgen receptor</i>
ARA	<i>AR-associated protein</i>
ARE	<i>androgen response element</i>
ARKO	<i>androgen receptor knock-out</i>
ASC-2	<i>activating signal cointegrator-2</i>
AF	<i>activating Function</i>
bFGF	<i>basic FGF</i>
bHLH-Zip	<i>basic helix-loop-helix-leucine zipper</i>
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CBP	<i>CREB-binding-protein</i>
CDCA	<i>acide chénodéoxycholique</i>
ChREBP	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
COX-2	<i>cyclooxygenase-2</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRPC	<i>castrate-resistant prostate cancer</i>
CYP11A1	<i>cytochrome P450, family 11, subfamily A, polyprotein 1</i>
DAG	<i>diacylglycérol</i>
DAX1	<i>dosage-sensitive adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1</i>
DBD	<i>DNA-Binding Domain</i>
DHEA	<i>déhydroépiandrostérone</i>
DHT	<i>dihydrotestostérone</i>
DII1	<i>delta-like ligand</i>
DR	<i>direct repeat</i>
E2	<i>œstradiol</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	<i>estrogen receptor</i>
ECBU	<i>Examen cyto-bactériologique des urines</i>
ELK-1	<i>E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
F1-6B	<i>fructose-1,6-biphosphatase</i>
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FF-MAS	<i>follicular fluid meiosis activating sterol</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FOX	<i>forkhead box</i>
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>
G6P	<i>glucose-6-phosphatase</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GLUT-4	<i>glucose transporter type 4</i>

GnRH	<i>gonadotropin Releasing Hormone</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GR	<i>glucocorticoid receptor</i>
GRP78	<i>glucose-regulated protein 78 kDa</i>
HAT	<i>histone acetyl-transferase</i>
HBP	<i>Hypertrophie Bénigne de la Prostate</i>
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
Hes1	<i>hairy-enhancer of spli</i>
HNF	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
HMGCoA	<i>hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A</i>
HPC1	<i>hereditary prostate cancer 1</i>
HSP	<i>heat shock protein</i>
IDOL	<i>inducible degrader of LDLR</i>
IFN γ	<i>interféron γ</i>
IGF	<i>insulin growth factor</i>
IHH	<i>indian hedgehog</i>
IL-2	<i>interleukine-2</i>
IMC	<i>indice de masse corporelle</i>
iNOS	<i>nitric oxide synthase</i>
IP3	<i>inositol triphosphate</i>
IPSS	<i>International prostate symptom scale</i>
IR	<i>inverted repeat</i>
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i>
KLK3	<i>kallikrein 3</i>
LBD	<i>ligand-binding domain</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>ldl receptor</i>
LH	<i>luteinizing hormone</i>
L-PK	<i>liver-pyruvate kinase</i>
LUTS	<i>low urinary tract symptoms</i>
LXR	<i>liver-X-receptor</i>
LXRE	<i>lxr-response element</i>
MAP-Kinases	<i>mitogen activated kinase</i>
MMP-9	<i>matrix metalloproteinase 9</i>
MR	<i>mineralocorticoid receptor</i>
MSMB	<i>beta-microseminoprotein</i>
N-Cor	<i>nuclear Receptor Co-Repressor</i>
NF κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
Nkx3.1	<i>NK homeobox3.1</i>
NLS	<i>nuclear localization site</i>
P450c17	<i>cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20 lyase</i>
P450scc	<i>P450 side-chain cleavage</i>
p/CAF	<i>P300/CBP-associated factor</i>
PEPCK	<i>phospho-enolpyruvate-carboxykinase</i>
PI3-Kinase	<i>phosphoinositid-3-OH kinase</i>
PIN	<i>prostatic intraepithelial neoplasia</i>

PKA	protéine kinase A
PLCO	<i>prostate, lung, colorectal, and ovarian</i>
PR	<i>progesterone receptor</i>
PRDX6	<i>peroxiredoxin 6</i>
PSA	<i>prostate specific antigen</i>
PSP94	<i>prostate secretory protein of 94 amino acids</i>
PTC	<i>patched</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
RXR	<i>retinoid-X-receptor</i>
SBP	<i>spermine-binding protein</i>
SCD1	<i>stearoyl-CoA desaturase1</i>
S-DHEA	sulfate de DHEA
SELECT	<i>the selenium and vitamin E cancer prevention trial</i>
SERM	<i>selective estrogen receptor modulators</i>
SF1	<i>steroidogenic factor 1</i>
SHBG	<i>sex hormone binding globulin</i>
SHP	<i>short heterodimeric partner</i>
SM22 α	<i>smooth muscle 22α</i>
SMO	<i>smoothened</i>
SMRT	<i>silencing mediator for RAR and TR</i>
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
SOX9	<i>sex determining region Y, box9</i>
SPI-KT3	<i>serine protease inhibitor kazaltype-3</i>
SPP1	<i>secreted phosphoprotein-1</i>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator-1</i>
SREBP1C	<i>sterol response element binding protein</i>
SRY	<i>sex determining region Y</i>
STAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
STS	<i>steroid sulfatase</i>
SULT	sulfotransférase
SULT2A1	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1</i>
SVS	<i>seminal vesicle secretion</i>
SYNPR1	<i>synaptoporin 1</i>
SYT12	<i>synaptotagmin 12</i>
TeBG	<i>testosterone binding-globulin</i>
TFM	<i>testicular feminized mouse</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
UGE	<i>urogenital sinus epithelium</i>
UGM	<i>urogenital sinus mesenchyme</i>
UGS	<i>urogenital sinus</i>
UDP	<i>uridine diphosphate</i>
UGT	<i>UDP glycosyltransferase</i>
UGT2B15	<i>UGT 2 family, polypeptide B15</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Sommaire

Sommaire	1
Introduction bibliographique	6
I. <u>La prostate physiologique et pathologique</u>	7
A. La glande prostatique.....	7
1. <i>Structure anatomique et fonction</i>	7
2. <i>Morphogenèse</i>	8
a. Les étapes du développement de la prostate	8
b. Régulation hormonale de la morphogenèse prostatique	8
(i) Les androgènes dans le développement de la prostate	8
(ii) Le rôle des interactions épithélium-mésenchyme et des androgènes dans le développement prostatique.....	9
(iii) Les autres stéroïdes et les rétinoïdes	10
c. Les gènes du développement	10
(i) Les gènes homéotiques (Hox).....	11
(ii) Les facteurs de transcription	11
(iii) Les molécules de signalisation sécrétées	13
B. Pathologies prostatiques.....	17
1. <i>Prostatites</i>	17
2. <i>Le cancer</i>	17
a. Epidémiologie et facteurs de risques	17
(i) L'âge.....	18
(ii) L'appartenance ethnique.....	18
(iii) Les antécédents familiaux	18
(iv) L'alimentation.....	18
(v) Les hormones.....	19
b. Les différents stades d'évolution du cancer	19
c. Diagnostic et traitements	20
3. <i>Hypertrophie bénigne de la prostate</i>	21
a. Epidémiologie et facteurs de risques	21
(i) L'âge.....	21
(ii) La génétique	21

(iii) Les hormones.....	22
(iv) Les désordres métaboliques et/ou le style de vie	22
(v) L'inflammation.....	23
b. Histologie de l'HBP.....	24
c. Symptômes et diagnostic.....	24
d. Traitements.....	25
II. <u>Les récepteurs nucléaires</u>	26
A. Introduction.....	26
1. Généralités sur les récepteurs nucléaires	26
2. Structure des récepteurs nucléaires	27
3. Mécanismes d'action	28
a. Mode d'action du récepteur des androgènes	28
(i) Mode d'action génomique du récepteur des androgènes	28
(ii) Mode d'action non génomique	29
b. Mode d'action de LXR.....	31
B. Le récepteur des androgènes (AR)	33
1. Les ligands du récepteur des androgènes	33
a. Les androgènes	33
b. Les anti-androgènes.....	33
2. Biosynthèse des androgènes	34
3. Métabolisme des androgènes	35
a. Testostérone et activité pro-hormonale	35
(i) La transformation en DHT	36
(ii) La transformation en 17 β -œstradiol	36
b. Le catabolisme de la testostérone.....	36
4. Contrôle de la stéroïdogénèse par l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	37
5. Fonctions physiologiques des androgènes	38
a. Les androgènes, la différenciation et le maintien du tractus génital mâle	38
(i) Déterminisme et différenciation sexuelle	38
(ii) La puberté.....	39
(iii) Le maintien de la fonction du tractus génital mâle.....	40

b. Les androgènes et la physiologie musculaire	40
c. Les androgènes et la physiologie osseuse	41
d. Les androgènes et le métabolisme du tissu adipeux.....	41
e. Les androgènes et la masculinisation du cerveau	42
f. Une « ménopause » chez l'homme ?.....	42
C. Les androgènes dans la prostate.....	44
1. <i>Les androgènes dans la physiologie de la prostate adulte</i>	44
a. Histoire de la découverte des androgènes dans la prostate	44
b. Les androgènes et le maintien de l'épithélium prostatique.....	44
(i) Les androgènes et maintien de l'épithélium différencié	44
(ii) L'apoptose prostatique : importance des interactions épithélium- mésenchyme.....	45
c. Les protéines sécrétées par l'épithélium prostatique	46
2. <i>Les androgènes dans la prostate pathologique</i>	48
a. Les androgènes et le cancer de la prostate	48
(i) Les androgènes et la carcinogenèse prostatique	48
(ii) Les androgènes et AR dans le cancer androgéno-indépendant	49
(iii) Influence des interactions épithélium-mésenchyme sur la carcinogenèse prostatique	49
b. Les androgènes et l'hypertrophie bénigne de la prostate.....	50
(i) Les androgènes tissulaires et l'HBP	50
(ii) L'hypothèse de McNeal : le stroma dans le développement de l'HBP.....	51
D. Les récepteurs des oxystéroïdes : les LXR	52
1. <i>Généralités</i>	52
2. <i>Ligands</i>	52
a. Les ligands agonistes naturels	52
b. Les ligands agonistes synthétiques.....	53
c. Les ligands antagonistes	54
3. <i>Fonctions physiologiques</i>	55
a. LXR et métabolisme des lipides	55
(i) Régulation de l'homéostasie du cholestérol	55
(ii) LXR et métabolisme des acides gras.....	57

b. LXR et métabolisme du glucose	57
c. LXR et contrôle de la stéroïdogenèse	58
d. LXR et immunité	58
4. <i>Utilisation des LXR comme cibles thérapeutiques</i>	59
a. LXR et athérosclérose	59
b. LXR et diabète	60
c. LXR et maladie d'Alzheimer	61
d. LXR et cancer	62
(i) LXR et cancer du sein	62
(ii) LXR et cancer du côlon.....	62
E. LXR dans la prostate	63
1. <i>LXR et cancer de la prostate</i>	63
2. <i>LXR et hypertrophie bénigne de la prostate</i>	64
III. <u>Présentation du projet de recherche</u>	65
Résultats.....	68
Article 1 : <i>LXRα regulates androgen response in prostate epithelium</i>	70
Résultats complémentaires	72
Discussion et perspectives	76
I. Les lobes ventraux sont-ils les seules zones de la prostate murine capables de développer une HBP ?	77
II. Les prostatites des souris <i>lxra</i> ^{-/-} présentent-elles des altérations de la composante musculaire ?	78
III. Quelle est la nature des relations associant les signalisations LXR et AR ?	79
IV. Le phénotype des souris <i>lxra</i> ^{-/-} est-il prédéterminé dès l'embryogenèse ou s'acquiert-il à l'âge adulte ?	83
V. Peut-on lier les modifications du trafic vésiculaire à des changements du contenu de la cellule en cholestérol ?	84
VI. LXR est-il impliqué dans l'étiologie de l'HBP chez l'homme ?	85
Annexes.....	87
Références bibliographiques.....	94

Introduction bibliographique

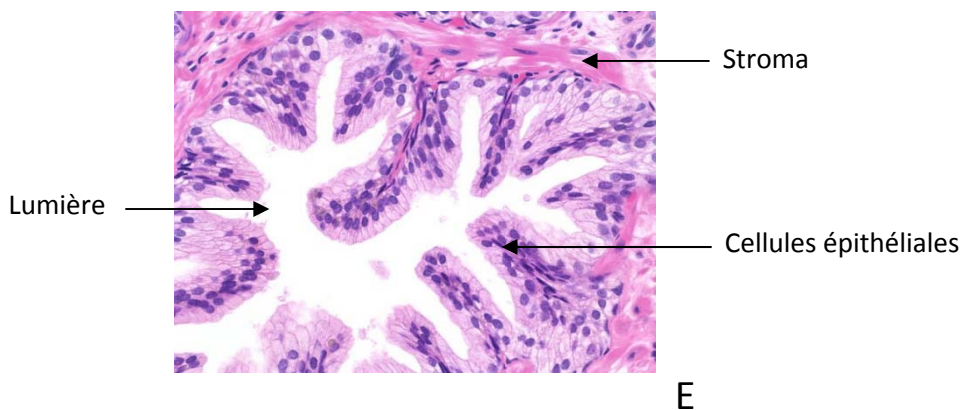
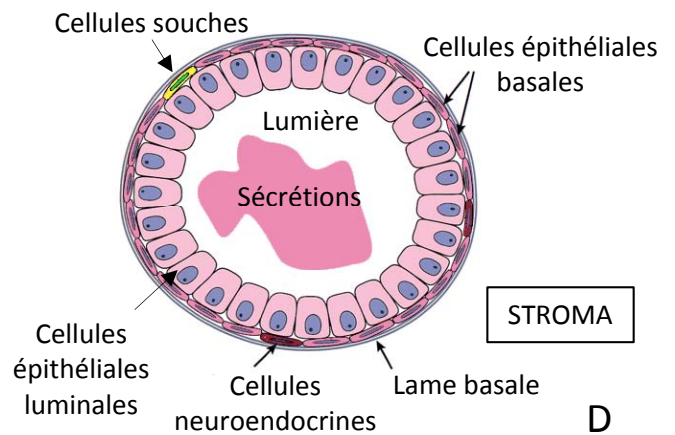
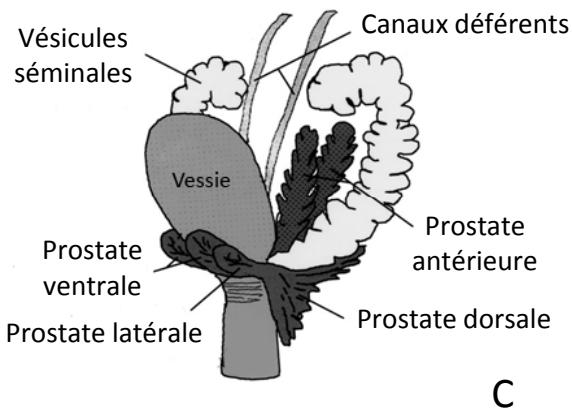
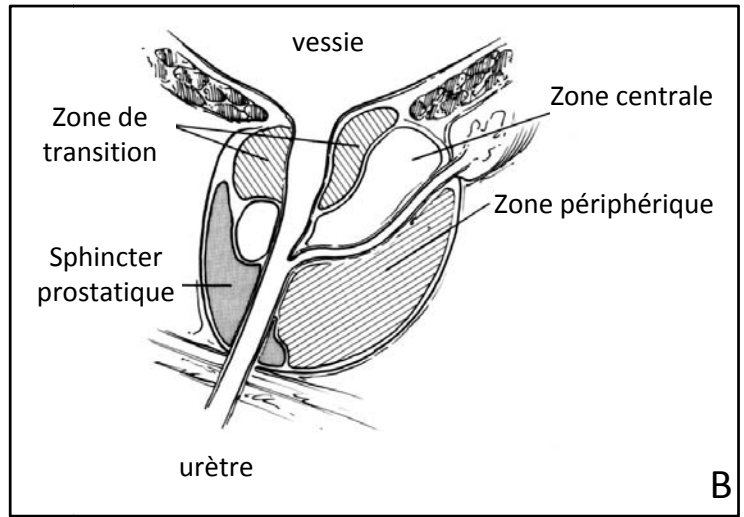
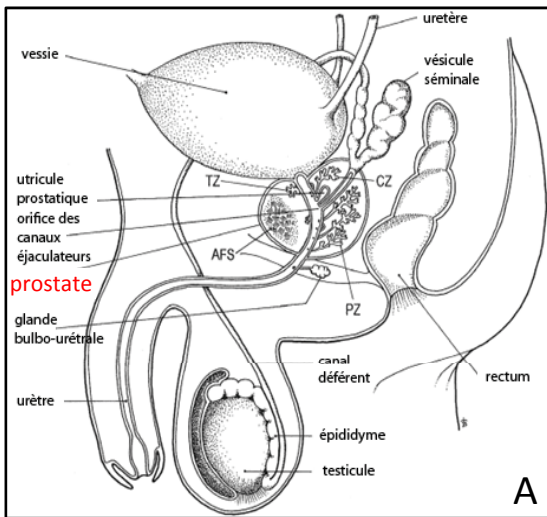


Figure 1 : Anatomie et histologie de la prostate murine et humaine

A, Localisation de la prostate au sein de l'appareil génital masculin. Modifiée d'après Abath-Shen et Shen, 2000.
 B, Vue longitudinale de prostate humaine et régionalisation. Modifiée d'après Abath-Shen et Shen, 2000.
 C, Localisation des différents lobes de la prostate murine. D, Représentation d'un acinus et des différents types cellulaires qui le composent. Modifiée d'après Abath-Shen et Shen, 2000. E, Photographie histologique d'une glande prostatique humaine. <http://webpathology.com/>

I. La prostate physiologique et pathologique

A. La glande prostatique

1. *Structure anatomique et fonction*

La prostate est une glande de l'appareil génital masculin formée d'une masse unique encapsulée, située autour de l'urètre à la base de la vessie et de la taille d'une noix de 15 à 25 g à l'âge adulte (**Figure 1A**). La prostate humaine n'est cependant pas homogène puisqu'il est possible de distinguer trois zones : une zone périphérique, une zone centrale et une zone transitoire (**Figure 1B**). Chez certains rongeurs comme la souris ou le rat, la prostate est divisée en quatre lobes anatomiquement distincts présents chacun en deux exemplaires : les lobes ventraux, dorsaux, latéraux et antérieurs (**Figure 1C**). Malgré ces différences anatomiques, la prostate chez l'homme ou la souris sont proches d'un point de vue histologique. La prostate se compose d'un ensemble de lobules exocrines, ou acini, dont les sécrétions sont drainées vers l'urètre par de multiples conduits. Ces unités fonctionnelles sont composées d'un épithélium glandulaire reposant sur une lame basale et maintenues par un stroma fibro-musculaire. Dans chaque unité glandulaire on distingue une couche de cellules épithéliales luminales sécrétrices directement en contact avec la lumière des canaux. Ces cellules reposent sur une couche de cellules épithéliales basales entrecoupées de cellules souches ou plus rarement de cellules neuro-endocrines. Ces différentes couches de cellules reposent sur une lame basale qui délimite un acinus (**Figure 1D-E**). Les acini sont entourés d'un stroma fibro-musculaire composé de cellules de type fibroblastique produisant et sécrétant, en réponse aux androgènes, des facteurs de croissance comme l'IGF (*Insulin growth factor*), l'EGF (*Epidermal growth factor*), le FGF (*Fibroblast growth factor*) ou le TGF β (*Transforming growth factor β*) qui vont agir de façon paracrine sur les cellules épithéliales et en stimuler la prolifération et la différenciation en cellules épithéliales luminales sécrétrices (Chung, 1995). Le stroma comporte également des cellules musculaires lisses qui permettent la contraction de la glande et la progression du fluide prostatique.

La principale fonction de la prostate est la production et la sécrétion par les cellules épithéliales sécrétrices du fluide prostatique qui entre dans la composition du sperme. Le fluide prostatique contient notamment des prostasomes, petites vésicules lipidiques qui favorisent la motilité des spermatozoïdes et ayant des actions immunosuppressives et anti-oxydantes (Fabiani et al., 1994, Kelly, 1999, Saez et al., 2000, Stegmayr and Ronquist, 1982). Les sécrétions prostatiques sont associées avec le liquide séminal produit par les vésicules séminales pour former la première fraction de l'éjaculat. Ce fluide jouerait un rôle protecteur sur les spermatozoïdes en favorisant leur survie et leur pouvoir fécondant dans les voies génitales femelles ou en les protégeant contre les agents pathogènes (Sitaram and Nagaraj, 1995). Des protéines régulées par les androgènes comme les kallikréines, dont KLK3 (Kallikrein 3) plus connue sous le nom de PSA (*prostate specific antigen*), sont retrouvées dans le fluide prostatique. La PSA est en partie responsable de la liquéfaction du sperme grâce à une protéolyse des protéines séménogelines I et II et de

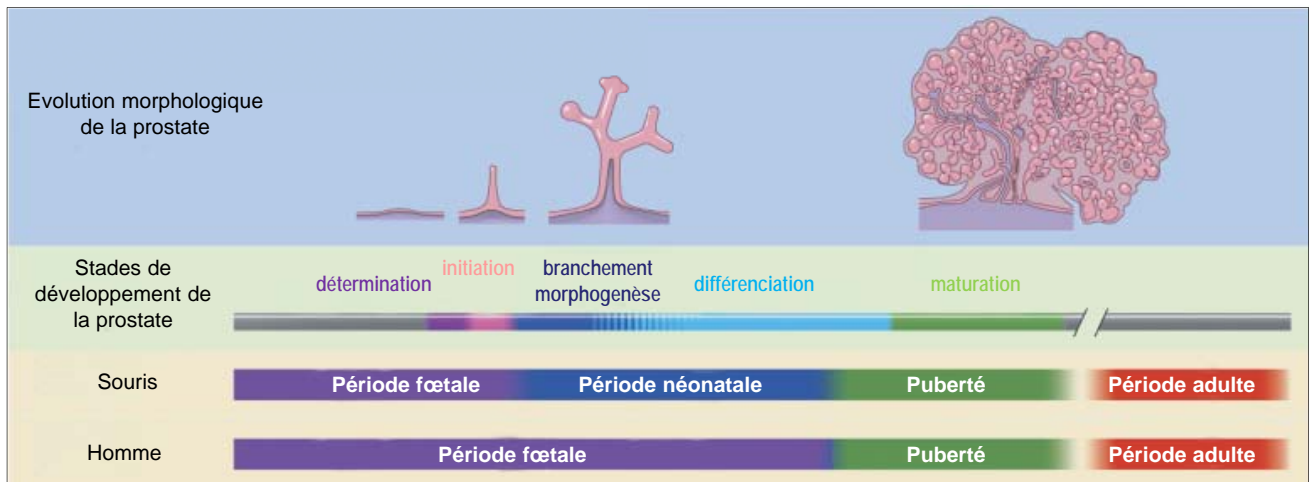


Figure 2: Morphogénèse de la prostate: cinétique d'évolution comparée chez l'homme et la souris

Les différents stades développementaux de la prostate sont représentés au cours de la morphogénèse de la prostate chez la souris depuis la période foetale jusqu'à l'âge adulte. La détermination s'effectue au stade foetal, le bourgeonnement à la naissance et la morphogénèse des branches a lieu en période néonatale. Enfin, à la puberté, la maturation de la prostate se termine grâce à l'augmentation des taux d'androgènes circulants. D'après Prins et Putz, 2008.

la fibronectine. Le PSA également retrouvé au niveau plasmatique représente un outil diagnostique majeur du cancer de la prostate puisque des taux élevés témoignent d'un dérèglement de la fonction prostatique (Stephan et al., 2007).

2. Morphogenèse

a. Les étapes du développement de la prostate

Contrairement aux autres tissus du tractus génital mâle dont le développement embryonnaire se fait à partir des canaux de Wolff d'origine mésodermique, la prostate dérive du sinus urogénital (UGS, *urogenital sinus*) d'origine endodermique. Le développement de la prostate est un phénomène qui se déroule selon les cinq étapes suivantes : la détermination, l'initiation et le bourgeonnement, la morphogenèse des branches, la différenciation et la maturation à la puberté (**Figure 2**) (Prins and Putz, 2008). Chez l'homme ce processus se déroule chez le fœtus pendant les second et troisième trimestres de grossesse pour se terminer au moment de la naissance (Prins and Putz, 2008). Chez les rongeurs comme la souris, la prostate est rudimentaire à la naissance et le développement se poursuit pendant les quinze jours post-nataux. L'excroissance des bourgeons épithéliaux s'effectue entre les 16^{ème} et 19^{ème} jours fœtaux (Sugimura et al., 1986). A la naissance, les lobes ventraux, dorsaux, et latéraux sont à l'état de bourgeons encore non branchés. La morphogenèse des branches débute une fois que les bourgeons épithéliaux entrent en contact avec le mésenchyme en périphérie du muscle lisse péri-urétral. La différenciation des cellules épithéliales et mésenchymateuses est coordonnée avec la morphogenèse des branches et s'oriente de façon proximo-distale (Hayward et al., 1996, Hayward et al., 1996).

b. Régulation hormonale de la morphogenèse prostatique

(i) Les androgènes dans le développement de la prostate

La détermination et l'initiation du développement prostatique aussi bien chez le fœtus humain que murin sont entièrement dépendantes des androgènes produits par les testicules fœtaux. Chez la souris, les cellules de Leydig fœtales produisent des androgènes dès 14,5 jours (à la 8^{ème} semaine de gestation pour le fœtus humain). Chez les rongeurs, la castration chirurgicale ou chimique visant à bloquer l'action des androgènes inhibe le développement de la prostate. Cunha *et al.* ont montré que des cultures *in vitro* d'explants d'UGS issus d'embryons de souris de 12 à 13 jours, dans un milieu dépourvu d'androgènes ne permettaient pas le bourgeonnement prostatique en culture (Cunha, 1973). En revanche, lorsque les UGS sont prélevés sur des fœtus de 14 à 17 jours, après que la testostérone a commencé à être produite *in vivo* par les testicules de l'embryon, les explants développent des bourgeons prostatiques en absence d'androgènes (Cunha, 1973). Ces résultats indiquent que, même si les androgènes sont essentiels pour la détermination et l'initiation, les bourgeons prostatiques ayant déjà été imprégnés par les androgènes, peuvent se développer en absence d'androgènes. Les UGS semblent donc garder la « mémoire des androgènes » dont ils ont été imprégnés. Cependant, bien que des bourgeons

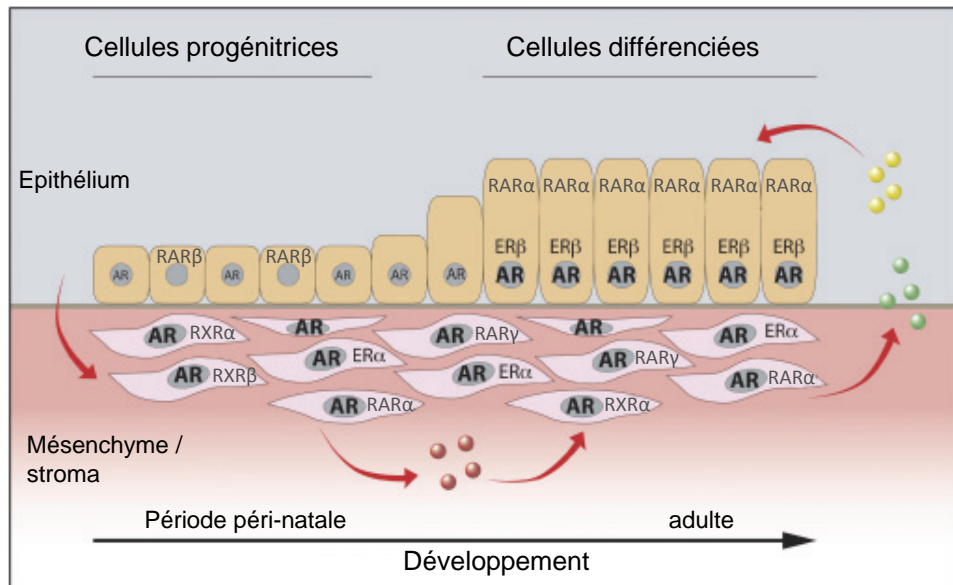


Figure 3 : Localisation et expression des récepteurs des stéroïdes et des rétinoïdes au cours du développement de la prostate murine

Au cours de la période périnatale, le récepteur des androgènes (AR) est très fortement exprimé dans les cellules du mésenchyme et absent ou très faiblement exprimé dans les cellules progénitrices du compartiment épithélial. En réponse aux androgènes, les cellules du mésenchyme produisent des facteurs paracrines ou autocrines de croissance ou de différenciation qui conduisent à la prolifération et à la différenciation des cellules épithéliales. Lorsque les cellules épithéliales sont différenciées, elles expriment fortement AR. Les cellules répondent à leur tour aux androgènes et sécrètent des facteurs paracrines qui agissent sur les cellules du mésenchyme, favorisant ainsi leur différenciation en cellules de muscle lisse. Au cours du développement, on retrouve l'expression d'autres récepteurs nucléaires tels que ERα dans le mésenchyme à des stades précoces, ERβ dans les cellules épithéliales luminales (après la différenciation), RARβ dans les cellules basales, RARα après la différenciation, et enfin RARγ, RARα, RXRα et RXRβ dans le stroma. D'après Prins et Putz, 2008.

prostatiques se forment, ces derniers ne parviennent jamais à donner une glande de taille adulte avec une cyto-différenciation complète. Ce n'est qu'en ajoutant de la testostérone *in vitro* que la croissance de l'organe peut être complète (Lipschutz et al., 1997). Ainsi, les androgènes, qui agissent selon des fenêtres d'action précises, sont indispensables pour le développement complet de la prostate.

L'androgène actif au niveau de la prostate est la dihydrotestostérone (DHT), issue de la conversion de la testostérone par l'enzyme 5 α -réductase exprimée au niveau de l'UGS dès la 9^{ème} semaine de gestation chez l'homme. L'action de la DHT a été, entre autre, démontrée *in vivo* par l'analyse de patients atteints de déficit en 5 α -réductase de type II (Imperato-McGinley et al., 1974). En plus de la présence d'un pseudohermaphrodisme masculin, ces patients se caractérisent par une atrophie de la glande prostatique (Imperato-McGinley et al., 1974). Si l'initiation du développement de la prostate est dépendante des androgènes, un récepteur des androgènes (AR) fonctionnel est également indispensable puisque les souris ARKO (*Androgen receptor knock-out*), déficientes en AR, ne développent pas de prostate (Yeh et al., 2002). En effet, l'action de la DHT, tout comme celle de la testostérone, est relayée par AR. Ce récepteur est présent dans le mésenchyme de l'UGS dès les premières étapes du développement prostatique avant la formation des bourgeons, alors que son expression dans la partie épithéliale de l'UGS n'apparaît qu'après les étapes de bourgeonnement et de morphogenèse des branches (Husmann et al., 1991, Shannon and Cunha, 1983). Ce point sera développé par la suite. Lorsque des cellules épithéliales se différencient, seules les cellules luminales expriment AR dans l'épithélium. Cette expression est maintenue dans la prostate adulte (Prins and Birch, 1995) (**figure 3**).

(ii) *Le rôle des interactions épithélium-mésenchyme et des androgènes dans le développement prostatique*

Les rôles respectifs du mésenchyme et de l'épithélium et leurs interactions ont été mis en évidence par Cunha et ses collaborateurs grâce à des expériences de recombinaisons tissulaires (Cunha, 1973). Des combinaisons ont été effectuées entre des tissus mésenchymateux et épithéliaux issus d'embryons normaux ou de souris présentant la mutation *Tfm* (*testicular feminized mouse*) au niveau de AR (Cunha and Chung, 1981), ce qui inhibe sa fonction et rend les animaux insensibles à toute stimulation androgénique. Différentes combinaisons de mésenchyme (UGM) et d'épithélia uro-génitaux (UGE) fœtaux ont été greffées sur des souris mâles ; les observations recueillies sur le développement des tissus sont répertoriées dans la **figure 4**. Ces expériences montrent que l'épithélium urogénital *Tfm* peut former des bourgeons prostatiques quand il est combiné avec un mésenchyme normal. En revanche, l'épithélium urogénital normal est incapable de former des bourgeons prostatiques quand il est combiné avec un mésenchyme *Tfm* (Cunha and Chung, 1981, Lasnitzki and Mizuno, 1980). Comme AR est exprimé dans le mésenchyme urogénital et pas dans les bourgeons épithéliaux, la signalisation androgénique des cellules épithéliales n'est pas suffisante pour le développement morphologique de la prostate alors que celle des cellules mésenchymateuses est nécessaire et suffisante. De plus, ces expériences mettent en évidence

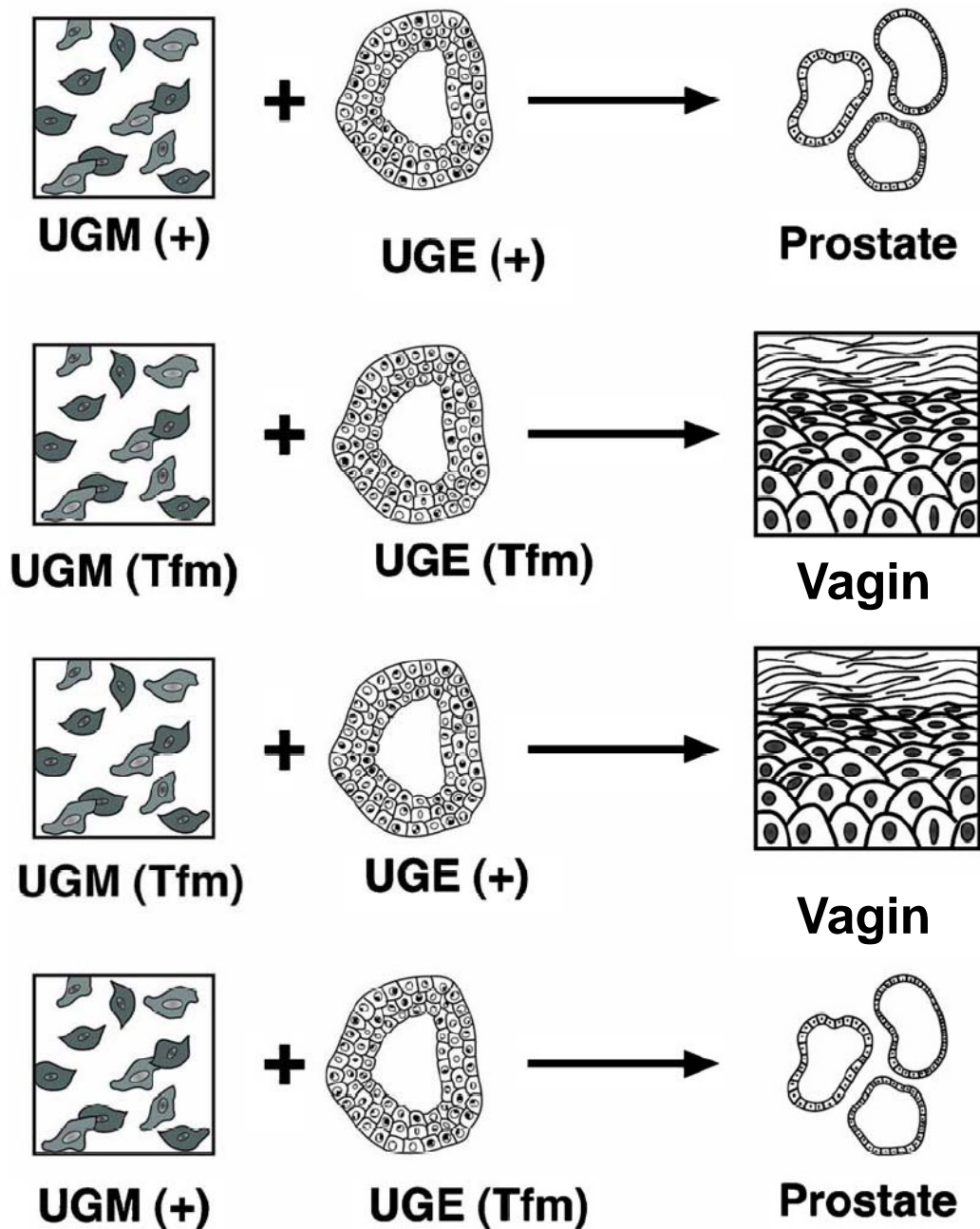


Figure 4 : Le mésenchyme est le médiateur de l'effet des androgènes sur l'épithélium au cours du développement
 Différentes combinaisons de mésenchyme (UGM) et d'épithélium (UGE) uro-génitaux provenant de souris mâles sauvages (+) ou *Tfm* (testicular feminized mouse) ont été greffées chez des souris mâles adultes. La combinaison UGM +/UGE + aboutit à la formation de tissu prostatique fonctionnel. Les combinaisons UGM *Tfm*/UGE *Tfm* et UGM *Tfm*/UGE + aboutissent au développement d'un tissu de type vaginal. La combinaison UGM +/UGE *Tfm* permet le développement morphologique de type prostatique avec formation des canaux, prolifération des cellules épithéliales et la différenciation des cellules luminales. En revanche, il n'existe pas production de marqueurs prostatiques en raison de l'absence d'un récepteur des androgènes fonctionnel au niveau de l'épithélium *Tfm*. D'après Cunha *et al.* 2004.

l'existence de facteurs paracrines synthétisés par les cellules mésenchymateuses en réponse aux androgènes qui régulent la fonction et la survie des cellules épithéliales. La signalisation androgénique dans ces cellules épithéliales intervient tardivement dans des processus de différenciation cellulaire terminaux tels que la production de molécules sécrétées et qui confèrent à l'organe sa fonction propre (Donjacour and Cunha, 1993). Le mésenchyme urogénital induit la différenciation de l'épithélium et de façon réciproque, l'épithélium prostatique induit la différenciation de l'UGM en muscle lisse. En effet, lorsque l'UGM indifférencié est greffé sous la capsule rénale de souris mâles, les greffes forment très peu de muscle lisse. En revanche, quand l'UGM est greffé avec de l'UGE, des conduits prostatiques se forment et sont entourés d'une couche de cellules de muscle lisse (Cunha et al., 1992). Ainsi, le développement de la prostate nécessite des interactions cellulaires réciproques entre le mésenchyme et l'épithélium. Le mésenchyme induit ainsi la différenciation épithéliale et l'épithélium prostatique met en place celle du muscle lisse dans le mésenchyme. Les relations stroma-épithélium qui s'exercent par l'intermédiaire de facteurs de croissance paracrines sous le contrôle des androgènes ont été mises en évidence dans la morphogenèse prostatique mais elles sont tout aussi importantes dans le maintien de l'homéostasie prostatique à l'âge adulte (Russell et al., 1998).

(iii) *Les autres stéroïdes et les rétinoïdes*

D'autres molécules de signalisation ont leur importance dans le développement de la prostate, notamment les œstrogènes et les rétinoïdes. Pendant le développement embryonnaire, les fœtus sont en contact permanent avec les œstrogènes maternels. Les œstrogènes se fixent sur leurs récepteurs spécifiques ER α et ER β (*Estrogen receptor α et β*). Les rétinoïdes se fixent quant à eux sur leur différents récepteurs RAR (*retinoic acid receptor*) ou RXR (*retinoid-X-receptor*) qui existent sous différentes isoformes, respectivement RAR α , RAR β et RAR γ et RXR α et RXR β . Ces récepteurs sont exprimés pendant le développement de la prostate dans des fenêtres de temps et des localisations cellulaires spécifiques (**Figure 3**) mais ne sont pas indispensables à la morphogenèse de la prostate (Prins and Birch, 1997, Prins et al., 1998, Prins et al., 2002). Notons par exemple que les souris invalidées pour ER α ne présentent aucune anomalie histologique de la prostate (Eddy et al., 1996). Bien que n'ayant pas une action primordiale dans la morphogenèse prostatique, ces stéroïdes modulent cependant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'homéostasie des cellules de prostate (Prins and Putz, 2008).

c. Les gènes du développement

En plus des signaux androgéniques, la combinaison spatio-temporelle de l'expression de différents gènes ainsi que leurs interactions, définissent le « code morphogénétique » permettant la différenciation des structures et des compartiments de la prostate. Ces gènes de la morphogenèse peuvent être divisés en trois catégories : (i) les gènes homéotiques tels que *hoxa13*, *hoxd13* ou *hoxb13*, (ii) les facteurs de transcription tels que *Nkx3.1* (*NK homeobox3.1*), *FoxA1-A2* ou *Notch1/delta/jagged* et

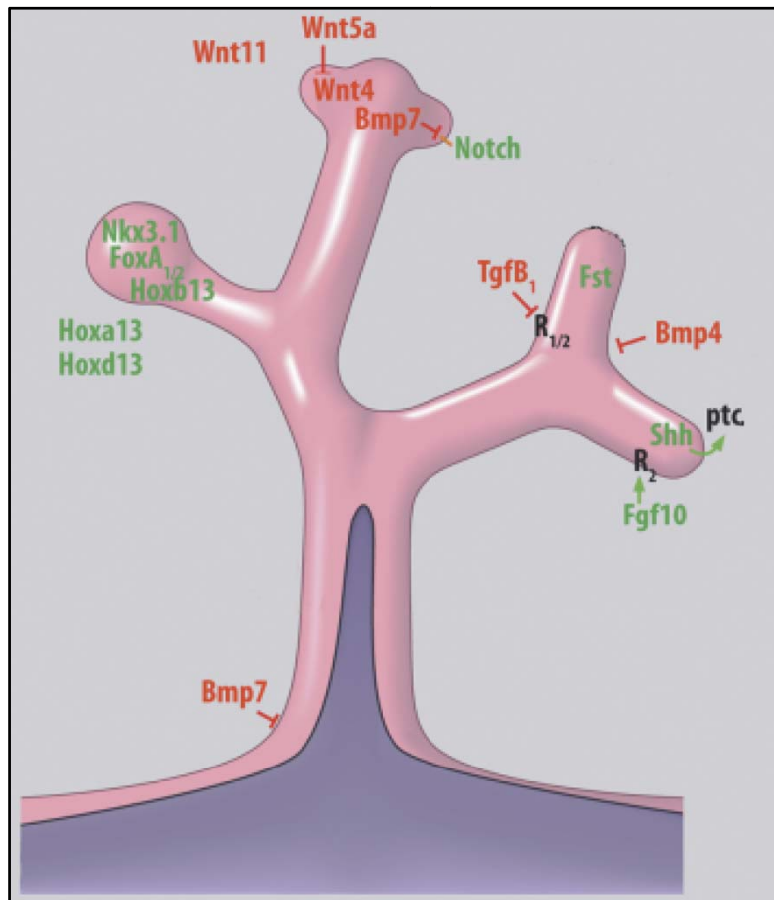


Figure 5 : Schéma récapitulatif de l'action des acteurs régulant la morphogénèse prostatique

Modèle schématique de l'élongation et du branchement des canaux prostatiques montrant la localisation de plusieurs facteurs de transcription, des facteurs morphogènes sécrétés et de leurs récepteurs respectifs. Les facteurs en vert montrent une action stimulatrice et à l'inverse, en rouge sont représentés les facteurs inhibiteurs. Les flèches symbolisent une action paracrine depuis le mésenchyme ou l'épithélium en direction des morphogènes sécrétés. Les flèches brisées symbolisent une inhibition. D'après Prins et Putz, 2008.

(iii) les ligands de signalisation sécrétés qui sont codés par une des familles multigéniques très conservées telles que *Hedgehogs*, *Wnt*, *Fgfs* et *Bmp/Tgf β /Activin* (Hogan, 1999). Les actions de ces différents morphogènes sur le développement prostatique sont représentées en **figure 5**.

(i) *Les gènes homéotiques (Hox)*

Chez les mammifères, la duplication des gènes a donné lieu à la formation de quatre *clusters* de gènes *Hox* (A, B, C et D) représentant au total 39 gènes portés par des chromosomes séparés (Krumlauf, 1994). La position de ces gènes de 3' en 5' de chaque *cluster* définit un profil d'expression spatio-temporelle dans l'embryon. On parle de la colinéarité des gènes *Hox*. Ainsi, les gènes à l'extrémité 3' du *cluster* sont exprimés en premier et participent à l'élaboration des structures antérieures alors que les gènes à l'extrémité 5' sont exprimés en dernier et participent à l'élaboration des structures postérieures. Comme la prostate est l'un des organes les plus postérieurs de l'embryon mâle, ce sont les gènes *Hox* positionnés en 5' du cluster, à savoir *Hoxa13*, *Hoxb13* et *Hoxd13*, qui sont impliqués dans l'identité de la prostate. *Hoxa13* et *Hoxd13* ont des profils d'expression similaires dans la prostate en développement et sont supposés avoir des fonctions redondantes. L'inactivation de *Hoxa13* et *Hoxd13* chez la souris a permis de montrer leurs rôles respectifs dans la croissance de la prostate et dans la croissance et la morphogenèse des branches (Podlasek et al., 1997, Podlasek et al., 1999). *Hoxa13* et *Hoxd13*, principalement retrouvés dans le compartiment mésenchymateux, sont majoritairement exprimés pendant la vie fœtale et voient leur expression diminuer après la naissance. Contrairement à ses paralogues A et D, *Hoxb13* est retrouvé exclusivement dans le compartiment épithélial de l'UGS et permet sa différenciation. En effet, les souris déficientes pour *Hoxb13* n'expriment plus les gènes codant les protéines sécrétées et les cellules épithéliales perdent leur polarité (Economides and Capecchi, 2003). Dans la prostate en développement les gènes *Hoxa13*, *Hoxd13* et *Hoxb13* sont stimulés par les androgènes spécifiquement dans le lobe ventral. La régulation androgénique des gènes *Hox* contribue à la morphogenèse de la prostate et au maintien de la différenciation de l'épithélium (Huang et al., 2007). Dans les autres lobes ces gènes ne sont pas sensibles aux stimulations androgéniques. A l'âge adulte, les androgènes n'ont qu'un effet limité sur l'expression de ces gènes.

(ii) *Les facteurs de transcription*

- *Nkx3.1 (NK homeobox3.1)*

L'expression de *Nkx3.1* dans le tractus mâle est restreinte à la prostate et aux glandes de Cowper (petites glandes situées de chaque côté de l'urètre de l'homme qui sécrètent le liquide pré-éjaculatoire). Au stade fœtal chez la souris, *Nkx3.1* est exprimé à l'emplacement des bourgeons avant leur formation, présageant de son rôle dans l'étape de détermination, mais son pic d'expression a lieu entre les 6^{ème} et 15^{ème} jours post-nataux au moment de la cytodifférenciation (Bieberich et al., 1996). L'expression de *Nkx3.1* est maintenue tout au long de la vie et joue un rôle important dans l'homéostasie prostatique.

L'invalidation de *Nkx3.1* chez la souris est associée à des défauts de branchement, des perturbations dans les fonctions de différenciation mais également à l'apparition de foyers de néoplasie intraépithéliale (PIN) indiquant que *Nkx3.1* est important pour la morphogenèse des branches et pour le maintien de la différenciation (Bhatia-Gaur et al., 1999). De plus, *Nkx3.1* agit comme un suppresseur de tumeur puisque sa perte d'expression est associée à la carcinogenèse et à la progression tumorale (Shen and Abate-Shen, 2003). Par ailleurs, il a été montré que les androgènes stimulent directement l'expression de *Nkx3.1* au cours du développement, ce qui représente une voie supplémentaire par laquelle les androgènes contrôlent le développement de la prostate (Pu et al., 2007).

- *Fox (Forkhead box) A1-A2* :

Les gènes *Fox* anciennement appelés gènes *HNF (Hepatocyte nuclear factor)* sont impliqués dans le développement de nombreux organes. *FoxA1* est localisé dans l'épithélium de la prostate en développement où il joue un rôle dans la morphogenèse des canaux et dans la maturation des cellules épithéliales. Son expression est restreinte aux bourgeons épithéliaux de l'UGS et augmente au cours du développement prostatique pour être maintenue ensuite à l'âge adulte (Kopachik et al., 1998). A l'inverse, *FoxA2* est uniquement exprimé dans les cellules épithéliales à l'interface avec le mésenchyme durant les stades précoces de bourgeonnement (Mirosevich et al., 2005). Les souris *foxA1*^{-/-} ne montrent aucun défaut au niveau du bourgeonnement prostatique. En revanche, la croissance des prostates de ces animaux est réduite avec une formation incomplète des lumières et une absence de protéines de sécrétion (Gao et al., 2005). La production de sécrétions prostatiques est fortement régulée par les androgènes. Il faut noter que *FoxA1* favorise l'action des androgènes pendant la formation de la prostate puisqu'il joue un rôle de cofacteur du récepteur des androgènes. Par exemple FOXA1 est requis pour l'expression des gènes androgéno-régulés codant la probasine et le PSA (Gao et al., 2005). Ce rôle de cofacteur peut donc expliquer l'absence de sécrétions prostatiques chez les souris *foxA1*^{-/-}.

- *Notch1/delta/jagged* :

NOTCH1 est un récepteur transmembranaire activé par les protéines JAGGED/DELTA présentes au niveau de la membrane des cellules adjacentes. L'activation de NOTCH1 entraîne son clivage protéolytique et la translocation vers le noyau de sa partie cytoplasmique qui va interagir avec des facteurs de transcription pour réguler l'expression de ses gènes cibles tels que *Hes1 (Hairy-enhancer of split)* (Grishina et al., 2005). L'expression de *Notch1* est très importante dans le compartiment épithélial à la naissance et pendant la morphogenèse puis décline à l'âge adulte (Shou et al., 2001). Alors que *Notch1* est initialement exprimé par toutes les cellules progénitrices, il est seulement localisé dans les cellules basales après la cytodifférenciation. *Dll1 (Delta-like ligand)* est exprimé au niveau des cellules épithéliales adjacentes au mésenchyme, à l'endroit où les bourgeons émergent. L'autre ligand, *Jagged* est exprimé dans le mésenchyme et les cellules épithéliales de l'UGS (Grishina et al., 2005). L'inhibition du clivage de *Notch1* par des inhibiteurs de protéases diminue la morphogenèse des branches et la différenciation

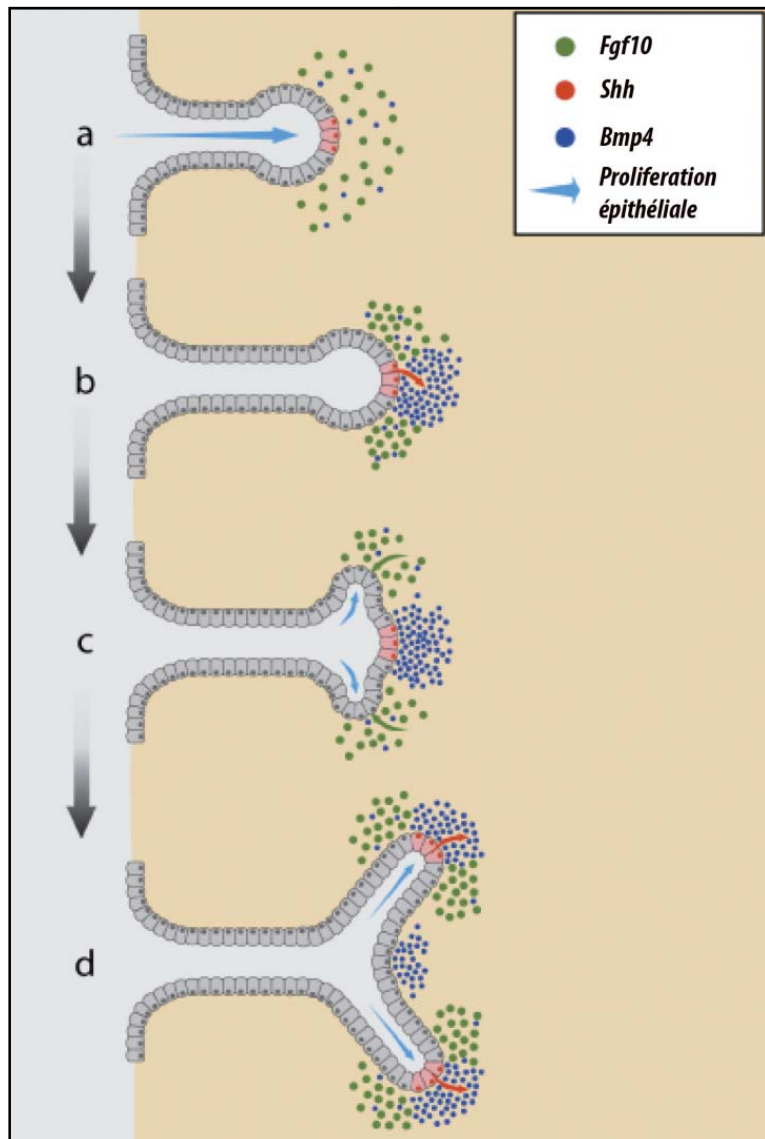


Figure 6 : Bourgeonnement et branchement des canaux : action de molécules sécrétées SHH, FGF10 et BMP4

Modèle de contrôle de la dichotomie de branchement des canaux prostatiques en développement par l'expression localisée et le dialogue entre certains morphorégulateurs. L'extrémité distale des canaux exprime SHH alors que le mésenchyme exprime FGF10 et BMP4 (a). Le contact de ces deux types cellulaires permet l'activation de *patched* au niveau des cellules mésenchymateuses par SHH sécrété (b) ce qui entraîne une répression locale de FGF10 et une augmentation de l'expression de BMP4. La diminution locale de FGF10 entraîne, au niveau latéral, une plus forte expression de FGF10 adjacente aux zones d'expression de SHH qui, en retour, réprime BMP4 au niveau de cette région et active ainsi la prolifération des cellules épithéliales *via* le récepteur FGFR2iib (c). Ceci permet la formation de deux canaux de part et d'autre de la région de sécrétion de SHH et permet l'initiation du branchement (d). D'après Prins et Putz 2008.

épithéliale de la prostate chez le rat, indiquant son rôle clé au cours de la morphogenèse prostatique (Wang et al., 2006). L'inactivation conditionnelle de *Notch1* à partir du 15^{ème} jour post-natal dans la prostate entraîne une diminution des sécrétions et une augmentation de la prolifération des cellules intermédiaires (Wang et al., 2006). Ces résultats confirment que la signalisation *Notch* inhibe la prolifération des cellules progénitrices, facilite la différenciation épithéliale pendant le développement et joue un rôle dans l'homéostasie du tissu adulte.

(iii) Les molécules de signalisation sécrétées

La morphogenèse prostatique est contrôlée par un réseau complexe d'interactions entre le mésenchyme et l'épithélium qui sécrètent des facteurs de croissance paracrines et autocrines. En effet, 1) les facteurs de croissance sont exprimés à la fois dans le compartiment épithélial et dans le mésenchyme ; 2) des cellules épithéliales isolées répondent *in vitro* à une exposition à des facteurs de croissance ; 3) le mésenchyme et l'épithélium sont pourvus des récepteurs spécifiques à ces facteurs de croissance ; 4) l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces facteurs de croissance ou de leurs récepteurs bloque les phénomènes de morphogenèse.

Ainsi, quelques molécules de signalisation très conservées ont un rôle primordial dans l'embryogenèse, en particulier des combinaisons *sonic hedgehog*, Wnt, FGF, BMP/TGF β /Activin. Leurs actions sur le bourgeonnement et le branchement des canaux sont détaillées en **figure 6**.

- *Sonic hedgehog* (SHH)

SHH est une glycoprotéine produite par les cellules épithéliales à l'interface avec le mésenchyme dans les stades précoces de l'induction du bourgeonnement prostatique. SHH se lie à son récepteur *patched* (*Ptc*) localisé au niveau des cellules mésenchymateuses, permettant d'établir des communications entre les cellules épithéliales et le mésenchyme. La liaison de SHH sur PTC entraîne une inhibition de *smo* (*Smoothed*) responsable d'une activation du facteur de transcription GLI. *Shh* est exprimé dans les cellules épithéliales prostatiques au début du bourgeonnement et décline peu à peu jusqu'à ce que la morphogenèse soit complète. Dans la prostate en développement *Ptc* est exprimé au niveau des cellules stromales adjacentes à l'épithélium en formation. *Shh* est capable de contrôler l'expression de nombreux gènes codant des protéines sécrétées et des gènes homéotiques, ce qui fait de SHH un des plus importants régulateurs impliqués dans la morphogenèse prostatique. Les rôles spécifiques de SHH pendant la morphogenèse prostatique ont été déterminés à partir de différentes approches sur des modèles murins (Podlasek et al., 1999). Ainsi, le blocage de l'action de SHH par un anticorps spécifique montre que la signalisation SHH est requise pour l'initiation du bourgeonnement et l'élongation des canaux. Néanmoins, une étude a montré que le bourgeonnement et l'élongation avaient toujours lieu dans les souris *shh*^{-/-}, menant à la conclusion que SHH n'était finalement pas indispensable à la mise en place de ces phénomènes (Berman et al., 2004). Des études complémentaires plus récentes ont mis en évidence des mécanismes compensatoires par la sécrétion importante de IHH (*Indian hedgehog*),

un autre membre de la famille *hedgehog*, normalement absent de la prostate (Doles et al., 2006). Les androgènes sont capables de réguler positivement l'expression de *Shh*. Cependant, cette régulation semble se faire indirectement dans les phases précoces de développement par l'intermédiaire des molécules sécrétées par le mésenchyme telles que FGF10 (Pu et al., 2007).

- *Fgf (Fibroblast growth factors)*

Les facteurs de croissance de la famille des FGF, qui contient 23 membres connus, participent au développement de nombreux organes. Ainsi, les membres de la famille des FGF tels que FGF-10 et FGF-7 (aussi appelé *Keratinocyte growth factor*, KGF), sécrétés par le stroma, jouent un rôle important dans le développement de la prostate. Il existe quatre récepteurs aux FGF qui ont tous plusieurs transcrits d'épissage. FGFR2iib, variant d'épissage du récepteur FGFR2, est le récepteur transmembranaire spécifique de FGF-10 et de FGF-7. Il est exprimé dans les cellules épithéliales prostatiques, ce qui permet les interactions paracrine entre le stroma et l'épithélium pendant le développement. Les souris invalidées pour *fgf-10* développent un UGS mais présentent un nombre de bourgeons très limité et une croissance prostatique restreinte (Donjacour et al., 2003). L'expression de *fgf-10* est limitée à la partie distale de la glande où il joue un rôle de chimioattractant pour l'élongation des canaux (Lu et al., 1999). Même si les souris invalidées pour FGF-7 ne présentent pas de défaut de développement prostatique, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre FGF-7 inhibe le branchement des canaux et la croissance épithéliale médiée par les androgènes (Sugimura et al., 1996). En modèle de culture organotypique, l'induction des branchements des canaux par FGF-10 est bloquée suite à l'utilisation d'un inhibiteur de la voie MEK1/2 démontrant que FGF-10/FGFR2iib agit par l'intermédiaire de cette voie pour le développement de la prostate (Kuslak and Marker, 2007). De façon intéressante, les souris invalidées pour FGFR2iib ne présentent pas de lobes ventraux alors que les lobes dorsaux et latéraux parviennent à se développer, ce qui souligne la dépendance du lobe ventral vis-à-vis de FGF-10 et FGF-7 (Lin et al., 2007). FGFR2 est un médiateur important de l'action androgénique dans la prostate puisque l'homéostasie prostatique dépendante des androgènes est perturbée dans les souris invalidées pour FGFR2iib. FGF-10 et FGF-7 ont été décrits comme des « andromédines » c'est-à-dire des facteurs stromaux, médiateurs paracrine de l'action des androgènes, qui permettent de moduler la prolifération et la différenciation de l'épithélium (Lu et al., 1999, Yan et al., 1992). Le blocage de FGFR2iib par un antagoniste montre que la signalisation de FGF-10 est essentielle pour la stimulation de l'expression de *shh* et *hoxb13* par les androgènes. Ce résultat place FGF-10 comme un facteur paracrine, régulé par les androgènes, qui permet de moduler l'expression d'autres gènes morphogéniques (Pu et al., 2007). Au final, FGF-10, FGF-7 et leur récepteur spécifique FGFR2iib peuvent être considérés comme des acteurs paracrine centraux dans la morphogénèse prostatique régulée par les androgènes.

- Membres de la famille TGF β (*Transforming Growth Factor β*)

Les BMP (*Bone morphogenetic proteins*) sont des membres de la famille des TGF β et sont considérés comme des inhibiteurs de la prolifération au cours du développement (Hogan, 1996). Les BMP sont sécrétés par les cellules épithéliales et se fixent sur leurs récepteurs transmembranaires de type II, BMPRII, présents à la fois à la surface des cellules épithéliales et mésenchymateuses qui vont alors se complexer aux récepteurs de type I pour activer les voies de signalisation intracellulaires impliquant SMAD1, 3 et 5. Dans la prostate de souris, *Bmp-4* est exprimé dans le compartiment mésenchymateux de l'UGS avant et pendant l'étape d'initiation du bourgeonnement et son niveau d'expression décline après la naissance. L'inactivation totale de *Bmp-4* est létale au stade embryonnaire mais les embryons transgéniques hétérozygotes pour *Bmp-4* voient leur nombre de branches augmenter dans la prostate ventrale indiquant que ce facteur agit comme un inhibiteur de la morphogenèse des branches au cours du développement prostatique. Cette conclusion est appuyée par une expérience de culture organotypique qui montre que l'apport exogène de *Bmp-4* inhibe le branchement des canaux (Lamm et al., 2001). A la différence d'autres facteurs sécrétés, les androgènes diminuent l'expression de *Bmp-4* dans la prostate en développement (Pu et al., 2007). Ainsi, l'inhibition de ce facteur contribue à la régulation androgénique du développement de la prostate. *Bmp-7* est un autre membre de la famille des *bmp* exprimé dans la prostate, qui joue un rôle inhibiteur sur le développement de cette glande. L'expression de *Bmp-7* est localisée dans le compartiment mésenchymateux de l'UGS avant l'initiation des bourgeonnements et dans les cellules épithéliales après la naissance. Le nombre de branches est multiplié par deux dans les souris invalidées pour *Bmp-7*. De plus, l'ajout de *Bmp-7* sur des cultures d'organe inhibe la morphogenèse (Grishina et al., 2005). Ainsi, BMP-7 et BMP-4 sont des inhibiteurs de la morphogenèse des branches au cours du développement prostatique.

TGF β 1 est un membre de la superfamille des TGF β qui a une action inhibitrice sur le développement prostatique. *Tgf β 1* est exprimé en période post-natale au niveau des cellules du mésenchyme. TGF β 1 inhibe l'action des androgènes sur la morphogenèse des branches et la croissance prostatique. Cet effet pourrait être en partie dû à une redistribution de AR du noyau vers le cytoplasme dans les cellules du muscle lisse, supprimant ainsi l'action des androgènes au sein de ces cellules (Gerdes et al., 1998). Chez la souris, TGF β 1 est aussi décrit comme étant impliqué dans la répression de l'expression de *fgf-10*, ce qui pourrait contribuer à son effet inhibiteur (Tomlinson et al., 2004). Par ailleurs, les gènes codant les récepteurs *Tgf β RI* et *Tgf β RII* sont exprimés au niveau des cellules épithéliales et stromales, ce qui permet à TGF β 1 d'exercer son action inhibitrice au niveau de ces deux types cellulaires (Chang et al., 1999).

Les activines sont également des membres de la famille des TGF β qui influencent le développement de la prostate. Il s'agit de glycoprotéines dimériques qui sont définies par leur action principale sur les cellules gonadotropes hypophysaires. Les activines sont des homo- ou hétérodimères de

sous-unités βA ou βB : $\beta A-\beta A$ pour l'activine A, $\beta B-\beta B$ pour l'activine B et $\beta A-\beta B$ pour l'activine AB. L'activine βA est exprimée au niveau des cellules mésenchymateuses qui entourent les extrémités distales des branches alors que l'activine βB est retrouvée dans les cellules fibroblastiques qui composent le stroma et dans les cellules épithéliales luminales différenciées. L'ajout exogène d'activine A inhibe le branchement et l'élongation des canaux dans les lobes ventraux en ralentissant la prolifération des cellules épithéliales au niveau des extrémités distales. Une suppression de la différenciation des cellules stromales en cellules musculaires lisses est également observée. L'action des activines dans le tissu est contrebalancée par la liaison des follistatines qui sont exprimées dans l'épithélium de la prostate en développement et mature. L'ajout de follistatine sur des cultures d'explants de prostate augmente leurs croissance et développement. Ainsi, il existe une balance entre l'action des activines et de la follistatine dans la prostate qui permet la régulation des étapes de morphogenèse des branches particulièrement au niveau des extrémités distales (Cancilla et al., 2001). Notons que la sous-unité α de l'inhibine (de la même famille que les activines) n'est pas exprimée *in vivo* jusqu'à la puberté. Contrairement aux activines, les inhibines ne sont donc pas impliquées dans le développement de la prostate (Cancilla et al., 2001).

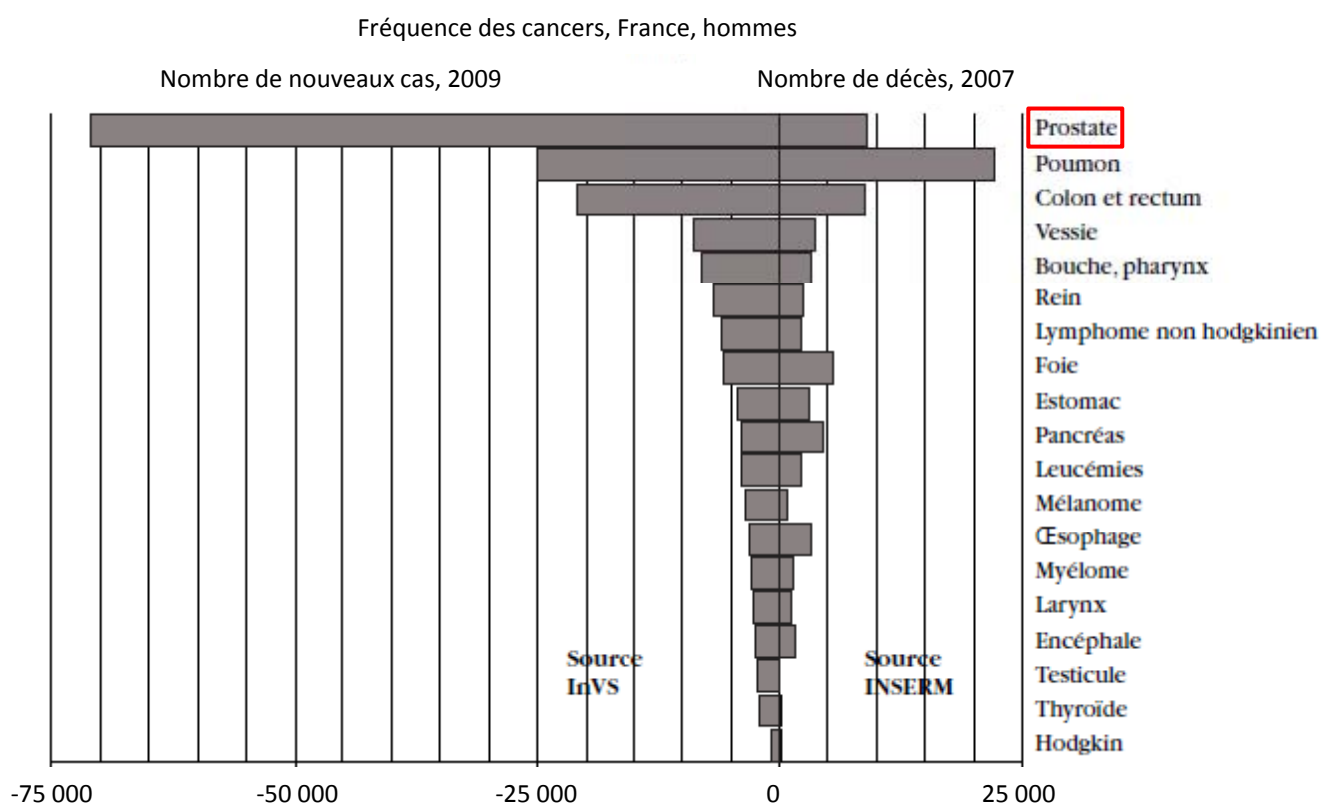


Figure 7 : Diagramme représentant le nombre de nouveaux cas de cancers (en 2009) et la mortalité associée à ces cancers (en 2007)

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent en France, chez l'homme avec 71000 nouveaux cas diagnostiqués en 2009, devant le cancer du poumon qui compte 25000 cas diagnostiqués. Il représente la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme avec 9033 décès recensés en 2007 après le cancer du poumon qui a causé 22144 décès en 2007. D'après Guérin et Hill, 2010.

B. Les pathologies de la prostate

Chez l'homme, la prostate peut être le siège de différentes pathologies : le cancer, la prostatite, ou l'hyperplasie bénigne de la prostate.

1. Les prostatites

Les prostatites correspondent à une inflammation de la prostate qui, contrairement aux autres pathologies prostatiques, touche préférentiellement l'homme jeune. Cette affection est fréquente puisque statistiquement 1 homme sur 11 y sera confronté durant sa vie. Deux grandes formes de prostatites sont connues : les prostatites aiguës et les prostatites chroniques.

- La **prostatite aiguë** peut s'accompagner de fièvre, de frissons, d'une rétention urinaire et de mictions difficiles et douloureuses. Il s'agit d'une infection bactérienne d'origine sexuelle (*chlamydiae*, mycoplasme) ou d'une infection par la bactérie *Escherichia coli* (80 % des cas recensés dans la littérature médicale), ou encore consécutive à des examens ou actes médicaux (biopsie de la prostate, sondage urinaire).

- La **prostatite chronique**, à l'origine de douleurs pelviennes récurrentes et plus diffuses, peut être d'origine bactérienne et souvent la conséquence d'une prostatite aiguë mal soignée. L'étiologie des prostatites chroniques non bactérienne est mal connue. Une malformation de l'appareil urinaire peut également être à l'origine de prostatites récidivantes.

Les prostatites aiguës et chroniques bactériennes sont diagnostiquées à l'aide d'un examen cytobactériologique des urines (ECBU) qui permet d'identifier et de dénombrer les bactéries responsables. Ces deux types de prostatite sont donc traités par des antibiotiques. Dans le cas de prostatites chroniques non bactériennes, les traitements mis en place peuvent être l'utilisation d'alpha-bloquants et de myorelaxants qui favorisent la vidange de la prostate et de la vessie, d'anti-inflammatoires ou encore le massage de la prostate, méthode controversée puisque les résultats sont très variables d'un individu à l'autre.

2. Le cancer

a. Epidémiologie et facteurs de risque

En France, le cancer de la prostate est de loin le cancer le plus fréquent chez l'homme avec 71000 nouveaux cas diagnostiqués en 2009, devant le cancer du poumon avec 25000 cas (**Figure 7**). Il représente la deuxième cause de décès par cancer chez l'homme avec 9033 décès recensés en 2007 (soit 10 % de la mortalité par cancer) après le cancer du poumon qui a causé 22144 décès en 2007 (soit 24,9 % de la mortalité par cancer) (Guerin and Hill, 2010) (**Figure 7**). Depuis 1950, l'incidence du cancer de la prostate n'a cessé d'augmenter. En effet, le nombre de cas diagnostiqués a été multiplié par 4 de 1980 à 2005

(Guerin et al., 2009). Ceci s'explique entre autre par un dépistage plus systématique, des outils d'analyse plus efficaces tels que le dosage de PSA et une baisse de la mortalité causée par d'autres pathologies telles que les maladies cardiovasculaires.

Plusieurs facteurs de risque à la fois génétiques, liés à l'âge et environnementaux sont associés au cancer de la prostate.

(i) L'âge

Il s'agit du facteur de risque principal. La majorité des cancers de la prostate sont découverts après 65 ans et 95% des cas surviennent entre 57 et 88 ans. L'âge moyen d'apparition d'un cancer de la prostate est de 73 ans. Des résultats d'autopsie suggèrent que la plupart des hommes de plus de 85 ans ont un cancer de la prostate (Sakr et al., 1993). Différentes hypothèses sont proposées pour expliquer l'influence de l'âge, comme la diminution progressive du taux d'androgènes au cours du vieillissement (Algarte-Genin et al., 2004) ou encore l'augmentation du stress oxydatif qui conduit à des cassures de l'ADN propices à l'apparition de mutations (Bostwick et al., 2004).

(ii) L'appartenance ethnique

Les différences d'incidence liées à l'origine ethnique sont le reflet très complexe de plusieurs paramètres qui incluent le régime alimentaire, la génétique et les moyens de diagnostic. L'incidence la plus élevée du cancer de la prostate est retrouvée chez les Afro-américains. Ils ont un risque plus élevé que les Américains blancs qui ont le même mode de vie et de régime alimentaire, révélant des différences liées à l'appartenance ethnique (Bostwick et al., 2004).

(iii) Les antécédents familiaux

Les hommes ayant des parents du premier degré (père ou frères) victimes d'un cancer de la prostate ont plus de risques d'être eux-mêmes atteints. Les études décrivent une multiplication de deux à trois fois du risque par rapport à un homme sans antécédent familial (Whittemore et al., 1995). Néanmoins, à la différence d'autres types de cancer, il n'y a pas à ce jour de gène identifié comme ayant une forte pénétrance avec le cancer de la prostate. De nombreuses équipes travaillent donc à la recherche de gènes de susceptibilité à la maladie. Plusieurs loci ont été identifiés depuis 1996 dont HPC1 (*Hereditary prostate cancer 1*) sur le chromosome 1 qui ségrége avec le cancer (Schaid, 2004, Smith et al., 1996). Cependant, la plupart des études sont réalisées sur un faible nombre de patients et ne sont pas toujours confirmées.

(iv) L'alimentation

De nombreuses études épidémiologiques soulignent le lien existant entre l'alimentation et le risque de développer un cancer de la prostate. Ainsi, un régime trop riche en graisses saturées d'origine

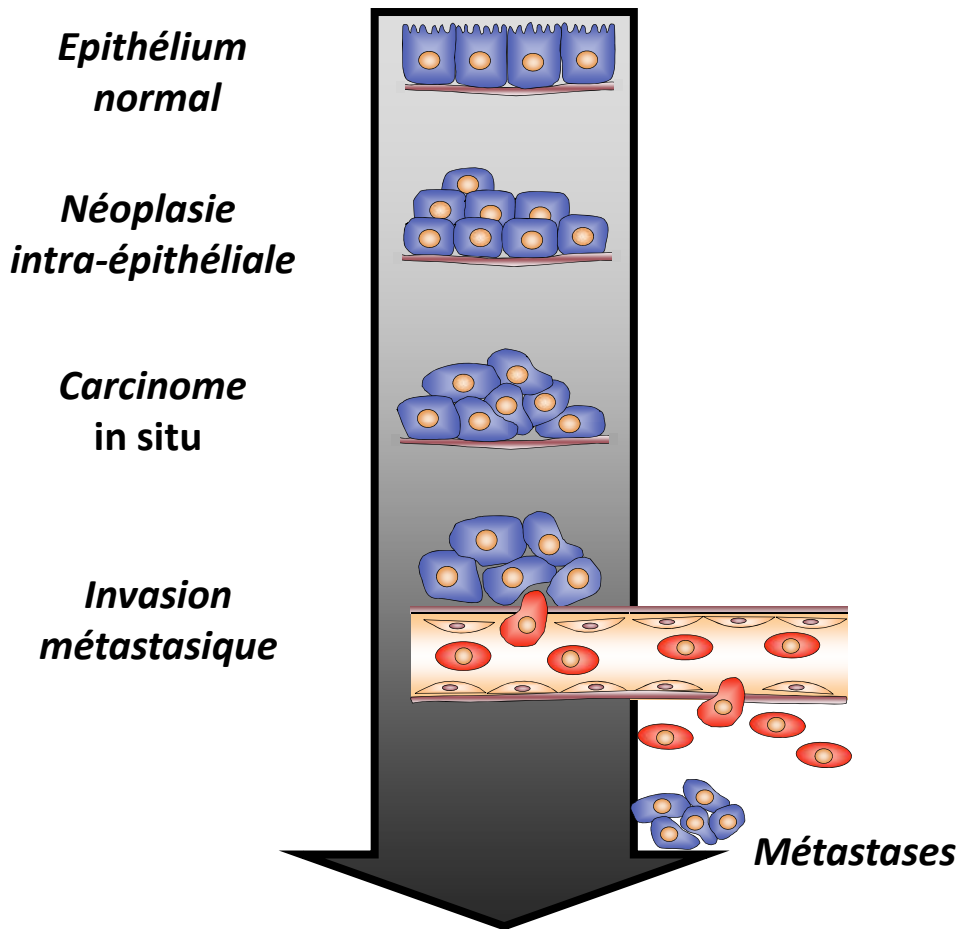


Figure 8: Les différents stades d'évolution du cancer de la prostate

Les cellules épithéliales prolifèrent de façon incontrôlée à l'intérieur du compartiment luminal conduisant à l'apparition de néoplasies intra-épithéliales (PIN). Après la perte de la lame basale, les cellules épithéliales proliférantes envahissent le compartiment stromal donnant lieu à la formation de carcinome *in situ*. Enfin, les cellules cancéreuses peuvent évoluer vers des stades plus agressifs où elles seront capables d'envahir d'autres tissus et de former des tumeurs secondaires ou métastases.

animale retrouvées notamment dans la viande rouge serait-il favorable au développement tumoral (Giovannucci et al., 1993). En effet, les populations asiatiques présentent une incidence peu élevée de cancer de la prostate par rapport aux caucasiens et africains d'Amérique du Nord. Cette différence n'est pas exclusivement génétique puisque les Japonais émigrés aux Etats-Unis qui adoptent une alimentation riche en graisses ont un risque accru de développer un cancer de la prostate (Watanabe et al., 2000). Certains facteurs nutritionnels semblent au contraire protecteurs vis-à-vis du cancer de la prostate. Par exemple la consommation de phyto-œstrogènes, retrouvés dans le soja, pourrait expliquer en partie la faible incidence de cancer de la prostate dans les pays asiatiques (Stephens, 1997). Le lycopène, agent anti-oxydant majoritairement retrouvé dans la tomate, est également associé à un risque réduit de développer un cancer de la prostate (Siler et al., 2005, Talvas et al., 2010). De même, les vitamines E (Albanes et al., 1995) et C (Maramag et al., 1997), le sélénium (Clark et al., 1998) ou encore la curcumine (Teiten et al., 2010) ont été associés soit à des risques diminués chez l'homme soit à un effet antiprolifératif sur des modèles de cellules cancéreuses de prostate. L'activité bénéfique ou néfaste de ces nutriments n'est qu'imparfaitement comprise au niveau moléculaire et des données récentes remettent en cause ces études. En effet, réalisée sur 35533 hommes sains de 50 ou 55 ans répartis dans plusieurs pays d'Amérique, l'étude SELECT (*The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*), ne montre pas d'effet bénéfique du sélénium et/ou de la vitamine E sur le risque de développer un cancer de la prostate (Lippman et al., 2009). Il est donc difficile de conclure à la seule vue des études épidémiologiques quant au rôle de ces nutriments sur la survenue du cancer de la prostate. Les études épidémiologiques ne suffisent donc pas et il reste nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents dans des modèles cellulaires ou animaux.

(v) *Les hormones*

Comme vu précédemment, les androgènes jouent un rôle important dans le développement normal de la prostate. En 1941, Huggins publie ces études sur le rôle des androgènes dans cette maladie (Huggins and Clark, 1940). L'implication des androgènes ainsi que leur rôle protecteur ou au contraire néfaste dans les pathologies prostatiques seront développés et discutés dans le chapitre II.C.3.

Une exposition à des perturbateurs endocriniens (ayant des effets œstrogéniques ou anti-androgéniques) retrouvés dans certains produits agricoles et industriels, plastiques et détergents peut également être associée à une augmentation du risque de développer un cancer de la prostate (Prins et al., 2007).

b. Les différents stades d'évolution du cancer

Le cancer de la prostate est un adénocarcinome qui se forme au niveau de la zone périphérique de la glande. La formation et l'évolution de l'adénocarcinome se déroulent en différentes étapes (**Figure 8**). De nombreux arguments suggèrent que les néoplasies intra-épithéliales ou PIN (*Prostatic*

intraepithelial neoplasia) sont des précurseurs des adénocarcinomes (Joniau et al., 2005). La mise en place des PIN se traduit par une désorganisation de la structure des unités prostatiques. En fonction de leur architecture et de leur cytologie, elles sont classées en PIN de bas ou de haut grade. Les PIN de haut grade seraient une transition entre les PIN de bas grade et les carcinomes invasifs (Abate-Shen and Shen, 2000, Bostwick et al., 2004). La perte de la lame basale est caractéristique du stade de carcinome invasif. Au stade de carcinome les cellules épithéliales basales et lumenales présentent une très forte activité de prolifération qui se traduit par une forte augmentation de la production de PSA. Les cellules cancéreuses peuvent ensuite évoluer vers un stade encore plus agressif où elles deviennent capables d'envahir les tissus périphériques notamment les vésicules séminales mais aussi la vessie ou le rectum (Wittekind et al., 2002). Le stade ultime de la carcinogenèse prostatique est la formation de métastases qui résultent d'une perte d'adhérence des cellules entre elles et à la matrice extra-cellulaire, d'un passage dans le système lymphatique ou sanguin et d'une colonisation des tissus distants tels que les ganglions lymphatiques, les os ou le cerveau (Salvati et al., 2005, Tantivejkul et al., 2004, Zeng et al., 2005).

c. Diagnostic et traitements

Le cancer de la prostate est asymptomatique jusqu'à des stades avancés. Alors, il peut entraîner une rétention d'urine, une hématurie (sang dans les urines), une impuissance ou encore des douleurs et/ou un dysfonctionnement d'autres organes si le cancer a atteint un stade très avancé et métastatique. Concernant son dépistage, il est recommandé que, passé 50 ans, chaque homme bénéficie tous les ans d'un toucher rectal qui va permettre de déceler les modifications du volume, de la forme et de la consistance de la prostate au niveau de la zone périphérique à partir de laquelle le cancer se développe. Le cas échéant un dosage du PSA sera effectué. C'est actuellement le test le plus utilisé pour la détection précoce du cancer de la prostate mais il peut être sujet à controverse. En effet, lorsque son taux est normal, il permet d'exclure la présence de cancer, en revanche lorsque son taux est augmenté, il ne témoigne pas obligatoirement de la présence d'un cancer mais plutôt d'une modification de l'activité sécrétrice des cellules épithéliales. De plus, les études épidémiologiques présentent des résultats discordants quant à l'impact du dépistage massif avec le marqueur PSA sur le taux de mortalité par cancer de la prostate. Par exemple, l'étude PLCO (*Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian*) réalisée sur une durée de dix ans n'a pas mis en évidence d'impact sur la mortalité, d'une procédure de dépistage de masse combinant dosage du PSA et toucher rectal (Andriole et al., 2009). Seule l'analyse anatomo-pathologique de biopsie de la prostate permet d'établir avec certitude le diagnostic de cancer de la prostate. Le pathologiste attribue un grade de 1 à 5 à chaque zone du cancer. Le score de Gleason est alors obtenu en additionnant les deux grades les plus fréquents ou en additionnant le grade le plus fréquent et le grade le plus élevé. Les scores de Gleason vont de 2 à 10. Les tumeurs de score 2 à 4 sont qualifiées de cancers de bas grade de malignité, celles de 5 à 7 de cancers de grade intermédiaire et les scores de 8 à 10 correspondent aux cancers de prostate de haut grade, les plus agressifs et évolutifs.

Le cancer de la prostate est une maladie de l'homme âgé et dans la mesure où le cancer est limité à la prostate, le choix du traitement doit être discuté au cas par cas en tenant compte du stade de la maladie, de l'âge du patient et de son état général (Mongiart-Artus et al., 2009). Ainsi, plusieurs traitements curatifs peuvent-ils être proposés : l'ablation chirurgicale (prostatectomie), l'hormonothérapie, la radiothérapie, la curiethérapie, la cryothérapie, l'utilisation d'ultrasons ou encore une chimiothérapie.

3. *L'Hypertrophie Bénigne de la Prostate (HBP)*

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), aussi appelée hyperplasie bénigne de la prostate ou adénome de la prostate, touche généralement les hommes de plus de 50 ans. Elle se traduit par une augmentation du volume de la prostate, liée à un adénome qui se développe le plus souvent dans la zone de transition, la plus proche de l'urètre, alors que le cancer est retrouvé majoritairement au niveau de la zone périphérique (Schauer and Rowley, 2011). Comme son nom l'indique l'HBP est une pathologie bénigne distincte du cancer. Il n'existe d'ailleurs aucune corrélation entre la présence de l'HBP et la survenue du cancer de la prostate.

a. **Epidémiologie et facteurs de risques**

Dans les pays occidentaux, l'HBP se développe chez 10% des hommes à partir de 30 ans, elle touche 50% d'entre eux à partir de 50 ans et atteint pratiquement la totalité de la population masculine au-delà de 80 ans (Madersbacher et al., 1998). En France, la chirurgie de l'HBP est la deuxième opération la plus pratiquée après celle de la cataracte. Après 60 ans, 43% des hommes se disent gênés par les symptômes liés à l'HBP. A l'inverse, la maladie est rare dans les pays asiatiques. En effet un polymorphisme de la 5 α -réductase de type II a été décrit dans cette population qui rend l'enzyme moins fonctionnelle (Reichardt et al., 1995).

Différents facteurs de risques ont été associés au développement de l'HBP : l'âge, la génétique, les hormones, le style de vie et l'inflammation.

(i) L'âge

Tout comme pour le cancer de la prostate, l'HBP s'accroît avec l'âge. La baisse de la testostérone dans le sang naturellement observée avec l'âge est une hypothèse proposée (Algarte-Genin et al., 2004).

(ii) La génétique

C'est en 1994 qu'a été réalisée, sur des jumeaux mono- et dizygotes, une des premières études visant à mettre en évidence le caractère héréditaire de l'HBP. L'analyse montre que 26% des jumeaux monozygotes développent tous deux une HBP contre 9 % des jumeaux dizygotes (Partin et al., 1994). Certaines études suggèrent que les antécédents familiaux avec un âge précoce de survenue de la maladie

seraient associés à une augmentation du risque de développer une HBP et que le mode le plus probable de transmission serait autosomique dominant (Pearson et al., 2003). De plus les hommes atteints de formes héréditaires de l'HBP auraient tendance à avoir des prostates plus larges à des âges plus précoces que les hommes développant les formes sporadiques (Sanda et al., 1997).

(iii) Les hormones

L'implication des hormones sexuelles, en particulier des androgènes, dans la physiologie prostatique a été soupçonnée très tôt puisqu'en 1889, Joseph Griffiths décrit la prostate de sujets eunuques comme étant « de la taille de celle d'un enfant ». En 1894, William White propose la castration comme une mesure thérapeutique pour les cas d'hypertrophie de la prostate (White, 1894). Il s'appuie pour cela sur des expériences de castrations réalisées sur le chien (animal qui développe spontanément une HBP) et des données sur les hommes castrés. Les études sont cependant contradictoires quant à l'influence des taux plasmatiques de testostérone sur le développement de l'HBP (Kristal et al., 2008, Parsons et al., 2010). Le fait que les hommes voient leur taux de testostérone plasmatique diminuer avec l'âge pousserait à penser qu'il n'existe en réalité pas de lien entre taux sérique de testostérone et développement d'HBP. En revanche, plusieurs études montrent des niveaux intra-prostatiques de DHT (métabolite actif de la testostérone dans les tissus cibles) augmentés chez les patients atteints d'HBP (Parsons et al., 2010). De plus, des inhibiteurs de la 5 α -réductase de type II, enzyme qui convertit la testostérone en DHT dans le tissu, sont couramment utilisés pour traiter l'HBP (voir chapitre I.B.3.c ci-dessous sur les traitements de l'HBP), ce qui confirme l'implication des androgènes, et plus particulièrement la DHT, dans l'HBP. Aucune corrélation évidente n'a été faite entre les œstrogènes endogènes et l'HBP. Ainsi, les androgènes jouent un rôle important dans l'étiologie de l'HBP même si les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore à déterminer.

(iv) Les désordres métaboliques et/ou le style de vie

Plusieurs études ont révélé des associations entre taille de la prostate et indice de masse corporelle (IMC). L'analyse d'une cohorte d'hommes âgés réalisée à Baltimore a montré que les hommes obèses avaient un risque 3,5 fois plus élevé de présenter une prostate hypertrophiée par rapport à des personnes non obèses (Parsons et al., 2006). De plus, l'obésité augmente les risques d'avoir recours à une chirurgie pour une HBP et d'avoir des symptômes urinaires caractéristiques de l'HBP (Parsons et al., 2009).

Des données épidémiologiques incluant plusieurs cohortes, révèlent également une association entre diabète et HBP. En effet, des concentrations plasmatiques élevées en insuline et en glucose ont été corrélées à des risques plus importants de développer une HBP avec les symptômes associés, ainsi qu'au recours à la chirurgie (Gupta et al., 2006, Sarma et al., 2009). Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le lien entre le diabète et l'HBP. Tout d'abord, l'insuline peut augmenter l'activité nerveuse

sympathique qui va jouer un rôle sur le tonus des muscles lisses de la prostate. L'insuline pourrait lier et activer le récepteur IGF-I induisant ainsi une prolifération des cellules épithéliales et une croissance de la glande. L'insuline pourrait également influencer directement sur le métabolisme des hormones sexuelles telles que les androgènes. Enfin, l'insensibilité au glucose est associée à une inflammation et à un stress oxydant important. Des données suggèrent que l'inflammation joue également un rôle important dans le développement de l'HBP. Ainsi, l'insensibilité au glucose pourrait influencer sur le développement de l'HBP par des processus inflammatoires (Sarma et al., 2009).

Même si les études mettant en lien la consommation de lipides et le développement de l'HBP sont contradictoires, l'alimentation n'en demeure pas moins un acteur important, protecteur ou néfaste, dans la survenue de l'HBP (Gupta et al., 2006, Parsons et al., 2008, Suzuki et al., 2002). Une augmentation des apports énergétiques, la consommation de viande rouge ou de régime riches en graisse augmentent les risques de développer une HBP (Kristal et al., 2008). En revanche, un régime riche en légumes est associé à une diminution des risques. De même, les suppléments en vitamine D et en lycopène sont associés à des risques diminués (Kristal et al., 2008).

L'activité physique a également une action favorable et réduit les risques d'HBP (Parsons and Kashfi, 2008). En revanche les études tentant de relier l'HBP à la consommation d'alcool ou de tabac ne se sont pas révélées concluantes.

(v) *L'inflammation*

L'HBP est associée à une inflammation chronique. De nombreuses équipes voient néanmoins l'inflammation comme un facteur initiateur de l'HBP. En effet, tous les tissus de prostate de patients atteints d'HBP présentent des infiltrations lymphocytaires signes d'une inflammation chronique (Nickel et al., 1999, Steiner et al., 1994, Theyer et al., 1992). Il a été montré qu'il pouvait s'agir de lymphocytes activés et donc qui pourraient entraîner la destruction du tissu (comme c'est le cas pour les maladies auto-immunes). De plus, de grandes concentrations de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ (interféron γ) et l'IL-2 (Interleukine-2) (Steiner et al., 2003), l'IL-8 (Penna et al., 2009), l'IL-15 (Handisurya et al., 2001), ou encore l'IL-17 (Steiner et al., 2003) sont retrouvées dans ces tissus. Ces cytokines induisent pour la plupart la prolifération des cellules stromales ou épithéliales et donc la croissance prostatique (Kramer et al., 2007). C'est sur un processus de destruction/reconstruction tissulaire qu'est basé le postulat selon lequel l'inflammation serait responsable de la pathogénicité (Steiner et al., 1994). De plus, l'étendue de l'inflammation semble corrélée au degré de sévérité de l'hypertrophie. Parmi les cytokines accumulées dans les tissus HBP, on peut citer l'IL-8 qui se trouve surexprimée dans les cellules épithéliales d'HBP humaines. L'IL-8 est d'ailleurs considérée comme le marqueur inflammatoire, retrouvé dans les sécrétions séminales, le plus fiable pour les prostatites chroniques et l'HBP (Castro et al., 2004).

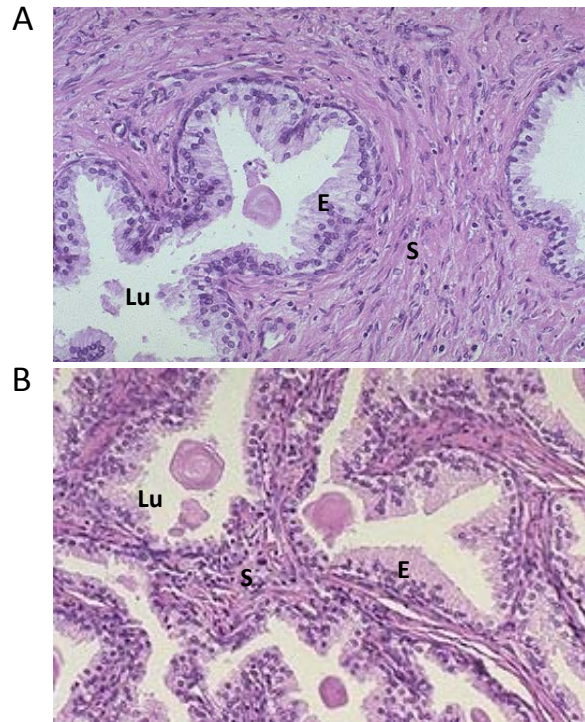


Figure 9 : Images d'anatomie pathologique de prostate humaine

A, Prostate normale. Au centre de la lumière, quelques concrétions peuvent être visibles (sympexions de Robin ou "sable prostatique"). B, Prostate avec une HBP. La prostate présente une hyperplasie glandulaire. Lu, lumière ; S, stroma ; E, épithélium. <http://library.med.utah.edu/WebPath/MALEHTML/MALEIDX.html>

b. Histologie de l'HBP

L'HBP est une hyperplasie adénofibromateuse c'est-à-dire qui concerne à la fois la partie glandulaire (c'est pourquoi on parle d'adénome), les fibres musculaires (myome) et les fibres conjonctives (fibrome). La part de chacune de ces trois composantes peut être variable d'une HBP à l'autre, donnant lieu à des aspects histologiques différents (**Figure 9**). Comme présenté dans le chapitre précédent, l'HBP comprend plusieurs altérations et notamment une inflammation chronique et est caractérisée par une hyperplasie progressive mais discontinue, à la fois des cellules épithéliales et stromales, ce qui entraîne l'expansion de la prostate et l'apparition des symptômes cliniques.

c. Symptômes et diagnostic

Notons tout d'abord qu'il n'existe aucune corrélation entre les symptômes et le volume prostatique. On distingue deux grandes familles de symptômes de l'HBP, les troubles urinaires de type irritatif (ou troubles de retenue) et les troubles urinaires de type obstructif (ou troubles « d'évacuation »). Les troubles urinaires irritatifs sont dus à une irritation de la vessie. Très gênants pour le patient, ils constituent souvent le premier motif de consultation. La pollakiurie, caractérisée par un besoin fréquent d'uriner, notamment la nuit, est le symptôme irritatif le plus fréquent, suivi du besoin soudain et irrésistible d'uriner. Les troubles mictionnels obstructifs, dus à un rétrécissement de la lumière de l'urètre, se traduisent par des difficultés à uriner. La dysurie par exemple, est à l'origine d'une diminution de la force du jet mictionnel. Parmi les autres symptômes obstructifs figure la sensation de vidange incomplète de la vessie. Le diagnostic de l'HBP est relativement facile à poser. Il repose tout d'abord sur un interrogatoire détaillé et sur un examen clinique. Lors de l'interrogatoire le patient doit répondre au questionnaire IPSS (*International prostate symptom scale*). Ce questionnaire permet de caractériser les problèmes de miction rencontrés et d'analyser le retentissement de ces troubles urinaires sur la vie du patient. Cette évaluation est importante car elle conditionne le choix du traitement : selon l'importance de la gêne occasionnée, le traitement sera la simple surveillance, la prise de médicaments ou l'intervention chirurgicale. Le médecin s'attache également à exclure toute autre cause pouvant expliquer les troubles urinaires, notamment le cancer de la prostate, c'est pourquoi un dosage de PSA est souvent réalisé. L'HBP, bien que bénigne, est une pathologie à surveiller et à traiter le cas échéant puisque des complications peuvent survenir. La rétention aiguë d'urine (ou impossibilité totale d'uriner) est la complication la plus courante de l'HBP. Non traitée, cette rétention risque de devenir chronique et de provoquer une distension de la vessie. On note également parfois l'apparition d'une incontinence urinaire. Par ailleurs, une vessie qui ne se vide pas complètement favorise la prolifération de bactéries. Il existe donc un risque d'infection.

d. Traitements

Le choix du traitement repose sur l'appréciation par le médecin de l'altération de la qualité de vie du patient à cause des troubles urinaires. Les traitements visent à soulager le patient de ses troubles urinaires et à prévenir des complications éventuelles. Deux stratégies thérapeutiques peuvent être proposées : un traitement médicamenteux ou une intervention chirurgicale.

Deux classes de médicaments peuvent être utilisées :

- Les alpha-1-bloquants tels que la tamsulosine (Omix®) ou l'alfuzosine (Xatral®) sont utilisés en première intention. Ils diminuent le tonus des fibres musculaires lisses de la prostate et du col de la vessie. Ainsi, la partie de l'urètre qui passe dans la prostate se dilate, facilitant la miction.
- Les inhibiteurs de la 5-alpha-réductase de type II tels que le finastéride (Chibroproscar®) (Gormley et al., 1992) ou de type I et II tels que le dutasteride (Avodart®) (Frye et al., 1998) bloquent la conversion de la testostérone en DHT entraînant une réduction du volume prostatique. Les effets indésirables sont l'apparition possible de troubles de l'érection et une diminution de la libido.

L'extrait lipido-stérolique de *serenoa repens* (une espèce de palmier nain), le Permixon®, est le produit de phytothérapie approuvé dans le traitement médical de l'HBP le plus prescrit et le plus largement étudié (Boyle et al., 2000, Carraro et al., 1996, Tasca et al., 1985). La fraction acide lipophile de l'extrait, et tout particulièrement l'acide laurique, est notamment responsable de l'inhibition des 5 α -réductases de type I et II (Bayne et al., 2000). L'activité antiandrogénique se caractérise par une sélectivité vis-à-vis de la prostate sans exercer d'incidence sur l'axe hypothalamo-hypophysaire ni sur les cellules de Leydig. Cette propriété explique l'absence d'effets indésirables tels que la gynécomastie et la baisse de la libido qui accompagnent les autres traitements antiandrogéniques. L'activité antiandrogénique de l'extrait de palmier nain ne modifie pas la sécrétion du PSA (antigène spécifique de la prostate) par les cellules prostatiques, de sorte que ce marqueur biologique reste exploitable dans le dépistage du cancer prostatique (Bayne et al., 1999).

Dans les cas de troubles urinaires sévères, en présence de complications ou en cas d'échec du traitement médicamenteux, la résection trans-urétrale de la prostate est proposée. Il s'agit de « raboter » les parties de la prostate qui obstruent l'urètre afin de laisser l'urine s'écouler à nouveau normalement. Depuis peu, cette résection peut être réalisée par des techniques faisant appel au laser, micro-sondes ou électrovaporisation. La complication la plus fréquemment observée après la résection endoscopique est l'éjaculation rétrograde c'est-à-dire qu'une partie du sperme reflue vers la vessie lors de l'éjaculation. Des problèmes d'incontinence peuvent également survenir mais ne sont le plus souvent que temporaires.

	Receptor	Subtype	Denomination	Ligand	Response Element	Monomer, Homodimer, or Heterodimer
Class I	TR	α, β	Thyroid hormone receptor	Thyroid hormone (T_3)	Pal, DR-4, IP	H
	RAR	α, β, γ	Retinoic acid receptor	Retinoic acid	DR-2, DR-5 Pal, IP	H
	VDR	α, β, γ	Vitamin D receptor	1-25(OH) ₂ vitamin D ₃	DR-3, IP-9	H
	PPAR		Peroxisome proliferator activated receptor	Benzotriene B4; Wy 14.643 Eicosanoids; thiazolidinediones (TZD _s); 15-deoxy-12,41-prostaglandin J ₂ ; polyunsaturated fatty acids	DR-1	H
	PXR	α, β	Pregnane X receptor	Pregnanes; C21 steroids	DR-3	H
	CAR/MB67		Constitutive androstane receptor	Androstanes; 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene	DR-5	H
	LXR	α, β	Liver X receptor	Oxysterols	DR-4	H
	FXR	α, β	Farnesoid X receptor	Bile acids	DR-4, IR-1	H
	RevErb		Reverse ErbA	Unknown	DR-2, Hemisite	M, D
	RZR/ROR		Retinoid Z receptor/retinoic acid-related orphan receptor	Unknown	Hemisite	M
Class II	UR		Ubiquitous receptor	Unknown	DR-4	H
	RXR	α, β, γ	Retinoid X receptor	9- <i>Cis</i> -retinoic acid	Pal, DR-1	D
	COUP-TF	α, β, γ	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor	Unknown	Pal, DR-5	D, H
	HNF-4	α, β, γ	Hepatocyte nuclear factor 4	Fatty acyl-CoA thioesters	DR-1, DR-2	D
	TLX		Tailless-related receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D
PNR		Photoreceptor-specific nuclear receptor	Unknown	DR-1, Hemisite	M, D	
Class III	TR2	α, β	Testis receptor	Unknown	DR-1 to DR5	D, H
	GR		Glucocorticoid receptor	Glucocorticoids	Pal	D
	AR		Androgen receptor	Androgens	Pal	D
	PR		Progesterone receptor	Progestins	Pal	D
	ER	α, β	Estrogen receptor	Estradiol	Pal	D
ERR	α, β, γ	Estrogen-related receptor	Unknown	Pal, Hemisite	M, D	
Class IV	NGFI-B	α, β, γ	NGF-induced clone B	Unknown	Pal, DR-5	M, D, H
Class V	SF-1/FTZ-F1	α, β	Steroidogenic factor 1 Fushi Tarazu factor 1	Oxysterols	Hemisite	M
Class VI	GCNF		Germ cell nuclear factor	Unknown	DR-0	D
Class 0	SHP		Small heterodimeric partner	Unknown		H
	DAX-1		Dosage-sensitive sex reversal	Unknown		

Figure 10 : Classification des récepteurs nucléaires chez les mammifères

M, monomère; D, homodimère; H, hétérodimère; Pal, palindrome; DR, *direct repeat*; IP, *inverted palindrome*; NGF, *nerve growth factor*. D'après Aranda et Pascual, 2001.

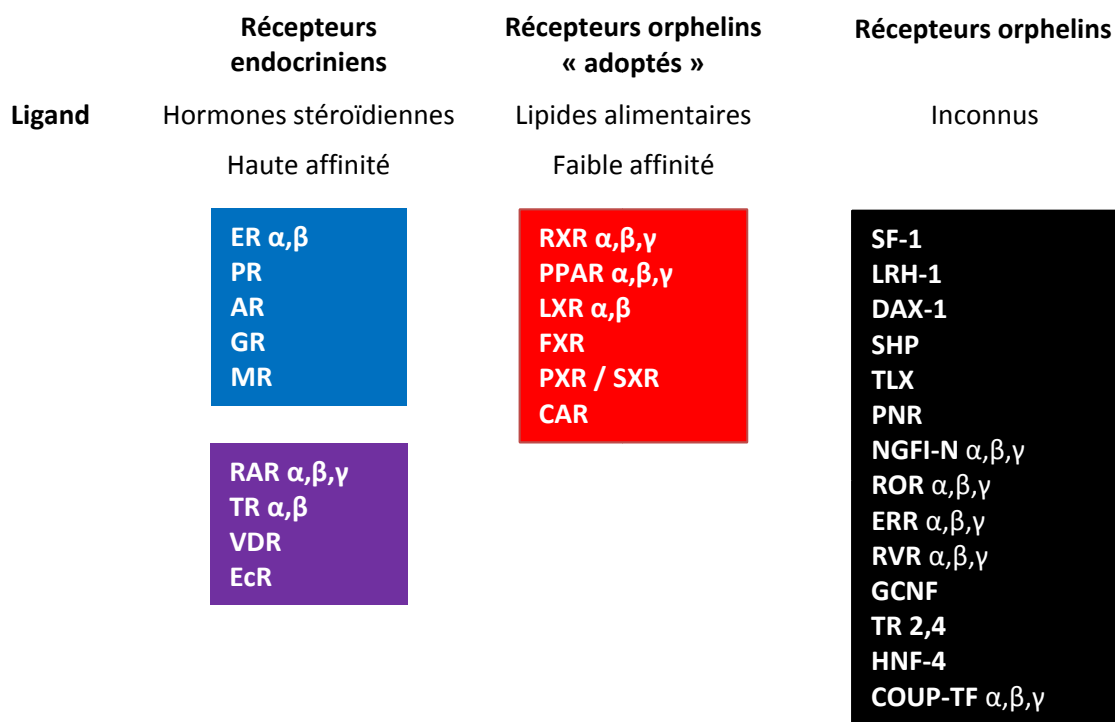


Figure 11 : Classification fonctionnelle des récepteurs nucléaires

Les récepteurs sont classés en fonction de leur capacité à fixer un ligand. En couleur sont représentés ceux pour lesquels un ligand est connu ; les récepteurs orphelins pour lesquels aucun ligand physiologique n'est connu sont représentés en noir. Les 48 récepteurs nucléaires humains sont présentés, ainsi que le récepteur EcR (*Ecdysone Receptor*) isolé chez les insectes. Adapté d'après Chawla *et al.*, 2001.

II. Les récepteurs nucléaires

A. Introduction

1. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription potentiellement activables par un signal habituellement lipophile. La nature hydrophobe des ligands leur permet de franchir facilement les membranes cellulaires, même si des transporteurs membranaires ont parfois été décrits, et d'activer leurs récepteurs dont la localisation est intra-cellulaire. Les récepteurs nucléaires sont largement répandus dans le règne animal et semblent être apparus tôt dans l'évolution des métazoaires (Escriva et al., 1997). Chez l'homme, 48 récepteurs nucléaires ont été identifiés qui sont pour la plupart exprimés au niveau de la prostate. D'un point de vue phylogénétique, ces 48 récepteurs nucléaires ont été classés en sept sous-familles (Laudet, 1997) (**Figure 10**). D'un point de vue fonctionnel, on peut définir trois classes de récepteurs nucléaires : les récepteurs aux hormones stéroïdes, les récepteurs nucléaires orphelins pour lesquels aucun ligand n'a encore été identifié à ce jour et les récepteurs nucléaires « orphelins-adoptés » (**Figure 11**) (Chawla et al., 2001).

Les premiers récepteurs nucléaires à avoir été identifiés sont les récepteurs des hormones stéroïdes sexuelles (œstrogènes) à la fin des années 60 (Toft et al., 1967). Dans les années 1980, le premier récepteur nucléaire à avoir été cloné est le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et al., 1985). Les gènes codant les récepteurs des autres hormones stéroïdes, récepteur des androgènes (AR), récepteur des œstrogènes (ER), récepteur des minéralocorticoïdes (MR) et récepteur de la progestérone (PR) ont par la suite été clonés. Les actions de ces récepteurs sont multiples puisqu'elles vont du développement du tractus génital masculin de la mise en place des caractères sexuels secondaires, au maintien de la fonction de reproduction en passant par le métabolisme de nombreux organes ou encore le contrôle du système immunitaire pour les glucocorticoïdes ou de la pression artérielle pour l'aldostérone.

Canoniquement, il est admis que les récepteurs des hormones non stéroïdes activent la transcription de leurs gènes cibles. En absence de ligand, le contact de co-répresseurs permet le maintien de la chromatine dans un état non permissif vis-à-vis de la transcription. L'entrée passive du ligand dans le noyau et la fixation sur son récepteur induit l'initiation de la transcription des gènes cibles. Ces récepteurs peuvent agir sous forme d'homodimère, d'hétérodimère avec le partenaire obligatoire RXR (*Retinoid X Receptor*), récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis*, ou bien de monomère. La partie III traitera en détail d'un de ces récepteurs des hormones non stéroïdes qui s'hétérodimérise de façon obligatoire avec RXR, le récepteur des oxystérols LXR (*Liver-X-Receptor*). Sa structure, son mode d'action et ses fonctions physiologiques y seront largement détaillés.

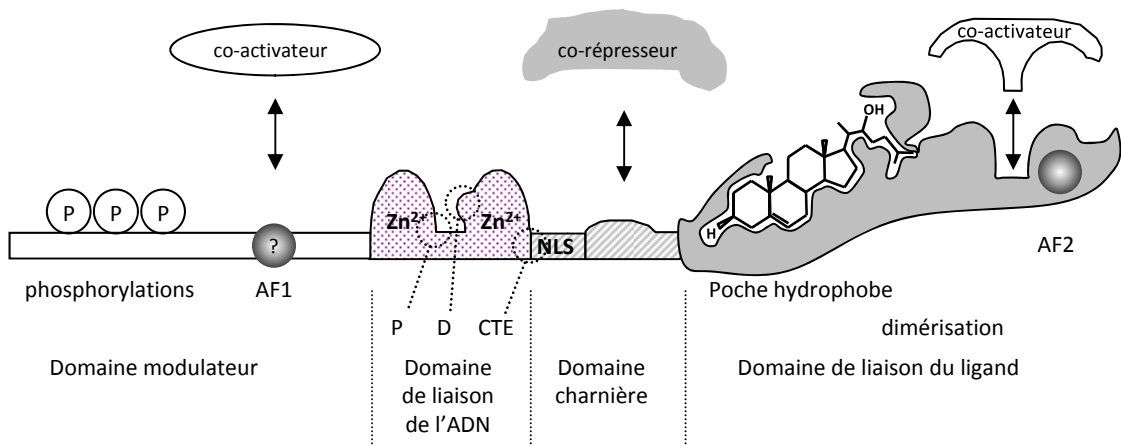


Figure 12 : Structure schématique des récepteurs nucléaires

Le ligand utilisé dans ce schéma est le 22(R)-hydroxy-cholestérol, ligand de LXR. AF1 et AF2 : domaines d'activation ; P : boîte P ; D : boîte D ; CTE : extension carboxy-terminale ; NLS : signal de localisation nucléaire ; (P) : site de phosphorylation. Pour certains récepteurs nucléaires, une interaction N-C terminale a été décrite: celle-ci impliquerait des co-activateurs. Pour AR, un second domaine d'activation, AF5 a été décrit dans la partie N-terminale. D'après Souidi *et al.*, 2004

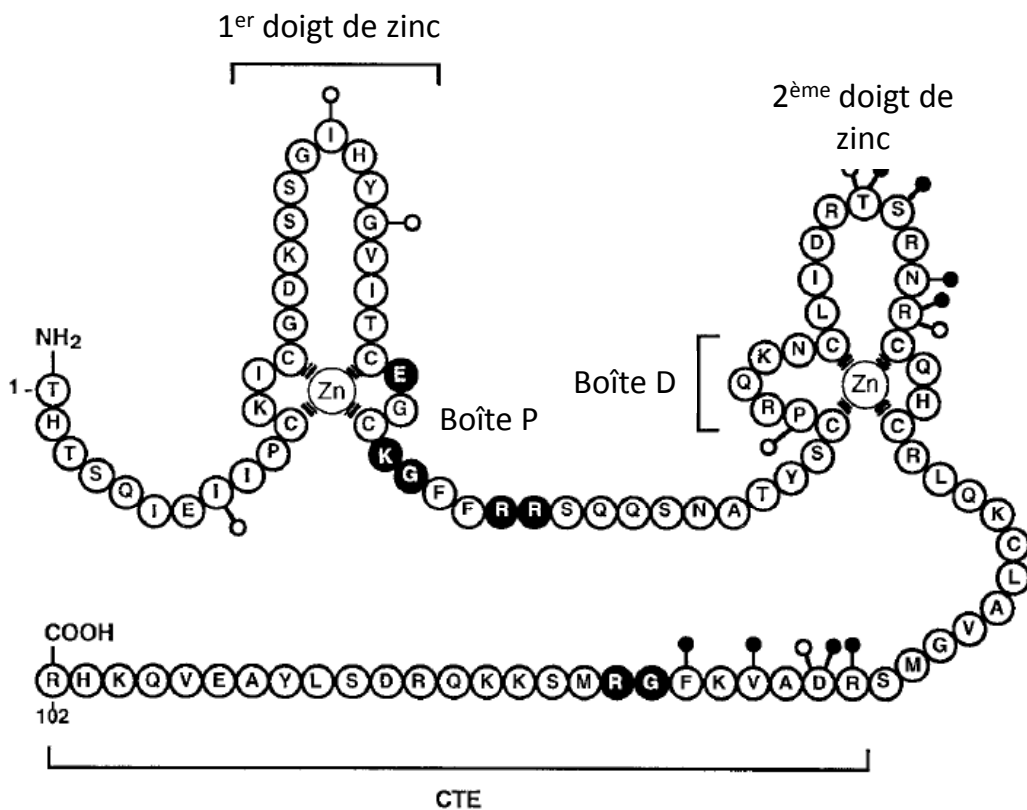


Figure 13 : Représentation schématique de la structure du domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'un récepteur nucléaire

Les deux doigts de Zinc et la CTE sont identifiés. Les acides aminés en noir sont impliqués dans les contacts directs avec l'ADN. Les cercles blancs représentent des acides aminés impliqués dans la dimérisation des récepteurs nucléaires. Adapté d'après Giguère, 1999.

Les récepteurs orphelins sont des protéines dont la structure présente une forte identité avec les autres récepteurs nucléaires mais dont les ligands naturels n'ont pas encore été identifiés. Parmi ceux-ci peuvent être cités SF1 et DAX1 dont les actions antagonistes sont impliquées dans le développement embryonnaire et dans le maintien des fonctions testiculaires, ovariennes et surrénaliennes (Iyer and McCabe, 2004, Val et al., 2003). Le récepteur orphelin SHP (*Short heterodimeric partner*) est un récepteur nucléaire atypique dépourvu de domaine de liaison à l'ADN. Il est principalement connu pour sa fonction au niveau du foie où il contrôle l'homéostasie des acides biliaires (Goodwin et al., 2000) mais il a également été décrit comme étant impliqué dans le contrôle de l'homéostasie testiculaire (Volle et al., 2007, Volle et al., 2009).

2. Structure des récepteurs nucléaires

La structure des différents récepteurs nucléaires est très conservée entre chaque classe de récepteur. Ils se composent de quatre domaines distincts (**figure 12**):

- **Le domaine N-terminal (domaine A/B)** qui porte le site d'activation AF-1 (*Activating Function 1*) permettant le recrutement de coactivateurs indépendamment de la présence du ligand dans la majorité des cas. Au niveau du récepteur des androgènes, il représente plus de la moitié de la protéine. Il intervient dans la régulation de la transcription grâce au domaine de transactivation AF-1 dépendant de la présence de l'hormone. On note également la présence sur AR du domaine de transactivation AF-5 indépendant de la présence de l'hormone (Brinkmann, 2001). Cette région comporte de nombreux sites de phosphorylation qui sont la cible de plusieurs voies de signalisation et qui contribuent à l'activité de AR ou encore à la détermination de l'effet antagoniste ou agoniste de l'hormone (Wang et al., 1999). Pour LXR, ce domaine est de taille plus réduite et il s'agit de la partie la moins conservée entre les deux isoformes de LXR.

- **Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C)** qui définit l'appartenance à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ce domaine (DBD, *DNA Binding Domain*) est caractérisé par la présence de deux doigts de zinc (**figure 13**). Dans chaque doigt de zinc la disposition de quatre cystéines permet la chélation d'un ion zinc. Le premier doigt de zinc porte une boîte P, dont la séquence en acides aminés est responsable de la spécificité de reconnaissance et de fixation de l'ADN (Zilliacus et al., 1995). Le second doigt de zinc porte la boîte D impliquée dans la dimérisation du récepteur ainsi que dans la stabilisation de l'interaction ADN-récepteur. C'est cette partie du DBD qui définit le caractère homodimérique ou hétérodimérique du récepteur nucléaire. Sous sa forme dimérique obligatoire, le récepteur des androgènes se lie à l'ADN sur les éléments de réponse aux androgènes ou ARE (*Androgen response element*) au niveau de séquences de type palindromique IR-3 (*inverted repeat 3*): 5'-GGA/TTACAnnnTGTTCT-3' (Roche et al., 1992). Le DBD de AR présente aussi une capacité de fixation à des ARE de type DR3 (*direct repeat 3*) (Schoenmakers et al., 2000). Ces derniers sont responsables de la spécificité d'action des androgènes (Claessens et al., 2001). Les ARE sont retrouvés au niveau des

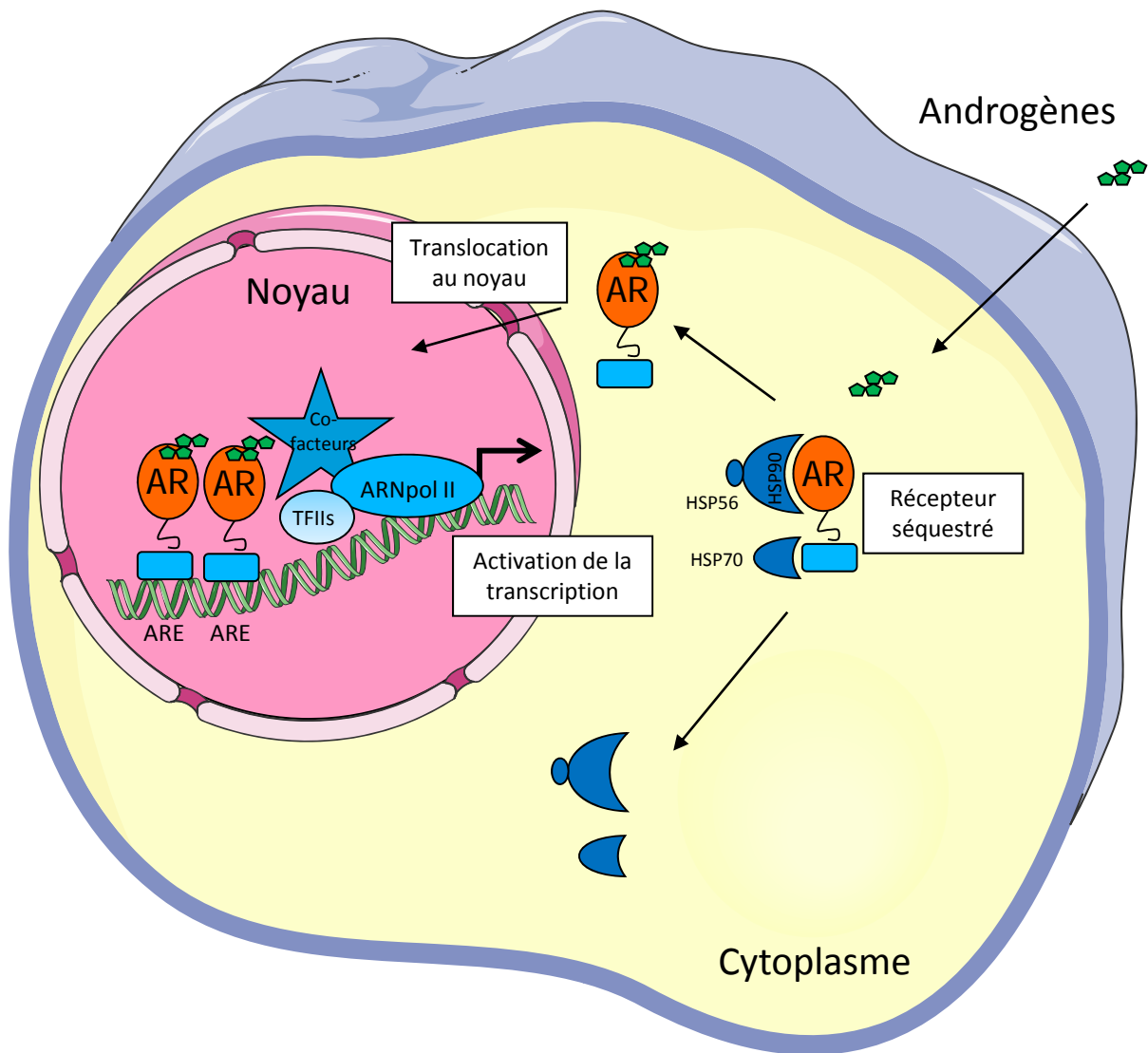


Figure 14 : Mode d'action génomique du récepteur des androgènes

La fixation du ligand, testostérone ou DHT (dihydrotestostérone), libère le récepteur des androgènes des protéines chaperonnes HSPs. Il est alors importé dans le noyau où il se fixe aux séquences spécifiques ARE (*androgen response element*) en homo-dimère. Après recrutement des co-facteurs et de la machinerie transcriptionnelle de base, facteurs de transcription II (TFIIIs) et ARN polymérase II, la transcription des gènes cibles de AR est activée.

séquences promotrices des gènes régulés par les androgènes, tels que le gène *PSA* chez l'homme ou la *probasine* chez le rat et la souris. Les LXR sont fixés sur leurs éléments de réponse (LXRE) dans les promoteurs de leurs gènes cibles avec leur partenaire RXR (Repa and Mangelsdorf, 2000). Les LXRE sur lesquels se fixe l'hétérodimère sont principalement de type DR4 ou DR1 dont les séquences canoniques sont DGGTYAyyynVGKKCA où D = A, G ou T ; K = G ou T ; V = A, C ou G ; et Y = C ou T pour les DR4 et AGGTCAaAGGTCA pour les DR1 (Willy et al., 1995). Dans les LXR, le DBD contient le signal de localisation nucléaire (NLS), une succession de 5 à 6 acides aminés basiques riches en arginine et lysine qui permet le transfert nucléaire.

- **Le domaine charnière (*hinge*, domaine D)** serait impliqué dans les changements conformationnels induits par la liaison du ligand. Il porte un site de phosphorylation nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de AR (Zhou et al., 1995). De plus, dans AR, ce domaine porte le signal de localisation nucléaire, NLS (*Nuclear Localization signal*) (Zhou et al., 1994). En ce qui concerne les LXR, le domaine charnière permet la fixation de co-répresseurs tels que N-Cor (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) ou SMRT (*Silencing Mediator for RAR and TR*) en absence du ligand, maintenant ainsi la transcription inactive (Chen and Evans, 1995, Horlein et al., 1995).

- **Le domaine C-terminal : le domaine de liaison du ligand (LBD) (domaine E/F)** qui est requis pour la dimérisation puisque les récepteurs nucléaires qui forment des dimères sont liés par leur LBD. Ce domaine définit une poche hydrophobe dans laquelle le ligand de nature lipophile peut se fixer. La nature des acides aminés qui composent cette poche est spécifique et non conservée entre les différents récepteurs nucléaires, ce qui leur confère leur spécificité vis-à-vis du ligand. L'hélice 12 porte la fonction AF-2 (*Activating function 2*) permettant le recrutement de co-activateurs portant des motifs LxxLL (L=Leucine) ou FxxLF (F=Phénylalanine) (Bourguet et al., 2000, Nolte et al., 1998). C'est la fixation de l'hormone qui va permettre un repliement de l'hélice 12 sur la poche de fixation du ligand, laissant apparaître le site AF-2 dans une conformation propice à la fixation de co-activateurs (Bourguet et al., 1995). Tout ligand induisant un repliement différent de l'hélice 12 pourrait ainsi empêcher le recrutement de co-activateurs et se comporterait alors comme une molécule antagoniste (Shiau et al., 1998). Le LBD de AR permet aussi la liaison entre AR et les protéines chaperonnes HSP (*heat shock protein*) (Fang et al., 1996). Les LXR sont des protéines acétylées au niveau des résidus K432 sur LXR α et K433 sur LXR β proches du site AF2 (Li et al., 2007).

3. Mécanismes d'action

a. Mode d'action du récepteur des androgènes

(i) Mode d'action génomique du récepteur des androgènes

On qualifie de génomique le mode d'action selon lequel le récepteur des androgènes agit en tant que facteur de transcription (**Figure 14**). En absence de liaison à son ligand, AR se trouve séquestré au niveau du cytoplasme. Le récepteur des androgènes se trouve en effet associé à un complexe protéique

qui contient notamment les protéines de choc thermique HSP telles que HSP90, HSP70 et l'immunophiline (HSP56/FKBP52). Le rôle premier de ces protéines chaperonnes est de masquer le NLS, de maintenir AR sous forme stable et sous une conformation favorable à la fixation du ligand (Marivoet et al., 1992, Pratt et al., 1992, Pratt and Toft, 1997). Les interactions entre AR et ces protéines sont transitoires et résultent de cycles d'association et de dissociation organisés autour de HSP90. La fixation du ligand au niveau du LBD du récepteur entraîne le découplage des protéines chaperonnes, le démasquage du NLS, sa translocation vers le noyau et sa dimérisation. Une fois dans le noyau, le récepteur se lie à l'ADN sous forme d'homodimère au niveau des éléments de réponse dans les promoteurs de ses gènes cibles. La liaison du récepteur sur ses séquences cibles entraîne le recrutement de co-facteurs, de la machinerie transcriptionnelle de base et de l'ARN polymérase II. Les co-facteurs permettent de moduler les interactions protéine-protéine au sein du complexe de transcription et le recrutement d'histones acétyltransférases qui induisent la décondensation de la chromatine, ce qui permet à la machinerie transcriptionnelle de se situer dans un environnement chromatinien favorable à la transcription (Heinlein and Chang, 2002). Parmi les co-activateurs, nous pouvons citer ceux de la famille p160 qui inclut SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*), SRC-2 et SRC-3 qui permettent le recrutement d'autres co-régulateurs (Demarest et al., 2002). Ces co-activateurs vont interagir avec la partie N-terminale de AR *via* une région riche en glutamine (Bevan et al., 1999). Les co-activateurs SRC vont par exemple recruter CBP/p300 (*CREB (cAMP response element-binding)-binding protein*) et p/CAF (*P300/CBP-associated factor*). CBP/p300 et p/CAF possèdent une activité HAT (*histone acetyl-transferase*) qui, en désacétylant les histones, vont induire une décondensation de la chromatine favorisant ainsi le recrutement du complexe de transcription. De nombreuses autres protéines s'associent à AR pour en favoriser l'action transactivatrice, comme ARA 70 (*AR-associated protein-70*), ARA 55 et ARA 54 (Heinlein and Chang, 2002, Zhou et al., 2002). La fixation des co-activateurs se fait en présence de ligand agoniste, au niveau de l'hélice 12 qui est repliée sur la poche de fixation du ligand. C'est ce changement de conformation qui rend l'accès du récepteur favorable pour des molécules co-activatrices uniquement. En revanche lorsqu'un ligand antagoniste comme le bicalutamide (Casodex®) se fixe dans la poche hydrophobe, l'hélice 12 ne se replie pas sur la poche de fixation du ligand ne créant donc pas cet accès facilité pour les co-activateurs. En revanche, sous cette conformation c'est l'accès aux co-répresseurs tels que NcoR ou SMRT qui est favorisé (Kang et al., 2004, Wang et al., 2001). Ces co-répresseurs vont inhiber la transcription dépendante de AR en recrutant notamment des protéines à activité HDAC (*Histone deacetylases*) qui vont compacter la chromatine.

(ii) Mode d'action non-génomique

Les hormones stéroïdes agissent classiquement par l'intermédiaire de leurs récepteurs qui jouent leurs rôles de facteur de transcription au niveau de l'ADN comme nous venons de le décrire. Ces processus qui font intervenir les mécanismes de transcription et de traduction nécessitent un délai minimum de une à plusieurs heures pour avoir leurs effets. Néanmoins, il est désormais admis que les

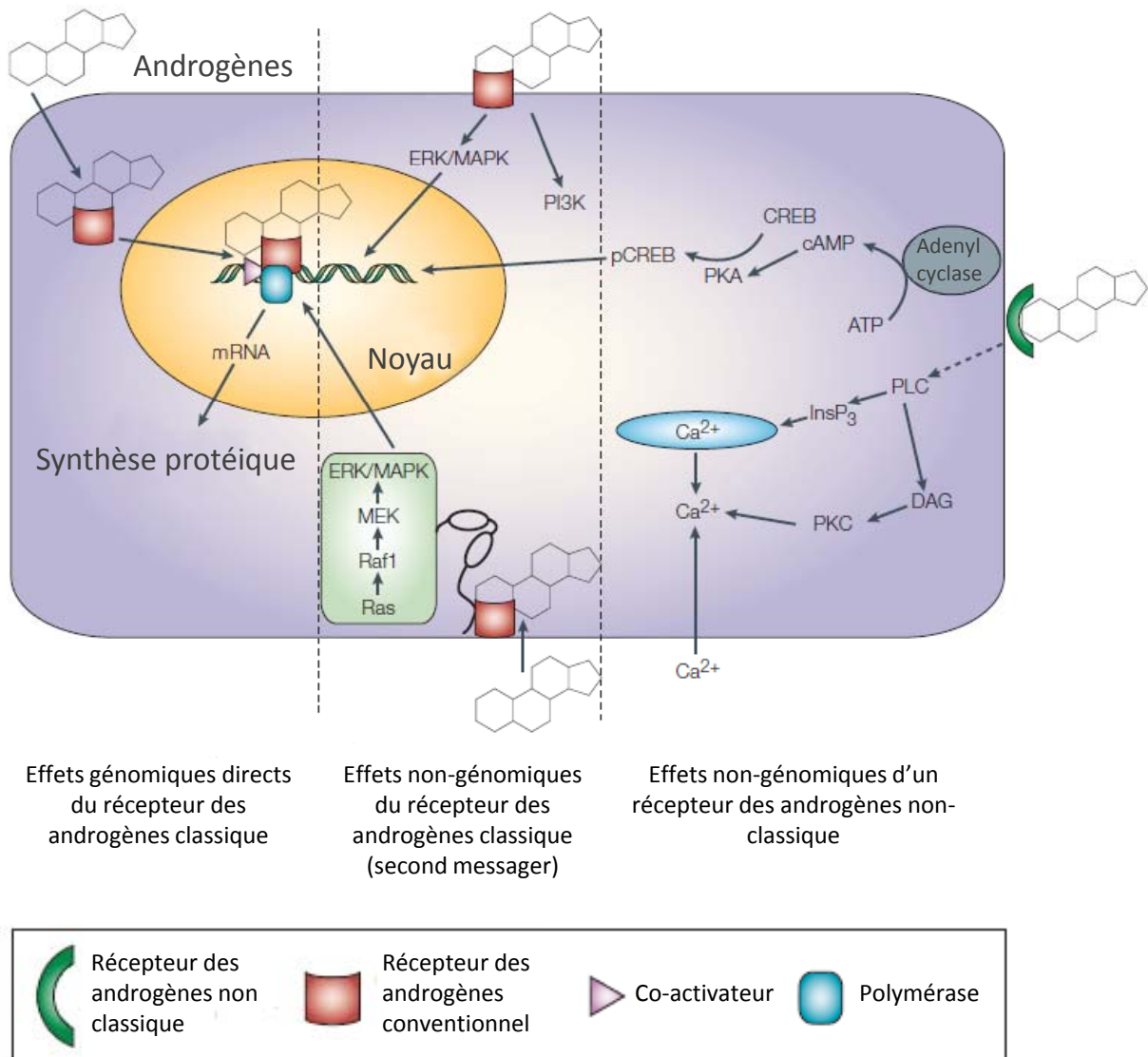


Figure 15 : Différents modes d'action du récepteur des androgènes

En plus de la voie dite génomique, le récepteur des androgènes peut initier des effets rapides non-génomiques par l'activation de voies alternes. Le récepteur cytosolique classique peut en effet activer des voies de signalisation telles que celle de la PI3K (phosphoinositid-3-OH kinase) ou celle des MAPK (mitogen activated kinase). De plus, les androgènes peuvent aussi induire la mobilisation du calcium intra-cellulaire ainsi que l'activation de l'adénylate cyclase en se liant à un récepteur membranaire différent de leur récepteur classique. (p)CREB, (phosphorylated)-cyclic AMP response element binding protein; DAG, diacylglycerol; ERK/MAPK, extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase; InsP₃, inositol triphosphate, PI3K, phosphatidylinositol triphosphate, PKA, protein kinase A; PKC, protein Kinase C; PLC, phospholipase C. Modifié d'après Losèl et al., 2003.

hormones stéroïdes ont la capacité d'induire des réponses cellulaires dans un délai très court de quelques secondes à quelques minutes. Ces effets qualifiés de non-transcriptionnels ou non-génomiques n'impliquent pas d'interaction récepteur/ADN. Ils impliquent la mobilisation rapide de seconds messagers tels que Ca^{2+} , l'IP3 (*inositol triphosphate*), le DAG (*diacylglycérol*) et l'activation de voies de signalisation par l'intermédiaire de la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC), la voie des MAP-Kinases (*mitogen activated kinase*) ou de la PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) (Falkenstein et al., 2000, Losel and Wehling, 2003). Les androgènes exercent différents rôles intracellulaires *via* ce mode d'action non génomique, comme par exemple des modifications des jonctions cellulaires communicantes, une modulation de la plasticité neuronale ou encore une relaxation aortique (Costarella et al., 1996, Pluciennik et al., 1996, Yamada, 1979). Ces effets non-génomiques semblent adopter divers mode d'action impliquant ou non le récepteur des androgènes (**figure 15**).

Les stéroïdes de nature hydrophobe peuvent interagir avec les têtes polaires des phospholipides membranaires et ainsi influencer la fluidité membranaire. Ce phénomène n'est cependant décrit que pour des concentrations supra-physiologiques en stéroïdes (Duval et al., 1983).

D'autres effets impliquent le récepteur des androgènes. Par exemple, AR est capable d'induire la voie des MAP-Kinase indépendamment de son activité transcriptionnelle. Ceci a notamment été démontré dans les cellules tumorales de prostate LNCaP ou les cellules PC3, stablement transfectées avec un vecteur d'expression de AR sauvage, dans lesquelles le traitement avec de la DHT induit une activation rapide et transitoire des MAPK résultant en une phosphorylation des kinases ERK1 (*Extracellular signal-regulated kinases 1*) et ERK2 et une activation du facteur de transcription ELK-1 (*E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1*) (Peterziel et al., 1999). L'activation de ELK-1 serait dépendante de l'action des voies PI3K et PKC. Il a été montré que par l'intermédiaire de cette activation de la voie MAPK et d'un autre facteur de transcription, CREB (*cAMP response element binding protein*), les androgènes pouvaient exercer une action sur les cellules de Sertoli et ainsi moduler la spermatogenèse (Fix et al., 2004). L'activation de la voie PI3K par les androgènes impliquant le récepteur conventionnel a été étudiée dans plusieurs systèmes cellulaires notamment les cellules tumorales prostatiques et épithéliales saines. Dans ces dernières, AR interagit avec la sous-unité p85 α de la PI3K, ce qui active la protéine kinase AKT et inhibe le facteur pro-apoptotique bad (Baron et al., 2004, Sun et al., 2003). Par l'intermédiaire de ce mécanisme, les androgènes sont donc impliqués dans la survie cellulaire et la protection contre l'apoptose.

Les androgènes pourraient aussi exercer leurs effets par l'intermédiaire d'un récepteur non conventionnel, localisé au niveau de la membrane plasmique et couplé à la protéine G. Cette hypothèse a été suggérée dans des cellules T, des macrophages, des cellules de Sertoli ou dans les cellules LNCaP, où le traitement avec de la testostérone-BSA (testostérone-*Bovine serum albumine*, qui ne peut pénétrer rapidement la membrane plasmique) induit une augmentation très rapide du taux de Ca^{2+} intracellulaire

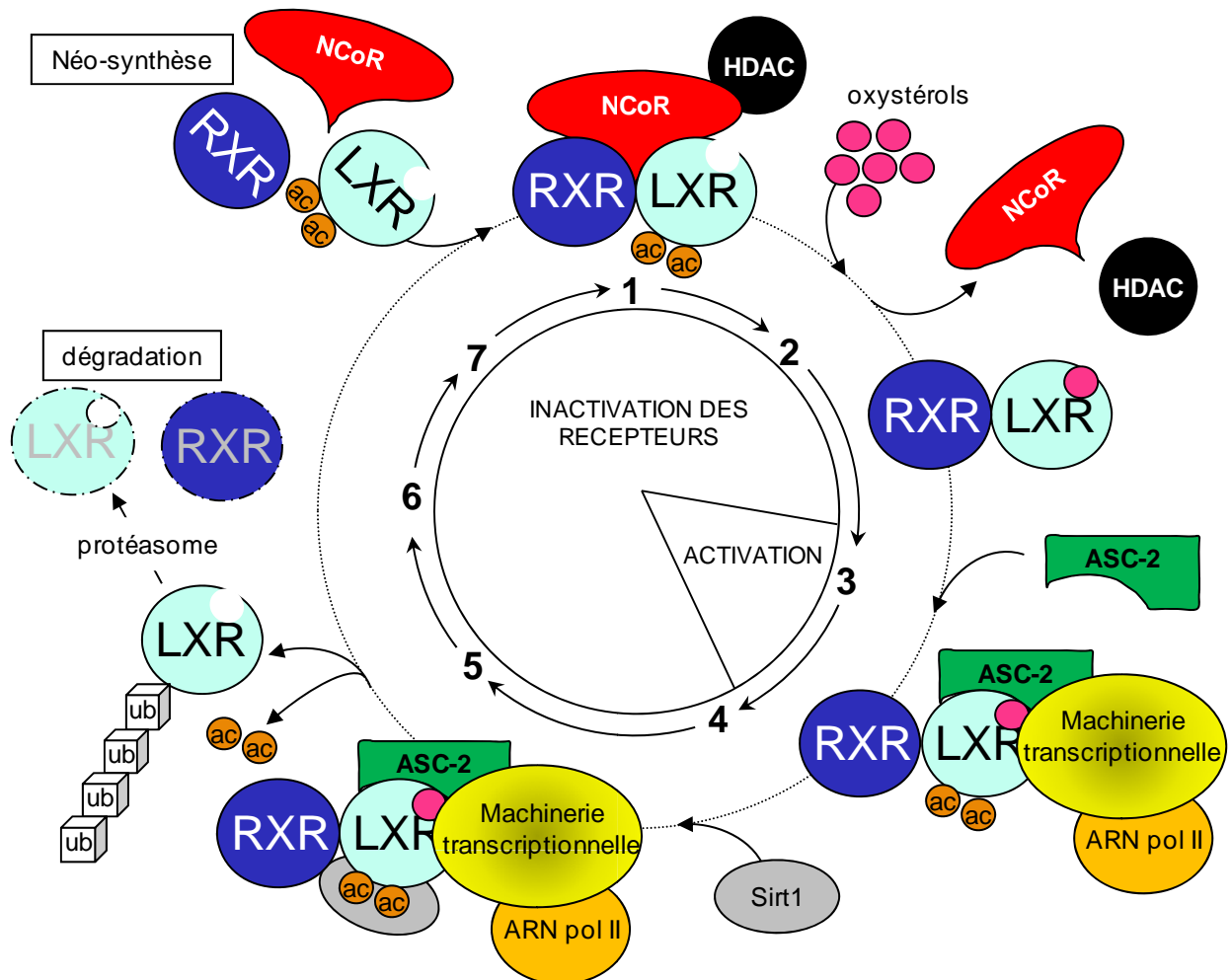


Figure 16 : Représentation schématique du cycle d'activation/inhibition de l'hétérodimère LXR/RXR

En absence de ligand, l'hétérodimère LXR/RXR est lié constitutivement à l'ADN avec des co-répresseurs (comme N-CoR). La liaison des agonistes d'un ou des deux récepteurs induit le relargage des co-répresseurs et le recrutement d'une série de co-activateurs (par exemple, ASC-2) au niveau du domaine AF-2. La fixation des protéines de la machinerie transcriptionnelle et de l'ARN polymérase II augmente la transcription des gènes cibles. La sirtuine 1 (Sirt1) LXR qui sera alors ubiquitinylé et dirigé vers le protéasome. Ac : acétylation ; ASC-2 : *activating signal cointegrator-2* ; HDAC : *histone deacetylase* ; LXR : *liver X receptor* ; NcoR : *nuclear receptor corepressor* ; RXR : *retinoid X Receptor* ; Sirt1: sirtuine 1 ; Ub: ubiquitine. D'après Viennois *et al.* 2011a.

(Benten et al., 1999, Benten et al., 1999, Rahman and Christian, 2007). Cette mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire est insensible à l'action des anti-androgènes mais est en revanche inhibée par la toxine de *pertussis*, ce qui suggère l'implication d'un récepteur couplé aux protéines G dans la transduction du signal. Il a de plus été montré dans des modèles de cellules LNCaP que la DHT induisait une augmentation rapide d'AMPc (Rosner, 1990) et que cette activation était abolie en présence d'un sérum dépourvu de la protéine SHBG (*Sex hormone binding globulin*), transporteur des androgènes dans le sang. Ainsi, la présence à la fois du transporteur SHBG et du récepteur membranaire de SHBG a-t-elle été montrée comme nécessaire à l'induction d'AMPc par les androgènes (Fortunati, 1999). L'AMPc irait donc activer la PKA qui pourrait à son tour moduler le niveau de phosphorylation de AR (Heinlein and Chang, 2002). On ne sait pas à l'heure actuelle si le récepteur couplé aux protéines G responsable de l'induction calcique après une stimulation androgénique est en fait le récepteur de SHBG ou un autre récepteur des androgènes non conventionnel et membranaire.

L'action non génomique de AR est donc modulée par au moins deux protéines connues pour lier les androgènes : AR et SHBG. Il est supposé que cette voie non-génomique pourrait aussi avoir des répercussions sur les effets transcriptionnels des androgènes en modulant, par l'intermédiaire de phosphorylations, l'activité transcriptionnelle de AR ou d'autres facteurs de transcription. Il est donc probable que les voies génomiques et non génomiques se croisent et agissent même de concert pour contrôler l'action des androgènes dans la cellule.

b. Mode d'action de LXR

Les LXR sont des protéines acétylées, fixées constitutivement sur leurs éléments de réponse (LXRE) dans les promoteurs de leurs gènes cibles, avec leur partenaire obligatoire RXR (Repa and Mangelsdorf, 2000) (**Figure 16**). La capacité de transcription de l'hétérodimère est inhibée par la présence de co-répresseurs (Hu et al., 2003), comme N-CoR et SMRT qui contactent à la fois directement et indirectement des histones désacétylases *via* des protéines de type Sin3A (étape 1) (Lazar, 2003). La chromatine est ainsi maintenue dans un état de condensation non permissif pour la transcription. La présence constitutive sur l'ADN des complexes RXR/LXR-Co-répresseur-HDAC agit donc comme un répresseur basal de l'expression génique comme le montre la levée de la répression basale de certains gènes cibles comme StAR dans les souris *lxra β -/-*. La liaison des oxystérols aux LXR (étape 2) entraîne une modification tridimensionnelle de la poche hydrophobe et le départ des co-répresseurs. Ce réarrangement permet la libération de l'hélice 12, agissant ainsi comme un « couvercle » qui scelle la poche en renforçant les interactions entre le ligand et la poche hydrophobe ainsi que la fixation de co-activateurs tel que ASC-2 (*Activating signal cointegrator-2*) (Lee et al., 2008) sur l'AF2 (Svensson et al., 2003). Cette cascade d'évènements provoque un environnement chromatinien permissif (étape 3) pour la transcription par le recrutement de protéines à activité histone acétyltransférase comme SRC-1, la mobilisation de facteurs affectant la méthylation des histones comme Rap250 et/ou la fixation des

protéines de la machinerie transcriptionnelle de base. De façon intéressante, la fixation concomitante de la sirtuine 1 (étape 4) provoque la désacétylation de LXR, son ubiquitination (étape 5), le routage vers le protéasome et sa dégradation (étape 6). Par la suite, deux nouvelles protéines RXR et LXR néosynthétisées s'hétérodimérisent en solution par leurs domaines de liaison du ligand (étape 7) et le complexe reconnaît les éléments de réponse sur l'ADN. L'activité transcriptionnelle des LXR peut aussi être modulée par une SUMOylation (Lee et al., 2009), des phosphorylations ou encore la compétition sur les sites de fixation avec d'autres récepteurs nucléaires.

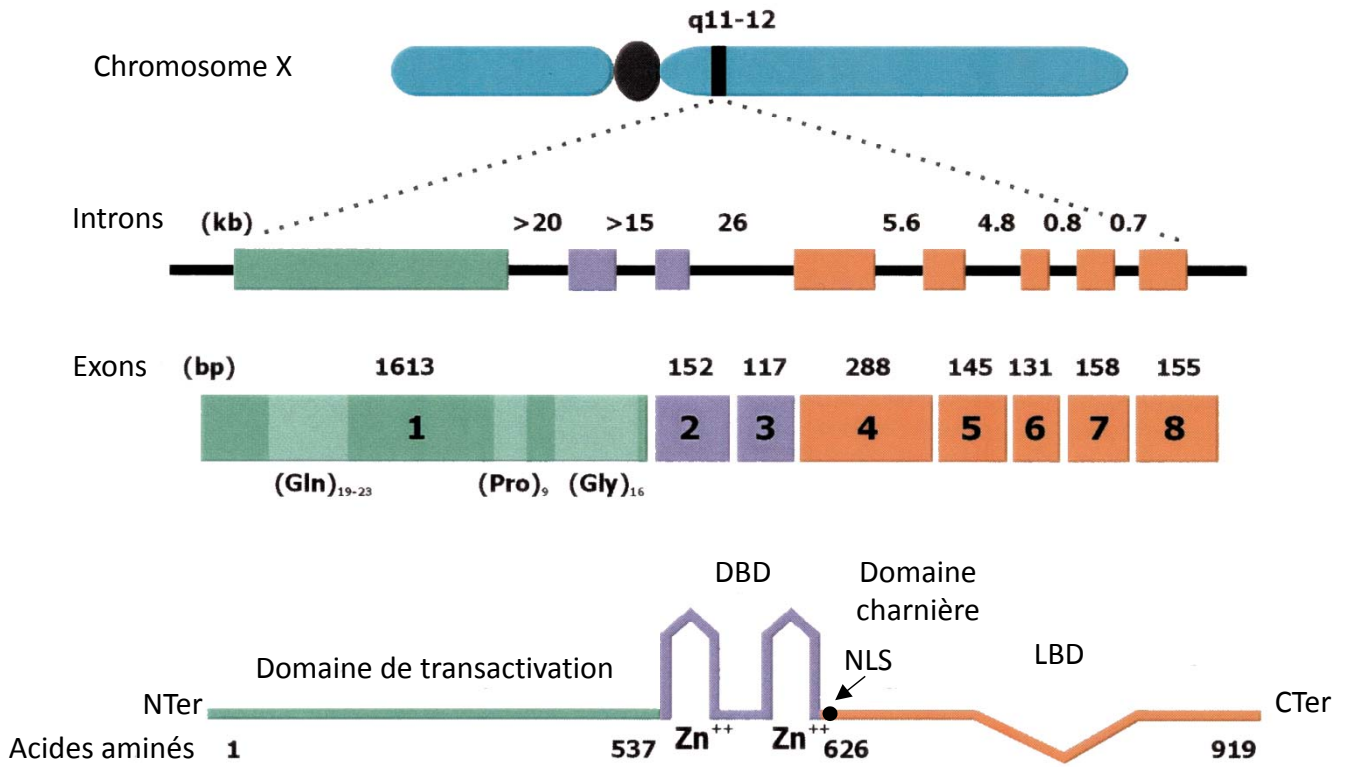


Figure 17 : Organisation génomique du gène codant AR et représentation schématique de la protéine AR

Le gène codant AR s'étend sur environ 90 Kb sur le bras long du chromosome X dans la région q11-12. Les organisations introniques et exoniques sont représentées. Le premier exon code le domaine N-terminal de la protéine. Le diagramme de la structure protéique permet de visualiser la correspondance entre les exons et les régions de la protéine. D'après Gelmann *et al.* 2002

B. Le récepteur des Androgènes (AR)

Le récepteur des androgènes (NR3C4) humain a été cloné en 1988 par plusieurs équipes (Chang et al., 1988, Lubahn et al., 1988). Il est codé par une seule copie d'un gène d'environ 90 Kb localisé sur le bras long du chromosome X dans la région Xq11-12 (**Figure 17**). Le poids moléculaire de la protéine AR est de 110 kDa (van Laar et al., 1989) mais il faut noter qu'il existe une autre isoforme, très minoritaire, nommée A, qui est issue d'une initiation de traduction interne donnant lieu à une protéine de 87 kDa déléetée de sa partie N-terminale et dont la fonction est encore mal connue (Gao and McPhaul, 1998).

1. Les ligands du récepteur des androgènes

a. Les androgènes

Les deux androgènes qui se fixent et activent naturellement le récepteur des androgènes sont la testostérone et son dérivé métabolique 5 α -réduit, la 5 α -dihydrotestostérone (DHT) (**Figure 18A**). Chaque molécule possède ses spécificités d'action. La testostérone active AR principalement au niveau du muscle ou de l'os pour en favoriser la croissance. Elle est également impliquée dans le développement des structures génitales dérivées des canaux de Wolf (épididyme, canal déférent, vésicules séminales), dans la spermatogenèse, l'érythropoïèse ou encore dans le contrôle négatif de sa propre synthèse, au niveau du système nerveux central. En revanche, la DHT est l'androgène actif au niveau de la prostate, des autres tissus dérivés de l'UGS (urètre, pénis) ou encore de la peau. La DHT est également impliquée dans la mise en place des caractères sexuels secondaires (Russell and Wilson, 1994, Tostain et al., 2004). Notons que la DHT, par son action sur les follicules capillaires, serait responsable de la perte des cheveux souvent observée chez les hommes. L'affinité de chacun de ces androgènes vis-à-vis de leur récepteur est différente. En effet, la testostérone est cinq à dix fois moins affine pour le récepteur des androgènes que la DHT et le taux de dissociation de la testostérone est de deux à cinq fois plus rapide que celui de la DHT en fonction du tissu (Grino et al., 1990, Wilson and French, 1976).

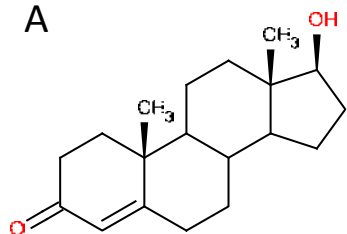
En plus des androgènes naturels, il existe des androgènes synthétiques agonistes dont le plus connu est le méthyltriénolone, R1881, composé non aromatisable (**figure 18B**), utilisé en recherche fondamentale pour activer le récepteur des androgènes. L'utilisation de molécules à effet androgénique en thérapeutique est rare, mis à part dans des cas d'hypogonadisme masculin. Les stéroïdes comme le R1881 sont utilisés par les athlètes comme produit dopant pour leurs effets anabolisants (Bhasin et al., 1996).

b. Les anti-androgènes

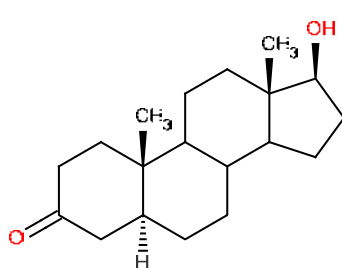
En thérapeutique, les molécules antagonistes du récepteur des androgènes ou anti-androgènes sont principalement utilisées dans le traitement du cancer de la prostate et parfois pour traiter la calvitie ou l'acné. L'effet des anti-androgènes seuls est cependant limité puisqu'ils augmentent la production de

Androgènes naturels et synthétiques

A

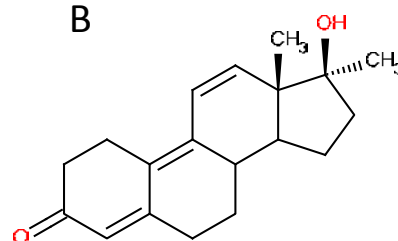


Testostérone



Dihydrotestostérone

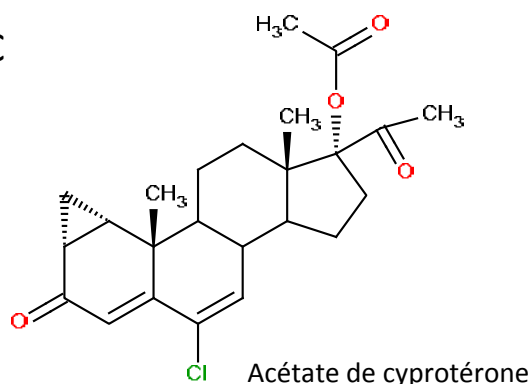
B



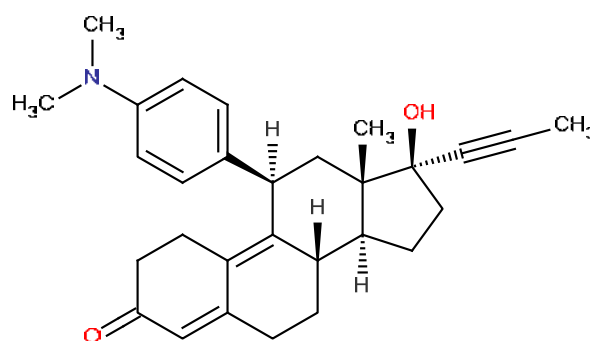
R1881

Anti-androgènes stéroïdiens

C



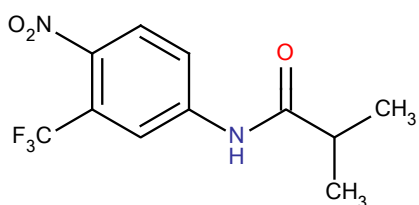
Acétate de cypotérone



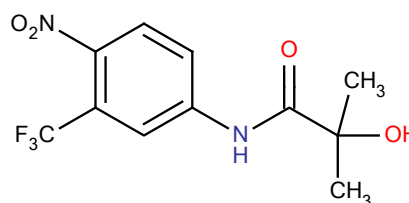
RU486

Anti-androgènes non stéroïdiens

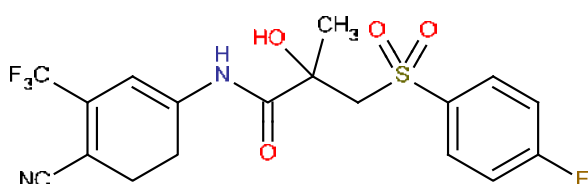
D



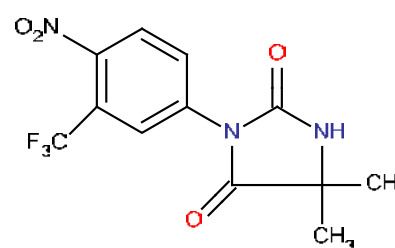
Flutamide



Hydroxy-flutamide



Bicalutamide



Nilutamide

Figure 18 : Structures chimique d'androgènes naturels (A) et synthétiques (B), d'anti-androgènes stéroïdiens (C) et non-stéroïdiens (D)

RU8181 : méthyltriérolone ; RU486 : mifepristone

LH (*Luteinizing hormone*) hypophysaire et donc la production de testostérone endogène. C'est pourquoi les anti-androgènes sont souvent utilisés en conjugaison avec des analogues de la GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) afin de supprimer la production endogène de testostérone (Gao, 2010). Les anti-androgènes peuvent être stéroïdiens comme c'est le cas de l'acétate de cyprotérone (Androcur®) ou du RU486 (Mifepristone, Mifégyne®) (**Figure 18C**) ou non-stéroïdiens comme le flutamide (Eulexin®) ou son métabolite actif l'hydroxy-flutamide, le bicalutamide (Casodex®) ou encore le Nilutamide (Anandron®) (**Figure 18D**). Un premier mode d'action des anti-androgènes notamment du bicamutamide et du nilutamide est de s'opposer au transfert de AR du cytosol vers le noyau (Georget et al., 2002). De plus, le bicalutamide augmente le taux de renouvellement du récepteur et régule négativement son niveau de phosphorylation (Waller et al., 2000, Wang et al., 1999). Les anti-androgènes peuvent également s'opposer à la liaison de AR à l'ADN, comme c'est le cas de l'hydroxy-flutamide et du nilutamide (Kuil and Mulder, 1996). Enfin, il a été montré que les anti-androgènes induisaient un repliement différent du domaine de liaison de l'hormone qui se traduit par une conformation différente du récepteur. Ce dernier va alors présenter une affinité moindre pour les molécules co-activatrices (Kang et al., 2004). Au total, l'action des anti-androgènes résulte en une inhibition de l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes.

2. Biosynthèse des androgènes

Chez l'homme, la testostérone est le principal androgène circulant. Elle est produite à 95% dans le testicule par les cellules de Leydig situées entre les tubes séminifères. Des androgènes sont également synthétisés en très faible quantité au niveau des glandes surrénales par la zone réticulée située dans le cortex. Le précurseur des androgènes est le cholestérol qui contient 27 atomes de carbone (C27). Ce dernier peut être soit produit par les cellules de Leydig elles-mêmes à partir de l'acétate intracellulaire, soit venir de l'alimentation (Morris et al., 1957), après extraction des lipoprotéines plasmatiques et notamment de la fraction de faible densité (LDL, *Low density lipoprotein*) (Freeman and Ascoli, 1982), ou encore issu des membranes cellulaires (Nagy and Freeman, 1990). La stéroïdogénèse débute par le transport du cholestérol du cytoplasme vers l'intérieur de la mitochondrie par une protéine de transfert, dite protéine activatrice de la stéroïdogénèse, StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) (**Figure 19**) (Stocco, 1997). Cette première étape de la stéroïdogénèse, qui en est aussi l'étape limitante, est régulée par la gonadostimuline LH (Clark and Stocco, 1995). Notons que les enzymes de la stéroïdogénèse sont également sous le contrôle de la LH. Dans la mitochondrie, le début de la cascade de la stéroïdogénèse est marqué par le clivage du cholestérol (C27) en prégnénolone (C21) par le cytochrome P450sc (P450 *side-chain cleavage*). La prégnénolone, biologiquement inactive, est exportée dans le réticulum endoplasmique où elle est convertie en une variété de stéroïdes à 19 atomes de carbones (C19). Deux voies sont alors possibles pour la suite de la synthèse de la testostérone désignées sous les termes de voie $\Delta 4$ (majoritaire chez la souris) ou voie $\Delta 5$ (majoritaire chez l'homme) :

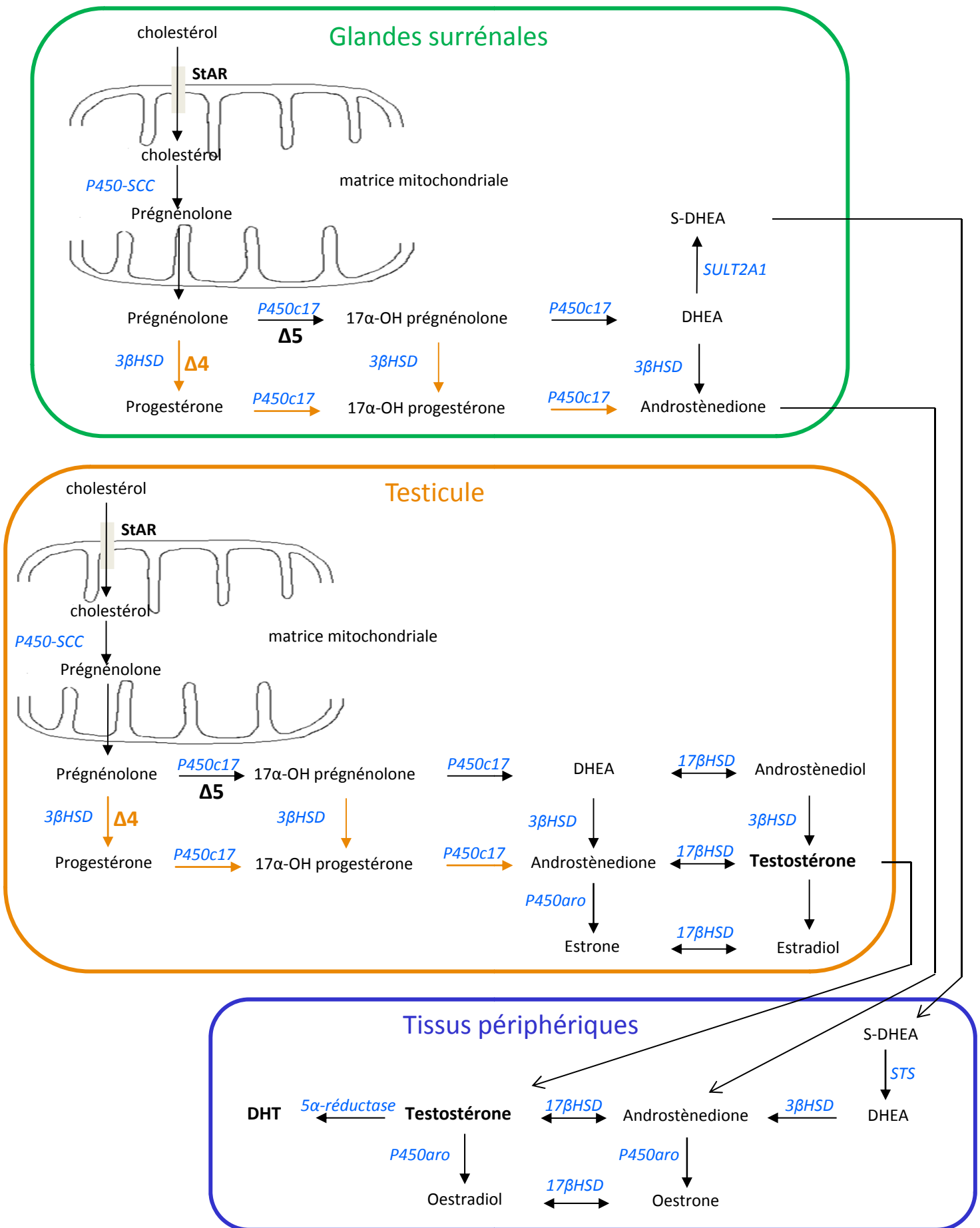


Figure 19 : Voies de biosynthèse des androgènes.

La synthèse de testostérone à partir du cholestérol est assurée par la voie Δ4 (flèches en orange) et Δ5. La voie Δ4 est la voie majoritaire chez la souris et la voie Δ5 est la voie majoritaire chez l'homme. Chez la souris, la glande surrénale ne produit pas d'androgènes puisque l'enzyme P450c17 est absente. P450sc, cytochrome P450 side chain cleavage ; 3β-HSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase ; P450c17, cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20 lyase ; 17β-HSD, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase ; DHEA, déhydroépiandrostérone ; DHT, dihydrotestostérone ; P450aro, cytochrome P450 aromatasase ; STS, steroid sulfatase ; SUL2A1, sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1.

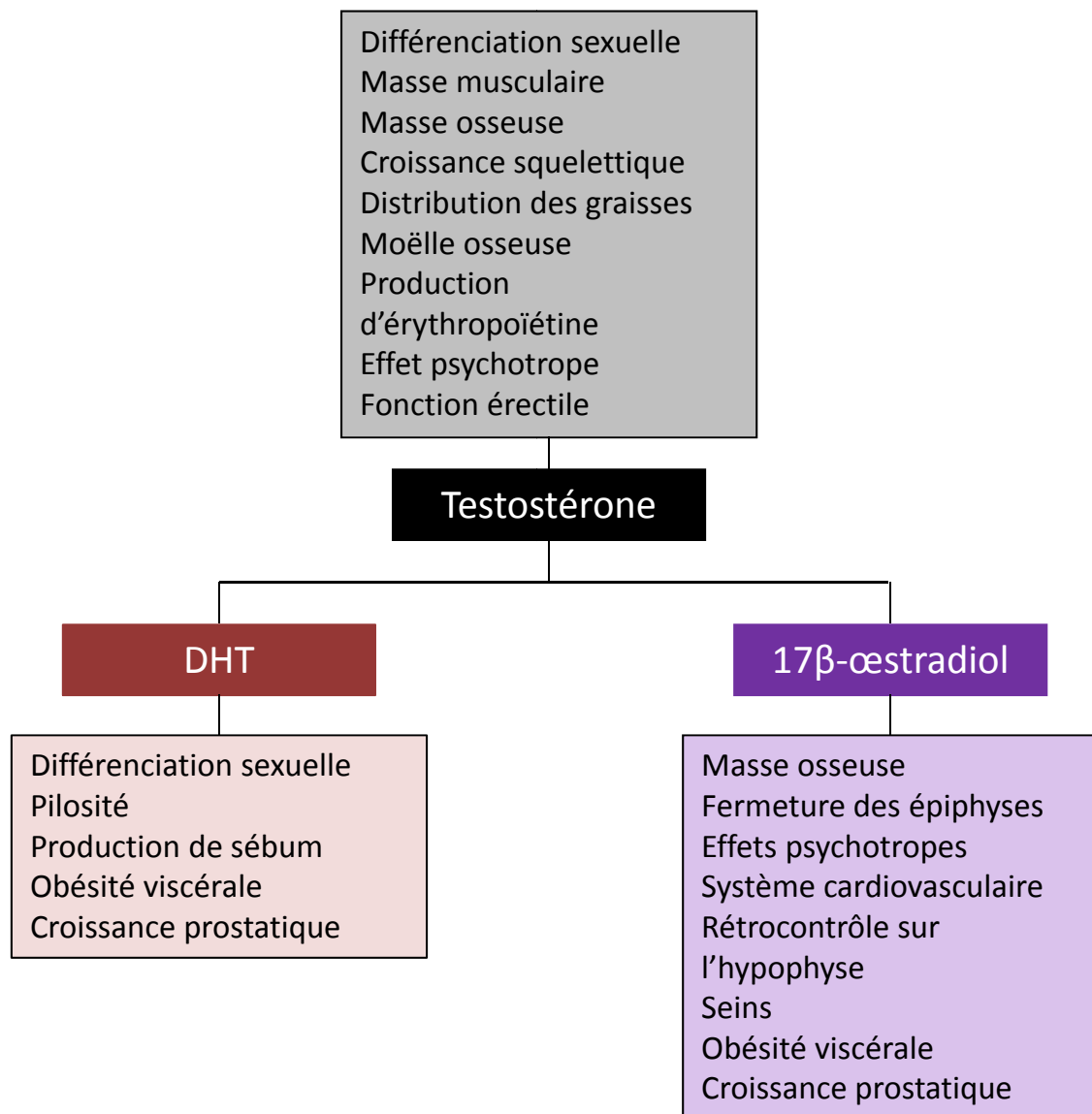


Figure 20 : Activités tissulaires et fonctionnelles spécifiques de la testostérone et de ses principaux métabolites la Dihydrotestostérone (DHT) et le 17β-œstradiol. D'après Tostain *et al.* 2004.

- La voie $\Delta 4$ fait tout d'abord intervenir l'enzyme 3β -HSD (*hydroxysteroid dehydrogenase*) qui réduit la prégnénolone en progestérone, laquelle est alors successivement transformée par le cytochrome P450c17 (*cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20 lyase*) en 17α -hydroxy-progestérone puis en $\Delta 4$ -androstènedione. Ce stéroïde C19 est transformé en testostérone par l'enzyme 17β -HSD.

- La voie $\Delta 5$ fait quant à elle intervenir en premier l'enzyme P450c17 qui transforme successivement la prégnénolone en 17α -hydroxy-prégnénolone et en DHEA (*déhydroépiandrostérone*). La DHEA est alors réduite en testostérone après l'action successive des 3β - et 17β -HSD.

La testostérone peut alors traverser librement la membrane plasmique des cellules de Leydig vers les autres compartiments cellulaires du testicule puis diffuser dans le plasma sanguin. Dans le plasma 2% de la testostérone circule sous forme libre, 45 à 75% est liée à des protéines de transport appelées TeBG (*testosterone binding-globulin*) ou SHBG (*sex hormone binding-globulin*) et 30 à 55% sous forme liée à l'albumine (Clark and Stocco, 1995, Rosner, 1991).

Au niveau de la glande surrénale humaine, les androgènes produits sont la DHEA et l'androstènedione. La DHEA peut être sulfatée au sein des cellules surrénaliennes pour donner un autre stéroïde, le sulfate de DHEA (S-DHEA), qui ne possède pas de rôle spécifique mais qui représente une réserve importante de DHEA en raison de sa demi-vie longue et de son inter-conversion continue avec la DHEA. La glande surrénale murine ne produit pas d'androgènes puisque l'enzyme CYP17 n'est pas exprimée. Ainsi, chez la souris, la totalité des androgènes est produite par le testicule.

3. Métabolisme des androgènes

La testostérone libre peut être transformée et agir en tant que pro-hormone mais elle est aussi conjuguée et dégradée. Ainsi le taux de testostérone circulant dépend d'un équilibre régulé entre sa synthèse, sa transformation et sa dégradation.

a. Testostérone et activité pro-hormonale

La testostérone libre a la possibilité d'agir directement sur le récepteur des androgènes puisque nous avons vu précédemment qu'elle était ligand de AR. C'est le cas dans certains tissus dépourvus d'activité 5α -réductase comme le muscle. Mais elle a aussi des effets indirects par le biais de métabolites actifs qui augmentent et diversifient ses effets biologiques (**figure 20**). Elle joue alors le rôle de pro-hormone. Ainsi la testostérone peut être réduite par la 5α -réductase en DHT. Elle peut également subir une aromatisation et être ainsi transformée en 17β -œstradiol qui activera un autre récepteur, celui des œstrogènes (ER, *Estrogen receptor α ou β*). L'action globale de la testostérone reflète ainsi la réponse intégrée de chaque tissu à la testostérone, la DHT et l'œstradiol.

(i) La transformation en DHT

Au niveau de certains tissus cibles comme la prostate, les vésicules séminales, la peau ou le foie, la transformation de la testostérone en DHT est catalysée par les enzymes 5 α -réductase de type I ou de type II (Russell and Wilson, 1994) codées respectivement par les gènes *srd5a1* et *srd5a2*. La déficience de l'isoforme II chez l'homme peut-être à l'origine d'un pseudohermaphrodisme (Andersson et al., 1991) car c'est l'isoforme prédominante au niveau des territoires sexuellement différenciés, alors que le type I est essentiellement hépatique.

(ii) La transformation en 17 β -œstradiol

La testostérone est métabolisée par l'aromatase P450arom, codée par le gène *cyp19*, en un œstrogène puissant, l'œstradiol (E2). Cette aromatisation, source de 75 à 90% des œstrogènes sériques de l'homme, a lieu dans les tissus périphériques, principalement le tissu adipeux et l'os (Simpson et al., 1999). Une petite quantité d'œstrogènes est également sécrétée dans le sang directement à partir du testicule (15%). Des mutations dans les gènes codant ER α (Smith et al., 1994) ou l'aromatase (Morishima et al., 1995) ont permis de confirmer l'importance de l'œstradiol chez les hommes, notamment dans la croissance et la minéralisation osseuse.

b. Le catabolisme de la testostérone

La concentration plasmatique de testostérone est la résultante de ce qui est produit et de ce qui est dégradé (appelé clairance métabolique). Les réactions catabolisant les androgènes se font majoritairement dans le foie, le rein, mais aussi dans la peau et la prostate pour aboutir à une élimination dans les urines ou par la peau. Les réactions cataboliques se déroulent en deux étapes :

- **L'étape d'oxydoréduction** : des oxydoréductases vont modifier les résidus hydroxyles ou cétones des stéroïdes dans le but de les inactiver.

- **L'étape de conjugaison** consiste en l'ajout d'acide glucuronique ou d'un groupement sulfate sur les stéroïdes. Cette modification résulte en la formation de composés sulfo- ou glucuro-conjugués, qui pourront être facilement éliminés dans les urines du fait de leurs propriétés hydrosolubles. Les enzymes qui permettent la sulfonation des stéroïdes sont les enzymes SULT (*sulfotransferase*). Lorsque les stéroïdes modifiés sont des androgènes, l'enzyme principalement impliquée est SULT2A1 (*sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1*) (**figure 19**) exprimée dans l'espèce humaine dans les tissus stéroïdogènes (glande surrénale, ovaire), ceux dépendant des androgènes (prostate) ainsi que dans le foie (Strott, 2002) alors que chez la souris elle est majoritairement exprimée dans le foie (Song et al., 1998). L'enzyme STS (*steroid sulfatase*) (**figure 19**) joue également un rôle dans l'homéostasie des androgènes, mais à l'inverse des enzymes transférases, elle retire les groupements sulfates du stéroïde au niveau des tissus cibles comme c'est le cas au niveau de la prostate (Reed et al., 2005). L'action des STS convertit ainsi les androgènes en une forme active. La glucuronidation

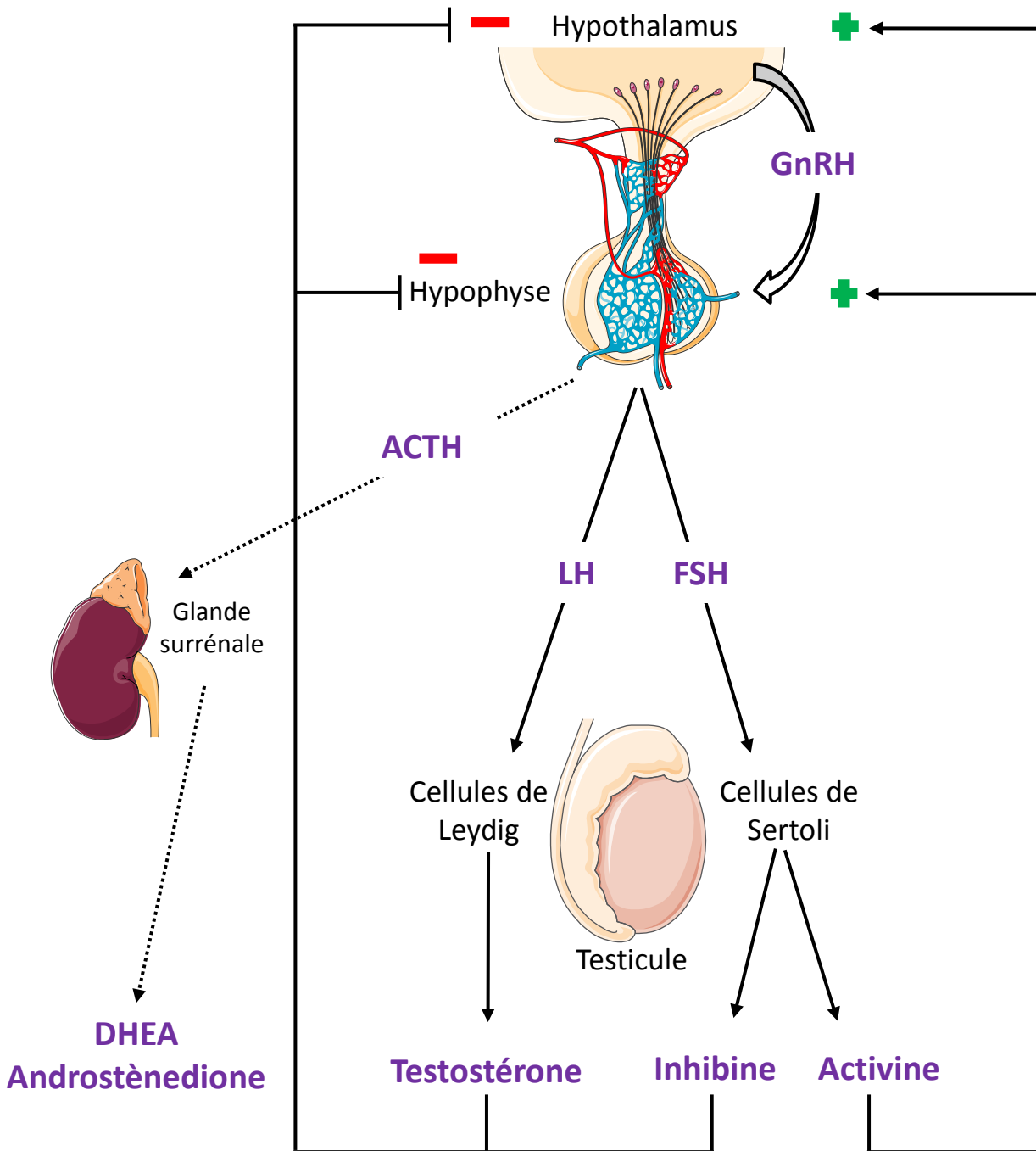


Figure 21 : Contrôle de la biosynthèse des androgènes par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

Les gonadostimulines FSH et LH produites par l'hypophyse stimulent la synthèse de testostérone au niveau testiculaire par les cellules de Leydig. En réponse à la FSH, les cellules de Sertoli libèrent des activines et inhibines qui exercent un rétrocontrôle positif et négatif respectivement sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. L'ACTH également produite par l'hypophyse, induit chez l'homme, la synthèse de DHEA et d'androstènedione au niveau des glandes surrénales (flèche en pointillés). ACTH, *adreno corticotropic hormone*; DHEA, *déhydroépiandrosterone* ; FSH, *folliculo-stimulating hormone*; GnRH, *gonadotropin releasing hormone*; LH, *luteinizing hormone*

se fait quant à elle grâce à l'action des enzymes UGT (*Uridine diphosphate (UDP) glycosyltransferase*). Ce sont les UGT2B15 (*UGT 2 family, polypeptide B15*) et B17 qui sont les formes les plus actives pour conjuguer les androgènes au niveau de la prostate chez l'homme (Chouinard et al., 2004). Elles correspondent respectivement aux formes UGT2 B35 et B5 chez la souris (Buckley and Klaassen, 2007).

Les androgènes le plus souvent catabolisés sont l'androstérone, l'étiocolanolone ou la DHEA. La DHT peut être transformée en androstènediol, à la fois forme de stockage car la conversion est réversible, et forme d'élimination stéroïdienne. L'ensemble métabolique qui participe à la dégradation de la testostérone est très actif puisque la demi-vie de la testostérone est de 12 minutes, ce qui implique une synthèse permanente par le testicule.

4. Contrôle de la stéroïdogénèse par l'axe hypothalamo-hypophysaire

La synthèse de testostérone est principalement régulée par l'axe neuro-endocrine hypothalamo-hypophysaire (**Figure 21**). L'hypothalamus situé à la base du cerveau produit et sécrète de façon pulsatile dans le système porte hypophysaire, la gonadolibérine GnRH. En réponse à cette stimulation, les cellules gonadotropes du lobe glandulaire (adénohypophyse) de l'hypophyse synthétisent et libèrent deux hormones : les gonadotrophines LH (*lutinizing hormone*) et FSH (*follicle-stimulating hormone*). Ces hormones sont des glycoprotéines à deux chaînes : une chaîne α identique et une chaîne β spécifique de chacune de ces deux hormones. Alors que la LH stimule la production et la sécrétion de testostérone *via* son récepteur spécifique situé à la surface des cellules de Leydig, la FSH favorise plutôt la spermatogénèse en agissant sur les cellules de Sertoli. La FSH induit également la production d'inhibines et d'activines par les cellules de Sertoli. Les androgènes ainsi que les inhibines exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire tandis que les activines exercent un rétrocontrôle positif sur ce même axe.

La LH agit sur les cellules de Leydig par l'intermédiaire de récepteurs membranaires de type GPCR (*G protein-coupled receptor*) (McFarland et al., 1989). Ces récepteurs fixent majoritairement la LH, mais en raison d'analogies structurales, l'hCG (*human chorionic gonadotropin*) peut également les activer. L'activation des récepteurs de la LH au niveau de la membrane des cellules de Leydig stimule l'adénylatecyclase et entraîne la formation d'AMPc (*adénosine monophosphate cyclique*) qui active la PKA (*protein kinase A*) (Dufau, 1998). La stimulation de cette voie induit l'expression des gènes codant les enzymes de la stéroïdogénèse tels que StAR (Clark and Stocco, 1995), le cytochrome P450_{scc} (Hales et al., 1990) ou encore la 3 β -HSD (Keeney and Mason, 1992) favorisant ainsi la production de testostérone.

La régulation de la stéroïdogénèse testiculaire ne s'exerce pas exclusivement par l'intermédiaire de la LH. En effet, plusieurs facteurs produits localement peuvent réguler la production d'androgènes de façon paracrine ou autocrine. On note parmi ces composés les facteurs de croissance IGF-I, TGF α ou β , EGF, FGF (Saez, 1994) ou encore les cytokines IL1 α et β (Bornstein et al., 2004). D'autres hormones

peuvent également réguler la stéroïdogénèse telles que les hormones thyroïdiennes qui contrôlent entre autre la transcription de StAR (Ariyaratne et al., 2000) et les glucocorticoïdes qui ont plutôt une action inhibitrice sur la stéroïdogénèse au niveau des cellules de Leydig en réponse au stress (Monder et al., 1994).

Chez l'homme, la production des androgènes surrénaliens est quant à elle principalement régulée par une hormone synthétisée et sécrétée par l'adénohypophyse, l'ACTH (*adreno corticotropic hormone*). Sa production est régulée par un rétrocontrôle négatif exercé sur l'axe hypothalamo-hypophysaire par le cortisol.

5. Fonctions physiologiques des androgènes

Les effets des androgènes actifs, la DHT et la testostérone sont pléiotropes : ils permettent en effet la différenciation embryonnaire sexuelle mâle et le maintien des organes sexuels primaires et secondaires, ils possèdent un pouvoir anabolisant sur les muscles squelettiques, participent au développement de l'os, au métabolisme du tissu adipeux ou encore à la masculinisation du cerveau.

a. Les androgènes, la différenciation et le maintien du tractus génital mâle

(i) Déterminisme et différenciation sexuelle

Les tous premiers stades embryonnaires sont marqués par une période d'indifférenciation sexuelle. En effet le tractus uro-génital comprend chez les deux sexes, à la fois les canaux de Wolff et les canaux de Müller. Le gène initiateur et déterminant de la différenciation sexuelle est SRY (*sex determining region Y*) qui se situe sur le bras court du chromosome Y (Sinclair et al., 1990). D'autres facteurs interagissant avec SRY sont également importants pour la différenciation sexuelle comme SF1 (*steroidogenic factor 1*), DAX1 (*dosage-sensitive adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1*), SOX9 (*sex determining region Y, box9*) ou WNT4 (McElreavey and Fellous, 1999). La différenciation des testicules apparaît entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine de gestation chez l'homme. C'est alors que les cellules de Sertoli deviennent actives et produisent l'AMH (*anti-müllerian hormone*) qui entraîne la régression des canaux de Müller à l'origine des trompes de Fallope, de l'utérus, du col de l'utérus et des deux tiers supérieurs du vagin chez la femme. La testostérone n'est produite par les cellules de Leydig qu'à partir de la 8^{ème} semaine de gestation chez l'homme et au 13^{ème} jour embryonnaire chez la souris, ce qui signifie qu'elle n'intervient pas dans ces premières étapes de la différenciation sexuelle (Hannema and Hughes, 2007). Dès leur production par les cellules de Leydig, les androgènes sont responsables de la différenciation morphogénétique des canaux de Wolff en épидидymes, canaux déférents et vésicules séminales. La différenciation des canaux de Wolff requiert à la fois la présence de la testostérone et d'un récepteur des androgènes fonctionnel. A cette étape, c'est la testostérone qui agit et non la DHT puisque l'enzyme 5 α -réductase de type II n'est exprimée qu'à partir de la 13^{ème} semaine de gestation chez l'homme. Les androgènes participent également à la différenciation du UGS en prostate

Stade	Pilosité pubienne
I	Absence de pilosité pubienne ; un fin duvet couvre la zone génitale
II	Quelques poils légèrement pigmentés, droits, allongés, en général à la base du pénis
III	Poils pubiens bien visibles, pigmentés, bouclés, étalés latéralement
IV	Pilosité de type adulte, plus drue
V	Pilosité adulte qui s'étend sur la surface interne des cuisses

Stade	Testicules et pénis
I	Testicules, scrotum et pénis de taille prépubère
II	Croissance du scrotum et des testicules ; peau scrotale plus rouge et augmentation du volume du pénis
III	Croissance du pénis en longueur. Allongement du scrotum et augmentation du volume testiculaire
IV	Le volume testiculaire et le scrotum continuent d'augmenter ; pigmentation plus marquée du scrotum ; le pénis continue de grandir et le contour du gland devient visible.
V	Les testicules, le scrotum et le pénis atteignent leur taille et leur forme adultes.

Figure 22 : Echelle de Tanner chez l'homme.

Les évolutions morphologiques de la puberté s'étendent sur plusieurs années. Leur durée et l'âge de leur survenue varient beaucoup d'un individu à un autre mais suivent un schéma constant. James Mourilyan Tanner en a proposé, en 1962, une classification en 5 stades. Cette classification est actuellement utilisée comme référence clinique.

(Cf. chapitre I.A.2.b), des tubercules génitaux en pénis et des bourrelets génitaux en scrotum. L'androgène qui contrôle cette différenciation de la prostate et des structures génitales externes est la DHT. En effet, des patients de sexe génétique XY présentant une mutation dans le gène codant la 5 α -réductase de type II développent bien une masculinisation des canaux de Wolff avec la présence d'épididymes, de canaux déférents et de vésicules séminales, mais présentent en revanche des structures génitales externes féminines (Imperato-McGinley et al., 1974, Imperato-McGinley et al., 1979). Ainsi, la DHT est nécessaire à la virilisation des structures génitales externes mais pas à la différenciation des canaux de Wolff. D'autre part, des patients qui présentent une mutation inactivatrice de AR qui résulte en une insensibilité totale aux androgènes, présentent des structures dérivées des canaux de Müller et des rudiments de canaux de Wolff (Wilson et al., 1981). Pour une revue exhaustive des mutations de AR voir <http://androgendb.mcgill.ca/>.

(ii) La puberté

La dernière phase de maturation sexuelle chez l'homme a lieu au moment de la puberté. Cette période est caractérisée chez le garçon, par une série de transformations physiques (apparition des caractères sexuels secondaires), fonctionnelles et comportementales comme le développement de la pilosité, la mue vocale (raucité), le développement de la musculature, une croissance osseuse et l'acquisition de la fonction reproductrice avec le début de la spermatogenèse. Le premier signe pubertaire chez le garçon est l'augmentation de volume des testicules qui s'explique principalement par le développement des tubes séminifères marqué par la différenciation des cellules de Sertoli et la multiplication des spermatogonies. La production des premiers spermatozoïdes débute à mi-puberté. L'âge de début de ces changements et la vitesse de passage d'un stade de développement au suivant sont très variables d'un individu à l'autre. Toutefois, les changements pubertaires progressent selon une séquence relativement constante. Tanner a d'ailleurs proposé une classification qui découpe en stades successifs et indépendants la progression du développement des organes génitaux externes (testicules, scrotum, pénis) ou de la pilosité pubienne ou axillaire (**figure 22**) (Marshall and Tanner, 1970). Le début de la puberté est marqué par une augmentation de la pulsativité de GnRH qui précède une forte augmentation des taux de FSH, LH puis des androgènes plasmatiques. Chez le garçon, il ne s'agit pas du premier épisode hypersécrétoire d'androgènes mais du troisième puisque le premier pic de testostérone se produit pendant la vie fœtale et le second juste après la naissance. C'est l'augmentation de la production de testostérone par les cellules de Leydig qui induit un certain nombre de changements pubertaires comme la mise en place des caractères sexuels secondaires. La DHT induit quant à elle le développement du pénis, de la prostate ou encore la croissance de la pilosité faciale. Notons que l'augmentation de l'activité stéroïdogénique du testicule au moment de la puberté est précédée par un phénomène appelé adrénarchie, spécifique de l'espèce humaine, qui survient autour de l'âge de 7 ou 8 ans. L'adrénarchie correspond à une augmentation de la production des androgènes, DHEA et sulfate de DHEA, par le cortex surrénalien. Bien que ce phénomène semble être impliqué dans l'apparition de la

pilosité pubienne et axillaire, l'adrénarchie est un processus indépendant de la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et ne semble pas jouer un rôle réel dans la survenue de la puberté (Sklar et al., 1980). Outre l'augmentation des androgènes qui contrôlent la mise en place des caractères secondaires, la puberté est caractérisée par un ensemble de changements hormonaux comme une augmentation de GH (*growth hormone*) ou d'IGF-I qui participent également à la croissance osseuse et musculaire.

(iii) Le maintien de la fonction du tractus génital mâle

Une partie des effets des androgènes sont définitifs ou irréversibles. En effet, une fois la puberté passée, si la production d'androgènes cesse, les structures génitales ne régressent pas. Néanmoins, les androgènes participent également au maintien d'un certain nombre de fonctions. Un individu qui subirait une castration post-pubertaire verrait la croissance de sa barbe diminuer. De même l'activité sécrétoire du tractus uro-génital (prostate, épидидyme, vésicules séminales), tout comme l'activité sexuelle, est abolie après castration. L'administration de testostérone permet de rétablir cette capacité sécrétoire ainsi que l'activité sexuelle masculine (Wilson and Griffin, 1980). A l'âge adulte, les androgènes participent donc au maintien des fonctions différenciées de certains tissus uro-génitaux. De plus, une régulation fine et subtile de la testostérone et des gonadotropines est indispensable au maintien de la stéroïdogénèse. Ainsi, la testostérone est-elle maintenue à des taux plasmatiques constants chez l'adulte grâce au système de rétro-contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire. Si cet axe est perturbé à quelque niveau que ce soit, la spermatogénèse cesse.

b. Les androgènes et la physiologie musculaire

Le rôle des testicules sur le maintien de la composition corporelle est reconnu depuis très longtemps et de nombreuses études ont établi l'effet anabolisant des androgènes sur le muscle squelettique. Un des premiers arguments en faveur d'une action des androgènes sur le muscle repose sur le fait que les hommes possèdent plus de muscle squelettique, où AR est présent et fonctionnel, que les femmes. De plus, les hommes atteints d'hypogonadisme perdent de la masse maigre et de la force musculaire. Au contraire, l'administration de testostérone augmente la synthèse protéique musculaire chez l'homme normal, la synthèse protéique totale chez le jeune homme prépubère et la synthèse protéique au niveau des muscles squelettiques, ainsi que la force musculaire chez l'homme âgé (Griggs et al., 1989, Mauras et al., 1994, Urban et al., 1995). L'androgène majoritaire dans le muscle est la testostérone, la DHT est en effet présente en de très faibles concentrations. De plus la testostérone augmente la différenciation des cellules mésenchymateuses pluripotentes en cellules musculaires et diminue la différenciation en cellules adipeuses (Singh et al., 2003). Les effets anabolisants des androgènes sur le muscle impliquent notamment une interaction avec le système IGF-I (Fryburg et al., 1995). La testostérone a un effet positif sur la production des ARNm de IGF-I, augmentant la synthèse protéique du muscle squelettique et les effets myotrophiques.

c. Les androgènes et la physiologie osseuse

Les androgènes sont également connus pour leurs effets bénéfiques majeurs sur le développement et le maintien du squelette à la fois chez l'homme et chez la femme. L'hypogonadisme chez l'homme est en effet associé à une perte osseuse qui est réversible après une supplémentation androgénique (Finkelstein et al., 1989). De nombreuses études ont permis de mettre en évidence une diminution de la densité minérale osseuse, une détérioration de l'architecture trabéculaire de l'os (Benito et al., 2003) et une augmentation du risque de fracture chez des sujets hypogonadiques. Ces effets peuvent être annihilés suite à un traitement avec des androgènes. Cependant, l'action des androgènes sur l'os est partiellement modulée par le récepteur des œstrogènes après la conversion de la testostérone en œstrogènes par l'aromatase. Une mutation a d'ailleurs été observée dans le gène codant l'aromatase chez des patients hommes et femmes atteints d'ostéoporose (Morishima et al., 1995). De plus, les souris invalidées pour le gène codant ER α (Windahl et al., 2002) et celles déficientes en P450 aromatasase développent une ostéoporose (Oz et al., 2001). Ainsi, une partie des effets bénéfiques des androgènes sur l'os passerait-elle par leur aromatisation en œstrogènes. Ces observations sont confortées par la présence des enzymes nécessaires à la synthèse d'œstradiol à partir de la DHEA et de l'androstènedione dans les cellules ostéoblastiques qui synthétisent l'os. Néanmoins, le récepteur des androgènes est lui aussi exprimé dans les cellules osseuses, à savoir les ostéoblastes (qui synthétisent l'os) et les ostéoclastes (qui dégradent l'os), mais aussi dans les cellules du cartilage de croissance qui assurent la croissance longitudinale de l'os (Abu et al., 1997, Colvard et al., 1989, Van Der Eerden et al., 2002). De plus, les souris invalidées pour le récepteur des androgènes présentent une ostéopénie, c'est-à-dire une diminution de la densité osseuse due à une résorption osseuse augmentée associée à une fabrication insuffisante qui ne permet pas de compenser la perte (Kawano et al., 2003). Le rôle des androgènes dans la physiologie osseuse semble donc multiple et complexe. Ils agissent d'une part sur la densité minérale osseuse et sur le renouvellement périodique de l'os par des cycles de résorption/genèse de l'os réalisés par les ostéoblastes et les ostéoclastes. De plus la testostérone, mais aussi la DHT, sont capables d'induire la prolifération des précurseurs ostéoblastiques, de favoriser la différenciation d'ostéoblastes matures mais aussi d'en inhiber l'apoptose (Kousteni et al., 2002, Manolagas et al., 2002).

d. Les androgènes et le métabolisme du tissu adipeux

Les androgènes sont maintenant admis comme étant des régulateurs de l'homéostasie du tissu adipeux. Ainsi, les hommes qui présentent un déficit androgénique présentent une quantité importante de masse grasse (Mauras et al., 1998). La supplémentation en testostérone chez ces hommes atteints d'hypogonadisme diminue la masse grasse (Bhasin et al., 1997). Les souris mâles invalidées pour le récepteur des androgènes développent une obésité (Sato et al., 2003). Dès l'âge de 12 semaines ces souris sont en surpoids par rapport aux souris sauvages et à 30 semaines elles sont obèses avec une augmentation de la masse du tissu adipeux blanc. La testostérone et la DHT sont capables d'inhiber la

différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures, ce qui empêche le stockage des lipides (Singh et al., 2006). Dans les souris invalidées pour AR on retrouve des adipocytes de taille plus importante qui stockent abondamment les lipides.

e. Les androgènes et la masculinisation du cerveau

Toutes les espèces à reproduction sexuée présentent des différences de comportement en fonction du sexe et des caractéristiques de chaque espèce. Ce dimorphisme sexuel est plus évident dans les comportements relatifs à la fonction de reproduction (accouplement, parentalité, séduction...). Cependant, dans l'espèce humaine ils sont plus difficiles à étudier du fait de la complexité des relations sociales et culturelles. Chez la souris et la plupart des mammifères, la différenciation sexuelle du cerveau est largement contrôlée par les stéroïdes sexuels. De nombreuses études réalisées chez la souris montrent que la structuration du cerveau et le comportement nécessitent à la fois les signalisations œstrogénique et androgénique au travers de leurs récepteurs respectifs (Juntti et al., 2008).

La testostérone agit ainsi soit directement sur son récepteur (AR) soit indirectement en tant que prohormone convertie en œstrogènes et donc *via* ER. Les souris mâles invalidées pour les deux isoformes α et β du récepteur des œstrogènes ne présentent ni les comportements typiquement mâles lors de l'accouplement, ni les comportements agressifs que l'on observe habituellement entre mâles (Ogawa et al., 2000). Cette perte de l'agressivité inter-mâle est également observée chez les mâles castrés. De plus, les mâles présentant une délétion de l'aromatase, qui convertit la testostérone en œstrogènes, ne s'accouplent peu ou pas et sont très peu agressifs (Honda et al., 1998, Toda et al., 2001). Ces données révèlent donc l'importance des œstrogènes dans les comportements mâles liés à la reproduction. Cependant, l'administration d'œstrogènes à des mâles castrés ne permet pas une restauration complète des comportements mâles comme l'agressivité « inter-mâle » et ceux associés à l'accouplement. En revanche, lorsque ces mêmes mâles castrés sont en plus traités avec de la testostérone ou de la DHT (composé non aromatisable), ces comportements mâles reviennent aux niveaux des mâles sauvages (Finney and Erpino, 1976, Wallis and Luttge, 1975). Enfin, les mâles invalidés pour le récepteur des androgènes (ARKO) ne se battent plus et ne s'accouplent pas (Sato et al., 2004). Ces données révèlent l'importance de la signalisation androgénique modulée par AR dans les comportements masculins.

f. Une « ménopause » chez l'homme ?

Certains médecins ont noté que certains de leurs patients leur rapportaient des symptômes similaires à ceux décrits par les femmes lors de la ménopause. Ainsi certains hommes décrivent-ils des symptômes tels que la fatigue, la faiblesse, des diminutions de la libido, de la déprime ou de la dépression. Les hommes n'ont pas de période bien définie comme c'est le cas de la ménopause chez la femme où la production hormonale s'arrête complètement, cependant ils sont sujets à un déclin progressif des taux de testostérone circulants. Certains praticiens parlent « d'andropause ». Cependant il

est difficile d'établir un lien de cause à effet entre ces diminutions de taux hormonaux et les symptômes décrits. Chez les hommes, les traitements hormonaux de substitution sont donc sujets à débat. La société américaine d'andrologie préconise ce type de traitement lorsque les symptômes cliniques, des signes suggestifs d' « andropause » et une déficience hormonale sont associés (ASA, 2006).

C. Les androgènes dans la prostate

1. *Les androgènes dans la physiologie de la prostate adulte*

a. Histoire de la découverte des androgènes dans la prostate

L'influence des testicules sur la prostate a été démontrée très tôt, à la fin du XIX^e siècle, par William White qui proposa la castration comme une solution thérapeutique contre l'hypertrophie prostatique (White, 1894). White et certains de ces contemporains réalisèrent donc des expériences de castration uni- ou bilatérale sur divers modèles animaux, notamment le chien, ou sur l'homme et observèrent une régression de la taille de la prostate (Fenwick, 1895, Griffiths, 1895, White, 1895). Cependant, l'androgéno-dépendance de la prostate ne fut révélée que bien plus tard par Charles Huggins dans les années 1940 (Huggins et al., 1939, Huggins and Clark, 1940). Néanmoins, ce sont deux découvertes dans les années 1960 qui donnèrent de l'élan aux études sur le rôle des androgènes dans la prostate. La première fut le développement du dosage des androgènes dans les fluides biologiques par la technique de RIA (*radioimmunoassay*) (Yalow and Berson, 1960). Par cette même méthode, les androgènes tissulaires purent aussi être dosés (Albert et al., 1976). La seconde fut la découverte de Bruchovsky et Wilson qui établirent la DHT comme l'androgène actif majeur dans la prostate (Bruchovsky and Wilson, 1968).

b. Les androgènes et le maintien de l'épithélium prostatique

(i) *Les androgènes et maintien de l'épithélium différencié*

Nous avons vu précédemment dans le chapitre I.A.2.b., que les androgènes jouaient un rôle prépondérant dans la morphogenèse prostatique. Le compartiment prostatique le plus sensible à la stimulation androgénique est, durant le développement, la partie stromale qui reçoit et médie les signaux androgéniques. Ainsi, les cellules mésenchymateuses positives pour AR produisent et sécrètent des facteurs de croissance (IGF, KGF, FGF, EGF) en réponse aux androgènes, qui agissent de façon paracrine sur les cellules épithéliales avoisinantes. Cette stimulation induit la croissance cellulaire et le développement de la glande. Dans la prostate adulte, les androgènes peuvent agir directement sur les cellules épithéliales, qui expriment AR, dans le but de promouvoir le maintien de l'état différencié de l'épithélium prostatique. A l'état différencié, les cellules épithéliales sécrètent des protéines dont l'expression est dépendante des androgènes (*Cf.* paragraphe suivant). Ainsi, la présence de AR dans les cellules épithéliales sécrétrices est-elle requise pour la synthèse par ces mêmes cellules des protéines de sécrétion (Donjacour and Cunha, 1993). C'est cette fonction sécrétrice qui caractérise l'état différencié des cellules épithéliales dans la prostate.

(ii) *L'apoptose prostatique : importance des interactions épithélium-mésenchyme*

Dans la prostate normale, 1 à 2% des cellules glandulaires entrent spontanément en apoptose chaque jour. Ce taux est contrebalancé par des niveaux équivalents de prolifération (Isaacs, 1984). La privation androgénique causée par une castration, entraîne la mort par apoptose de 70% des cellules épithéliales sécrétrices. Les cellules épithéliales basales, ainsi que les cellules stromales restent en revanche très peu affectées par la castration (English et al., 1989). Dans la prostate intacte de rat, les cellules épithéliales expriment fortement le récepteur des androgènes alors que la plupart des cellules basales sont négatives pour AR, ce qui fournit une explication possible pour la différence de sensibilité des différents compartiments cellulaires à la privation androgénique (Prins et al., 1991, Prins and Birch, 1993). Cependant, AR est bien exprimé dans les cellules stromales. Les cellules stromales ont donc bien la capacité de répondre aux androgènes mais elles sont indépendantes des androgènes en ce qui concerne la survie puisqu'elles résistent à l'apoptose. La question sous-jacente est donc de comprendre pourquoi deux types cellulaires (épithélial et stromal) exprimant tous deux AR, répondent différemment à une privation androgénique. La réponse à cette question est basée sur les expériences de recombinaison entre un UGM *Tfm* (dont AR porte une mutation inactivatrice) ou sauvage et un UGE *Tfm* ou sauvage, décrites dans le chapitre I.A.2.b et en **figure 4** (Cunha and Chung, 1981). Ces expériences permettent le développement de prostates mûres à l'intérieur de mâles hôtes. Quand ces mâles hôtes sont castrés, on observe une régression des deux types de prostates recombinées : les combinaisons UGM + épithélium *Tfm* ainsi que les UGM + épithélium sauvage. L'administration de testostérone aux mâles hôtes induit à nouveau la prolifération des cellules épithéliales dans ces deux types de recombinaison. Cependant, dans la prostate recombinée UGM + épithélium *Tfm*, le récepteur des androgènes fonctionnel n'est présent que dans la partie stromale, ce qui montre que la présence de AR dans l'épithélium n'est pas requise pour réguler l'apoptose des cellules épithéliales. Cette expérience suggère également le rôle prépondérant des interactions paracrines entre le stroma et l'épithélium dans la prostate adulte. Il existe en effet un réseau développé de facteurs de croissance (détaillé dans la revue Russell et al., 1998) qui sont produits soit par les cellules épithéliales soit par les cellules du stroma et qui agissent de façon paracrine sur l'autre compartiment cellulaire *via* leurs récepteurs spécifiques respectifs. La plupart de ces facteurs ainsi que leurs récepteurs sont dépendants des androgènes. Les interactions cellulaires paracrines entre les différents compartiments sont réciproques et ne concernent pas uniquement les phénomènes apoptotiques mais sont impliqués dans l'ensemble des mécanismes intervenant dans le maintien de l'homéostasie prostatique (Russell et al., 1998). Nous pouvons citer par exemple le facteur TGF β qui est exprimé à la fois par les cellules stromales et épithéliales et qui a pour rôle de contrebalancer les effets mitotiques des autres facteurs de croissance (Schuurmans et al., 1988). Le facteur bFGF est quant à lui exprimé à la fois dans les cellules stromales et épithéliales mais son récepteur ne l'est que dans les

cellules basales. Ce facteur joue un rôle important dans la croissance des cellules du compartiment stromal (Sherwood et al., 1992).

La prostate ventrale contient un mélange de différents types cellulaires soit androgéno-dépendants soit androgéno-indépendants. Après castration, seuls les compartiments cellulaires dépendant (directement ou indirectement) des androgènes arrêtent de proliférer et entrent en apoptose (English et al., 1987). Ainsi, un sous-ensemble de cellules basales est-il considéré comme des « cellules souches ». Ces dernières sont indépendantes des androgènes en ce qui concerne leur survie, puisqu'elles résistent à une castration, mais sont en revanche dépendantes des androgènes pour la prolifération et la différenciation. La complémentation androgénique restaure les propriétés de ces cellules basales qui se différencient à nouveau en cellules épithéliales intermédiaires puis sécrétrices.

En plus de l'apoptose des cellules épithéliales sécrétrices, la castration entraîne l'apoptose et la dégénérescence des capillaires prostatiques et la constriction de vaisseaux sanguins de taille plus importante (Buttayan et al., 2000). Ces étapes précèdent l'apoptose de l'épithélium suggérant que la diminution du flux sanguin pourrait contribuer à la mort des cellules épithéliales. Après l'administration de testostérone à des rats castrés, le développement des vaisseaux sanguins reprend et l'épithélium acquiert à nouveau son pouvoir sécrétoire (Franck-Lissbrant et al., 1998). Cependant, les cellules endothéliales de la prostate de rat n'expriment pas AR (Prins et al., 1991), soulignant encore l'action de facteurs paracrines entre les cellules épithéliales et stromales (Cf. paragraphe II.C.1.d). Ainsi, l'expression du bFGF (*basic FGF*) et du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) peut-elle être régulée par les androgènes et en retour stimuler la survie des cellules endothéliales (Burchardt et al., 2000, Haggstrom et al., 1998). Les facteurs paracrines décrits sont la plupart du temps sécrétés par le stroma qui exprime AR et qui répond à une stimulation androgénique. De façon similaire au dialogue observé entre l'épithélium et le mésenchyme, l'endothélium vasculaire semble impliqué dans une interaction avec le stroma, indispensable à sa survie.

c. Les protéines sécrétées par l'épithélium prostatique

L'effet majeur de la stimulation androgénique sur la prostate adulte est la synthèse d'une grande quantité de protéines de sécrétion, comme c'est également le cas dans les vésicules séminales. Quarante pour cent de la totalité des protéines synthétisées sont évacuées dans les conduits éjaculateurs.

Chez le rat et la souris, certaines de ces protéines sont responsables de la formation du bouchon vaginal *post-coïtum*. En effet, chez la plupart des rongeurs, l'accouplement est suivi de la formation d'un bouchon vaginal qui résulte de la polymérisation de protéines SVS (*seminal vesicle secretion*) synthétisées et sécrétées par les vésicules séminales mais aussi par l'épithélium prostatique. On parle alors de protéines coagulantes. Cette polymérisation se fait sous l'action d'une enzyme dépendante du calcium, la transglutaminase 4 spécifique de la prostate. Une fois formé, le bouchon reste en place plusieurs heures.

Chez les rongeurs, la prostate est divisée en quatre lobes distincts : la prostate ventrale, la prostate latérale, la prostate dorsale et la prostate antérieure. Les lobes prostatiques présentent des spécificités fonctionnelles et sécrètent des protéines différentes qui peuvent constituer des marqueurs de chaque lobe. Chez le rat, les protéines *prostatein* et *cystatin-related protein* sont principalement produites dans les lobes ventraux tandis que d'autres protéines telles que PSP94 (*prostate secretory protein of 94 amino acids*), la probasine et SVS2 (*seminal vesicle secretion 2*) sont particulièrement abondantes dans les lobes latéraux et dorsaux (Cunha et al., 1987). L'expression des gènes codant ces protéines est directement régulée par les androgènes. L'étude de Fujimoto *et al.* en 2006 a permis d'identifier par spectrométrie de masse les protéines sécrétées par les différents lobes prostatiques (Fujimoto et al., 2006). Les protéines les plus abondantes dans les lobes ventraux murins sont les protéines SBP (*spermine-binding protein*) et SPI-KT3 (*serine protease inhibitor kazaltype-3*) qui sont indétectables dans les autres lobes (Fujimoto et al., 2006, Mills et al., 1987, Mills et al., 1987). Ces deux protéines représentent donc des marqueurs très spécifiques des lobes ventraux chez la souris. Des expériences de castration suivies de supplémentation en testostérone ont montré que les niveaux d'accumulation des ARNm codant ces protéines étaient hautement régulés par les androgènes. Dans les lobes ventraux, on retrouve également les protéines Prdx6 (*peroxiredoxin 6*), GRP78 (*glucose-regulated protein 78 kDa*), PSP94 ainsi qu'en plus faible quantité, les protéines probasine et calréticuline. Ces différentes protéines sont retrouvées en plus ou moins grande quantité dans l'ensemble des lobes mais présentent tout de même des spécificités d'expression. En effet, la Prdx6 et la calréticuline sont plus abondantes dans les lobes dorso-latéraux et antérieurs tandis que GRP78, PSP94 et la probasine sont majoritairement retrouvées dans les lobes dorso-latéraux. Parmi ces protéines sécrétées, PSP94 est particulièrement sensible aux androgènes (Fujimoto et al., 2006). Notons que chez la souris, les protéines de sécrétion prostatiques sont connues pour être glycosylées. C'est le cas de la protéine SBP qui peut être N-glycosylée au niveau des résidus asparagine et thréonine en position 62 et 64. Ces modifications post-traductionnelles font de SBP une molécule identifiable à différents poids moléculaires sur gel : 22kDa, 25 kDa ou encore 30 kDa (Mills et al., 1987).

Chez l'homme, trois protéines sont majoritairement synthétisées et sécrétées par les cellules épithéliales prostatiques : ACP (acid phosphatase, prostate), PSA (*prostate-specific antigen*) et PSP94, connue également sous le nom de MSMB (*beta-microseminoprotein*). La PSA par son action sur ses substrats, les séménogélines, intervient dans la liquéfaction du sperme. En effet, les séménogélines I et II (SEMGI et II) sont les protéines majeures contenues dans le sperme chez l'homme. Elles interagissent spontanément entre elles par des liaisons non-covalentes et *via* des ponts disulfures pour former un coagulum qui enchâsse les spermatozoïdes éjaculés. Quelques minutes après l'éjaculation, l'action de protéases prostatiques comme la PSA permet de rompre ces liaisons et de liquéfier le sperme ce qui permet aux spermatozoïdes de se mouvoir plus librement (Mitra et al., 2010).

2. *Les androgènes dans la prostate pathologique*

Les androgènes jouent un rôle obligatoire dans l'étiologie des deux pathologies prostatiques que sont le cancer et l'hypertrophie bénigne de prostate. En effet, il a été rapporté que les eunuques ne développaient jamais aucune de ces deux pathologies (Wu and Gu, 1991). Charles Huggins reçut en 1966 le prix Nobel de physiologie et médecine pour ses découvertes sur l'hormonothérapie comme traitement du cancer de la prostate.

a. **Les androgènes et le cancer de la prostate**

(i) *Les androgènes et la carcinogenèse prostatique*

Il est clairement établi que le développement du cancer de la prostate et sa progression vers l'échappement hormonal sont le résultat d'évènements multiples. Le récepteur des androgènes joue néanmoins un rôle central dans ces mécanismes. Cependant, la grande majorité des données épidémiologiques n'établissent finalement pas de lien entre des taux élevés de testostérone, de DHT ou d'androgènes surrénaliens et le risque de développer un cancer de la prostate (Hsing, 2001). Huggins rapporta en 1941 que la castration réduisait de façon significative les niveaux de PSA (maintenant utilisé comme un outil diagnostique de ce cancer) dans le sang de patients atteints du cancer de la prostate, mettant en évidence la dépendance androgénique de ces tumeurs. Depuis, les traitements pharmacologiques de première ligne visent à éteindre la signalisation androgénique. Cette inhibition se fait en bloquant l'activité de AR par des anti-androgènes (comme le Casodex®), en utilisant des inhibiteurs de la 5 α -réductase (le finastéride), des composés à activité œstrogénique et/ou par castration chimique avec des analogues de la LHRH (*Luteinizing-hormone releasing hormone*). Les anti-androgènes agissent directement sur AR en tant qu'antagonistes. Les inhibiteurs de la 5 α -réductase inhibent la conversion de la testostérone en DHT, le métabolite actif au niveau de la prostate. Les composés à activité œstrogénique agissent en partie comme des inhibiteurs de la LHRH, *via* un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Dans tous les cas, ces traitements hormonaux visent à éteindre la signalisation androgénique. Quelle que soit la méthode employée, la privation androgénique entraîne un arrêt de la prolifération et dans certains cas, une réduction par apoptose du nombre de cellules épithéliales sécrétrices. Des données cliniques et sur l'animal suggèrent en effet qu'une proportion significative de tumeurs est résistante à l'apoptose induite par l'ablation androgénique (Westin et al., 1995). Les mécanismes de résistance à l'apoptose passent en partie par une augmentation des protéines anti-apoptotiques BCL-2, BCL-x et MCL-1 dans les PIN, ce qui suggère que cet évènement est précoce dans la survenue du cancer de la prostate (Krajewska et al., 1996). Les traitements hormonaux permettent une réponse positive chez environ 80% des patients, avec une diminution du PSA. Cependant, les bénéfices de l'hormonothérapie sont temporaires et ne dépassent pas 30 mois (Russell and Khatri, 2006). Passé ce délai, les taux de PSA augmentent de nouveau, ce qui traduit un échappement des cellules tumorales vis-à-vis du traitement. Les cellules cancéreuses qui deviennent pharmaco-résistantes prolifèrent même en

absence d'androgènes. On parle alors de CRPC (*castrate-resistant prostate cancer*). On observe à ce stade, l'apparition de *foci* cancéreux où les cellules sont prolifératives (Murphy et al., 1991). Cet échappement thérapeutique nécessite le recours à d'autres types de prise en charge comme la chimiothérapie qui diminue la croissance tumorale. A ce stade, les cellules cancéreuses utilisent des voies alternatives qui autorisent leur survie et leur croissance.

(ii) *Les androgènes et AR dans le cancer androgéno-indépendant*

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'apparition du CRPC. Notons que le récepteur des androgènes est toujours exprimé à ce stade. Tout d'abord, dans certains cas, des mutations activatrices dans le gène codant AR ont été décrites en quantité plus importante dans les cellules pharmaco-résistantes métastatiques que dans les cellules de la tumeur primaire. Ainsi, ces mutations de AR pourraient-elles donner aux cellules un avantage de croissance en absence ou en présence de quantité très faibles d'androgènes ou même en présence d'anti-androgènes (Marcelli et al., 2000, Taplin et al., 1995). La pharmaco-résistance peut être acquise *via* d'autres mécanismes qu'une mutation du récepteur. Notamment, la progression du cancer de la prostate est souvent associée à une altération du taux des facteurs de croissance ou de leurs récepteurs spécifiques au niveau de la tumeur (Russell et al., 1998). La liaison des facteurs de croissance et des cytokines à leur récepteur membranaire initie une cascade de phosphorylations impliquant de nombreuses protéines intra-cellulaires dont les cibles peuvent être AR lui-même ainsi que ses co-régulateurs, pouvant ainsi conduire à une activation de AR indépendante de la fixation de son ligand en réponse à des facteurs de croissance tels que l'EGF, l'IGF ou le KGF (Culig et al., 1994). Une dérégulation des équilibres de ces molécules de signalisation paracrine ou de leurs récepteurs peut donc être impliquée dans l'acquisition de la croissance tumorale androgéno-indépendante. Enfin, la phosphorylation du récepteur des androgènes est impliquée dans différents processus tels que sa stabilité par une protection contre sa dégradation, une stabilisation des homodimères (Blok et al., 1998) ou encore son activité transcriptionnelle (Rochette-Egly, 2003). Le récepteur est de même une cible des voies MAPK, PI3K ou encore de la voie PKC dans les cellules tumorales prostatiques (Yeh et al., 1999).

(iii) *Influence des interactions épithélium-mésenchyme sur la carcinogénèse prostatique*

Le processus de carcinogénèse prostatique peut avoir lieu dans un contexte de déséquilibre de l'homéostasie tissulaire normalement finement régulée, comme nous l'avons vu précédemment, par un dialogue entre les différents compartiments prostatiques à savoir le mésenchyme et l'épithélium. Des études de recombinaison tissulaire ont révélé l'importance du stroma fibro-musculaire dans la carcinogénèse prostatique : des cellules épithéliales transformées dérivées de tumeurs humaines ne développent pas de tumeur lorsqu'elles sont inoculées à des souris, alors que la co-inoculation de cellules cancéreuses mésenchymateuses avec les cellules épithéliales permet la transformation de ces dernières en cellules cancéreuses (Chung et al., 1989). Ainsi les cellules du mésenchyme prostatique exercent-elles

une influence directe sur les cellules épithéliales adjacentes *via* un mécanisme paracrine pour induire leur croissance et leur tumorigénicité (Camps et al., 1990, Chung et al., 1989). Nous savons que l'équilibre et le maintien à l'état quiescent de la prostate adulte résultent d'interactions réciproques entre l'épithélium et le stroma qui permettent le maintien de la fonction différenciée de chacun des deux compartiments (*Cf.* paragraphe III.C.1.b). Des expériences de recombinaison tissulaire entre des épithélia normaux ou néoplasiques en combinaison avec des UGM ont en effet permis de montrer que seuls des épithélia non néoplasiques sont capables d'induire la différenciation complète du muscle lisse (Hayward et al., 1996). Un épithélium néoplasique perd sa capacité à induire et maintenir la différenciation du muscle lisse. Il s'agit là d'un des aspects de la carcinogenèse. La dérégulation des relations réciproques entre épithélium et stroma contribue donc à la fois aux stades précoces et tardifs de la carcinogenèse prostatique. De plus, le microenvironnement stromal est une composante importante dans la carcinogenèse dépendante des hormones. En effet, l'inoculation de cellules BPH-1 (cellules épithéliales immortalisées non tumorigènes n'exprimant pas AR) à des souris ne permet pas le développement de tumeurs chez le mâle hôte, traité ou non avec de la testostérone (Cunha et al., 2003, Wang et al., 2001). En revanche, lorsque ces cellules sont greffées avec l'UGM (qui exprime AR) dans des souris mâles hôtes traitées avec de la testostérone, les cellules BPH-1 deviennent cancéreuses. Ces expériences mettent en évidence l'importance capitale du récepteur des androgènes stromal dans la carcinogenèse (Cunha et al., 2003, Wang et al., 2001). Si cette même expérience est réalisée avec un UGM *Tfm* (où AR est muté) alors les cellules BPH-1 ne développent pas de cancer. La carcinogenèse prostatique est donc régulée en partie par des facteurs paracrines dont l'expression est dépendante du récepteur des androgènes stromal. Pour une revue exhaustive de l'ensemble des facteurs de croissance et de leur récepteurs spécifiques exprimés dans le stroma et l'épithélium, sous la dépendance ou non des androgènes et qui sont dérégulés dans le cancer de la prostate voir (Russell et al., 1998).

b. Les androgènes et l'hypertrophie bénigne de la prostate

(i) Les androgènes tissulaires et l'HBP

L'androgène actif au niveau de la prostate est la DHT plus que la testostérone (Bruchovsky and Wilson, 1968). Cette découverte a permis de montrer que la taille de la prostate pouvait être diminuée, non pas en réduisant les taux de testostérone dans le sang, mais de DHT dans la prostate. Cependant les inhibiteurs de 5 α -réductase de type II n'ont été disponibles qu'au début des années 1990. Peu après la découverte de la DHT comme « 1^{er} androgène prostatique », de nombreux travaux rapportent des taux augmentés de DHT intraprostatiques dans des échantillons de prostate de patients souffrant d'HBP (Geller et al., 1976, Krieg et al., 1979, Siiteri and Wilson, 1970). Cependant, alors que les dosages étaient réalisés sur tissus frais, les contrôles utilisés étaient, dans ces études, des échantillons d'autopsie. Or, quand Walsh *et al.* utilisèrent du tissu frais, à la fois pour les échantillons testés et les contrôles, ils n'observèrent plus de différence significative des taux de DHT dans la prostate hypertrophiée (Walsh et

al., 1983). Certaines études épidémiologiques établissent en outre des corrélations entre le taux de DHT sérique et la taille de la prostate ou encore la prévalence de l'HBP (Liao et al., 2011). Même si les études au sujet du lien potentiel entre les taux d'androgènes dans le tissu et le volume de la prostate sont très controversées, la DHT n'en demeure pas moins un acteur permissif dans le développement de la maladie.

(ii) *L'hypothèse de McNeal : le stroma dans le développement de l'HBP*

Chez l'homme, la prostate est structurée, comme décrit précédemment, en quatre zones anatomiquement distinctes : les zones périphérique, centrale, transitionnelle et antérieure. La zone transitionnelle, représentant environ 5% du volume prostatique, est l'unique zone qui développe l'HBP. La prostate est un des seuls organes capables de continuer à croître, une fois le développement et la charge androgénique pubertaire passés, tout au long de la vie adulte. L'HBP est associée à un phénotype inflammatoire et peut toucher le compartiment épithélial et/ou le compartiment stromal. Même si les mécanismes moléculaires conduisant à l'apparition de l'HBP demeurent inconnus, il semble maintenant évident que l'HBP implique une dérégulation des interactions entre le stroma et l'épithélium. Dans le milieu des années 1970, John McNeal a émis le postulat selon lequel le développement de l'HBP pourrait être dû en partie à un « réveil » du mésenchyme embryonnaire (McNeal, 1978). Les premières expériences qui étayaient cette hypothèse sont les expériences de recombinaison menées par Cunha (Cunha et al., 1980, Cunha et al., 1980). Il a en effet montré que la combinaison d'UGM avec de l'épithélium de vessie adulte aboutissait au développement d'une prostate. De plus, l'épithélium prostatique adulte est capable de répondre au mésenchyme embryonnaire. Ainsi, les cellules de la prostate adulte, quiescentes, répondent-elles à des signaux mésenchymateux par une prolifération massive. Selon McNeal, le développement de l'HBP résulte donc d'une réactivation du pouvoir d'induction du stroma adulte dans la région péri-urétrale de la glande adulte. L'action du stroma induit, en retour, la prolifération des cellules épithéliales adjacentes. Les travaux de Chung (1984) ont montré que l'implantation *in situ* d'UGS induisait une augmentation de 10 à 20 fois de la taille de la prostate ventrale adulte (Chung et al., 1984). Cette croissance des prostates ventrales chimères est dépendante des androgènes testiculaires de la souris hôte. Le stroma joue donc un rôle important dans le contrôle de la prolifération épithéliale et de la différenciation. Plus que la simple réactivation du stroma dans le tissu adulte, l'HBP semble être associée à de nombreux changements dans tous les compartiments du tissu prostatique adulte (Schauer and Rowley, 2011).

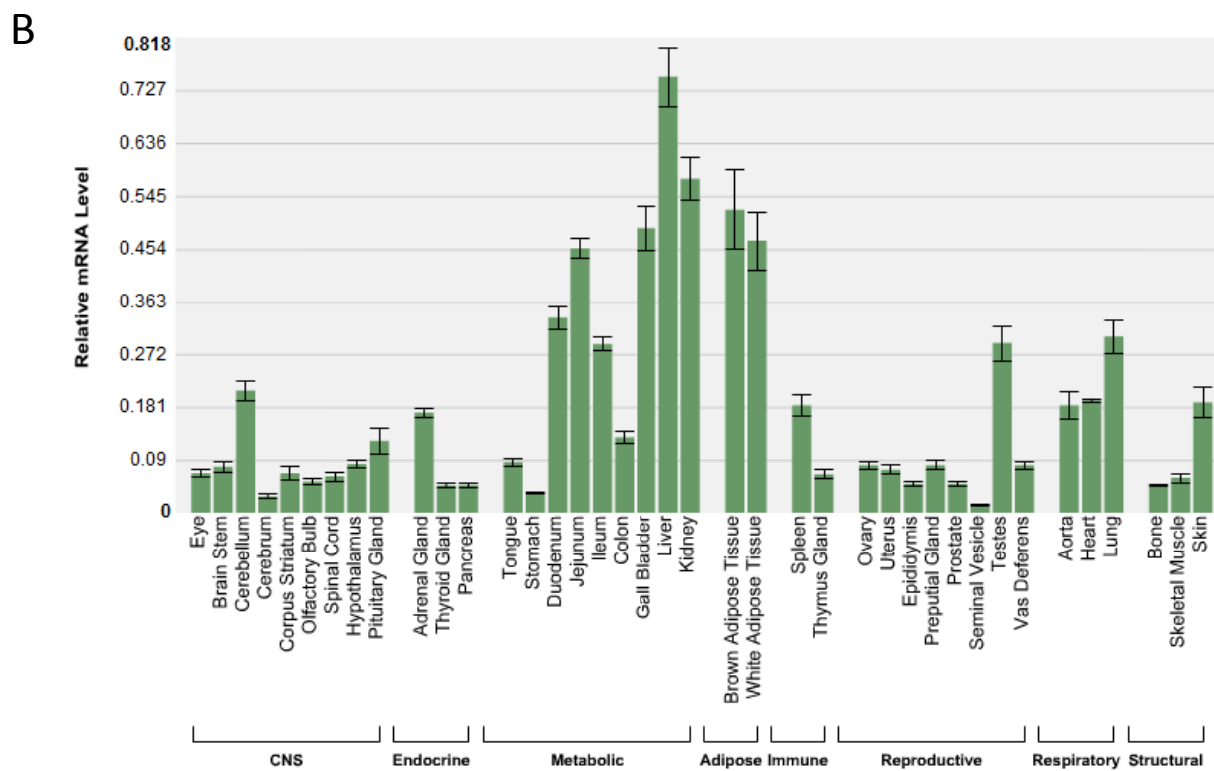
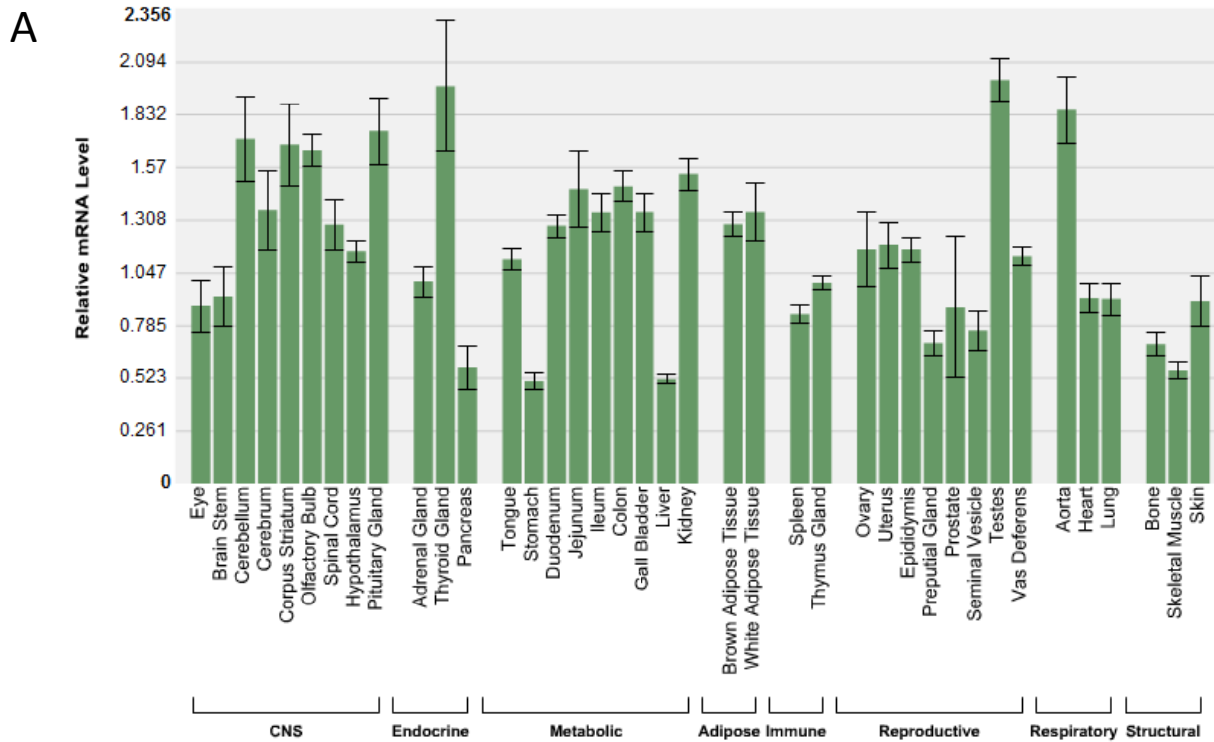


Figure 23 : Expression de *Ixrβ* (A) et *Ixrα* (B) chez la souris
 D'après A.J. Bookout et D.J. Mangelsdorf (<http://www.nursa.org/>).

D. Les récepteurs des oxystérols : LXR

1. Généralités

Les LXR (*Liver-X-receptors*) font partie de ces récepteurs nucléaires « orphelins adoptés » qui forment un hétérodimère obligatoire avec RXR, le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis*. Il existe deux isoformes LXR α (Willy et al., 1995) ; NR1H3) et LXR β (Shinar et al., 1994, Song et al., 1994); NR1H2) provenant de deux gènes distincts localisés respectivement sur les chromosomes 11p11.2 et 19q13.3 chez l'homme. Chez la souris, les gènes codant LXR α et LXR β sont portés respectivement par les chromosomes 2 et 7. Si l'expression de LXR β est ubiquiste (**figure 23A**), LXR α (**figure 23B**) est plutôt exprimé dans les organes présentant un fort métabolisme lipidique comme le foie, le rein, la rate, l'intestin, tissu adipeux et les organes stéroïdogènes (www.nursa.org). Les LXR sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques : la synthèse *de novo* du cholestérol (Wang et al., 2008), l'excrétion (Repa and Mangelsdorf, 2000) et la détoxification des acides biliaires (Barbier et al., 2009) et des lipides (Volle et al., 2004), l'homéostasie glucidique (Cha and Repa, 2007), l'immunité (Zelcer and Tontonoz, 2006), l'homéostasie de la peau (Demerjian et al., 2009) et les fonctions neurologiques (Koldamova and Lefterov, 2007, Leoni and Caccia, 2011). Pour une revue lire (Viennois et al., 2011a, présentée en annexe).

2. Ligands

a. Les ligands agonistes naturels

Un grand nombre de ligands naturels de LXR ont été décrits. Chez les mammifères, les ligands naturels sont les oxystérols, dérivés oxydés du cholestérol. De façon schématique, les oxystérols que l'on retrouve dans le sang peuvent provenir soit d'une source endogène, produits par voie enzymatique ou biochimique, soit d'un apport exogène *via* l'alimentation. C'est Janowski qui réalisa en 1996 (Janowski et al., 1996) les premières recherches de ligands pour LXR en utilisant un système double hybride à l'aide du LBD de LXR α associé au DBD de Gal-4. Les molécules qui présentèrent les meilleurs facteurs d'induction furent 22(R)-hydroxy-cholestérol, 20(S)-hydroxy-cholestérol, 24(S)-hydroxy-cholestérol, 7 α -hydroxy-cholestérol et le 27-hydroxy-cholestérol (Janowski et al., 1996). A la même époque, les 24-céto-cholestérol, 25-hydroxy-cholestérol et 24(S),25-époxy-cholestérol se sont révélés être de bons activateurs à la fois de LXR α et de LXR β (Lehmann et al., 1997) (**figure 24**). De façon intéressante, la nature des oxystérols dépend du site de synthèse. Ainsi, c'est le 22(R)-hydroxy-cholestérol qui est retrouvé préférentiellement au niveau des tissus stéroïdogènes, le 24(S)-hydroxy-cholestérol (ou cérébrostérol) dans le cerveau et le plasma, le 24(S),25-époxy-cholestérol dans le foie et le 27-hydroxy-cholestérol dans le plasma et dans les macrophages.

En plus des oxystérols, d'autres molécules dérivées du cholestérol ont été montrées comme pouvant activer LXR : le FF-MAS (*follicular fluid meiosis activating sterol*) peut activer LXR α (Ruan et al.,

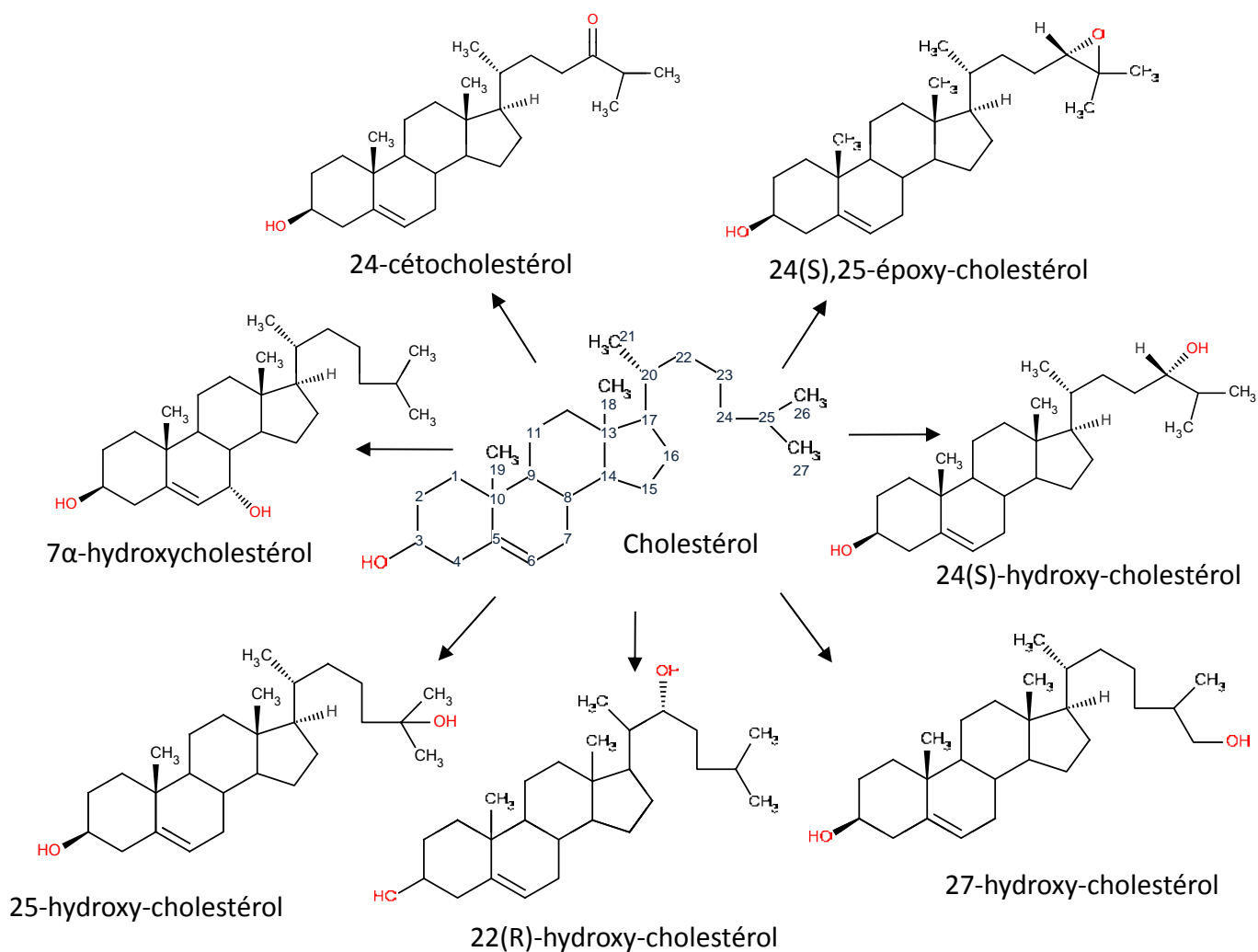


Figure 24 : Ligands agonistes naturels

Ligands agonistes naturels (oxystérols). La structure chimique du cholestérol est représentée et les atomes de carbone sont numérotés. Le nom de chaque oxystérol dépend de la position des groupements hydroxyl.

1998) et le desmostérol, précurseur du cholestérol produit à partir du zymostérol, peut activer LXR (Yang et al., 2006).

Des molécules dérivées de la voie de biosynthèse des acides biliaires, ligands naturels du récepteur FXR (Makishima et al., 1999), en particulier les acides biliaires 6 α -hydroxylés peuvent activer LXR α (Song et al., 2000), de même que l'acide cholesténoïque, précurseur de l'acide chénodéoxycholique (CDCA) (Song and Liao, 2000).

De nombreux composés isolés à partir de plantes et de certains champignons se sont révélés être des ligands potentiels de LXR. Parmi eux, l'acide acanthoïque, extrait de *rollinia* un fruit exotique (Jayasuriya et al., 2005), la gynosporine extraite de *Gynostemma pentaphyllum*, appartenant à la famille des cucurbitacés (Huang et al., 2005) ou encore la paxilline dérivée de la moisissure *Penicillium paxilli* (Huang et al., 2005) peuvent augmenter l'activité transcriptionnelle des LXR. Plus récemment, il a été montré que l'honokiol, issu de l'écorce d'une variété japonaise de Magniola, pouvait activer l'hétérodimère LXR/RXR (Kotani et al., 2010). Enfin, l'acide podocarpique extrait à partir de résine de *Podocarpus*, variété de conifère, est capable de lier LXR α et LXR β (Singh et al., 2005). Pour les formules chimiques de ces molécules Cf. revue (Viennois et al., 2011b, présenté en annexe).

b. Les ligands agonistes synthétiques

La découverte du pouvoir hypocholestérolémiant des LXR (Peet et al., 1998), à la fin des années 1990 a poussé de nombreuses compagnies pharmaceutiques à rechercher de nouveaux ligands pour LXR (pour une revue exhaustive lire (Li et al., 2010)). Cependant, l'action hypertriglycéridémiant associée à l'activation de LXR rend l'utilisation de la plupart des ligands agonistes actuels impossible en thérapeutique à ce jour.

Parmi les nombreux composés qui ont été développés, le T0901317 reste le composé le plus utilisé dans les études fondamentales sur LXR. Néanmoins ce composé n'est pas totalement sélectif pour LXR puisqu'il est capable à des concentrations élevées d'activer PXR ou FXR (Houck et al., 2004, Mitro et al., 2007, Shenoy et al., 2004). La compagnie GlaxoSmithKline (GSK) a identifié le GW3967 comme un puissant agoniste de LXR α et LXR β . Il est aujourd'hui largement utilisé dans les études fondamentales puisque contrairement au T0901317, ce composé est incapable de lier PXR (Mitro et al., 2007). Malheureusement, l'utilisation de ces molécules en thérapeutique demeure impossible du fait de leur action hypertriglycéridémiant (Joseph et al., 2002). Plus récemment GSK a développé un agoniste de LXR, proche du GW3967 et spécifique de l'intestin, le GW6340. Cette molécule active les gènes cibles intestinaux de LXR (ABCG5 et ABCG8, *ATP-binding-cassette G5 et G8*) sans modifier les taux de triglycérides hépatiques (Yasuda et al., 2010). Le groupe de Makishima a développé le composé (22E)-ergost-22-ene-1 α ,2 β diol (YT-32) capable d'activer LXR (Kaneko et al., 2003). Administré chez la souris par voie orale, le YT-32 entraîne une augmentation de l'accumulation de ABCA1, ABCG5 et ABCG8 dans

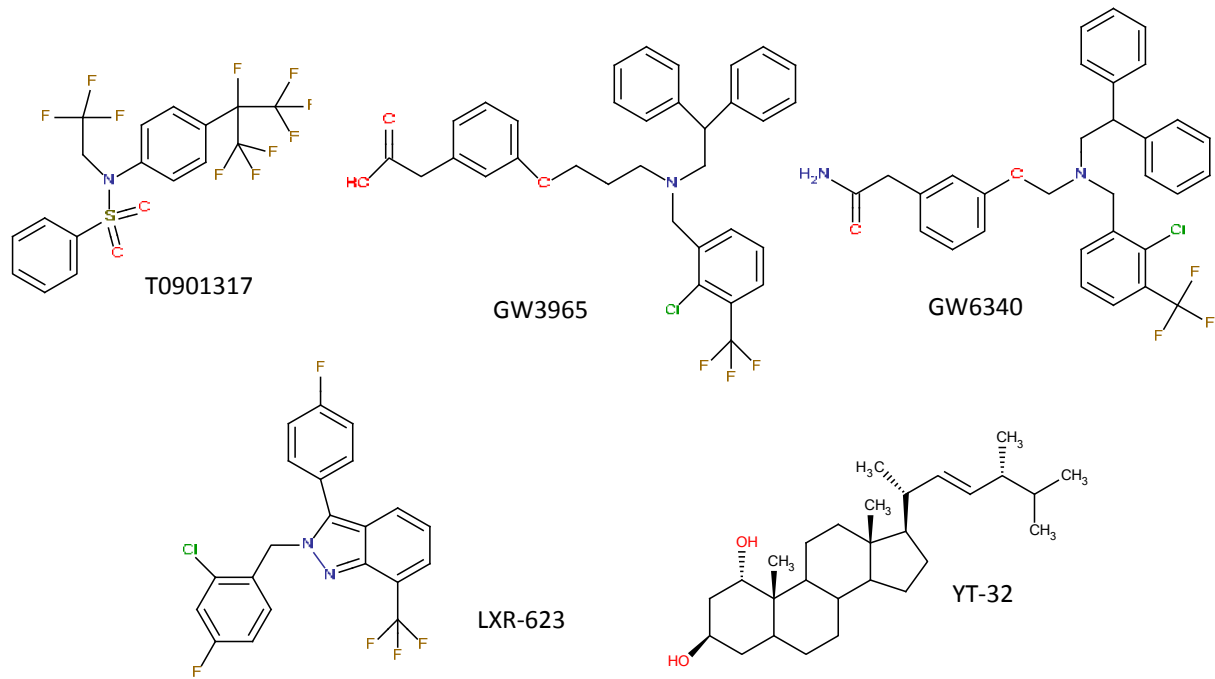


Figure 25 : Ligands agonistes synthétiques

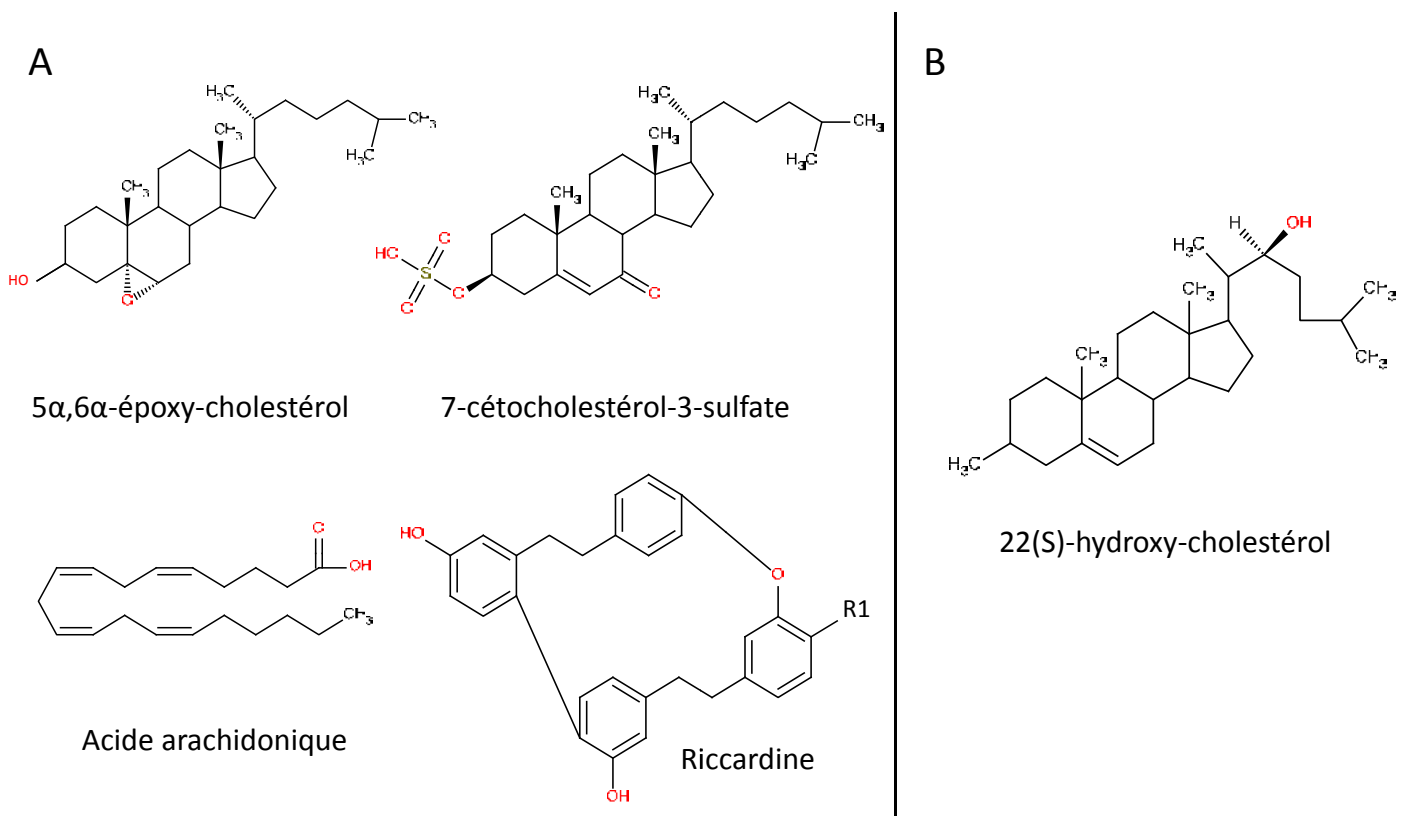


Figure 26 : Antagonistes naturels (A) et synthétique (B) de LXR

A, Le groupe R1 représente un groupement $-OCH_3$ pour la Riccardin F et $-OH$ pour la Riccardin C. B, Le 22(S)-hydroxy-cholestérol est capable d'interférer avec la fixation d'autres oxystérols au niveau du LBD de LXR.

l'intestin ainsi qu'une réduction des taux plasmatiques de cholestérol sans modifier l'expression de ces gènes dans le foie. Ce composé est le premier agoniste de LXR qui présente une spécificité tissulaire. Pour expliquer cette spécificité tissulaire Kaneko *et al.* proposent plusieurs hypothèses (Kaneko et al., 2003). Le composé YT-32 pourrait réduire l'absorption intestinale de cholestérol en induisant l'expression des transporteurs ABCG5 et G8 qui pourraient alors excréter le composé depuis les membranes apicales des cellules épithéliales intestinales. Le YT-32 pourrait aussi être sécrété dans la bile par ABCG5 et G8 avant qu'il ne puisse induire la synthèse des enzymes de la lipogenèse hépatique. Enfin, l'activité tissu-spécifique du YT-32 pourrait s'expliquer par un recrutement différentiel de co-facteurs en fonction du tissu, comme c'est le cas pour les modulateurs sélectifs du récepteur des œstrogènes, les SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) (**figure 25**).

Le premier agoniste de LXR à avoir été testé en phase I d'essai clinique chez l'homme fut le composé Wyeth, LXR-623 (DiBlasio-Smith et al., 2008, Katz et al., 2009) (**figure 25**). L'administration de ce composé à des volontaires sains entraînait une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol au niveau des macrophages sans aucune induction de la synthèse de triglycérides. Malheureusement, l'apparition d'effets secondaires au niveau de système nerveux central interrompit les essais.

Les compagnies pharmaceutiques ont poursuivi et poursuivent toujours leurs efforts à l'heure actuelle sur la recherche de composés pouvant activer LXR sans induire les gènes de la lipogenèse au niveau hépatique. Les critères recherchés sont la spécificité d'isoforme ainsi que la spécificité tissulaire d'activation.

c. Les ligands antagonistes

Les LXR ayant un fort pouvoir hypocholestérolémiant, les efforts des compagnies pharmaceutiques sont plutôt centrés sur le développement de ligands synthétiques activateurs plutôt qu'inhibiteurs. Néanmoins, l'utilisation d'antagonistes présente un intérêt dans les études fondamentales portant sur les fonctions physiologiques des deux isoformes de LXR notamment *via* l'utilisation d'antagonistes spécifiques des deux isoformes des LXR.

Il existe des antagonistes naturels comme le 7-céto-cholestérol-3-sulfate ou le 5 α ,6 α -époxy-cholestérol, dans sa forme sulfatée ou non sulfatée, qui sont capables de se lier au LBD de LXR et d'empêcher le recrutement de co-activateurs (Berrodin et al., 2010, Song et al., 2001). Les acides gras poly-insaturés connus pour être des agonistes de PPAR α et PPAR γ , en particulier l'acide arachidonique, sont des antagonistes de LXR α (Ou et al., 2001) et LXR β (Yoshikawa et al., 2002). La riccardine C, composé dérivé de l'hépatique *Blasia pusilla*, est un antagoniste naturel de LXR β alors que la riccardine F est un antagoniste des deux isoformes. Ces deux composés entrent en compétition avec les agonistes de LXR (Tamehiro et al., 2005) (**Figure 26A**).

Des molécules synthétiques ont également été identifiées comme le 22(S)-hydroxy-cholestérol (**figure 26B**) qui est capable d'interférer avec la fixation d'autres oxystérols (Janowski et al., 1999) ou du T0901317 au niveau du LXR-LBD et d'en inhiber l'action lipogénique (Lehmann et al., 1997, Svensson et al., 2003).

3. Fonctions physiologiques

Depuis les deux dernières décennies, la caractérisation des fonctions physiologiques des récepteurs nucléaires demeure un domaine d'intérêt important pour de nombreux laboratoires dans le monde. Le développement de ligands synthétiques ainsi que l'étude des souris invalidées pour chacune des deux isoformes de LXR ont permis de les associer à de nombreuses fonctions physiologiques. Les LXR peuvent être schématiquement associés à quatre grandes fonctions : le métabolisme des lipides, l'homéostasie du glucose, la stéroïdogénèse et l'immunité.

a. LXR et métabolisme des lipides

(i) Régulation de l'homéostasie du cholestérol

La régulation de l'homéostasie du cholestérol par les LXR résulte de la modulation de quatre composantes : la synthèse *de novo* du cholestérol, la synthèse des acides biliaires, le transport inverse du cholestérol, ainsi que le captage du cholestérol circulant.

- La synthèse *de novo* du cholestérol

Les souris déficientes pour LXR α (*lxra*^{-/-}) présentent une augmentation des niveaux d'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme hépatique du cholestérol comme *srebp2* et ses gènes cibles : les 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl (HMG)-CoA réductase et synthase, la farnésyl diphosphatase et la squalène synthase (Peet et al., 1998). *In vivo*, l'administration de T0901317 à des souris sauvages provoque une diminution des gènes codant la squalène synthase et la HMG-CoA synthase (Schultz et al., 2000).

- La synthèse des acides biliaires

Les souris *lxra*^{-/-} nourries avec un régime riche en cholestérol développent une stéatose hépatique, que l'on ne retrouve pas dans les souris *lxr β* ^{-/-} (Peet et al., 1998). Cette hépatomégalie résulte d'une accumulation d'esters de cholestérol dans les hépatocytes. Le phénotype est causé par une absence de régulation du gène *cyp7a1* qui code l'enzyme limitante de la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol. Il est à noter que la régulation de *cyp7a1* par LXR α ne se fait que chez les rongeurs et n'a pas lieu chez l'homme puisque le promoteur de ce gène n'y possède pas de LXRE (Chiang et al., 2001).

- Le transport inverse du cholestérol

Le processus de transport inverse du cholestérol désigne le mécanisme par lequel le cholestérol en excès est pris en charge par les HDL (*High density lipoproteins*) depuis les tissus périphériques pour être conduit vers le foie où il sera métabolisé. Les transporteurs de type ABC (*ATP binding cassette*) permettent le transport actif, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et unidirectionnel d'un substrat spécifique au travers des membranes. Dans cette famille, ABCA1 exerce un rôle clé dans le métabolisme du cholestérol puisqu'il permet l'efflux du cholestérol des cellules qui en sont surchargées vers des accepteurs extracellulaires. Des mutations ont été découvertes dans le gène *abca1* chez des familles de patients atteints de la maladie de Tangier, associant un déficit de HDL et un risque élevé de développer une athérosclérose (Brooks-Wilson et al., 1999). Le traitement de macrophages humains par du 22(R)-hydroxy-cholestérol ou de l'acide 9-cis rétinolique active l'expression de *abca1* (Costet et al., 2000). *In vivo*, cette régulation présente dans les macrophages et l'intestin grêle est abolie dans les souris *lxraβ*^{-/-} mettant en évidence le rôle clé des LXR dans le transport inverse du cholestérol (Repa et al., 2000). De plus, alors que chez les souris sauvages le traitement T0901317 inhibe l'absorption intestinale de cholestérol et son accumulation au niveau hépatique, il n'a aucun effet chez les souris *lxraβ*^{-/-}. Un régime en cholestérol ou un traitement au T0901317 provoque *in vivo* une augmentation de l'expression des gènes *abcg5* et *abcg8* (Repa et al., 2002). Par la suite d'autres transporteurs de type ABC contrôlés par LXR ont été associés au transport inverse du cholestérol notamment ABCG1 (Kennedy et al., 2001) et ABCG4 (Engel et al., 2001).

Les apolipoprotéines sont des protéines permettant la prise en charge des lipides dans la circulation sanguine. Les gènes codant ces protéines qui entrent dans la composition des VLDL, comme *apoE*, sont eux aussi régulés par LXR. Les LXR stimulent donc le retour hépatique du cholestérol *via* les HDL (Laffitte et al., 2001).

- Le captage du cholestérol circulant

Récemment la découverte de *idol* (*inducible degrader of LDLR*) comme nouveau gène cible des LXR a permis d'associer ces derniers au contrôle du captage des LDL par les cellules. IDOL est une protéine ayant une activité E3 ligase qui a pour rôle d'ubiquitinyler le récepteur des LDL (LDLR) conduisant à sa dégradation par le protéasome. En culture cellulaire, l'activation de LXR entraîne une augmentation d'expression de *idol*, la dégradation de LDLR et une diminution du captage de LDL par les cellules. A l'inverse, LDLR s'accumule dans le foie, les macrophages et l'intestin grêle dans les souris *lxraβ*^{-/-} (Zelcer et al., 2009). Ainsi LXR contrôle-t-il le captage de LDL en induisant *Idol* qui va envoyer LDLR vers la dégradation protéasomale.

Au final, les LXR ont une action hypocholestérolémiant grâce au contrôle de la synthèse du cholestérol, de sa transformation en acide biliaires, de son transport inverse vers le foie ainsi que de son captage dans les cellules.

(ii) *LXR et le métabolisme des acides gras*

C'est Repa *et al.* qui décrivent en premier les interactions entre le métabolisme du cholestérol et celui des acides gras. Ils montrèrent que le gène codant le facteur de transcription SREBP1C (*Sterol response element binding protein*) était un gène cible de LXR dans le promoteur duquel on retrouve des LXRE (Repa *et al.*, 2000). SREBP1C est une protéine ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique, de la famille des bHLH-Zip (*basic helix-loop-helix-leucine zipper*), qui répond à des concentrations faibles en stérol pour être transloquée au niveau du noyau et ainsi permettre la transcription de ses gènes cibles.

Shultz *et al.* ont montré que le traitement de souris sauvages avec du T0901317 entraînait une augmentation de l'expression des gènes *scd1* (*Stearoyl-CoA desaturase1*), *acc* (*acetyl CoA carboxylase*) et *fas* (*fatty acid synthase*), induisant ainsi une augmentation des concentrations en triglycérides dans le foie et le plasma (Schultz *et al.*, 2000). Ces effets ne sont pas retrouvés dans les souris *lxra*^{-/-} mais ils sont maintenus dans les souris *lxrβ*^{-/-} suggérant que c'est l'isoforme LXRα qui est responsable de la lipogénèse hépatique et donc des effets délétères que l'on connaît suite à une activation de LXR *in vivo* (Cf. chapitre V.A.3 les ligands), à savoir une augmentation de la triglycéridémie (Joseph *et al.*, 2002).

Les LXR ont, par leur action lipogénique au niveau du foie, un pouvoir hypertriglycéridémiant, qui s'avère être un obstacle à l'utilisation d'agonistes de LXR dans le traitement de problèmes d'hypercholestérolémie.

b. LXR et le métabolisme du glucose

ChREBP (*Carbohydrate response element binding protein*) est un régulateur central de l'homéostasie des lipides et du glucose dans le foie. ChREBP est une cible transcriptionnelle directe de LXRα puisque deux LXRE fonctionnels ont été identifiés dans le promoteur de ChREBP. *In vivo*, le T0901713 stimule son expression hépatique et celle-ci est perdue chez les souris *lxrαβ*^{-/-}. ChREBP est requis pour l'induction de l'enzyme glycolytique L-PK (*liver-pyruvate kinase*) et il agit en synergie avec SREBP1C pour induire l'expression des gènes lipogéniques *fas* et *acc* (Cha and Repa, 2007). Toutefois, il est important de noter que l'induction de ces gènes cibles par un régime riche en glucose est conservée chez les souris *lxrαβ*^{-/-} démontrant que dans ce contexte, l'activation de ces gènes est indépendante de LXR (Denechaud *et al.*, 2008).

Les LXR inhibent les gènes codant des enzymes clés de la gluconéogenèse comme PEPCK (*phospho-enolpyruvate-carboxykinase*), F1-6B (*fructose-1,6-biphosphatase*) et G6P (*glucose-6-*

phosphatase). Au niveau du tissu adipeux blanc, le GW3965 active l'expression du gène codant GLUT-4 (*Glucose transporter type 4*) un transporteur de glucose sensible à l'insuline et cible directe de LXR, ce qui résulte en une augmentation de l'absorption et de l'utilisation du glucose (Laffitte et al., 2003). Même si aucune modification majeure de l'insulinémie n'a pu être observée *in vivo*, l'activation de LXR β dans des cellules d'îlots pancréatiques de rat augmente la sécrétion d'insuline dépendante du glucose (Efanov et al., 2004, Ogihara et al., 2010). De plus, les souris *lxr β* ^{-/-} développent un diabète associé à une intolérance au glucose lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en graisse (Gerin et al., 2005). Ce n'est pas le cas pour les souris *lxr α* ^{-/-}, ce qui suggère que l'insulinémie est plutôt contrôlée par LXR β *in vivo* (Zitzer et al., 2006).

Au total, l'activation des LXR permet une diminution de la glycémie.

c. LXR et contrôle de la stéroïdogénèse

Les études de Cummins et Volle *et al.* ont mis en évidence un rôle majeur de LXR dans le contrôle de la stéroïdogénèse surrénalienne (Cummins et al., 2006). Les niveaux circulants de corticostérone sont plus élevés aussi bien dans les souris *lxr α* ^{-/-} que suite au traitement de souris sauvages avec du T0901317. Cette modification hormonale est corrélée à une augmentation des gènes de la stéroïdogénèse : *star*, *cyp11a1* (*cytochrome P450, family 11, subfamily A, polyprotein 1*) et *3 β hsd* (*3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*). Des études menées sur le promoteur de *star* ont révélé qu'il s'agissait d'une cible transcriptionnelle de LXR. Il a été montré que LXR α régule également l'expression de *star* dans des modèles de cellules de Leydig (Volle et al., 2007) et que le traitement de souris sauvages avec du T0901317 induisait une augmentation du taux intra-testiculaire de testostérone. Cet effet n'est pas retrouvé dans les souris *lxr α* ^{-/-}. Dans l'ovaire, le T0901317 induit également l'accumulation des transcrits *star* (Mouzat et al., 2009).

Au total, LXR α régule la stéroïdogénèse dans tous les organes qui en sont le siège : le testicule, la surrénale et l'ovaire.

d. LXR et immunité

Les LXR jouent un rôle important dans la physiologie du macrophage où l'activation *in vivo* de LXR par le GW3965 diminue la production de facteurs pro-inflammatoires tels que iNOS (*nitric oxide synthase*), COX-2 (*cyclooxygenase-2*) ou l'IL-6 (*interleukine-6*) induite par une infection bactérienne ou des lipopolysaccharides (Joseph et al., 2003). Cette suppression passe par l'inhibition de NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) (Joseph et al., 2003). Dans le même contexte, LXR entraîne une inhibition de la transcription du gène codant MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*), une enzyme qui dégrade la matrice extracellulaire induisant un remodelage tissulaire, favorisant ainsi le développement des plaques athérosclérotiques. Cette inhibition est perdue dans les macrophages de souris *lxr α β* ^{-/-} (Castrillo et al., 2003). Castrillo *et al.* (Castrillo et al., 2003) décrit une interaction entre LXR et la signalisation TLR (*Toll-like receptor*). Ainsi,

l'activation de TLR3 et TLR4 suite à une infection microbienne entraîne, dans des macrophages en culture, une diminution de l'activité de LXR et de la transcription de certains de ses gènes cibles comme *abca1*. Ceci a pour conséquence de modifier le métabolisme du cholestérol dans les macrophages favorisant leur transformation en cellules spumeuses. Dans les macrophages humains en culture, le récepteur nucléaire Rev-erba qui inhibe TLR4 est une cible directe de LXR (Fontaine et al., 2008). Les LXR ont également été montrés comme favorisant l'élimination des cellules apoptotiques par les macrophages ce qui permet une diminution des phénomènes pro-inflammatoires (Gonzalez et al., 2009). Enfin, la cytokine pro-inflammatoire, l'ostéopontine est inhibée suite à une activation de LXR dans les macrophages en culture ou en modèle de souris (Ogawa et al., 2005). De même, l'activation transcriptionnelle de LXR module la maturation des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes en bloquant l'expression de fascine (Geyeregger et al., 2007). Le rôle modulateur de LXR dans la réponse immunitaire, leur confère un pouvoir inhibiteur de la croissance tumorale (Russo, 2011, Villablanca et al., 2010).

Au total, les LXR ont une action anti-inflammatoire qui s'avère importante dans le contrôle des mécanismes mis en jeu dans les phénomènes athérosclérotiques et de croissance tumorale.

4. Utilisation des LXR comme cible thérapeutique

L'analyse phénotypique des souris déficientes pour une ou chacune des deux isoformes de LXR a permis de déterminer les fonctions physiologiques de ces récepteurs comme décrit dans le chapitre III.B. Les LXR ont également été associés à plusieurs pathologies puisque ces modèles miment certaines maladies retrouvées chez l'homme. Au contraire, l'activation des LXR a des effets bénéfiques sur de nombreuses pathologies (détaillées ci-dessous).

a. LXR et athérosclérose

De par leurs propriétés à la fois hypocholestérolémiantes et anti-inflammatoires, les LXR ont un pouvoir anti-athérogène. Le traitement avec du GW3965 de souris modèles de l'athérosclérose (les souris *apoE*^{-/-} et *LDLR*^{-/-} nourries avec un régime riche en cholestérol) entraîne une diminution des lésions athérosclérotiques (Joseph et al., 2002). Les LXR sont également impliqués dans la physiologie du macrophage. Ainsi, LXR y active l'expression des cassettes ABC d'efflux de cholestérol, permettant d'empêcher leur transformation en cellules spumeuses en réponse à une charge trop importante en cholestérol. Le groupe de Moschetta a montré que l'activation génétique de LXR spécifiquement dans l'intestin diminuait l'absorption intestinale de cholestérol et augmentait le transport inverse de celui-ci *in vivo* (Lo Sasso et al., 2010). Les souris *ldlr*^{-/-} sont protégées de l'athérosclérose suite à cette même activation de LXR au niveau de l'intestin (Lo Sasso et al., 2010). Ainsi, la signalisation LXR au niveau intestinal a-t-elle une importance capitale pour contrôler leur action anti-athérogène. Le rôle athéro-protecteur des LXR peut aussi passer par une inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la formation du

thrombus. En effet, l'activation de LXR β qui est exprimé au niveau des plaquettes inhibe l'agrégation plaquettaire (Spyridon et al., 2011).

L'activation de LXR spécifiquement au niveau intestinal, grâce à l'utilisation du GW6340, augmente le transport inverse du cholestérol au niveau des macrophages. ABCA1, ABCG5 et ABCG8 sont augmentés de façon significative au niveau de l'intestin grêle mais pas au niveau hépatique. Au niveau de l'intestin il y a également une augmentation de la production et de l'excrétion des HDL (Yasuda et al., 2010).

Comme décrit dans le chapitre III.A.3.b., le composé LXR-623 a été le premier agoniste de LXR à avoir été testé chez l'homme en phase 1 d'essai clinique. Les essais cliniques ne furent cependant pas concluants à cause des effets secondaires qu'a eu cette molécule sur le système nerveux central. Ce composé était prometteur puisque le traitement de primates avec le LXR-623 diminuait le cholestérol total et les LDL dans le sang, sans activer la lipogenèse hépatique et donc sans les effets hypertriglycéridémiantes néfastes (Quinet et al., 2009). Le LXR-623 avait également été associé à une augmentation de l'expression des gènes cibles de LXR ABCA1/G1 dans les cellules sanguines (Quinet et al., 2009).

Notons que des mutations dans le LBD de LXR α ont été décrites chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires. Ces mutations entraîneraient un changement conformationnel du récepteur qui empêche son activation par ces ligands naturels (Dave et al., 2009). Ces observations corroborent les données qui présentent LXR comme une cible thérapeutique importante dans le traitement des maladies cardiovasculaires et particulièrement de l'athérosclérose.

b. LXR et diabète

Le diabète de type 2 est un désordre métabolique dont le principal facteur de risque est l'obésité. Il est caractérisé par une hyperglycémie et une insulino-résistance (Misra and Khurana, 2008). Plusieurs études montrent en effet que le traitement de différents modèles animaux de diabète, d'insulino-résistance ou d'obésité par des agonistes de LXR augmente la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline et réduit les concentrations plasmatiques en glucose (Cao et al., 2003, Laffitte et al., 2003). Par exemple, l'administration de T0901317 à des rats ou des souris modèles de diabète de type II associés à une obésité sévère et à une insulino-résistance diminue les concentrations plasmatiques en glucose (Cao et al., 2003, Loffler et al., 2006). En revanche, le T0901317 n'a aucun effet sur le taux de glucose plasmatique d'animaux contrôles. Le traitement par le GW3965 de souris modèles d'obésité induite par un régime augmente la tolérance au glucose (Laffitte et al., 2003). De la même façon, le GW3965 réduit les concentrations en glucose et en insuline dans le sang et augmente la sensibilité à l'insuline des souris déficientes en leptine *ob/ob*, obèses et diabétiques (Grefhorst et al., 2005). Cependant des études *in vitro* montrent que l'effet lipogénique de LXR est plus important sur du muscle squelettique de patients

atteints de diabète de type 2 que sur celui de patients contrôles (Kase et al., 2005). L'effet lipogénique de LXR serait donc plus important encore dans un contexte où les concentrations en glucose sont élevées dans le muscle squelettique, probablement *via* l'induction des enzymes de la lipogénèse. L'utilisation d'agonistes de LXR dans le traitement du diabète de type 2 semble donc pour l'instant peu envisageable.

c. LXR et maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des troubles neurologiques progressifs, notamment une perte de mémoire et des troubles du comportement. Cette maladie est associée à une dégénérescence neuronale et à l'accumulation de neurofibrilles intracellulaires et à des plaques β -amyloïdes extracellulaires. Le constituant majeur de ces plaques est un peptide appelé A β produit par le clivage d'un précurseur AAP (*Amyloid precursor protein*) par une β -sécrétase. Des données épidémiologiques et biochimiques ont permis d'établir un lien entre cholestérol, peptide A β et maladie d'Alzheimer (Martin et al., 2010). En effet, des patients traités avec des statines, inhibiteurs de la synthèse *de novo* du cholestérol, présentent un risque diminué de développer la maladie d'Alzheimer (Jick et al., 2000, Wolozin et al., 2000). *In vivo*, l'administration de T0901317 à des souris transgéniques APP, modèles de la maladie d'Alzheimer, diminue la production de peptide A β et une augmentation d'ABCA1 (Koldamova et al., 2005). Ces résultats suggèrent qu'ABCA1 a un rôle protecteur dans l'évolution de la maladie et que son induction par les LXR pourrait être bénéfique. De plus, les souris APP mutées croisées avec des souris déficientes en LXR α ou LXR β développent des dépôts A β plus importants que les souris APP mutées (Zelcer et al., 2007). En parallèle, le T0901317 permet une réduction importante des déficits de mémoire qui sont observés dans les modèles de souris APP mutées, nourries avec un régime riche en graisse (Fitz et al., 2010). Chez l'homme des mutations dans le gène codant la préséniline1 sont responsables de la majorité des formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Les souris APP/préséniline1, modèle d'amyloïdogénèse, traitées avec du GW3965 recouvrent la mémoire. Cet effet est transmis par ABCA1 (Donkin et al., 2010). Zelcer *et al.* ont montré que l'activation de LXR diminue les processus inflammatoires qui sont souvent impliqués dans la maladie (Zelcer et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats placent les LXR comme des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer ou d'autres types de démence qui impliquent une perturbation de l'homéostasie du cholestérol.

Ces données sont corroborées par la découverte de SNP (*Single-nucleotide polymorphism*) dans le gène qui code LXR β chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Adighibe et al., 2006, Infante et al., 2010). Leoni et Caccia ont récemment montré que les concentrations de 24(S)-hydroxy-cholestérol, ligand agoniste naturel de LXR (voir chapitre III.A.3.a), sont diminuées dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de maladies neurodégénératives, alors que le 27-hydroxy-cholestérol est augmenté (Leoni and Caccia, 2011). Cette étude met en évidence l'utilisation potentielle des oxystérols comme des marqueurs dans la détection de certaines pathologies.

d. LXR et cancer

(i) LXR et cancer du sein

Plusieurs études ont montré qu'une activation de LXR pouvait moduler la prolifération et l'apoptose de cellules cancéreuses mammaires. Vedin *et al.* ont démontré que le T0901317 avait une action anti-proliférative sur des lignées cancéreuses de sein dépendantes des œstrogènes (Vedin *et al.*, 2009). En revanche dans des lignées indépendantes des œstrogènes, cet effet est aboli suggérant que la signalisation œstrogénique est requise pour que les LXR exercent leurs effets anti-prolifératifs. *In vivo*, l'activation de LXR augmente le catabolisme des œstrogènes conduisant à une privation œstrogénique. Dans ce contexte, les LXR entraînent une diminution de la croissance de tumeurs mammaires dépendantes des œstrogènes (Gong *et al.*, 2007). Parmi les autres cancers féminins, des études mettent également en évidence un effet anti-prolifératif de l'activation de LXR sur des modèles de cancers ovariens (Rough *et al.*, 2010).

(ii) LXR et cancer du côlon

L'activation de LXR entraîne une diminution de l'accumulation de transcrits de gènes cibles de la β -caténine comme *myc* (un proto-oncogène), *bmp4* (un facteur de croissance, *bone morphogenetic protein 4*) et *mmp7* (*Matrix metalloproteinase 7*, notamment impliquée dans l'invasion cellulaire) dans des cellules de cancer de côlon. Ceci est corrélé à une diminution de la prolifération cellulaire sans modification de l'apoptose (Uno *et al.*, 2009). Les connexions entre la signalisation LXR et WNT/ β caténine ont également été révélées dans d'autres systèmes cellulaires (Makoukji *et al.*, 2011). En effet, l'activation de LXR inhibe le recrutement de la β -caténine sur ses éléments de réponse TCF/LEF dans les promoteurs de gènes cibles impliqués dans la myélinisation des axones. Les oxystérols inhibent, en agissant via LXR, la voie de signalisation WNT dans les cellules de Schwann (Makoukji *et al.*, 2011). La signalisation LXR est donc capable d'interférer sur d'autres voies de signalisation et notamment la voie WNT/ β -caténine.

Dans une revue récente, Chuu *et al.* proposent LXR comme un bio-marqueur potentiel du cancer du côlon (Chuu, 2011). Un régime riche en phytostérols diminue l'incidence de plusieurs cancers et le β -sitostérol inhibe la prolifération des cellules cancéreuses de côlon HT-29. Le β -sitostérol est un ligand de LXR, ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il exerce son action anti-proliférative sur les cellules de cancer du côlon, en partie *via* une activation de LXR (Chuu, 2011). Cette hypothèse est étayée par une étude cas-contrôle qui associe la consommation de soja (qui contient des quantités importantes de phytostérols) et la survenue du cancer du côlon (Spector *et al.*, 2003). Cette revue propose ainsi LXR comme un acteur pouvant jouer un rôle dans le cancer du côlon.

E. Les LXR dans la prostate

1. LXR et cancer de la prostate

Des études épidémiologiques ont mis en évidence une corrélation entre l'hypercholestérolémie et l'incidence du cancer de la prostate (Bravi et al., 2006, Magura et al., 2008). De plus, des études épidémiologiques ont montré que les populations asiatiques, ayant des risques plus faibles de développer un cancer de la prostate, augmentaient ce risque après avoir migré en Amérique du Nord (Watanabe et al., 2000). Cette étude met donc en évidence le rôle du mode de vie « occidental », en particulier une alimentation riche en lipides dans la prédisposition au cancer de la prostate. Le rôle délétère du cholestérol dans la progression tumorale a été montré par des expériences *in vitro* : le traitement par des statines, inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, a un effet antiprolifératif sur des cellules tumorales prostatiques (Zhuang et al., 2005). Des études épidémiologiques et cliniques ont révélé que les patients traités avec des statines pour cause d'hypercholestérolémie familiale avaient un risque plus faible de développer un cancer de la prostate (Murtola et al., 2008, Platz et al., 2006, Shannon et al., 2005). C'est dans ce contexte qu'un certain nombre d'études ont été menées afin d'élucider le rôle potentiel des LXR dans la tumorigenèse prostatique.

C'est le groupe Fukuchi qui a rapporté pour la première fois le rôle antiprolifératif des LXR sur des cellules humaines de carcinome prostatique (Fukuchi et al., 2004). Dans ces expériences, l'activation de LXR par le T0901317 diminue le nombre de cellules en phase S suite à une augmentation de $p27^{kip1}$, inhibiteur du cycle cellulaire. Dans cette étude, les auteurs montrent également que l'activation de LXR dans les cellules LNCaP induit une accumulation de la cassette membranaire d'efflux de cholestérol, ABCA1 (Fukuchi et al., 2004). Dans les membranes plasmiques, le cholestérol s'accumule au niveau des *rafts* lipidiques. Une augmentation des apports en cholestérol à la membrane plasmique augmente la coalescence des *rafts* (Freeman and Solomon, 2004). Depuis ces dernières années les *rafts* lipidiques sont considérés comme de véritables plateformes de signalisation impliquées dans la transduction des signaux intracellulaires. Ainsi, la sérine-thréonine kinase AKT est activée par phosphorylation au niveau de ces micro-domaines lipidiques pour stimuler les processus de survie et de croissance cellulaire dans les tumeurs prostatiques. Cette phosphorylation est en partie dépendante de la présence de cholestérol dans la membrane qui, par sa présence, augmente la coalescence des *rafts*, facilitant ainsi le recrutement de AKT au niveau de la membrane plasmique (Lasserre et al., 2008). Connaissant le rôle des LXR dans les mécanismes d'efflux de cholestérol, des travaux de l'équipe ont visé à analyser leur potentiel rôle modulateur sur les concentrations en cholestérol dans les *rafts* (Pommier et al., 2010, présenté en annexe). Ainsi, des études *in vitro* et *in vivo* montrent-elles que l'activation de LXR induit l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques. Cet effet implique à la fois la cassette d'efflux ABCG1 et une perturbation de la signalisation dépendante des *rafts* lipidiques (Pommier et al., 2010). L'activation de LXR dans les LNCaP augmente tout d'abord ABCG1 qui stimule l'efflux de cholestérol, entraînant ainsi une

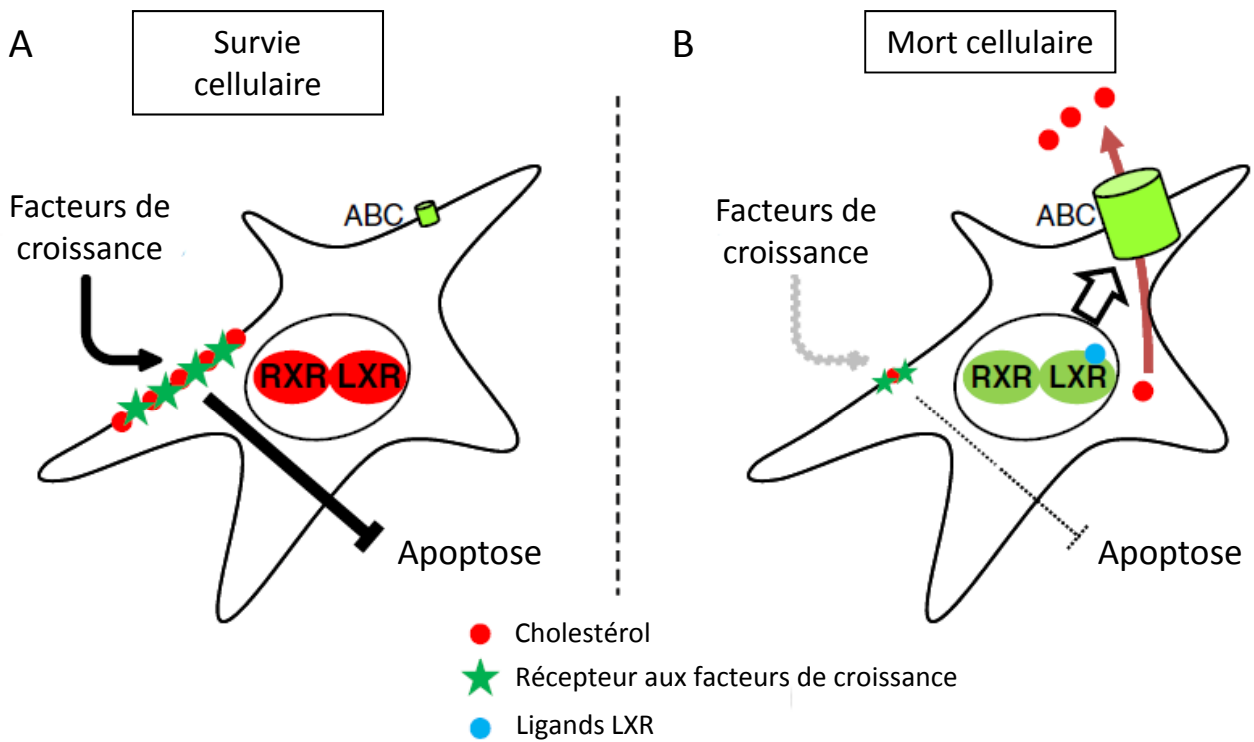


Figure 27 : Rôle des LXRs dans le contrôle de l'apoptose de cellules humaines de cancer de la prostate

A, Lorsque les niveaux de cholestérol sont élevés, il s'accumule dans les membranes au niveau des *rafts* lipidiques ce qui permet aux facteurs de croissance d'accéder à leurs récepteurs. Ces facteurs de croissance augmentent la prolifération et diminuent l'apoptose. B, L'activation des LXR induit la production des cassettes *ATP-binding-cassette* (ABC) impliquées dans l'efflux de cholestérol, ce qui diminue la coalescence des *rafts*. Ceci diminue l'ancrage des récepteurs de croissance à la membrane induisant ainsi une inhibition de la prolifération et une augmentation de l'apoptose. D'après El-Hajjaji, Oumeddour *et al.* 2011.

diminution du taux de cholestérol dans la membrane plasmique et donc une altération des *rafts* lipidiques. De cette façon, la fraction phosphorylée de AKT associée aux *rafts* est diminuée. Un apport exogène en cholestérol dans ces cellules inhibe l'apoptose induite par le T0901317 démontrant ainsi que la régulation de l'homéostasie du cholestérol par les LXR est un processus clé dans le contrôle de l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques. De plus, le traitement chronique avec du T0901317 de souris xénotransplantées avec des cellules LNCaP diminue AKT et stimule l'apoptose dans les tumeurs (Pommier et al., 2010) (**Figure 27**). Ainsi, LXR α et LXR β sont des acteurs modulateurs importants dans les mécanismes de prolifération et d'apoptose des cellules tumorales prostatiques.

Parallèlement au rôle primordial des androgènes dans le développement du cancer de la prostate, il a été montré récemment que les androgènes pouvaient également inhiber LXR dans les cellules de cancer LNCaP (Krycer and Brown, 2011). Ainsi, les LXR pourraient-ils aussi moduler le développement du cancer de la prostate à travers la signalisation androgénique.

2. LXR et hypertrophie bénigne de la prostate

Ce sont les travaux de Kim *et al.* qui ont permis d'établir un lien entre la signalisation LXR et l'HBP (Kim et al., 2009). Ces auteurs présentent les souris déficientes en LXR comme un modèle murin d'HBP. Ils décrivent en effet des changements morphologiques importants au niveau du stroma des prostates ventrales des souris *Lxr α -/-*, *Lxr β -/-* et *Lxr $\alpha\beta$ -/-* à partir de l'âge de 6 mois. Ils observent notamment la présence de nodules fibreux dans les canaux prostatiques. Ces nodules fibreux sont présentés comme des amas de cellules fibreuses stromales qui auraient traversé voire brisé la couche de cellule épithéliales pour envahir la lumière des canaux prostatiques. Les auteurs décrivent une hypertrophie du compartiment stromal accompagnée d'une activation de la voie TGF β et observent également la présence de cellules épithéliales prolifératives. Pour expliquer leur phénotype, ils proposent l'hypothèse selon laquelle la croissance du compartiment stromal résulterait d'un phénomène de transition épithélium-mésenchyme. Ainsi, les cellules épithéliales perdraient l'expression de l'E-cadhérine suite à une activation de la voie TGF β et donc de *snail*, répresseur de l'E-cadhérine. En résumé Kim *et al.* présentent les LXR comme des acteurs importants de la croissance prostatique. Les prostates des souris *Lxr α -/-* ont plusieurs caractéristiques proches de l'HBP chez l'homme, à savoir, des cellules épithéliales prolifératives, un stroma compact et hypertrophié ainsi que des canaux dilatés (Kim et al., 2009). Leur modèle de souris semble donc développer une HBP avec une altération en particulier de la composante fibrillaire. Le mécanisme qu'ils proposent pour expliquer ces altérations est la mise en place de phénomènes de transition épithélium-mésenchyme. Cependant, la part des autres composantes, et notamment la composante glandulaire, ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore élucidés.

III. Présentation du projet de recherche

Les LXR sont des récepteurs impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques. L'étude bibliographique met clairement en évidence leurs rôles au niveau de la prostate. Ces données montrent en effet que les LXR contrôlent l'efflux de cholestérol au niveau des cellules cancéreuses de prostate. Les LXR contrôlent également la prolifération et l'apoptose des cellules LNCaP. De plus, les souris *lxra*^{-/-} ont été récemment montrées comme des modèles d'HBP (Kim et al., 2009). Elles présentent en effet plusieurs caractéristiques proches de la pathologie humaine, avec des cellules épithéliales prolifératives, une hypertrophie du stroma ainsi que la présence de nodules fibreux à l'intérieur des canaux. Les données bibliographiques présentent donc les LXR comme des acteurs importants de la physiologie prostatique mais les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore élucidés. A la genèse de ce projet de thèse, des données préliminaires du laboratoire montraient que les souris *lxra*^{-/-} présentaient une hypertrophie des lobes prostatiques ventraux, associée à une caractéristique récurrente de l'HBP chez l'homme, à savoir une accumulation d'urine dans la vessie, témoignant de problèmes de miction.

L'HBP est une pathologie de l'homme âgé qui peut avoir des effets très néfastes sur la qualité de vie. Une des composantes de l'HBP est glandulaire, c'est-à-dire que l'atteinte concerne l'épithélium de la glande. Le rôle prépondérant des androgènes dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium prostatique mais aussi dans la survenue de pathologies telles que l'HBP a largement été développé dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit. Ainsi, un des traitements de l'HBP, vise-t-il à éteindre la signalisation androgénique en inhibant la conversion de la testostérone en son métabolite actif, la DHT, par l'utilisation d'inhibiteurs de la 5 α -réductase. Le phénotype d'hypertrophie de la prostate pourrait donc s'expliquer par une altération de la signalisation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-}. Les données bibliographiques indiquent en effet clairement qu'il existe des interactions entre les LXR et la signalisation androgénique appuyant l'hypothèse d'une modification de la signalisation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-}.

Tout d'abord LXR α a la capacité de réguler la production d'androgènes au niveau du testicule. Les taux de testostérone testiculaire ainsi que des ARNm codant l'enzyme 3 β -HSD sont diminués dans les souris *lxra*^{-/-}. Des souris sauvages traitées avec du T0901317 présentent une forte augmentation de la concentration intra-testiculaire de testostérone ainsi que des transcrits *star* et *3 β hsd* contrairement à ce qui est observé chez les souris *lxra β* ^{-/-} (Volle et al., 2007). LXR α régule donc la sécrétion de testostérone par un contrôle transcriptionnel direct de gènes clés de la stéroïdogénèse au sein de la cellule de Leydig. Les LXR régulent également la stéroïdogénèse au niveau surrénalien (Cummins et al., 2006). Un certain nombre de données bibliographiques établissent également un lien entre les androgènes et LXR au niveau de la prostate. Ainsi, l'activation par un androgène de synthèse, le R1881, inhibe l'expression de ABCA1 dans les cellules LNCaP en culture (Fukuchi et al., 2004). Des données montrent également, grâce à l'utilisation de souris transgéniques qui surexpriment LXR α spécifiquement au niveau du foie, que

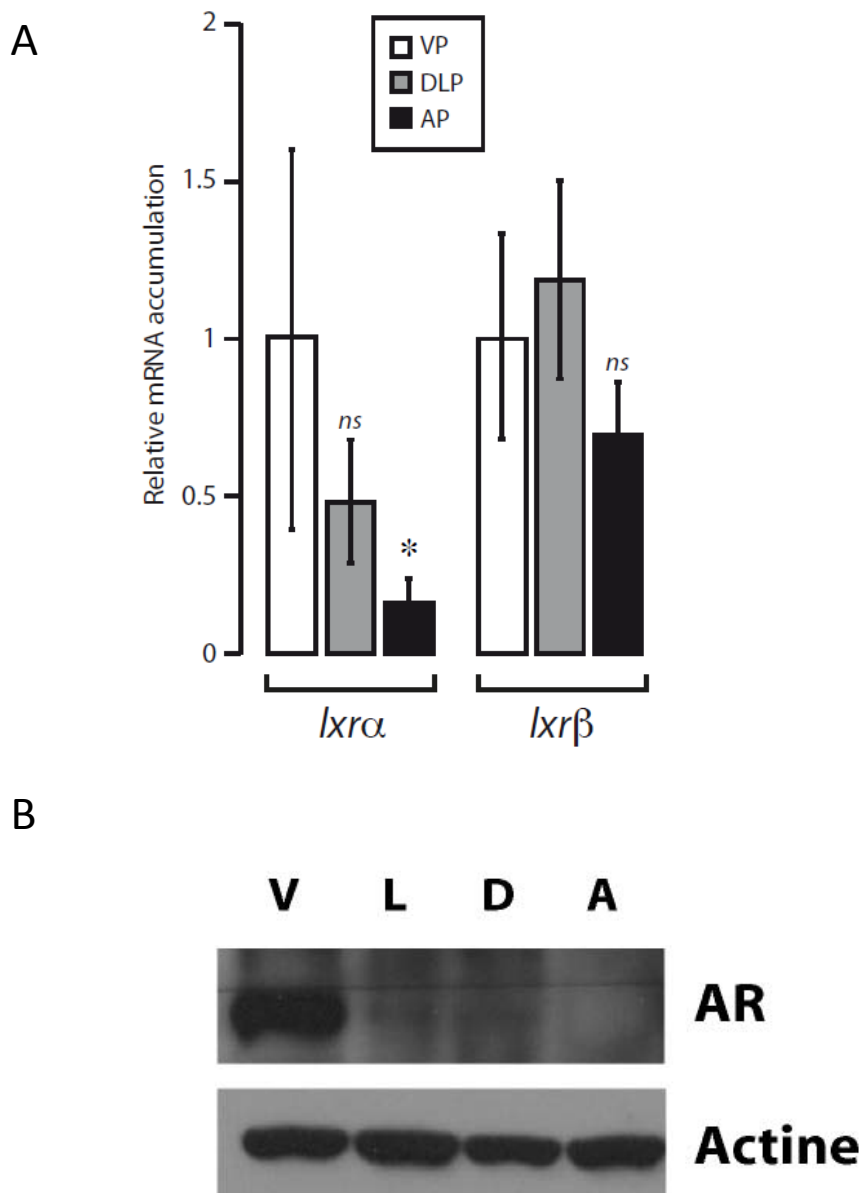


Figure 28 : Expression de *LXRα* et *LXRβ* (A) et accumulation de AR (B) dans les différents lobes de la prostate murine

Les niveaux d'accumulation des ARNm codant *LXRα* et *LXRβ* (A) ont été quantifiés par RT-qPCR dans les différents lobes prostatiques de souris âgées de 9 mois. B, La protéine AR a été détectée en Western blot sur des échantillons de protéines totales extraites à partir des différents lobes prostatiques de souris âgées de 9 mois. Données non publiées obtenues au laboratoire. A, antérieure ; AP, *anterior prostate* ; D, dorsale ; DLP, *dorsolateral prostate* ; L, latérale ; V, ventrale ; VP, *ventral prostate*.

l'activation de LXR α hépatique inhibe la régénération prostatique dépendante des androgènes suite à une castration (Lee et al., 2008). Cette activation hépatique de LXR entraîne une diminution du taux de testostérone circulante, ce qui conduit à une inhibition de la prolifération de l'épithélium prostatique. L'origine de cette inhibition de l'activité androgénique se situe dans la dérégulation de gènes codant les enzymes du catabolisme hépatique (Lee et al., 2008). Les LXR sont donc impliqués dans le catabolisme hépatique des androgènes.

Ces différentes données bibliographiques indiquent clairement que des interactions entre les voies de signalisation LXR et AR sont possibles dans les cellules de prostate. En revanche, les interactions entre les LXR et la signalisation androgénique n'ont pas été décrites *in vivo* dans la prostate. Notons que les acteurs principaux de ces interactions sont exprimés dans la prostate murine et particulièrement dans les lobes ventraux (**Figure 28**). Des données obtenues au laboratoire semblent en effet montrer que LXR α est exprimé majoritairement au niveau de la prostate ventrale par rapport aux lobes dorso-latéraux et antérieurs (**Figure 28A**), tandis que LXR β est exprimé de la même façon dans l'ensemble des lobes de prostate (**Figure 28A**). Concernant le récepteur des androgènes, c'est le lobe ventral qui l'exprime en majorité (**Figure 28B**). Ce faisceau d'arguments appuie l'hypothèse d'une altération de la signalisation androgénique qui expliquerait l'apparition du phénotype dans les lobes ventraux des souris *lxra*^{-/-}.

L'objectif de ce travail de thèse était donc de : 1) comprendre l'impact *in vivo* d'une inactivation de LXR sur la physiologie prostatique ; 2) déterminer la nature des relations associant les signalisations LXR et AR ; 3) comprendre si le contrôle du maintien de la physiologie prostatique par LXR dépend d'une interaction épithélium/mésenchyme.

1) comprendre l'impact *in vivo* d'une inactivation de LXR sur la physiologie prostatique

Les modèles de choix pour cette étude sont les souris invalidées pour LXR α (*lxra*^{-/-}) et/ou LXR β (*lxr β* ^{-/-}; *lxra β* ^{-/-}), ce qui nous donne la possibilité d'étudier les rôles spécifiques de chacune des deux isoformes de LXR dans la prostate. Des analyses histologiques ont été menées pour caractériser le phénotype prostatique de ces souris. Kim *et al.* proposent les souris *lxra*^{-/-} comme des modèles d'HBP (Kim et al., 2009). Ils suggèrent que dans ces souris, c'est la composante fibrillaire de la prostate qui est majoritairement altérée. Nous nous sommes demandé, si les altérations observées dans les prostates des souris *lxra*^{-/-} pouvaient être dues à une dérégulation de la partie glandulaire de la prostate. Nous nous sommes donc intéressés au(x) rôle(s) des LXR sur l'activité sécrétoire de l'épithélium.

2) déterminer la nature des relations associant les signalisations LXR et AR

Lee *et al.* mettent en évidence que l'activation hépatique de LXR α augmente le catabolisme des androgènes. Cette étude montre que LXR α hépatique, en influant sur les taux d'androgènes circulants, entraîne une privation androgénique dans la prostate et ainsi une inhibition de la prolifération de l'épithélium. LXR α peut ainsi exercer une action anti-androgénique et influencer la physiologie

prostatique en agissant « à distance ». Mais qu'en est-il de l'action de LXR directement au niveau de la prostate. LXR α est-il capable d'influer sur la signalisation androgénique au niveau de la glande ? Des données récentes montrent que les androgènes sont capables d'inhiber la signalisation LXR dans des cellules de prostate. En effet, le traitement de cellules LNCaP avec de la DHT diminue les quantités de transcrits *abca1* dans ces cellules. Cette inhibition de ABCA1 par les androgènes requiert la présence de LXR dans les cellules (Krycer and Brown, 2011). Ainsi, des données sont-elles disponibles concernant une modulation possible de la signalisation androgénique par LXR ou au contraire de LXR sur la voie de signalisation androgénique. Cependant, aucune donnée ne révèle *in vivo* d'influence de LXR α sur la signalisation androgénique dans la prostate. Une des questions à laquelle nous avons cherché à répondre au cours de ce travail de thèse était : *in vivo*, dans la prostate, l'action des androgènes est-elle dépendante de LXR ?

3) comprendre si le contrôle du maintien de la physiologie prostatique par LXR dépend d'une interaction épithélium/mésenchyme

Kim *et al.* montrent qu'il existe une altération du compartiment stromal dans les prostates des souris *lxra*^{-/-}. Il serait intéressant de savoir si les atteintes décrites au niveau de la prostate ventrale des souris *lxra*^{-/-} pourraient être dues à une altération du dialogue entre le mésenchyme et l'épithélium dans la prostate. Nous savons d'après plusieurs études récentes que les LXR jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie prostatique. De plus l'influence des interactions épithélium/mésenchyme dans le maintien de l'intégrité de la glande prostatique a été longuement décrite dans l'introduction bibliographique. Au final, le rôle important de LXR dans l'homéostasie prostatique implique-t-il un dialogue entre le compartiment stromal et l'épithélium ?

Résultats

Présentation succincte du contexte scientifique

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est une pathologie de l'homme âgé qui affecte un des trois compartiments de la prostate (stroma, muscle lisse, épithélium) voire les trois. Kim et al. (Kim et al., 2009) ont décrit que les souris *lxra*^{-/-} présentaient des anomalies du compartiment stromal. Néanmoins, les altérations de la partie glandulaire sont très répandues et l'étiologie implique notamment les androgènes. En effet, un des traitements de première ligne vise à inhiber la conversion de la testostérone en DHT, le ligand préférentiel du récepteur des androgènes au niveau de la prostate.

De nombreuses données bibliographiques établissent un lien fonctionnel entre les androgènes et les récepteurs des oxystérols LXR au niveau de la prostate. L'activation du récepteur des androgènes AR par un androgène de synthèse, le R1881, diminue considérablement l'expression du gène *abca1* dans les cellules LNCaP (Fukuchi et al., 2004). De plus, les souris transgéniques qui surexpriment un LXR α hépatique constitutivement actif n'ont plus de régénération prostatique dépendante des androgènes suite à une castration (Lee et al., 2008). Cette activation de LXR entraîne une diminution des taux circulants de testostérone, ce qui conduit à une inhibition de la prolifération de l'épithélium prostatique. Cette baisse résulte de la dérégulation de gènes codant les enzymes SULT2A1 et STS impliquées dans le catabolisme hépatique et périphérique des androgènes (Lee et al., 2008).

Nous avons analysé le phénotype des souris *lxra*^{-/-} afin de répondre à deux questions majeures :

- Les souris *lxra*^{-/-} développent une HBP dépendante du stroma. Cependant existe-t-il une altération de la partie glandulaire, et celle-ci implique-t-elle les androgènes ?
- Existe-t-il un dialogue (impliquant AR) entre la signalisation dépendante de LXR et celle activée par les androgènes dans la prostate ?

Article 1 : *LXR α regulates androgen response in prostate epithelium.*

Viennois E. *et al.*

En préparation.

LXR α regulates androgen response in prostate epithelium

Emilie VIENNOIS¹⁻⁴, *et al.*

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

²CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 AUBIERE, France

³INSERM, Unité 931, GReD, F-63177 AUBIERE, France

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

⁵Service d'Urologie, Centre Hospitalier Universitaire, 63000 Clermont-ferrand, France

⁶Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France

⁷Dipartimento di Medicina Sperimentale, Laboratorio di Biologia Molecolare, Sec. F. Bottazzi, Second University of Naples, Italy

Abstract. Benign prostatic hyperplasia is nonmalignant enlargement of the prostate gland that commonly occurs in older men. We identified that Liver X receptor (LXR) α knock-out mice (*lxra*^{-/-}) develop a ventral prostate hypertrophy, correlated with an over-accumulation of secreted protein on the prostatic ducts, especially Spermine Binding Protein (SBP). After castration, *sbp* gene expression exhibits a hyper-sensitivity to androgen re-stimulation in *lxra*^{-/-} mice. Our data also suggest that LXR α could interfere with the androgen regulated pathway. Finally, we point that LXR α can mediate epithelial-mesenchyme interaction in mouse prostate.

Caption. Mice lacking the nuclear receptor LXR α develop BPH-like symptoms in which the epithelium homeostasis is affected. LXR α modulates the transcriptional activity of the androgen receptor on specific promoters. LXR α could be used as a novel pharmacological target to modulate AR activity.

Keywords. Prostate – androgen – LXR – benign hyperplasia

Introduction

Benign prostate hyperplasia (BPH) is a very common prostatic disorder that affects 50% of men at 60 years (1). BPH is characterized by lower urinary tract disorders having severe effects on life quality. Even though mechanisms at the origin of these disorders remain unclear, three main forms of BPH have been described: glandular, fibrous and muscular form. Two types of medication are commonly used : 5-alpha-reductase inhibitors, such as finasteride, which inhibit the conversion of testosterone into dihydrotestosterone (DHT) (2), and the alpha-blockers, such as prazosin, which block the α -adrenergic receptor of smooth muscle helping to relax prostate-associated muscle fibers (3), facilitating urination. In addition to pharmacological treatment, surgery is a current approach, specifically transurethral prostate resection.

Androgens play important roles in the prostate embryonic development as well as in its function in adult (4). Numerous evidences have been reported regarding the primary role

of androgen signaling in the etiology of prostatic hypertrophy. DHT is the major active androgen within the prostate (5), and interestingly, inhibition of testosterone conversion into DHT is one the most effective pharmacological treatment of BPH (2). Androgen receptor (AR, NR3C4) belongs to the nuclear hormone receptor superfamily and is activated by DHT or testosterone. Upon activation by androgens, AR translocates from cytoplasm into the nucleus, where it binds to the androgen responsive element (ARE) on target genes and recruits coactivators to mediate gene regulation (6, 7). Altogether, AR activates signaling pathways required for prostate development and physiological function (4, 8).

Recent studies identify Liver-X-Receptors (LXR) as important factors involved in prostate physiology (Review in (9)). LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2), two members of the nuclear receptor superfamily, are bound by oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols, and stimulate expression of target genes essentially involved in lipid metabolism (10, 11). Interestingly, LXR ligands such as the synthetic T0901317 have anti proliferative effects in prostate cancer cell line LNCaP (12). Besides, we have previously shown that LXR activation also leads to LNCaP cell death by apoptosis as well as inhibition of tumor growth in xenograft models (13). Moreover, LXR

*Correspondance: "Génétique Reproduction et Développement", Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 Clermont Université INSERM U931, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. E-mail:

activity could be down-regulated by AR in LNCaP cells at the promoter level (14). This regulation implies the N-terminal domain of AR. Conversely, constitutive activation of hepatic LXR α activates the androgen catabolism in mice (15). Collectively, these data support the idea of two-way cross-talk between LXR and AR, a functional link between LXR signaling pathway and androgen network. However, the precise molecular mechanisms have not been clearly identified so far.

Kim *et al.* (16) described that LXR α -lacking mice were characterized by several BPH-like features such as dilated prostatic ducts. The authors suggested that this phenotype was due to stromal compartment alterations. However, no data was available regarding the glandular portion whose homeostasis is dependant of androgens.

The aim of this study was to understand how LXR α could be involved in the prostate physiology and whether LXR α could interfere with the androgen signaling *in vivo*, explaining thus the BPH-like phenotype in mice defective for this nuclear receptor.

Materials and methods

Animal care and animal experiments procedure - LXR-knockout mice (*lxra*^{-/-}, *lxr β* ^{-/-} and *lxra β* ^{-/-}, (17)) and wild type (WT) mice were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and housed in a temperature-controlled room with 12-h light, 12hr dark cycles and fed *ad libitum* with water and Global-diet 2016S (Harlan, Gannat, France). Eight to 12 month-aged mice were anesthetized by ketamine/xylazine; blood was collected by cardiac puncture, whereupon animals were killed by cervical dislocation and organs harvested. Some mice were surgically castrated at 6 month of age and three weeks after they received two daily intramuscular injection of 75 μ g testosterone propionate (Sigma Aldrich L'Isle d'Abeau, France) for 1 week to allow the prostate to regenerate. Animals were then sacrificed and ventral prostate (VP) lobes were collected for the various analyses. For anti-androgen experiments, 6 month-aged mice were daily gavaged with the anti androgen bicalutamide (12mg/day/kg Casodex®, AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) or with vehicle methylcellulose. Among the experiment, ventral, dorso-lateral and anterior prostate lobes, testis, epididymis, vas deferent, seminal vesicle, and liver were collected and either immediately frozen in liquid nitrogen or fixed in 4%

paraformaldehyde. All the chemicals were from Sigma-Aldrich unless indicated. All mouse experiments were performed in accordance with the Region Ethic Committee (# CE26-11).

Anatomy and pathology analyses - VP lobes were collected, fixed in 4% PFA, embedded in paraffin and 5- μ m-thick sections were stained with hematoxylin/eosin/saffron or Masson's trichrome and analyzed with axiovision 4.2 software (CarlZeiss Vision GmbH, LePecq, France). For electron microscopy, samples were fixed in 2% glutaraldehyde-0.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer at 4°C for 24 h. Fixed VP were washed in cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.4) and post-fixed for 1.5hr in buffered osmium tetra-oxide at 4°C, dehydrated and embedded in Epon Araldite. Ultrathin sections were made with a UC6 ultramicrotome (Leica, Nanterre, France), mounted onto copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Hitachi H-7650 transmission electron microscope (Hitachi Elexience, Verrières-le-buisson, France). Pictures were taken with a CCD AMT HR camera (Hamamatsu, 1024 \times 1024 pixels, Massy, France).

Mouse prostate epithelial cell establishment - Culture procedure was derived from methods developed for mouse vas deferens epithelial cells by Manin *et al.* (18). Mouse prostate epithelial (MPE) cells were harvested from the VP lobes of 20- to 30-days-old of *lxra*^{-/-} or wild-type mice. Fragments were kept in a sterile phosphate buffer (PBS) and minced with a razor blade. Minced tissue was transferred onto cell culture insets (BD Falcon TM) coated with a thin layer of Extra Cellular Matrix (ECM) gel (Sigma Aldrich), plated onto 35 mm culture dishes, and cultured in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (50:50, GIBCO) supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France), cholera toxin (10ng/ml), epidermal growth factor (5ng/ml), gentamycin (100 μ g/ml), insulin (5 μ g/ml), transferrine (10 μ g/ml), L-glutamine (2mM), HEPES (20mM), ethanolamine (0.6 μ g/ml), cAMP (25 μ g/ml), selenium (17.3ng/ml) and hydrocortisone (10nM)] at 37°C in a humidified air 5% CO₂ incubator. All the chemicals were from Sigma Aldrich unless indicated. Medium was changed every 2 days. Cells emerging from the explants were exclusively epithelial cells, and upon confluence, cells were re-plated in the same conditions at a split ratio of 1:2 until they survived senescence, which typically occurs after six passages. After this point, cells were transfer in 100-mm culture dishes every 3-4 days at a 1:5 to 1:10 split ration. Studies on

MPE cells were performed at passages 15 to 30.

Cell immunofluorescence and lysotrackerProbes labeling - MPE were seeded at a density of 150,000 cells/well in 6-well plates. After 24h of culture, they were rinsed three times in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 10min. After rapid washes in PBS, cells were permeabilized in PBS Triton X-100 0.1% for 5 min. Anti rabbit EEA1 (Abcam, Paris, France) and anti mouse tubulin (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France) antibodies were incubated 2hr at room temperature in 0.1% bovine serum antigen-0.2% normal goat serum/PBS. After washes, Alexa 488 conjugated anti-rabbit and Alexa 555 conjugated anti-mouse immunoglobulins (Invitrogen Oslo Norway) were added in 0.2% normal goat serum/PBS for 1 h at room temperature. Cell nuclei staining was obtained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml.

For lysotracker analysis, MPE cells were seeded at a density of 150,000 cells/well. Twenty-four hours after seeding, MPE were incubated 1h in minimal medium (DMEM supplemented with gentamycin (100 μ g/ml), L-glutamine (2mM)) containing 50mM of lysotracker[®] (Invitrogen). Cell nuclei staining was obtained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml. Slides were mounted with PBS/glycerol (1:1) and were visualized with axiovision 4.2 software (CarlZeiss Vision GmbH).

Cell culture and transient transfection - Mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. *Lxr α* ^{-/-} and wild-type MEF cells were seeded at a density of 70,000 cells/well in 6-well plates (BD-Falcon, Le Pont-De-Claix, France) and were transfected 24 h after seeding with 1 μ g of the luciferase reporter construct ARE-TK-LUC (19) in combination with 500ng or 1 μ g of pSG5-hAR using lipofectamine 2000 (Sigma-Aldrich). After transfection, cells were starved for 12hr in a basal medium without growth factors and then they were cultured in DMEM medium in the absence or the presence of 1 nM DHT (Sigma-Aldrich) for 24 hr. Cells were harvested and luciferase activity of each sample were measured with a luciferase assay kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

Hormone measurement - Intraprostatic DHT was quantified using enzyme immunoassay kit from Diagnostics Biochem Canada Inc

(London, Canada) (20). Briefly ventral prostate lobes were homogenized in tissue lyser from Qiagen (Les Ulis, France) in a solution of PBS-0.1mg/ml BSA. DHT concentration in the homogenate was determined according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR - Frozen ventral prostate were disrupted in lysis buffer and total mRNA were extracted using NucleoSpin[®] RNA II kit (Macherey Nagel EURL, Hoerdt, France) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with 200 units of MMLV-RT (Promega), 5 pmoles of random primers (Promega), 40 units RNAsin (Promega) and 2.5mM dNTPs. Quantitative PCR was performed on Mastercycler[®] ep realplex (Eppendorf, LePecq, France) using 4 μ l of 1:50 diluted cDNA template amplified by MESA GREEN qPCR masterMix Plus for SYBR[®] (Eurogentec, Angers, France). Sequences of primers used are listed in Table 1 (suppl. Data 4).

Coomassie blue gel and LC-MS/MS analysis - Proteins were extracted from ventral prostate from *Lxr α* ^{-/-} and their wild-type control mice using Hepes 20 mM, NaCl 0.42 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM and NP40 1% supplemented with PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich), Protease inhibitor (Complete 1X, Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), NaF 0.1 mM and Na₂VO₃ 0.1mM (Sigma-Aldrich). Thirty μ g of total proteins were load on Mini-PROTEAN[®] TGX 4-15% precast gels (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), and gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad). For protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry, protein bands were first excised, destained, and submitted to tryptic digestion, as previously described (21). Briefly, positive ion MALDI mass spectra were recorded in the reflectron mode of a MALDI-TOF MS (Voyager DE-Pro, Applied BioSystems, Carlsbad, Ca). Interrogations were performed against Swissprot database *Mus musculus*, using Mascot software. The following parameters were considered for the searches: a maximum ion mass tolerance of \pm 25 ppm, partial oxidation of methionine and one maximum miss cleavage.

Western blot analysis - Proteins were extracted as described for Coomassie blue gel. Forty μ g of total proteins were subjected to denaturing SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose Hybond-ECL membrane (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against beta-Actin (Sigma-Aldrich), androgen

receptor (PG21, Millipore), or pan-prostate secretions (Kind gift from Dr. C. Abate-Shen). A second 1h-incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (P.A.R.I.S, Compiègne, France) was performed, and peroxidase activity was detected with the Western Lightning System (Perkin-Elmer, Villebon Sur Yvette, France).

Chromatin immunoprecipitation - Ventral prostates from *Lxra*^{-/-} and their wild-type control mice were harvested and homogenized in 200 μ l of cell lysis buffer (5mM PIPES, 85mM KCl, 0.5% NP40) supplemented with PMSF 1mM and protease inhibitor 1X, following by centrifugation at 2000g for 5min at 4°C. Chromatin complexes were fixed by 1% formaldehyde/PBS for 15min at RT in the presence of 125mM glycine to quench any further fixation. Samples were centrifuged at 1500g for 5 min and pellets were washed two times in PBS supplemented with 1mM PMSF and protease inhibitor. Nuclei were then lysed 45min on ice in 200 μ l of nucleus lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate), and chromatin was sheared by sonication into 0.4- to 1-kb fragments. Sheared chromatin was then pre-clear 2h at 4°C in 500 μ l IP buffer [0.01% sodium dodecyl sulfate, 1.1% triton X100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl (pH 8.1) and 167mM NaCl] containing 30 μ l of Dynabeads Protein A (Invitrogen). The beads were subsequently discard with MagnaRack (Invitrogen) and sample obtained was split in two individual samples. Immunoprecipitation were performed overnight at 4°C with 5 μ g of negative control IgG (Diagenode, Liège, Belgique) or specific anti-AR antibody (Millipore, Molsheim, France). Beads were washed 6 times in cold IP buffer, and elutions were performed according to Chelex® protocol (Bio-Rad). Before PCR, chromatin samples were further purified using purification columns (Qiagen) and eluted in 30 μ l water. Quantitative PCR was performed on 2 μ l of eluted chromatin using GoTaq (Promega). PCR was performed with the following primers: FKBP5: 5'-ACCCCATTTTAATCGGAGAAC-3' and 5'-TTTTGAAGAGCACAGAACCCT-3', SBP: 5'-GCCCTACTGACCCAGTATAGC-3' and 5'-GAACTTTGTTTTCTGCTTATCCCTCAG-3' and Probasine: 5'-ATACTAAATGACACAATGTCAATG-3' and 5'-CCCCAACACATTTGTTATTCTC-3'.

Urogenital sinus dissection and subrenal prostate regeneration - The urogenital sinus were collected from embryos of 16.5 days and dissected into urogenital epithelium (UGE) and urogenital mesenchyme (UGM) according the

protocol described by (22). Briefly, dissected tissues were washed 3 times in PBS 1X and digested by 200 μ l 10% trypsin at 4°C for 60 min. After that, trypsin was immediately diluted in PBS1X, and the cells washed 5 times. Fifty μ l PBS 1X was added with 5 μ l DNase (10mg/ml, Roche). Samples were kept on ice for 5 min and DNase activity was stopped with 500 μ l dissecting media (DMEM supplemented with 10% FBS, P/S and glutamine, Invitrogen) and washed 4 times. Under binocular loop, the mesenchyme (translucent and vascularized) was separated easily from the epithelium (opaque cylinder-shaped). Four mesenchymes were two epithelia in 5 μ l of type 1 collagen extemporary prepared (250 μ l collagen, 5.75 μ l 1N NaOH, 28.4 μ l PBS1X, BD Biosciences). Four combinations were performed: UGE_{WT}/UGM_{WT}; UGE_{Lxra}^{-/-}/UGM_{Lxra}^{-/-}; UGE_{WT}/UGM_{Lxra}^{-/-}; UGE_{Lxra}^{-/-}/UGM_{WT}. After collagen polymerization at 37°C, the collagen grafts were cultured at 37°C, 5% CO₂ in dissecting media supplemented with 10⁻⁷M DHT (Sigma Aldrich) for 24h.

The subrenal dissociated prostate cell regeneration assay has previously been described in detail (22, 23). Briefly, male Nude mice (Charles River, L'Arbresle, France) were anesthetized with ketamine/xylazine. A small incision was done in the middle of the back and another one on the peritononeum. The capsule kidney was then incised and lifted, and the collagen graft gently pushed underneath the membrane. Kidney were repositioned into the body, the peritoneum and the skin were sutured. The grafts were harvested 8 weeks after surgery. All mouse experiments were performed in accordance with the Region Ethic Committee (# CE21-11).

Statistical analysis - Values were expressed as means +/- SEM. Statistical comparisons were performed using 2-tailed Student's t test. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mice lacking LXR α develop a benign prostatic hypertrophy associated with abnormal epithelial secretion activity

Ventral prostates (VP) were obtained from 12 month old wild-type (WT), LXR α (*Lxra*^{-/-}), LXR β (*Lxr β* ^{-/-} and LXR α and β (*Lxra β* ^{-/-}) deficient mice. Lobe weights (Figure 1A) and sizes (Figure 1B) were significantly higher in *Lxr*^{-/-} compared to WT mice, *Lxra*^{-/-} mice showing the most prominent phenotype (2.7-

fold increase compare to WT, vs. 2-fold for *lxr β* ^{-/-} and *lxr $\alpha\beta$* ^{-/-} mice). Macroscopic analysis (Figure 1C) showed that *lxr α* ^{-/-} mice harbored a filled bladder, sign of a urinary flow obstruction usually observed in BPH, as well as aberrant dilated ducts (Figure 1D), characterized by an accumulation of the secretion fluid, which could explain the VP weight increase. No fibrous nodule linked to the fluid retention was seen, conversely to Kim et al. (16).

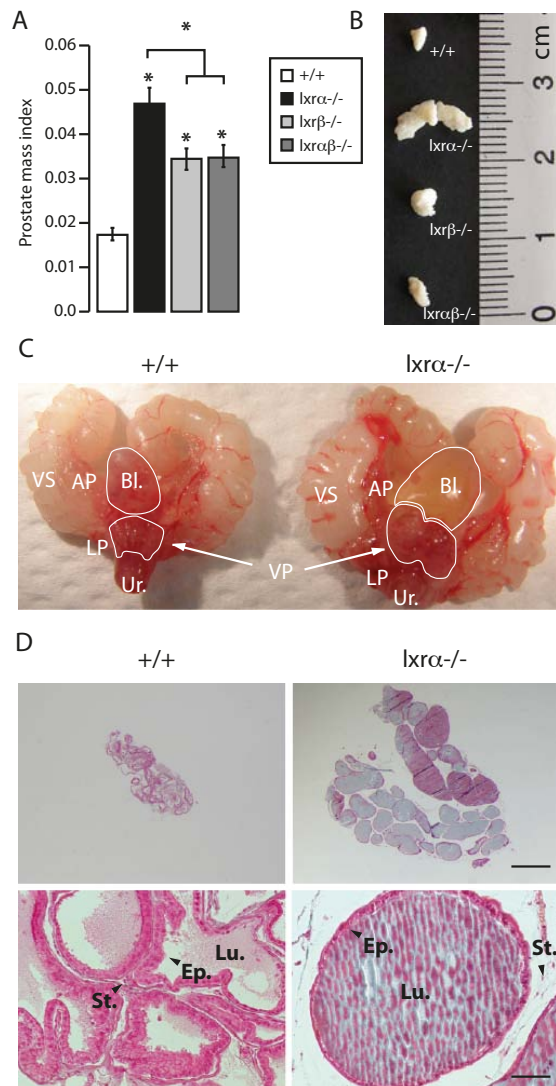


Figure 1. *Lxr α* ^{-/-} mice develop a prostate hypertrophy. A, Ventral prostate weight normalized to body weight of wild-type (WT), *lxr α* ^{-/-}, *lxr β* ^{-/-} and *lxr $\alpha\beta$* ^{-/-} mice. Prostate weight (A) and size (B, cm) are increased in *lxr α* ^{-/-} mice compared to WT, *lxr β* ^{-/-} and *lxr $\alpha\beta$* ^{-/-} mice. *, $p < 0.05$ compared to the WT mice. C, Macroscopic photograph of urogenital tract of *lxr α* ^{-/-} compared to WT mice. *Lxr α* ^{-/-} mice develop a bladder enlargement with a urine accumulation. D, Masson-Goldner trichrome staining of VP in WT and *lxr α* ^{-/-} mice at the age of 8 months.

Given that, we hypothesized that the enlarged VP phenotype could result from the

deregulation of epithelial secretion activity. Electron microscopy analyses pointed out a higher vesicle trafficking and abnormal vesicle structures in *lxr α* ^{-/-} compared to WT mice (Figure 2). Indeed as observed, secretion vesicles in cytoplasm were larger and exhibited filamentous contents, whose composition is unknown so far. Interestingly LXR β was not able to reverse the phenotype: this cell disorganization was not seen in *lxr β* ^{-/-} mice (data not shown). Altogether, *lxr α* ^{-/-} mice present a VP epithelium which is defective in the regulation of secretion. The hypothesis that an exclusive expression of *lxr α* in the VP could explain the phenotype in the *lxr α* ^{-/-} mice was ruled out since *lxr α* and *lxr β* mRNA were detected in all prostate lobes in wild type mice (Supplementary data 1).

***Lxr α* ^{-/-} ventral prostate exhibits an over-accumulation of the secreted Spermine Binding Protein in the prostate fluid**

In order to decipher the molecular mechanisms leading to the phenotype observed in VP from *lxr α* ^{-/-} mice, analysis of protein expression profiles was performed using western blot and mass spectrometry. Coomassie blue staining showed strong modifications in secreted protein compositions between WT and *lxr α* ^{-/-} mice (Figure 3A). These observations were confirmed by western blot using an antiserum directed toward the mouse prostate secretions (24) in isolated secretions and in cell lysates from WT and *lxr α* ^{-/-} mice. Both experiments showed a strong protein signal at 30 kDa in WT (band 1) mice while this signal (band 2) was at approximately 22/25 kDa in *lxr α* ^{-/-} mice (Figure 3B). Mass spectrometry analysis led to identify both bands as Spermine Binding Protein (SBP) (Figure 3C). The molecular weight discrepancy could result from differential posttranslational modifications. Indeed, SBP is known to be a highly glycosylated protein thus resulting in multiple molecular weight (25). Interestingly, if O-GlcNAcylation has been shown to increase LXR α activity (26), LXR α itself has never been reported to modulate glycosylation of proteins. Besides, the increased accumulation of SBP and the apparent modification of its migration profile, *sbp* mRNA accumulation (Figure 3D) was drastically increased in *lxr α* ^{-/-} mice (3000-fold compare to WT mice) suggesting that LXR α ablation could affect its gene transcription. Hence, it could be concluded that *lxr α* ^{-/-} mice showed a deregulation of the prostatic fluid composition due to a strong accumulation of SBP. This increase was considered as marker of BPH.

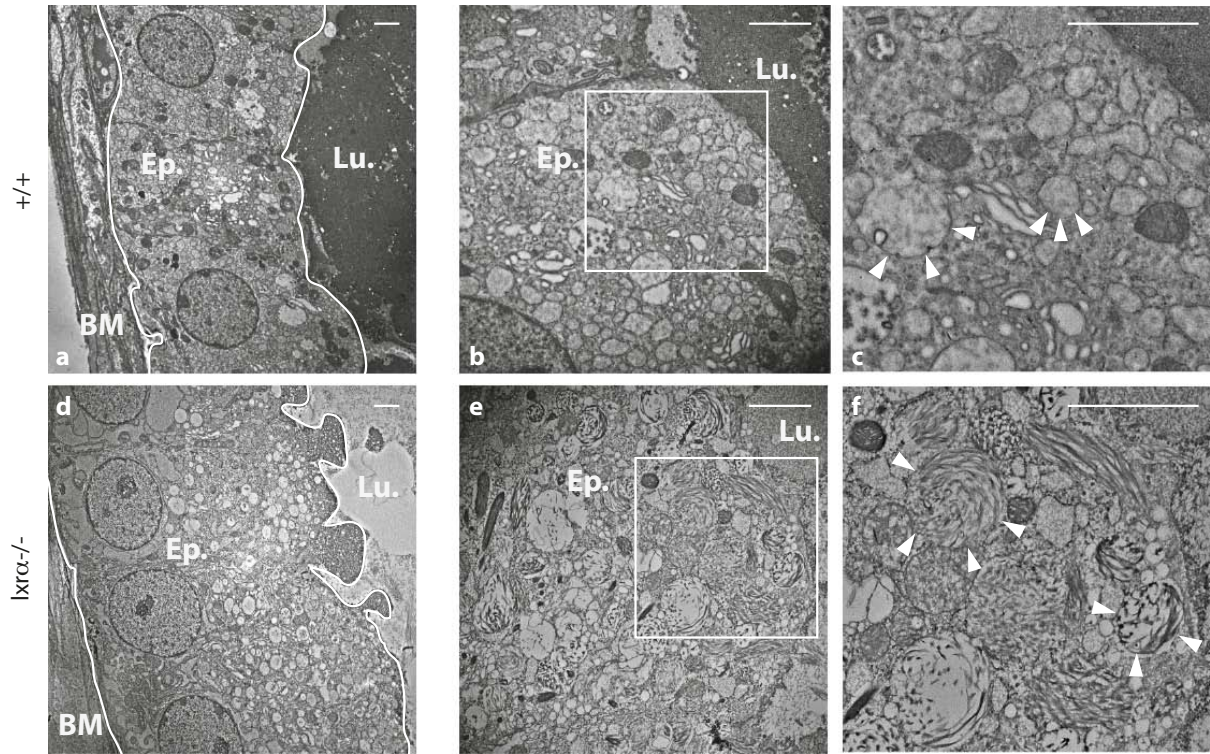


Figure 2. LXR α -deficient mice present an abnormal epithelial secretory activity. Ultrathin sections of VP from WT (a, b, c) or *Lxr α* ^{-/-} (d, e, f) mice were made and analyzed by electron microscopy to observe the cytoplasm ultra-structural organization of the cells. White arrow heads indicate vesicle of secretion. Secretion vesicles on *Lxr α* ^{-/-} cytoplasm are bigger and present filamentous content. Ep, epithelium; Lu, lumen; BM, basal membrane. Bar, 2 μ m (a, d) and 2 μ m (b, e). Squared portions indicate the magnified view shown in c and f.

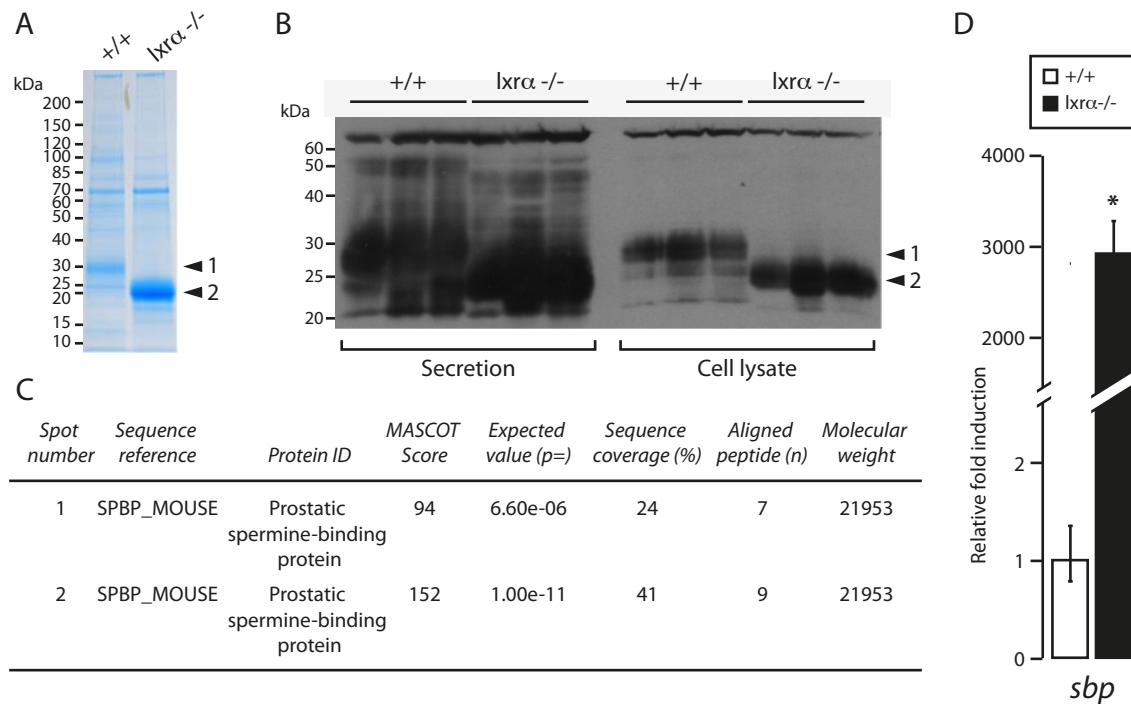


Figure 3. *Lxr α* ^{-/-} ventral prostate exhibits an over-accumulation of the secreted protein Spermine Binding Protein (SBP). A, Secretory proteins of WT and *Lxr α* ^{-/-} ventral prostate were electrophoresed on 4-15% acrylamide gel. Gel was stained with Coomassie Blue. B, The protein spots (arrows 1 and 2 in A) were excised from the gel and analyzed by mass spectrometry and SBP protein was identified and found highly accumulated in secretion of *Lxr α* ^{-/-} ventral prostate compared to WT. C, Western blot analysis using anti-prostate secretory protein antibody was performed on samples of whole prostate protein extract

or on prostate secretion only, from WT or *lxa-/-* mice. D, mRNA relative accumulation levels of *sbp* was measured in 9 to 12 month animals by qPCR and normalized using 18s. *Sbp* is 3000 fold-induced in *lxa-/-* ventral prostate compared to WT. N=7 to 10; *, $p \leq 0,05$.

***Sbp* over accumulation is mediated by androgens in *lxa-/-* mice**

SBP is the most abundant protein within the prostatic fluid and its accumulation is tightly regulated by androgens (27, 28). To check whether the higher accumulation of SBP in the VP of *lxa-/-* mice was due to a higher level of androgens, plasma testosterone level was evaluated. As shown in Figure 4A, plasma testosterone was significantly increased by 2-fold in LXR α -lacking mice compared to WT. These results could be surprising since we previously showed that intra-testicular testosterone levels decrease in *lxa-/-* mice (29). These observations could actually be explained by a defect in hepatic androgen catabolism (15). Indeed, steroid-sulfatase (STS) and sulfo-transferase 2a1 (SULT2A1) control androgen metabolism. *Sts* transcript accumulation level was significantly increase both in liver and ventral prostate, indicating this could transform desulfonated androgens in active metabolites (Supplementary data 2), while *sult2a1* was undetectable in VP. Even though testosterone was higher in *lxa-/-* mice, DHT level, the main active androgen in prostate, was not significantly different in both genotypes (Figure 4A). Likewise, AR protein accumulation was not modified in VP of *lxa-/-* mice compared to WT mice (Figure 4B).

Because no significant change was observed in DHT levels and AR accumulation despite a higher accumulation of *sbp*, we hypothesized that AR activity on the *sbp* promoter could have been modified by the absence of LXR α . In order to test this hypothesis, castration and testosterone complementation experiments were performed. As expected, castration abolished *sbp* accumulation in VP of WT mice (Figure 4C, open bars). The same drastic decrease was observed in *lxa-/-* mice without, however, reaching the low level observed in WT mice. Interestingly, testosterone treatment restored *sbp* level in *lxa-/-* and WT castrated-mice compared to respective sham-operated mice (Figure 4C, black bars), confirming the androgen regulation. Careful examination enlightened that *sbp* accumulation was 122-fold increased by testosterone propionate treatment in WT, while *lxa-/-* mice exhibited a 439-fold induction. We hypothesized that *sbp* accumulation *per se* is hypersensitive to androgens in *lxa-/-* mice.

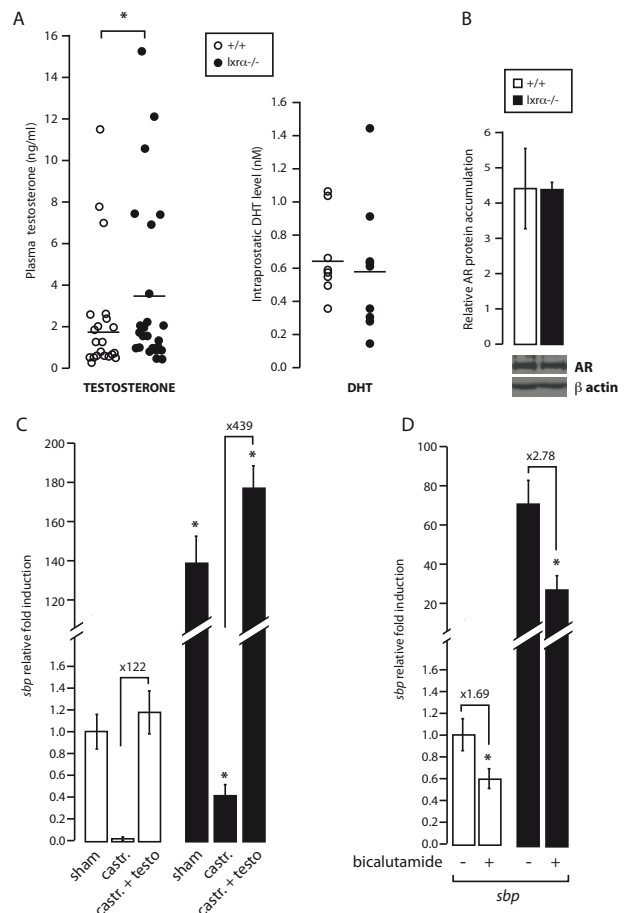


Figure 4. *Sbp* expression deregulation in *lxa-/-* mice is mediated by androgens.

A, Testosterone concentrations were measured in plasma of WT and *lxa-/-* mice. Circulating testosterone was significantly increased in *lxa-/-* (n=25) compared to WT (n=25) mice. The active androgen metabolite, dihydrotestosterone (DHT) was measured in ventral prostate of WT, *lxa-/-* mice. DHT levels are unchanged in ventral prostate. (n=25). B, Basal androgen receptor (AR) accumulation determined by western blot. As observed, this accumulation is unchanged in *lxa-/-* ventral prostate. *, $p \leq 0.05$. C, *Sbp* accumulation in 5 to 6 months of age WT or *lxa-/-* castrated mice. After 3 weeks of castration castrated mice were injected with 75 μ g/kg of testosterone twice a day during one week. Castration caused a large decrease of *sbp* in WT and *lxa-/-* mice. Testosterone reinjection led to a larger recovery of *sbp* expression in VP of *lxa-/-* compared to WT mice, suggesting an androgen hypersensitivity of *lxa-/-* (n=7). *, $p < 0.05$ compare to sham WT mice. D, 5 to 6 month old WT and *lxa-/-* mice were treated with bicalutamide at a daily oral dose of 12mg/kg during 21 days. Bicalutamide caused a 2.78 fold-decreased of androgen dependant gene *sbp* expression in *lxa-/-* mice (1.69 fold-decreased in WT mice) (n=7 to 9). *, $p < 0.05$ compare to sham WT mice.

As already pointed, basal *sbp* accumulation remained significantly higher in castrated *lxa-/-* compared to WT mice ($p < 0.05$; Figure 4C). This observation raised the question of *sbp* being a *bona fide* target gene of LXR α . To test this hypothesis, both sham and castrated mice

were gavaged with T0901317, a LXR-ligand. No modification of *sbp* level was seen in T0901317-gavaged mice, with or without LXR α , (Supplementary data 3) ruling out a direct regulation of *sbp* expression by LXR α .

In parallel, pharmacological inhibition of AR by the anti-androgen bicalutamide (Figure 4D) resulted in the decrease of *sbp* expression both in WT (1.69-fold inhibition) as suspected, and *lxra*^{-/-} mice (2.78-fold inhibition).

Altogether, even though androgens are clearly involved in the regulation of *sbp* level in VP of *lxra*^{-/-} mice, these mice still presented a higher amount of *sbp* when androgen depletion in total (castration) or when AR is blocked (bicalutamide). It could be suggested that LXR α basally affects *sbp* expression indirectly through a mechanism that need to be discovered.

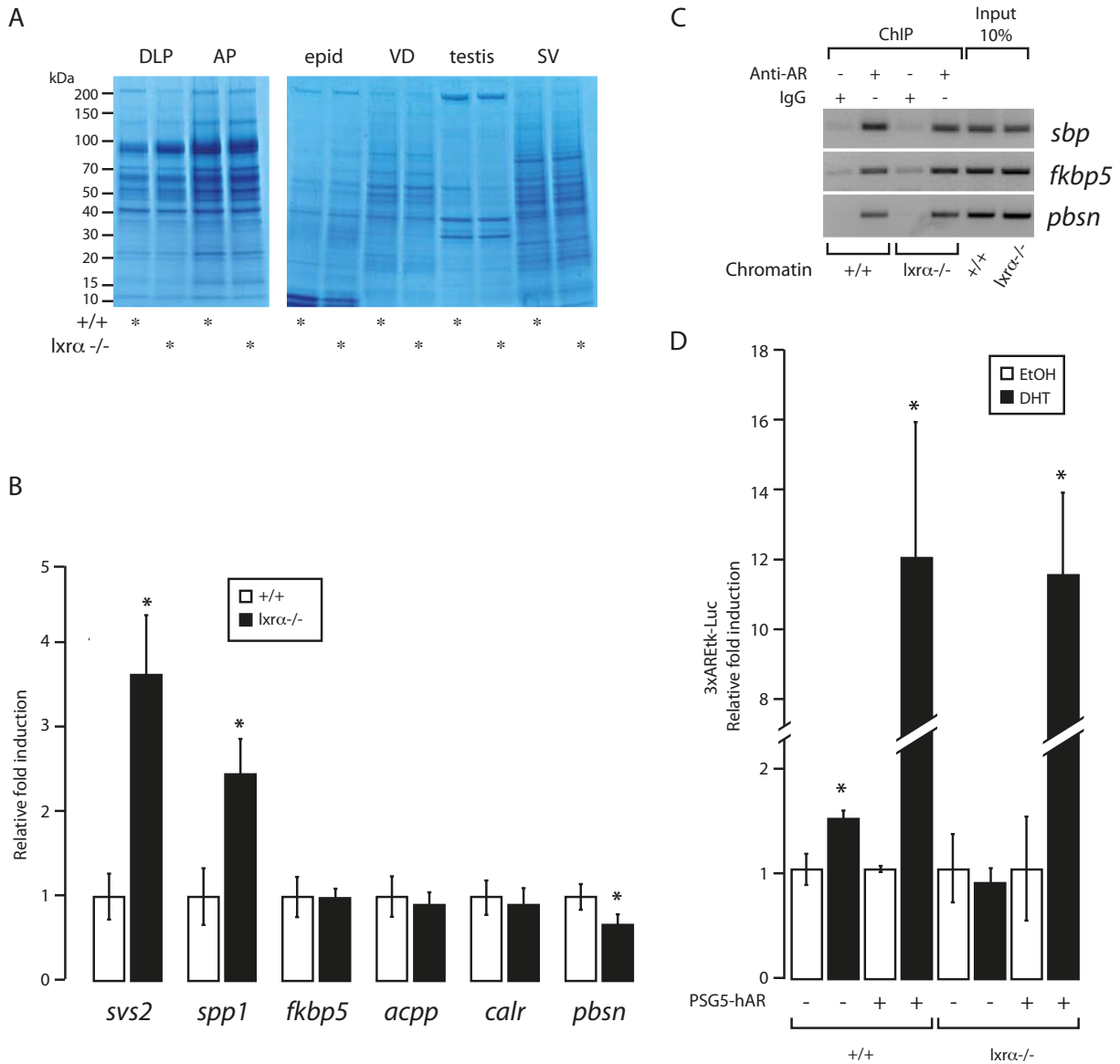


Figure 5. Androgen hypersensitivity in *lxra*^{-/-} mice targets specific genes and is restricted to VP. A, Whole protein extracts from dorsolateral and anterior prostate, epididyme, vas deferens, testicles and seminal vesicles were migrated in 4-15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. *Sbp* accumulation is lobe-specific and is not found in other male genital tract tissues. B, mRNA relative accumulation levels of *svs2*, *spp1*, *fkbp5*, *acpp*, *calr* and *pbsn* were measured by qPCR and normalized with 18s. Some of them have the same expression profile than *sbp*, other are down-regulated or remain unchanged in ventral prostate (n= 7 to 10), *, p<0.05 compare to the WT animals. C, Anti-Androgen Receptor Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) was performed on ventral prostate of WT and *lxra*^{-/-} mice. AR specifically binds on the regulatory element of androgen-regulated genes (*sbp*, *pbsn*, and *fkbp5* promoters). Depending on the LXR α context, there is no AR enrichment and/or androgen-regulated genes. D, *Lxra*^{-/-} and WT MEF cells were transfected with the luciferase reporter construct ARE-TK-LUC in combination with pSG5-hAR and treated or not with 10⁻⁹M DHT. Means +/- SEM. *, p<0.05 compare to the respective ethanol incubated cells.

Androgen hypersensitivity in *Lxra*^{-/-} mice targets specific genes and is restricted to VP.

In order to enlighten whether the abnormal androgen-response is specific of VP or present in other tissues, we analyzed the protein accumulation profiles in several androgen-dependant tissues: dorso-lateral and anterior prostates, epididymis, testis, *vas deferens* and seminal vesicles (Figure 5A). No clear difference was observed among the migration profiles of WT and *Lxra*^{-/-} samples, providing evidences that the abnormal response to androgens was restricted to VP. We next investigated whether *sbp* was the only gene altered in VP. qPCR analysis of several androgen-regulated genes was performed: *svs2* (seminal vesicle secretion-2) (30), *spp1* (secretory prostatic protein-1) (31), *fkbp5*

(fk506 binding protein prostate-5) (32), *acpp* (acid phosphatase, prostate protein) (33), *calR* (calreticulin) (34) and *pbsn* (probasin) (35). Three different categories of genes appeared in *Lxra*^{-/-} mice (Figure 5B): genes whose basal expression was higher (*svs2* and *spp1*); genes whose accumulation was not modified in both genotypes (*fkbp5*, *acpp* and *calR*); *pbsn* whose basal accumulation was significantly lower than WT mice.

These results led us to wonder whether the absence or the presence of LXR α could modify AR recruitment on the target gene promoters *in vivo*. AR occupancy on target promoter sequences was investigated by *in vivo* ChIP experiments. We showed that ARE sequences of *sbp*, *pbsn*, and *fkbp5* promoters harbored similar AR recruitment in WT and *Lxra*^{-/-} mice (Figure 5C).

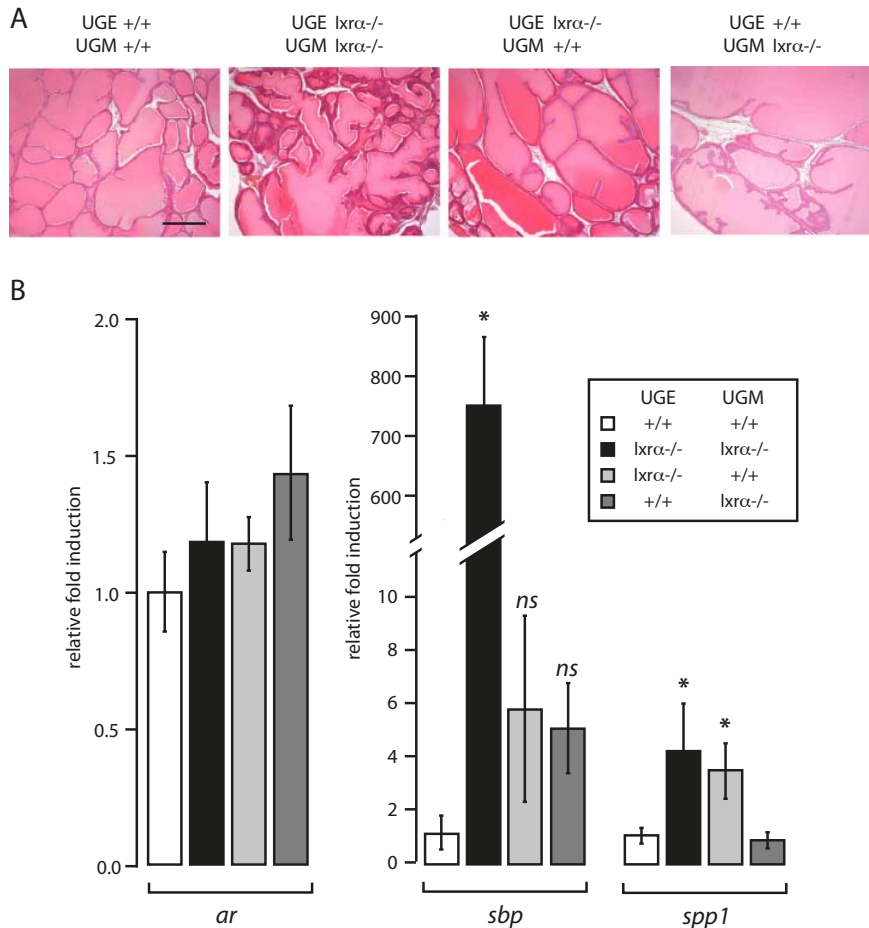


Figure 6. The deregulation of androgen-dependant genes is dependant of both stroma and epithelium compartment in *Lxra*^{-/-} mice. Epithelium (UGE) and mesenchyme (UGM) urogenital were dissected from WT or *Lxra*^{-/-} embryos. Different combinations were performed (see text for more details). The different explants were grafted under the kidney capsule of Nude mice. After 8 weeks of growth, prostate were present on the kidney. A, Histological analysis (hematoxylin-eosin staining) was performed on the 4 different combinations. B, Accumulations of *ar*, *sbp* and *spp1* mRNA were measured by qPCR and the fold-induction between each recombinant condition was represented. (N= 3 to 7). *, p < 0.05 compare to the UGE_{WT}/UGM_{WT} condition.

Because intraprostatic DHT, AR accumulations and recruitment of AR on the promoters were found identical in both genotypes, we raised the question of a possible modification of AR transcriptional by LXR α . Wild type and *lxra*^{-/-} MEF were transfected with the androgen-sensitive construct AREtk-Luc in the presence or absence of AR expression vector. Luciferase induction by DHT was similar in WT or *lxra*^{-/-} MEF, suggesting that intrinsic AR transcriptional efficiency was not directly modified by LXR α .

LXR α coordinates stroma/epithelium functions to control androgen-dependent secretion process of the ventral prostate in mice

Androgen action on prostate is the result of a complex paracrine network between stromal cells and epithelium (8). Integration of androgen signal is, in part, supported by the stromal compartment and is necessary to the epithelium maintenance and survival. In order to investigate whether the stroma could be involved in the development of the enlarged duct and the increased accumulation of SBP, we generated chimeric recombinant prostate derived from embryonic WT or *lxra*^{-/-} urogenital mesenchyme (UGM, stroma) and WT or *lxra*^{-/-} urogenital epithelium (UGE). The four UGE/UGM combinations (UGE_{WT}/UGM_{WT}; UGE_{*lxra*^{-/-}}/UGM_{*lxra*^{-/-}}; UGE_{WT}/UGM_{*lxra*^{-/-}}; UGE_{*lxra*^{-/-}}/UGM_{WT}) were grafted under the kidney capsule of Nude mice (36). Eight weeks after the implantation, the four conditions presented a similar gross histology: a differentiated prostate with enlarged tubules, due to the absence of any evacuation of the secretions (Figure 6A). *Ar* transcript remained unchanged in the four conditions showing that AR accumulation was not altered by the experiments. *Sbp* accumulation, marker of the BPH-like phenotype, was the highest (767-fold accumulation) when both LXR α -lacking stroma and epithelium were mixed (Figure 6B). Hence *sbp* deregulation originates from both stromal and epithelial defects in *lxra*^{-/-}. *Spp1* expression was found to be deregulated only when LXR α was deleted in the epithelium. It could thus be concluded that LXR α plays a physiological role both in stroma and epithelium.

Vesicular trafficking is altered in epithelial cells derived from *lxra*^{-/-} ventral prostate

In order to investigate the intrinsic role of LXR α in the epithelium, vesicular trafficking was analyzed in mouse prostate epithelial (MPE) cells derived from VP of *lxra*^{-/-} or WT, according (18). Early endosome antigen 1 (EEA1), a protein that binds phospholipid vesicles and involved in endosomal trafficking, was investigated in cultured cells. We found that endosomal vesicles were smaller in *lxra*^{-/-} vs. WT MPE (Figure 7). We next investigated lysosome biogenesis since this process is tightly link to vesicle trafficking (37). LysoTracker® incubation on MPE cell culture showed that lysosomes are smaller and less abundant in *lxra*^{-/-} vs. WT MPE (Figure 7). Taken together, these observations led to conclude that LXR α -lacking epithelial cells present an abnormal vesicle trafficking and could explain the abnormal feature observed in electronic microscopy.

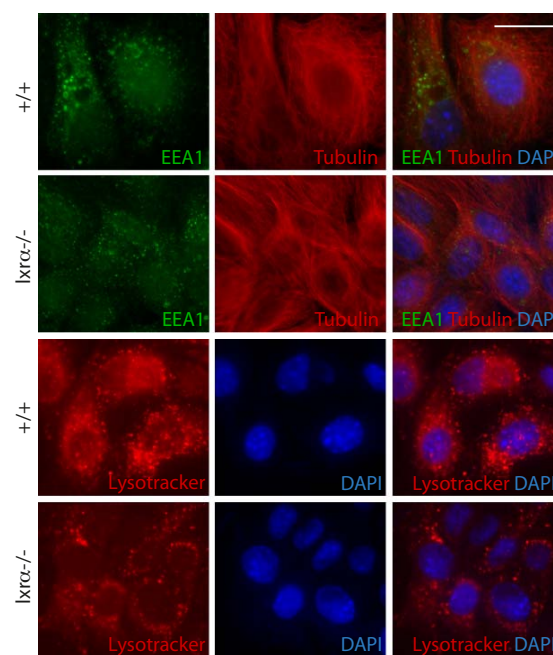


Figure 7. Mouse prostatic epithelial cell line derived from *lxra*^{-/-} mice exhibits an abnormal vesicular trafficking. WT and *lxra*^{-/-} MPE were immunostained using Anti-EEA1 and anti-tubulin antibody. EEA1 labeling pointed out that endosomal vesicles were smaller in *lxra*^{-/-} vs. WT. LysoTracker analysis was performed in MPE cells. Cell nuclei were stained with Hoechst. LysoTracker analysis showed that lysosomes are smaller and less abundant in *lxra*^{-/-} vs. WT.

Discussion

In this report we show that *lxra*^{-/-} mice exhibit a BPH-like phenotype characterized by a hypersecretion activity of the epithelium. Our work provides a mechanism by which LXR α is involved both at the stromal and the epithelial

levels. Indeed, androgen-regulated gene expression is deregulated alternatively by *lxra* ablation in both compartments. Using *lxra*^{-/-} mice we show that neither androgens levels in prostate, nor AR recruitment in targeted-sequences are altered. It thus can be concluded that the observed deregulation of androgen signal in prostate results from a complex paracrine network between epithelium and stroma.

LXR α and LXR β play an important role in prostate epithelium homeostasis in others lobes specially when the mice are challenged with a high cholesterol diet (Pommier et al. unpublished data). As already mentioned, human and murine prostate are architecturally different. Nevertheless, gene expression pattern of the peripheral and central zone in human is respectively closely related to the dorso-lateral and ventral lobe in mice (38). These observations highlighted that the prostate molecular signature of regionalization

is an important process conserved between the two species. Given that each lobe harbors specific features, it could be hypothesized that *lxra* ablation results in different phenotype according the prostate lobes *in vivo*. Consistent with these findings, *lxra*^{-/-} mice have been described to recapitulate "several BPH-like features" according Kim et al. (16). These authors reported fibrous nodules, abnormal stroma growth and lesions in the muscular compartment, without any clear sign of epithelial defect (16). In our mouse model, we mainly reported an epithelial phenotype. This apparent discrepancy could be due to the fact that both *lxra*^{-/-} mice were not similarly engineered. Altogether, these observations underline that the identification of the set of genes targeted by LXR α specifically in the prostatic ventral lobe in rodent could be informative in order to understand the BPH etiology in human.

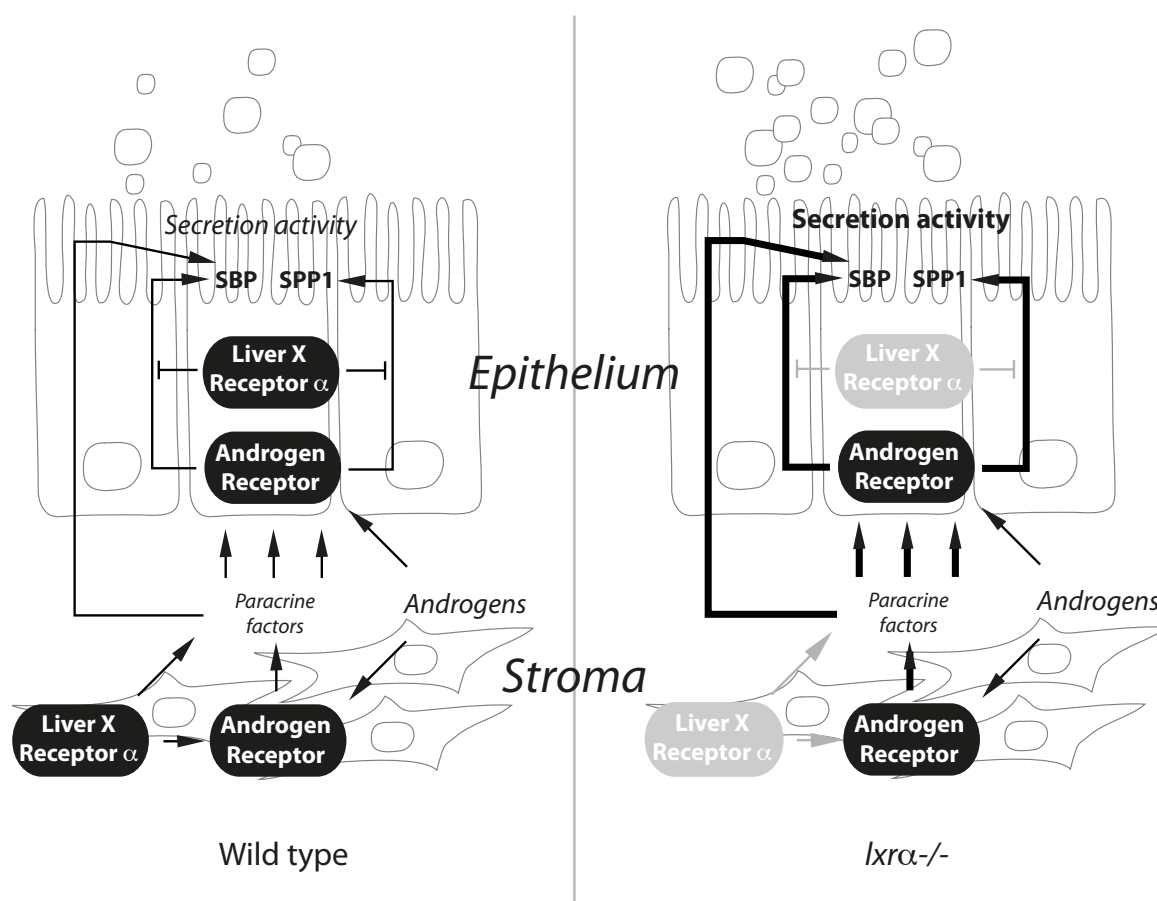


Figure 8. Model for the physiological roles of the LXR α in the ventral prostate and possible interactions with the androgen regulated pathway. LXR α is important for the epithelium homeostasis. Lack of this receptor induces a duct enlargement and a BPH-like phenotype due to a hypersecretion of the fluid proteins and an increased vesicular trafficking. In the absence of LXR α , three sets of androgen-regulated genes can be made: *sbp* and *spp1*, which present a higher accumulation; *pbsn* whose basal accumulation was decrease; genes such as *fkbp5*, *acpp* and *calR* whose level were not modified. For more details, see text.

Prostate epithelium function is the production and the secretion of proteins that compose prostatic fluid. This secretion activity is tightly regulated *in vivo* by androgens that orchestrate the entire male genital tract capacity. A possible connection between LXR and AR has been previously evoked. DHT or synthetic androgen R1881 treatments result in *abca1* accumulation inhibition in LNCaP cells (39) indicating that LXR target genes are sensitive to androgen stimulation. Krycer *et al.* showed that LXR were indeed required for the *abca1* down-regulation in response to R1881 treatment (14). The association between the expression of LXR target genes and androgen sensitivity has been also described in xenograft models that recapitulate pharmacoresistance prostate cancer (40). In these tumors, *fas*, *srebp1c*, *abca1* and *cyp-27* gene expressions decrease during androgen insensitivity evolution.

Given that *lxra* ablation resulted in an aberrant production of androgen-regulated secretory proteins in prostate, we investigated how LXR α could interfere with the androgen signal in the epithelium. Indeed, transgenic mice that over-expressed a dominant-positive construct of LXR α specifically targeted in liver (41) exhibit an inhibition of androgen-dependent prostate regeneration after castration (15), indicating that LXR activation impact androgenic responsive tissues. Hepatic LXR activation leads to decreased circulating testosterone levels by regulating genes such as *sult2a1* and *sts* involved in androgen catabolism. In peripheric tissue, LXR control androgens biodisponibility through *sts* expression, which encodes the steroid sulfatase that desulfonates androgens to convert them into active metabolites. These data could explain the plasmatic testosterone level increase observed in *lxra*^{-/-} mice. Nevertheless, no modification of DHT accumulation or androgen receptor activity in androgen-regulated gene promoters was seen in VP of *lxra*^{-/-} mice. Our findings indicate that the mechanism by which LXR α regulates the response of androgen-regulated genes results from a complex network. This could involve epithelial factors, AR-cofactors, and/or paracrine interaction between the different cell compartments of the prostate.

Consistent with this hypothesis, androgen regulated gene expression exhibits different profiles in *lxra*^{-/-} mice prostate. While *sbp* accumulation increases in mice lacking LXR α , *calr* remains unchanged while *pbsn* decreases. These observations strongly support that several regulation processes are involved. We

focused on paracrine interaction between epithelial and stromal cells. Indeed, Cunha *et al.* extensively described the role of mesenchymal-epithelial interaction in the normal and pathological prostate development as well as in adult prostate homeostasis (8). Cunha *et al.* (42) made various combinations between mesenchymal and epithelial tissue derived from normal or defective AR *Tfm* embryos. The authors clearly showed that mesenchymal-epithelial interactions were necessary for prostate development. In adult prostate those interactions are just as important for prostate maintenance. Molecular mechanisms regulating these interactions involve androgen regulated pathway and multiple growth factors. For the first time, we identify LXR α as a new actor that mediates the epithelial physiology thought carrying its activity in both stroma and epithelium. Indeed the absence of LXR α in both prostate stroma and epithelium is necessary to develop a prostate hypertrophy. LXR α also mediates the androgen signaling, as demonstrated by the numerous androgen-responsive genes dysregulation when LXR α is missing. Indeed normal *spp1* gene expression needs LXR α in epithelium while the normal response of *sbp* to androgens by epithelium is dependant of LXR α in both epithelial (directly) and stroma (indirectly) cells. We speculate that LXR α will module the production of paracrine signals by mesenchyme.

Altogether, these results demonstrate that LXR α acts as a key modulator of the crosstalk between stroma and epithelium compartment which is essential for the integration of the androgen signal in prostate.

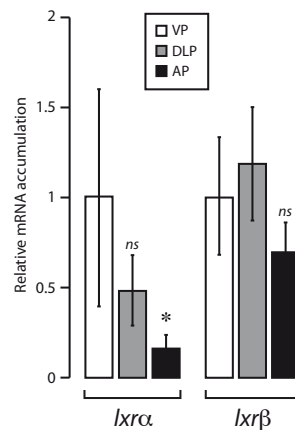
Acknowledgements - We thank Dr. M. Thomsen (Institute of Cancer Research, London, United Kingdom) for his excellent advices on prostate regeneration; Dr. M. Manin (GReD) for her helpful comments for the MPE cell culture; J.P. Saru and A. De Haze for molecular biology technical assistance; C. Puchol and S. Plantade for animal facilities. Dr. P. Val (GReD) for critically reading the manuscript; and the members of the Chester's lab for assistance in animal dissections and discussions; C. Szczepaniak and C. Blavignac (CICS platform, Clermont University) for their scientific and technical assistance in electron microscopy. Pan-prostate secretion antibody was a kind gift from Dr. C. Abate-Shen (Department of Medicine, Columbia University Medical Center, New York). Pathology analyses have been done on the Anip@th facility platform. This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas and Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Nouveau Chercheur Auvergne (to SB) research grants. E. Viennois is funded by Région Auvergne and Fond Européen de Développement Régional (FEDER) and ARC grants. J. Dufour is funded by MNERT grant. G. Alves was founded by Région Auvergne program. T. Esposito was the recipient of an ERASMUS exchange grant.

References

- Madersbacher S, Haidinger G, Temml C, Schmidbauer CP** 1998 Prevalence of lower urinary tract symptoms in Austria as assessed by an open survey of 2,096 men. *Eur Urol* 34:136-41
- Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, et al.** 1992 The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 327:1185-91
- Lepor H** 1990 Role of alpha-adrenergic blockers in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 3:75-84
- Huggins C, Clark PJ** 1940 Quantitative Studies of Prostatic Secretion : li. The Effect of Castration and of Estrogen Injection on the Normal and on the Hyperplastic Prostate Glands of Dogs. *J Exp Med* 72:747-62
- Bruchovsky N, Wilson JD** 1968 The intranuclear binding of testosterone and 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate. *J Biol Chem* 243:5953-60
- Gelmann EP** 2002 Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20:3001-15
- Heinlein CA, Chang C** 2002 Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23:175-200
- Cunha GR** 1973 The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* 175:87-96
- Ei-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, et al.** 2011 Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta* 1812:974-81
- Tontonoz P, Mangelsdorf DJ** 2003 Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17:985-93
- Volle DH, Lobaccaro JM** 2007 Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 265-266:183-9
- Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S** 2004 Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7686-9
- Pommier AJ, Alves G, Viennois E, et al.** 2010 Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29:2712-23
- Krycer JR, Brown AJ** 2011 Cross-talk between the Androgen Receptor and the Liver X Receptor: IMPLICATIONS FOR CHOLESTEROL HOMEOSTASIS. *J Biol Chem* 286:20637-47
- Lee JH, Gong H, Khadem S, et al.** 2008 Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149:3778-88
- Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA** 2009 Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:558-63
- Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, et al.** 2006 Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116:1902-12
- Manin M, Veyssiere G, Cheyvalle D, Chevalier M, Lecher P, Jean C** 1992 In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 131:2378-86
- Lobaccaro JM, Poujol N, Terouanne B, et al.** 1999 Transcriptional interferences between normal or mutant androgen receptors and the activator protein 1-dissection of the androgen receptor functional domains. *Endocrinology* 140:350-7
- Torres JM, Ortega E** 2003 Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J* 17:1428-33
- Nadaud I, Girousse C, Debiton C, et al.** 2010 Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *Proteomics* 10:2901-10
- Lukacs RU, Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Witte ON** 2011 Isolation, cultivation and characterization of adult murine prostate stem cells. *Nat Protoc* 5:702-13
- Cunha GR, Lung B** 1978 The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. *J Exp Zool* 205:181-93
- Economides KD, Capecchi MR** 2003 Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development* 130:2061-9
- Chaurand P, DaGue BB, Ma S, Kasper S, Caprioli RM** 2001 Strain-based sequence variations and structure analysis of murine prostate specific spermine binding protein using mass spectrometry. *Biochemistry* 40:9725-33
- Anthonisen EH, Berven L, Holm S, Nygard M, Nebb HI, Gronning-Wang LM** 2010 Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem* 285:1607-15
- Sun Q, Yu X, Degraff DJ, Matusik RJ** 2009 Upstream stimulatory factor 2, a novel FoxA1-interacting protein, is involved in prostate-specific gene expression. *Mol Endocrinol* 23:2038-47
- Fujimoto N, Akimoto Y, Suzuki T, Kitamura S, Ohta S** 2006 Identification of prostatic-secreted proteins in mice by mass spectrometric analysis and evaluation of lobe-specific and androgen-dependent mRNA expression. *J Endocrinol* 190:793-803
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al.** 2007 Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21:1014-27
- Kawano N, Yoshida M** 2007 Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biol Reprod* 76:353-61
- Seenundun S, Robaire B** 2007 Time-dependent rescue of gene expression by androgens in the mouse proximal caput epididymidis-1 cell line after androgen withdrawal. *Endocrinology* 148:173-88
- Magee JA, Chang LW, Stormo GD, Milbrandt J** 2006 Direct, androgen receptor-mediated regulation of the FKBP5 gene via a distal enhancer element. *Endocrinology* 147:590-8
- Sharief FS, Mohler JL, Sharief Y, Li SS** 1994 Expression of human prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen genes in neoplastic and benign tissues. *Biochem Mol Biol Int* 33:567-74

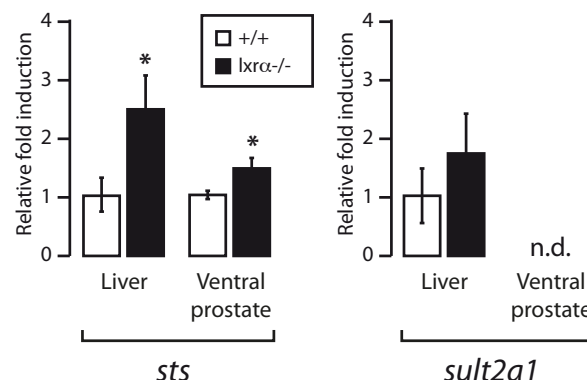
34. **Zhu N, Pewitt EB, Cai X, et al.** 1998 Calreticulin: an intracellular Ca⁺⁺-binding protein abundantly expressed and regulated by androgen in prostatic epithelial cells. *Endocrinology* 139:4337-44
35. **Johnson MA, Hernandez I, Wei Y, Greenberg N** 2000 Isolation and characterization of mouse probasin: An androgen-regulated protein specifically expressed in the differentiated prostate. *Prostate* 43:255-62
36. **Lukacs RU, Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Witte ON** 2010 Isolation, cultivation and characterization of adult murine prostate stem cells. *Nat Protoc* 5:702-13
37. **Hirota Y, Kuronita T, Fujita H, Tanaka Y** 2007 A role for Rab5 activity in the biogenesis of endosomal and lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 364:40-7
38. **Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ** 2005 Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280:36442-51
39. **Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, et al.** 2004 Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7682-5
40. **Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, Liao S** 2006 Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 66:6482-6
41. **Uppal H, Saini SP, Moschetta A, et al.** 2007 Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice. *Hepatology* 45:422-32
42. **Cunha GR, Chung LW** 1981 Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem* 14:1317-24

Supplementary data 1



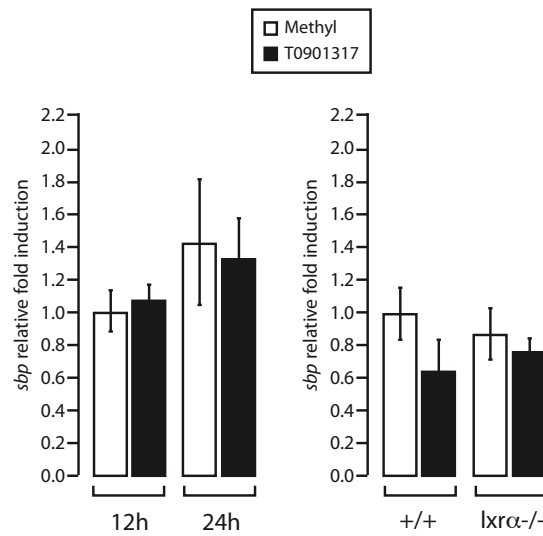
Expression levels of *Lxra* and *Lxrβ* were measured by quantitative-PCR in the four lobes of the WT mouse prostate (n=4). *Lxra* and *Lxrβ* were detected in each prostate lobes.

Supplementary data 2



Expression levels of *sts* and *sult2a1* were measured by quantitative-PCR in liver (n=10) and ventral prostate (7≤n≤10). *sts* is significantly increased in liver and ventral prostate of *Lxra*^{-/-} vs WT mice. *sult2a1* is not modify in liver of *Lxra*^{-/-} vs WT mice and is not detected into ventral prostate.

Supplementary data 3



A) WT mice were treated with a single dose of T0901317, a LXR agonist, 12 or 24 hours before analysis. In WT mice, *sbp* mRNA accumulation remained unchanged after LXR activation B) *Lxr α* ^{-/-} and WT castrated mice were treated with a single oral dose of T0901317 12 hours before analysis. In WT or *Lxr α* ^{-/-} castrated mice, *sbp* mRNA accumulation remained unchanged after LXR activation showing that *sbp* was not affected by LXR activation in the absence of androgens and did not behave as a *bona fide* LXR target gene.

Supplementary data 4

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>18s</i>	GGGAGCCTGAGAAACGGC	GGGAGCCTGAGAAACGGC
<i>ar</i>	CCACTGAGGACCCATCCAGAA	CGGCACACCACTCCTGGCTC
<i>pbsn</i>	GGTCATCATCCTCCTGCTCA	AGGCCGTCAATCTTCTTTTT
<i>sbp</i>	GAAGATCAGGGGCAACTCAA	TCTGACCGGTTCCATAGAC
<i>svs2</i>	CAGAGCAGCTCCTCAGAGGG	TCTGGGTCATGTCACCACCA
<i>acpp</i>	GGAATGAGACCCAGAACGAG	AGTGGCAAGGATAACCCTCA
<i>spp1</i>	TCTGATGAGACCGTCACTGC	AGGCCTCATCTGTGGCATC
<i>calr</i>	ACCGTGAAGCATGAGCAGAAT	TGTTGATCAGCACATTCTTGCC
<i>fkbp5</i>	CTCAAACCAACGAAGGAG	CATCTTACCAGGGCTTTGT
<i>lα</i>	AAGCAGGTGCCAGGGTTCT	TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT
<i>lβ</i>	GCTCTGCTCATTGCCATCAG	TGTTGCAGCCTCTCTACTTGGA
<i>sts</i>	GAGGTCAGACGGACAGGAAG	ACGACGCCGTGAACAGGTA
<i>sult2a1</i>	TCTGGGGTAACACAAACCTTG	AATCCGGCCATTTTCTCT

Conclusion

Les résultats de ce travail ont permis de mettre en lumière les points suivants :

- ✓ Les souris *lxra*^{-/-} présentent des altérations rencontrées dans l'HBP chez l'homme : une hypertrophie de la prostate associée à une rétention d'urine dans la vessie, témoignant d'un défaut de miction.
- ✓ L'épithélium prostatique des souris *lxra*^{-/-} est hypersécrétoire. Ceci est caractérisé par la production excessive de protéines sécrétées dans le fluide comme SBP et par des défauts dans le trafic vésiculaire. Ces anomalies sont « intrinsèques » à l'épithélium *lxra*^{-/-} car retrouvées dans un modèle de reconstruction de la prostate en souris isogéniques.
- ✓ Les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-} présentent une réponse aberrante aux androgènes.
- ✓ Les modifications du profil sécrétoire de l'épithélium sont restreintes au lobe ventral de la prostate.
- ✓ La sensibilité aux androgènes des gènes androgéno-régulés dépend des gènes considérés.
- ✓ La régulation différentielle de certains gènes androgéno-régulés dans les souris *lxra*^{-/-} est dépendante d'interactions paracrines entre le stroma et l'épithélium.

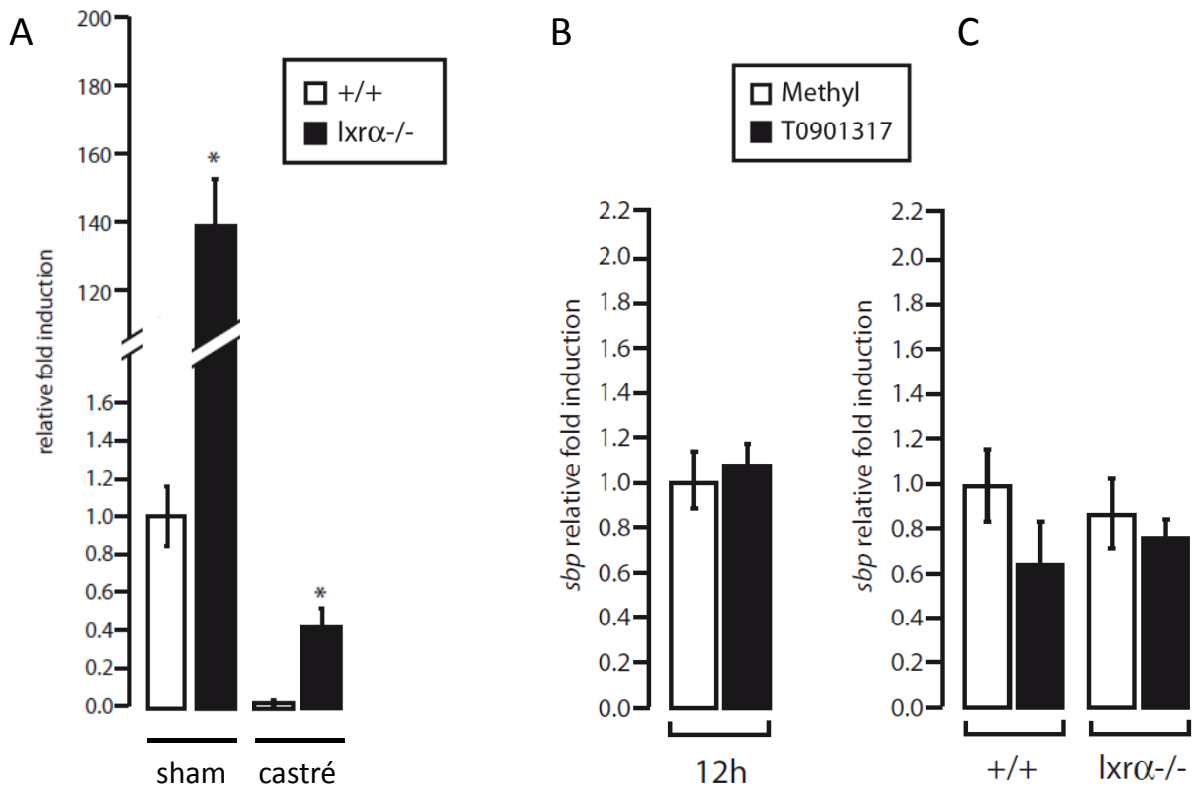


Figure 29 : *sbp* est-il un gène cible de LXR ?

Copie des figures 3D (A) et suppl2. (B et C) de l'article. A, L'expression de *sbp* est fortement augmentée dans prostates ventrales des souris *lxa* α ^{-/-} par rapport aux souris sauvages. La castration entraîne une chute importante de l'expression de *sbp*, dans les souris sauvages et *lxa* α ^{-/-} mais elle reste significativement plus importante dans les prostates ventrales *lxa* α ^{-/-} par rapport aux sauvages. B, Le traitement T0901317 de souris sauvages, n'entraîne pas de modification de l'accumulation des transcrits *sbp*. C, Le traitement T0901317 de souris sauvages ou *lxa* α ^{-/-} castrées ne modifie pas l'accumulation des transcrits *sbp*.

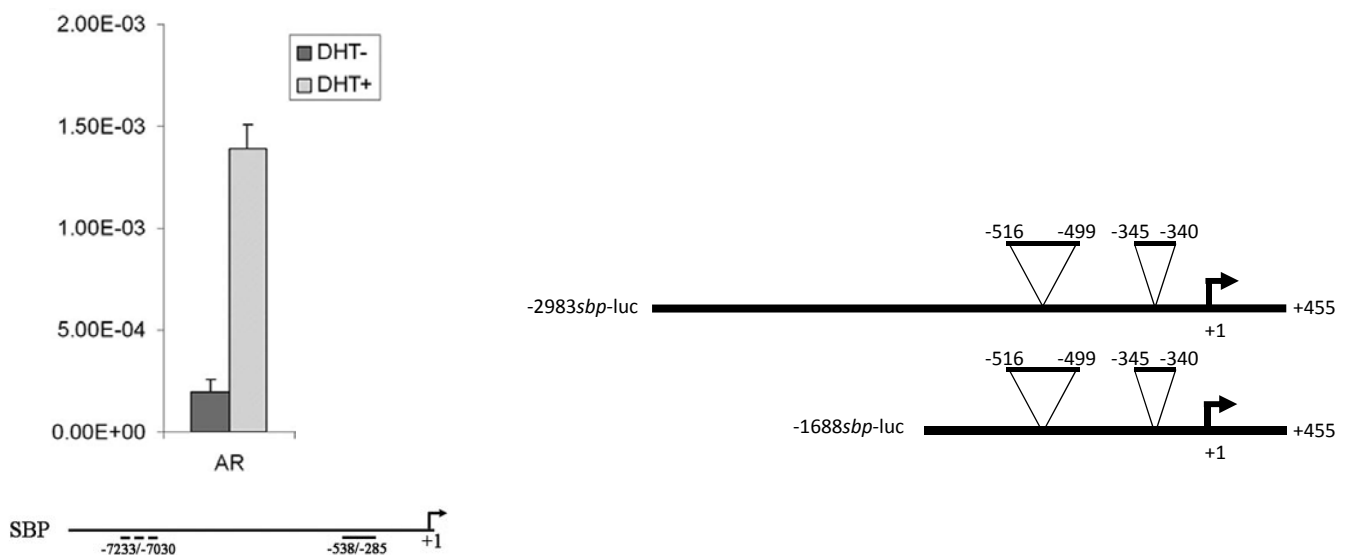


Figure 30 : AR se fixe sur le promoteur de *sbp*

Expérience de CHIP réalisée sur de la chromatine extraite de cellules LNCaP traitées ou non avec 10⁻⁸M de DHT pendant 12h. La chromatine est immunoprécipitée avec un anticorps anti-AR et la région amplifiée du promoteur (-538/-285) contient deux ARE. L'expérience montre que le traitement DHT induit le recrutement de AR sur ses régions cibles. (D'après Sun *et al.* 2009)

Figure 31 : Promoteur *sbp* cloné et position des ARE

Deux formes du promoteur de *sbp* ont été clonées dans le vecteur pGL3b, une forme plus longue, -2983*sbp*-luc et une forme plus courte -1688*sbp*-luc. Le +1 représente le site d'initiation de la transcription. La position des ARE par rapport au +1 est indiquée. (D'après Gao *et al.* 2005)

Résultats complémentaires à l'article en cours de soumission

I. *sbp* est-il une cible transcriptionnelle de LXR ?

Nos données montrent que l'accumulation de *sbp* est fortement augmentée dans les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages (**figure 29A**). Bien que la castration induise une diminution importante de cette accumulation, le niveau basal de *sbp* reste significativement plus élevé dans les prostates des souris *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages après castration (**figure 29A**). Ce profil est caractéristique d'une cible transcriptionnelle des LXR puisque l'expression de certains gènes cibles est augmentée dans les souris *lxra*^β^{-/-}. C'est le cas du gène *star* dans la surrénale (Cummins et al., 2006) ou du gène *scd1* dans le testicule (Volle et al., 2007). Pour répondre à cette question, des souris sauvages non castrées (**figure 29B**) ou des souris castrées sauvages ou *lxra*^{-/-} (**figure 29C**) ont été traitées avec un agoniste synthétique de LXR, le T0901317. L'accumulation des transcrits *sbp* a été étudiée 12 h après l'induction. Dans les trois expériences, l'activation de LXR par le T0901317 ne modifie pas l'accumulation des transcrits *sbp*. L'ensemble de ces résultats exclut un contrôle direct de l'expression de *sbp* par LXR.

II. La réponse de *sbp* aux androgènes est-elle dépendante de LXRα ?

Sbp est un gène cible des androgènes dans la prostate murine. L'expression du gène est sensible à la castration (Fujimoto et al., 2006) et son promoteur présente des éléments de réponse aux androgènes en position -516 et -345 (Gao et al., 2005) (**figure 31**). Des expériences de CHIP révèlent que le recrutement de AR sur une portion de la séquence promotrice qui s'étend de -538 à -285 en amont du +1 de transcription est augmenté en présence de DHT (Sun et al., 2009) (**figure 30**). L'ensemble de ces observations indique que *sbp* est bien une cible directe transcriptionnelle de AR. Afin de comprendre si la régulation transcriptionnelle du promoteur de *sbp* par les androgènes pouvait être modifiée par LXR, deux régions du promoteur (-2983*sbp*-luc et -1688*sbp*-luc) ont été clonées dans le vecteur pGL3b en amont du gène rapporteur luciférase (**figure 31**). Les constructions ont été transfectées et testées dans différents modèles cellulaires. Le meilleur facteur d'induction a été observé dans les cellules CV-1. Dans ce modèle cellulaire des quantités croissantes de vecteur d'expression de AR humain, pSG5-hAR ont été co-transfectées avec les constructions -2983*sbp*-luc ou -1688*sbp*-luc (**figure 32A**). En présence de 100 et 500 ng de vecteur d'expression de hAR, le traitement DHT induit une augmentation significative de l'activité luciférase. Afin de mettre en évidence une éventuelle modification de la réponse androgénique du promoteur de *sbp* par LXRα, les cellules CV-1 ont donc été transfectées avec la construction -2983*sbp*-luc répondant le mieux aux androgènes et les vecteurs d'expression codant hAR, LXRα et RXRα (**figure 32B**). En absence des vecteurs d'expression de LXRα et de RXR, la DHT induit faiblement mais significativement l'activité luciférase de 1,5 fois. La surexpression de l'hétérodimère LXRα/RXR entraîne : i) une diminution de

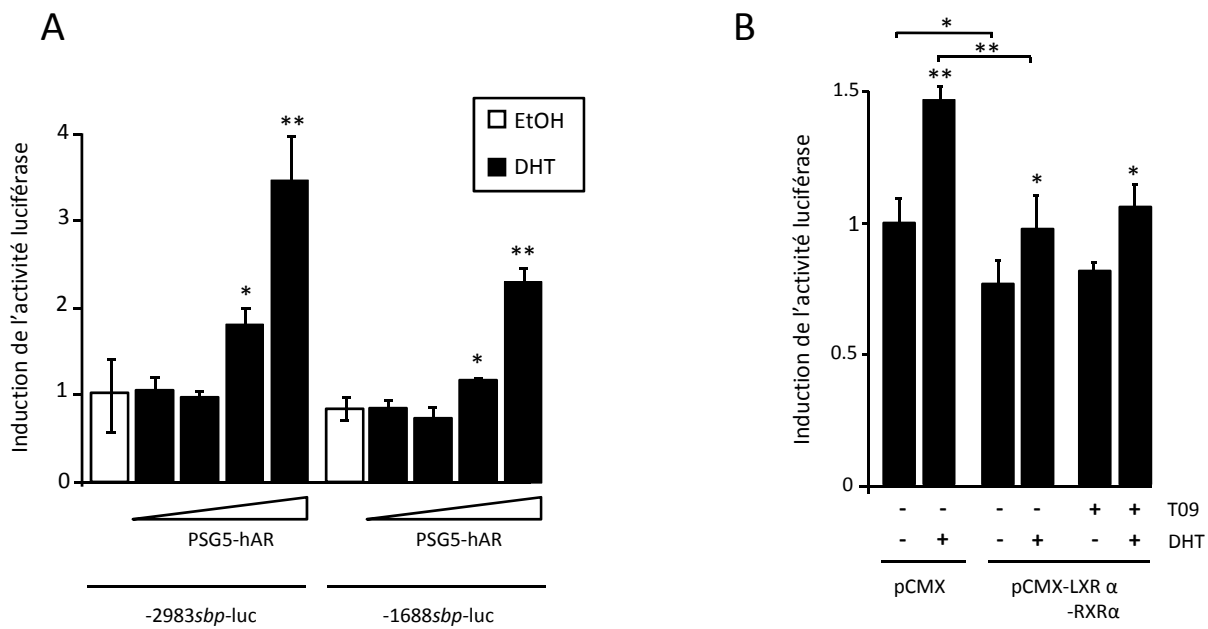


Figure 32 : La réponse du promoteur *sbp* aux androgènes dépend t-elle de LXR ?

A, Les cellules CV-1 ont été transfectées avec 500 ng de la construction -2983*sbp*-luc ou -1688*sbp*-luc ainsi que des quantités croissantes (10 ng, 50 ng, 100 ng ou 500 ng) du vecteur d'expression de AR, PSG5-hAR, puis traitées 24h avec 10^{-9} M de DHT. Le traitement DHT augmente l'activité luciférase à partir de 100 ng de vecteur d'expression de hAR. B, Les cellules CV-1 ont été transfectées avec 500 ng de la construction -2983*sbp*-luc ainsi que 500 ng du vecteur d'expression PSG5-hAR et 250 ng des vecteurs d'expression pCMX-LXR α et pCMX-RXR, puis traitées pendant 24h avec du T0901317 en combinaison ou non avec de la DHT. *, $p < 0,05$. **, $p < 0,01$

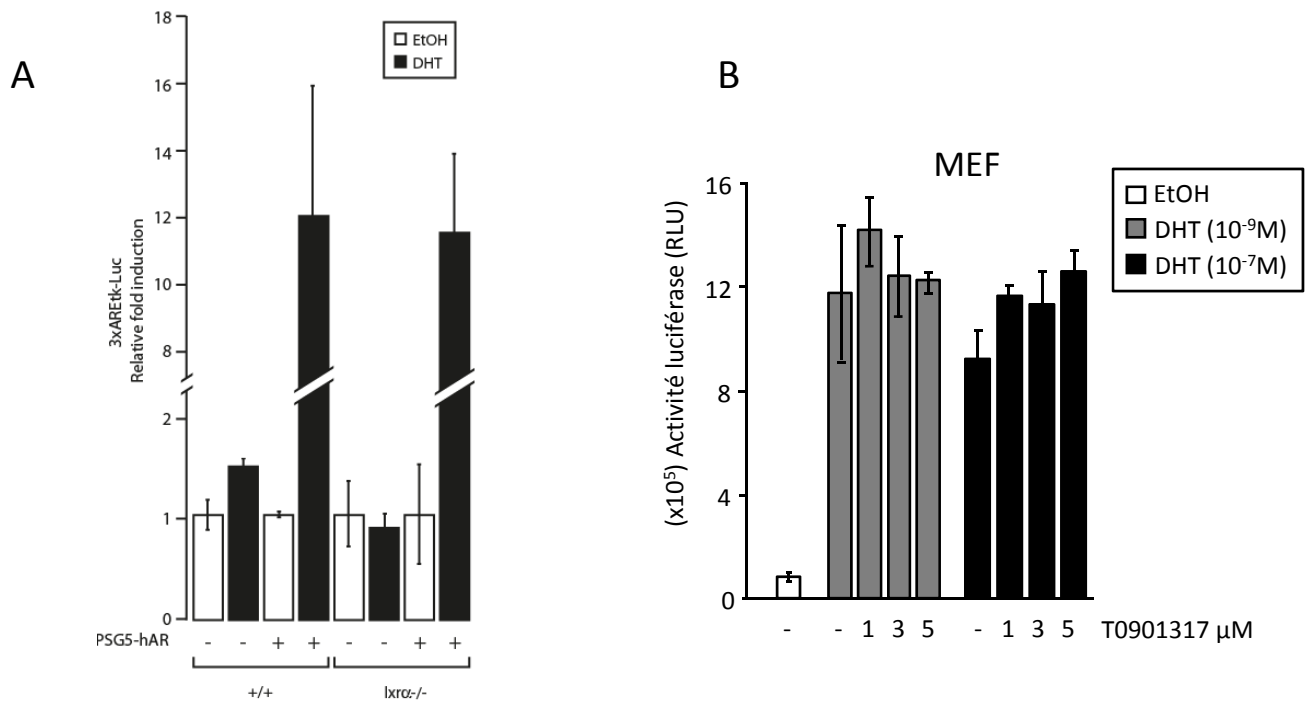


Figure 33 : L'activité d'une ARE est-elle dépendante de LXR ?

A, Rappel de la figure de la figure 5D de l'article. Les cellules MEF *lxrα*^{-/-} ou sauvages ont été transfectées avec la construction rapportrice AREtk-Luc et le vecteur d'expression PSG5-hAR puis traitées ou non avec 10^{-9} M de DHT. B, Les cellules MEF sauvages ont été transfectées avec la construction rapportrice AREtk-luc et 500 ng du vecteur d'expression PSG5-hAR. Les cellules ont été co-traitées avec 0, 10^{-9} M ou 10^{-7} M de DHT et 0, 1, 3 ou 5 μ M de T0901317. L'activité luciférase a été mesurée après 24h de traitement.

l'accumulation basale de *sbp* ; ii) une diminution de l'inductibilité de-2983*sbp*-luc par la DHT. L'activation de LXR par le T0901317 ne modifie pas la réponse à la DHT (**figure 32B**). Nos données montrent donc qu'en présence du récepteur LXR α , l'activité basale du promoteur de *sbp* est modifiée ainsi que la réponse à la DHT. *In vivo*, c'est l'absence de LXR α qui induit une augmentation de l'expression de *sbp* et une augmentation de son inductibilité à la testostérone. Que ce soit par une approche en culture de cellule ou *in vivo*, les résultats révèlent que la présence/absence de LXR a des répercussions sur l'activité du promoteur de *sbp*.

Nous avons également développé les cellules fibroblastiques embryonnaires (MEF) où LXR α est absent. Ces cellules provenant de souris sauvages ou *lxra*^{-/-} ont donc été transfectées avec la construction ARE-tk-luc sensible aux androgènes et traitées ou non avec de la DHT (figure 5D de l'article et **figure 33A**). L'objectif était d'étudier la réponse aux androgènes. Dans le figure 5D de l'article nous montrons que l'induction de l'activité luciférase par la DHT est la même dans les MEF sauvages ou *lxra*^{-/-}. Nous avons souhaité analyser si la sensibilité de l'ARE aux androgènes était modifiée par une activation de LXR. Des MEF sauvages ont donc été traitées avec de la DHT et des concentrations croissantes de T0901317 (**figure 33B**). Le T0901317 ne modifie pas l'activité luciférase sous contrôle du promoteur AREtk-luc en présence de DHT en concentration physiologique (10^{-9} M) ou pharmacologique (10^{-7} M). Ces données suggèrent que la réponse dépendante des androgènes est insensible à la présence et à l'activation de LXR α . ARE-tk-luc est un gène rapporteur « simplifié » puisque les éléments de réponse aux androgènes sont isolés. On peut donc exclure que les effets observés *in vivo* (figure 5B de l'article) dépendent du contexte cellulaire de chaque promoteur.

Ces données révèlent que LXR ne modifie pas l'activité de AR sur son élément de réponse mais interfère avec la signalisation androgénique dans un contexte cellulaire ou tissulaire plus complexe. Ces interactions impliquent vraisemblablement des facteurs intermédiaires (intracellulaires ou non) tels que des facteurs paracrines et/ou des facteurs de transcription ou cofacteurs non encore identifiés.

III. LXR modifient-ils *ex vivo* l'activité d'un promoteur endogène ?

Puisqu'un élément de réponse aux androgènes isolé est insensible à la présence et/ou à l'activité transcriptionnelle des LXR, nous avons analysé l'activité de LXR sur l'activité du gène androgéno-régulé endogène *PSA*. Les cellules LNCaP ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre *lxra* et/ou *lxr β* (**figure 34A**). La diminution de la quantité de LXR entraîne une diminution des quantités de PSA sécrétées dans le surnageant de culture. En parallèle l'activation de LXR par 10 μ M de T0901317 provoque une chute importante des quantités de PSA sécrétées dans le milieu de culture (**figure 34B**). Ce profil paradoxal a déjà été observé pour des gènes comme *star*, augmentés basalement dans les souris *lxra β* ^{-/-} et après le traitement avec du T0901317. *PSA* n'étant pas une cible transcriptionnelle des LXR, nous pouvons émettre

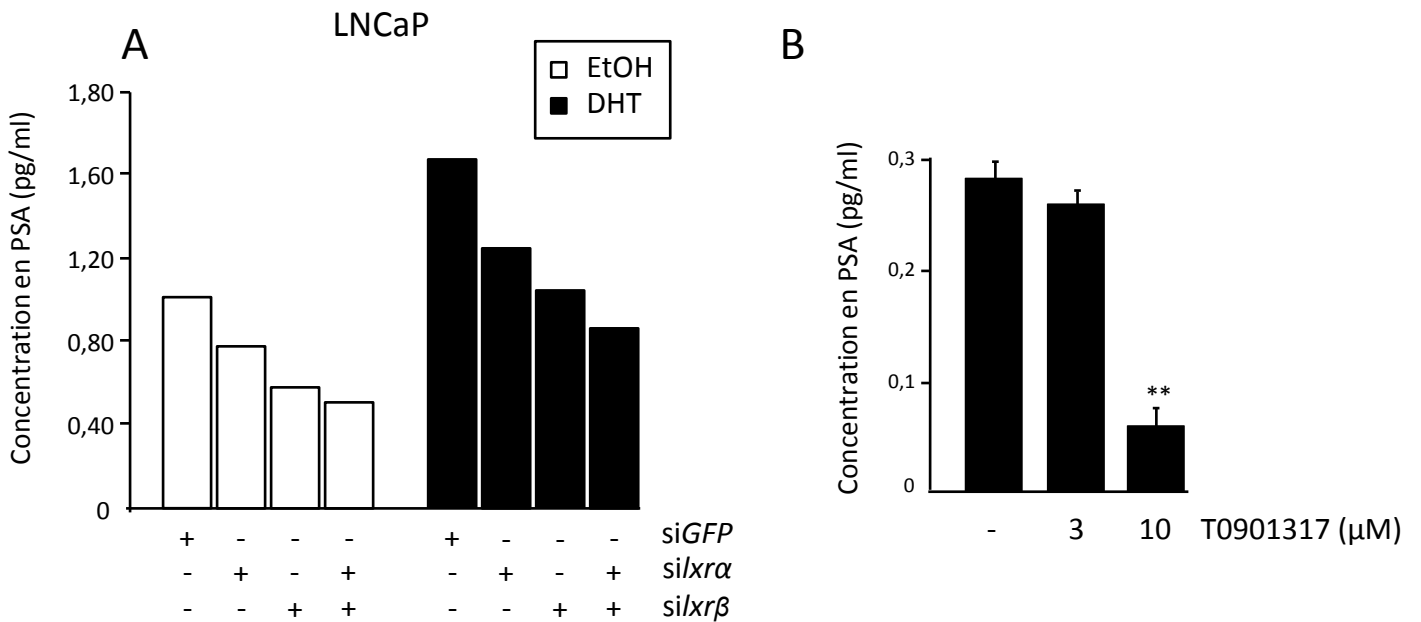


Figure 34 : La sécrétion de PSA par les cellules LNCaP est modifiée par LXR

A, Le PSA a été dosé par chimi-luminescence dans le surnageant de culture de cellules LNCaP transfectée avec *siGFP*, *silxra*, *silxrβ* ou *silxra* et *silxrβ*, et traitées ou non pendant 24h avec de la DHT (10^{-9} M). B, Le PSA a été dosé dans le surnageant de culture de cellules LNCaP traitées ou non avec 3 et 10 μ M de T0901317 (Données non publiées de A. Pommier). **, $p < 0,01$

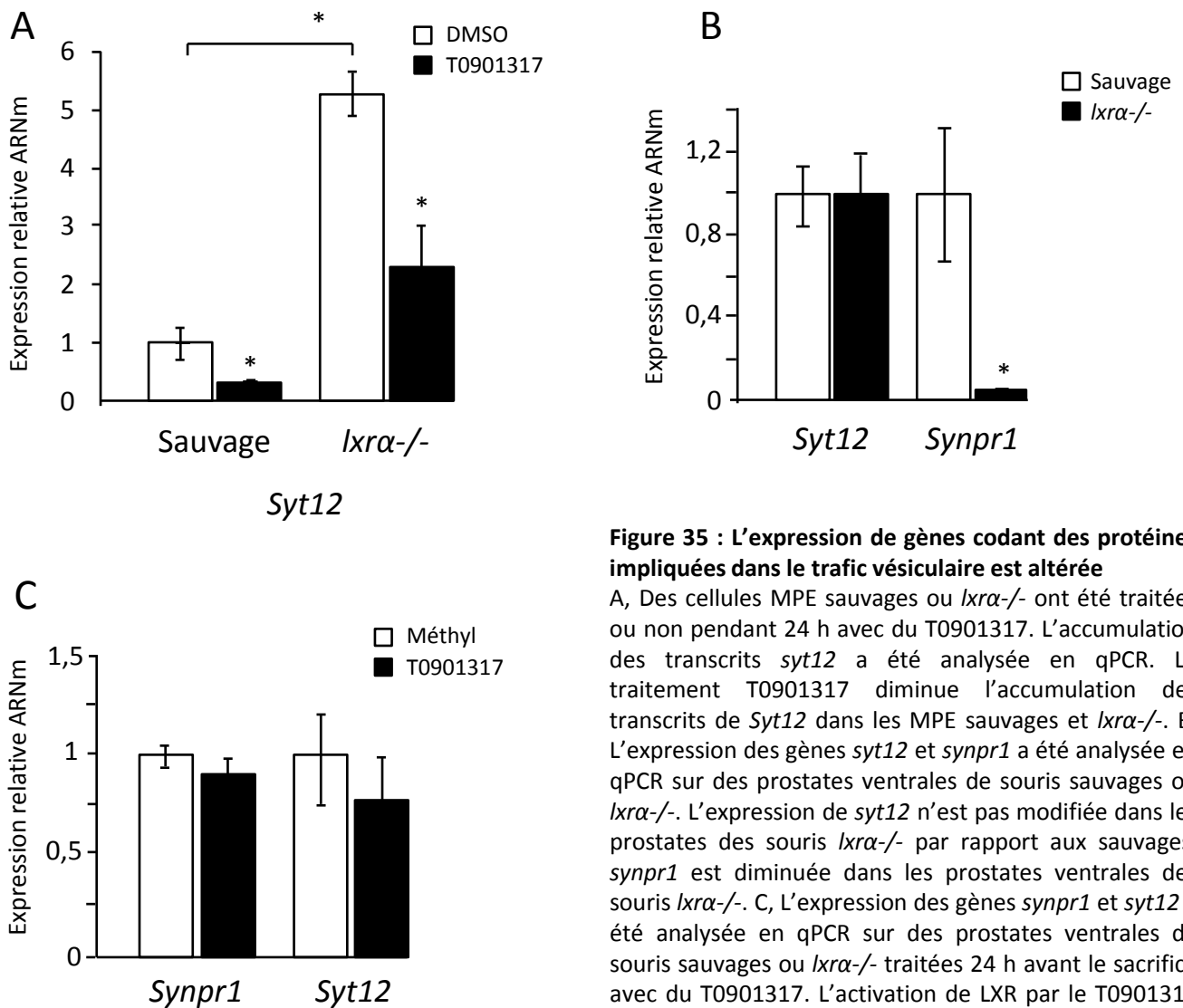


Figure 35 : L'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire est altérée

A, Des cellules MPE sauvages ou *lxra*^{-/-} ont été traitées ou non pendant 24 h avec du T0901317. L'accumulation des transcrits *syt12* a été analysée en qPCR. Le traitement T0901317 diminue l'accumulation des transcrits de *Syt12* dans les MPE sauvages et *lxra*^{-/-}. B, L'expression des gènes *syt12* et *synpr1* a été analysée en qPCR sur des prostates ventrales de souris sauvages ou *lxra*^{-/-}. L'expression de *syt12* n'est pas modifiée dans les prostates des souris *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages. *synpr1* est diminuée dans les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-}. C, L'expression des gènes *synpr1* et *syt12* a été analysée en qPCR sur des prostates ventrales de souris sauvages ou *lxra*^{-/-} traitées 24 h avant le sacrifice avec du T0901317. L'activation de LXR par le T0901317 ne modifie pas l'accumulation des ARNm de *Synpr1* et *Syt12*. *, $p < 0,05$

l'hypothèse de l'existence d'un co-régulateur de AR, gène cible de LXR, pouvant expliquer les effets de LXR sur le gène *PSA*.

IV. Les cellules épithéliales de prostates ventrales *lxra*^{-/-} présentent des anomalies du trafic vésiculaire

Les images de microscopie électronique présentées en figure 2 de l'article montrent que l'épithélium prostatique des souris *lxra*^{-/-} développe des structures vésiculaires plus volumineuses et remplies de structures filamenteuses dont la nature est encore inconnue. Les modifications morphologiques observées en microscopie électronique nous permettent de soupçonner des anomalies du processus de sécrétion. Des marquages des lysosomes et des endosomes précoces ont donc été réalisés sur les lignées de cellules épithéliales MPE sauvages ou *lxra*^{-/-} (figure 7 de l'article). Nous observons des différences morphologiques notables entre les cellules épithéliales sauvages et les cellules *lxra*^{-/-}. Les endosomes ainsi que les lysosomes sont de taille plus réduite dans les cellules *lxra*^{-/-} que dans les cellules sauvages, ce qui suggère une anomalie du trafic vésiculaire. Afin de caractériser plus précisément ce dysfonctionnement et d'identifier les acteurs impliqués, nous avons analysé par qPCR l'expression de gènes codant des protéines importantes dans les phénomènes d'ancrage des vésicules d'exocytose à la membrane.

- La synaptotagmine est une protéine ancrée à la membrane des cellules sécrétrices impliquée dans le mécanisme d'exocytose dépendant du calcium (Lin and Scheller, 2000). Le gène *syt12*, codant la synaptotagmine 12, s'exprime dans les cellules MPE en culture et nous montrons que son expression est augmentée dans les MPE *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages (**figure 35A**). De plus, le traitement avec du T0901317 de MPE sauvages ou *lxra*^{-/-} entraîne une diminution de 50% de l'accumulation des transcrits *syt12*. Cette diminution de *syt12* dans les MPE *lxra*^{-/-} s'explique sans doute par la présence de LXR β qui pourrait avoir une action redondante avec elle de LXR α . L'accumulation de *syt12* a été mesurée *in vivo* dans les prostates. Aucune modification des taux de mRNA n'a été identifiée (figure 35A).
- La synaptoporine est une protéine glycosylée, qui a tout d'abord été identifiée comme un composant majeur de certaines vésicules d'exocytose de neuropeptides au niveau des synapses (Knaus et al., 1990). Ce type de protéine peut être retrouvée au niveau des vésicules d'exocytose dans d'autres types cellulaires et notamment les cellules épithéliales neuroendocrines (Leube et al., 1994). Les niveaux d'accumulation de *synaptoporin1* (*synpr1*) ont été mesurés dans les prostates. En condition basale, *Synpr1* est diminué dans les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages (**figure 35B**).
- Au vu de la dérégulation de *Synpr1* dans les prostates *lxra*^{-/-} et de la diminution de *syt12* dans les cellules MPE après activation de LXR par le T0901317, l'expression de ces deux gènes a été mesurée *in vivo* après une activation de LXR. Le T0901317 de souris sauvages ne modifie ni

l'accumulation des transcrits *synpr1* ni celle des transcrits *syt12* (**figure 35C**). Ces gènes ne sont donc pas des cibles transcriptionnelles de LXR. Notons que dans les cellules MPE l'expression de *synpr1* n'est pas retrouvée, témoignant probablement du fait qu'elle n'est pas exprimée dans les cellules épithéliales.

La signalisation LXR semble donc moduler des gènes codant des protéines impliquées dans les processus de trafic vésiculaire et de sécrétion. Ainsi, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, nous observons des altérations de certains acteurs de ces processus. La discordance de nos résultats observés *in vivo* dans la prostate et *in vitro* dans les cellules MPE peut s'expliquer par le fait que dans la prostate, plusieurs types cellulaires sont représentés (cellules fibro-musculaires du stroma, cellules épithéliales basales, cellules neuroendocrines, cellules luminales sécrétrices), alors que les MPE représentent une population homogène de cellules épithéliales. Ainsi la synaptoporine 1/*synpr1* n'est-elle pas retrouvée dans les cellules MPE alors qu'elle l'est dans la prostate totale. La synaptotagmine/*syt12* est retrouvée à la fois dans la prostate et dans les cellules MPE mais son expression n'est affectée que dans les cellules MPE. L'absence de dérégulation des taux de *syt12* dans les prostates ventrales *in vivo* pourrait être liée à une expression basale du gène dans les autres types cellulaires.

Discussion & Perspectives

L'objectif de ces travaux était de 1) comprendre l'impact *in vivo* d'une inactivation de LXR sur la physiologie prostatique ; 2) déterminer la nature des relations associant les signalisations LXR et AR ; 3) comprendre si le contrôle du maintien de la physiologie prostatique par LXR dépend d'une interaction épithélium/mésenchyme. Nous montrons que les souris *lxra*^{-/-} présentent une hypertrophie prostatique caractérisée en particulier par des altérations épithéliales : hypersécrétion, anomalies du trafic vésiculaire, réponse modifiée de gènes cibles des androgènes. Nous mettons également en évidence que la régulation de gènes androgéno-régulés dans les souris *lxra*^{-/-} est dépendante d'interactions paracrines entre le stroma et l'épithélium. Les altérations décrites sont spécifiques du lobe ventral de la prostate murine. L'hypertrophie de la prostate que nous mettons en évidence est associée à une rétention d'urine dans la vessie qui témoigne de troubles mictionnels. Ces altérations sont couramment rencontrées chez les hommes atteints d'HBP. Cette pathologie de l'homme âgé, se caractérise par des atteintes des compartiments épithélial, musculaire et/ou fibreux de la prostate.

Dans la prostate humaine il est possible de distinguer trois zones anatomiques : une zone périphérique, une zone centrale et une zone transitoire. L'HBP se forme exclusivement dans la zone de transition (McNeal, 1978) tandis que plus de 80% des cancers chez l'homme se forment au niveau de la zone périphérique (Sakr and Grignon, 1998). Chez l'homme, les pathologies de la prostate sont donc spécifiques à certaines régions de la glande. En 1963, Price développe l'idée que les lobes dorso-latéraux de la souris sont équivalents à la zone périphérique de l'homme (Price, 1963). Les travaux de Berquin en 2005 appuient cette hypothèse puisqu'ils montrent que les profils d'expression génique des lobes dorso-latéraux de la souris correspondent à ceux de la zone périphérique de l'homme (Berquin et al., 2005). La signature moléculaire de chaque zone de la prostate est conservée entre les deux espèces, ce qui permet d'établir des analogies entre les zones définies chez l'homme et les lobes prostatiques de la souris. Chez l'homme, les profils d'expression génique de la zone périphérique et de la zone de transition prédisposent ces parties de la prostate respectivement au cancer et à l'HBP vis-à-vis des autres zones.

I. Les lobes ventraux sont-ils les seules zones de la prostate murine capables de développer une HBP ?

Les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-} présentent un phénotype d'hypertrophie qui se rapproche de l'HBP. L'épithélium de la prostate répond de façon aberrante aux androgènes et se caractérise par des anomalies de sécrétion. Le gène *sbp* qui code la protéine majoritaire des sécrétions de prostate chez la souris est retrouvé très exprimé, et la protéine SBP est très largement accumulée dans les prostates. Ainsi, ce gène peut-il être considéré comme un marqueur du phénotype prostatique dans ce modèle. Dans les souris invalidées pour LXR α seuls les lobes prostatiques ventraux sont touchés par les altérations épithéliales que nous décrivons. Dans ces souris, les lobes dorso-latéraux et les lobes antérieurs sont *a priori* normaux (données non présentées). En revanche, des données de l'équipe, en cours de soumission, révèlent que les lobes dorso-latéraux des souris invalidées pour les deux isoformes,

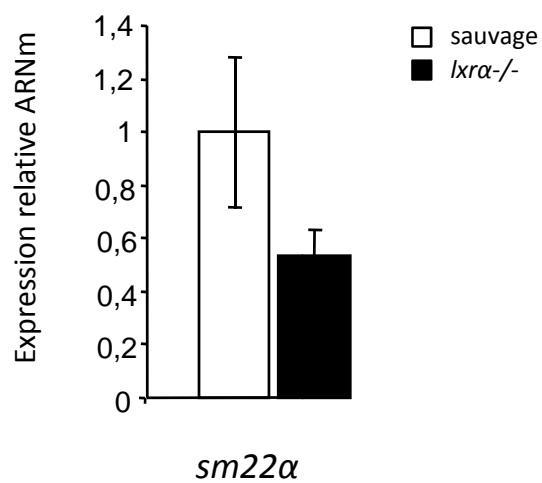


Figure 36 : Le marqueur de différenciation musculaire *sm22α* est diminué dans les prostates des souris *lxa-/-*. L'accumulation de *sm22α* a été étudiée dans les prostates ventrales de souris sauvages et *lxa-/-*. *sm22α* a tendance à diminuer dans les prostates ventrales des souris *lxa-/-*. (n=10). p=0,09

LXR α et LXR β , développent des lésions pré-cancéreuses lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en cholestérol.

Ainsi, pouvons-nous émettre l'hypothèse que, dans les souris *lxra*^{-/-}, l'hypertrophie de la prostate associée aux anomalies sécrétoires des cellules épithéliales soit due à un processus spécifique du lobe ventral qui implique en particulier LXR α et plus largement une dérégulation de l'expression de gènes spécifiques de la prostate ventrale. Puisque les souris *lxra*^{-/-} présentent diverses altérations, stromales (Kim et al., 2009) et glandulaires (nos données) caractéristiques de l'HBP, il serait intéressant de pouvoir établir une liste exhaustive de gènes spécifiquement dérégulés dans les prostates ventrales de ces souris *lxra*^{-/-}. Ces données pourraient être informatives pour mieux comprendre le rôle des LXR dans l'étiologie de l'HBP chez l'homme. Dans cette optique, nous envisageons de :

- réaliser une analyse transcriptomique qui compare les profils d'expression génique entre les lobes ventraux et dorso-latéraux (voir antérieurs) des souris *lxra*^{-/-}. Ainsi, nous pourrions établir des listes de gènes dérégulés spécifiquement dans les lobes ventraux *lxra*^{-/-} par rapport aux autres lobes (dorso-latéraux et antérieurs) *lxra*^{-/-}.
- mesurer dans la prostate humaine les transcrits identifiés chez la souris, c'est-à-dire analyser les gènes orthologues chez l'homme. Cette analyse de puce transcriptomique serait une base de travail intéressante dans le décryptage des bases moléculaires de l'HBP, et pourrait conduire à très long terme à l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques, complémentaires de celles actuellement ciblées.

II. Les prostates des souris *lxra*^{-/-} présentent-elles des altérations de la composante musculaire ?

Notre étude et celle de Kim *et al.* (Kim et al., 2009) ont permis de proposer les souris *lxra*^{-/-} comme des souris modèles pour l'étude de l'HBP. Nos données montrent que ces souris présentent des altérations de la fonction glandulaire de la prostate associées à des problèmes de vidange vésicale comme observé chez les patients atteints d'HBP. Les travaux de Kim *et al.* rapportent une hypertrophie de la prostate associée à des altérations du compartiment stromal chez les souris *lxra*^{-/-}. Cependant, aucune de ces deux études ne démontre une atteinte musculaire. Or, il est admis, que la partie musculaire compte parmi les trois composantes altérées dans l'HBP (McNeal, 1978). Notre groupe a démontré que des défauts de contractilité musculaire étaient observés au niveau de l'utérus des souris femelles déficientes pour LXR β (Mouzat et al., 2007). Une diminution de *sm22 α* (*smooth muscle 22 α*), un marqueur de la différenciation du muscle lisse, a été associée au phénotype utérin. Des études préliminaires ont montré que les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-} présentaient une tendance à la diminution de *sm22 α* (**figure 36**). Il est donc envisageable que le muscle lisse des prostates des souris *lxra*^{-/-} soit atteint. Pour vérifier une atteinte musculaire, nous proposons de traiter les souris *lxra*^{-/-} avec un α 1-bloquant fréquemment utilisé chez l'homme pour le traitement de l'HBP (Lepor, 1991). En effet, les récepteurs α 1-adrénergiques

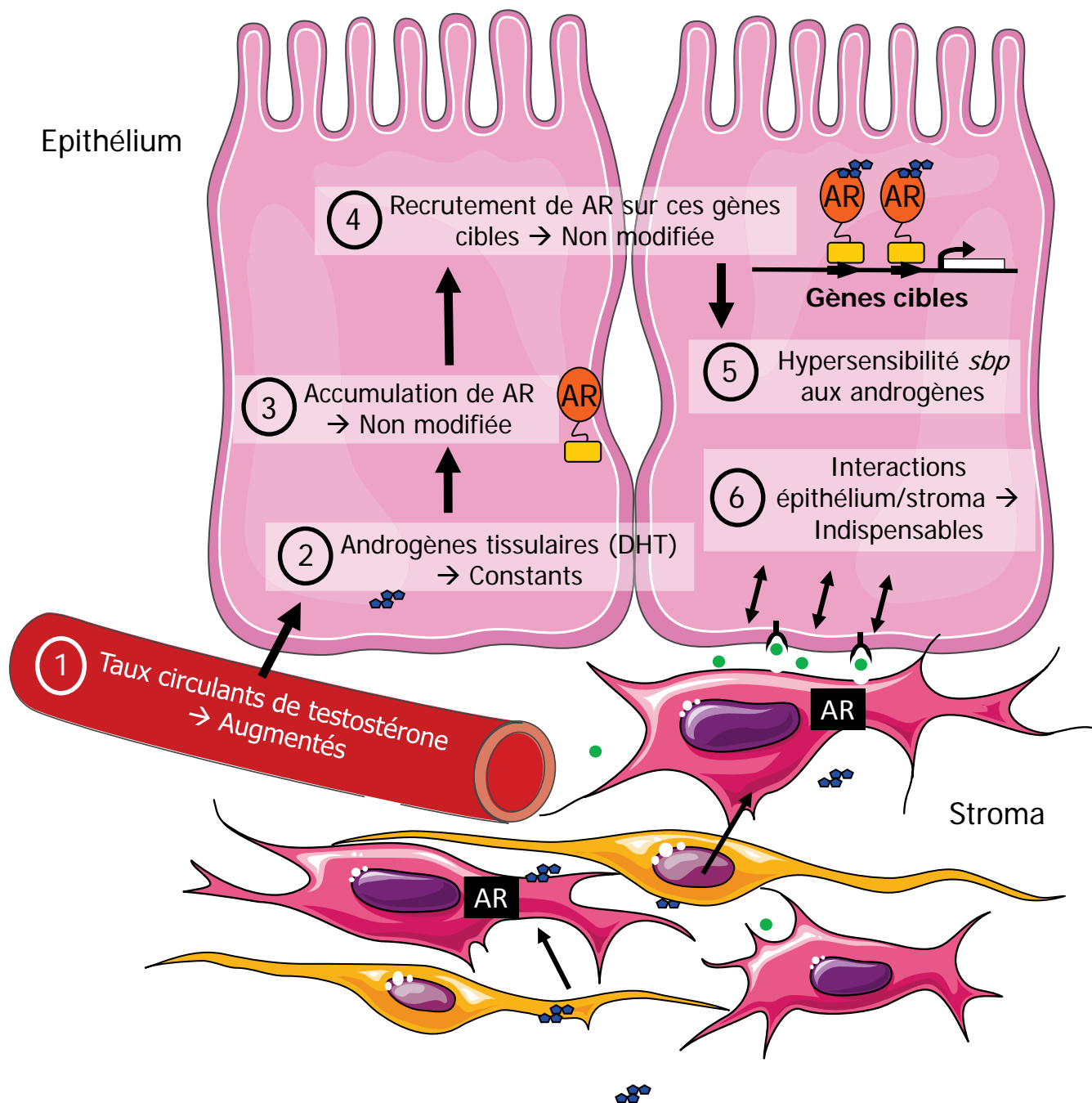


Figure 37 : Schéma résumant les différents niveaux de modulation de la signalisation androgénique dans les prostates *lxra*^{-/-}

 : DHT ;
  : Molécule de signalisation paracrine ;
  : Récepteur membranaire de signalisation paracrine

localisés dans la prostate humaine sont des médiateurs de la contraction des muscles lisses de la prostate. Ces récepteurs induisent également une contraction du col de la vessie. Les antagonistes des récepteurs α 1-adrénergiques permettent un relâchement des muscles lisses de la prostate et donc une diminution de la pression exercée sur l'urètre. Chez l'homme, plusieurs composés de ce type sont utilisés notamment, la tamsulosine ou l'alfuzosine (Association, 2010). Les α -bloquant ne modifient pas le volume de la prostate mais interviennent sur un des symptômes associés ; ils permettent une amélioration du débit urinaire (Association, 2010). Nous envisageons donc d'administrer quotidiennement et par gavage, un composé comme la tamsulosine aux souris. L'objectif de cette étude sera de mesurer le volume de la vessie afin de déterminer si le traitement diminue les troubles mictionnels des souris *lxra*^{-/-}. Au final, si les souris *lxra*^{-/-} répondent aux antagonistes α -adrénergiques, elles constitueront un modèle animal très pertinent pour l'étude de l'HBP reproduisant les symptômes urinaires associés ou LUTS (*Low Urinary Tract Symptoms*). A long terme, ces souris pourront constituer des modèles pour tester de nouvelles molécules pour le traitement de l'HBP dans le cadre d'études pré-cliniques.

III. Quelle est la nature des relations associant les signalisations LXR et AR ?

Afin de répondre à cette question la signalisation androgénique a été étudiée à différents niveaux : systémique, organique et cellulaire, dans les souris *lxra*^{-/-} (**figure 37**). Ainsi les niveaux de testostérone circulante sont-ils augmentés dans les souris *lxra*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (**point 1 dans la figure 37**). Les taux de l'androgène actif dans la prostate, la DHT ne sont en revanche pas modifiés (**2**). De même, l'accumulation de AR et son recrutement sur les séquences régulatrices de ses gènes cibles ne sont pas modifiés (**3, 4**). Le gène *sbp* est hypersensible à la stimulation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-} (**5**). L'expression de *sbp* par les cellules épithéliales n'est augmentée que lorsque les deux compartiments principaux de la prostate, l'épithélium et le stroma, sont invalidés pour LXR α (**6**). L'absence de LXR en présence d'androgènes a une action synergique sur le contrôle de l'expression de *sbp*.

Les données de la littérature montrent que l'activation de AR par du R1881 ou de la DHT dans les cellules LNCaP inhibe l'expression de *abca1*, gène cible de LXR (Fukuchi et al., 2004), et que les LXR sont requis pour cette inhibition (Krycer and Brown, 2011). Cependant il est important de noter qu'aucune interaction directe entre LXR et AR n'a été décrite *in vitro* (Krycer and Brown, 2011). Nous mettons pour la première fois en évidence un lien *in vivo*, entre les signalisations dépendantes de LXR et celles dépendantes des androgènes.

Tout d'abord les taux plasmatiques de testostérone sont augmentés d'un facteur deux dans les souris *lxra*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui montrent que la surexpression hépatique de LXR α entraîne une diminution des taux plasmatiques de testostérone et une inhibition de la régénération prostatique dépendante des androgènes suite à une castration (Lee et al., 2008). L'origine de cette diminution des taux de testostérone est liée à la l'augmentation de SULT2A1 (**figure 38**), enzyme qui sulfate les androgènes, en particulier la DHEA en S-

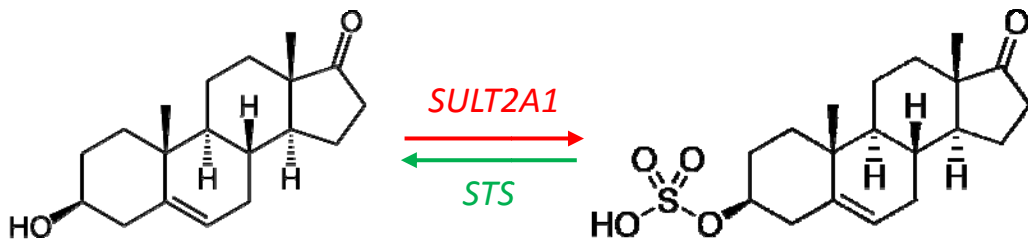


Figure 38 : Métabolisme des androgènes

L'enzyme SULT2A1, *sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1* ajoute un groupement sulfate sur la DHEA, qui devient alors la DHEA-S qui s'élimine facilement dans les urines. L'enzyme STS, *steroid sulfatase*, retire le groupement sulfate, transformant la DHEA-S en sa forme active, la DHEA.

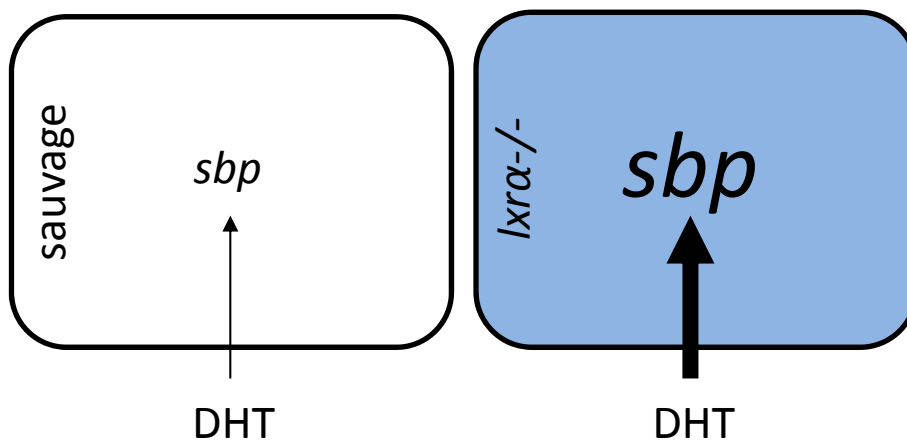


Figure 39 : L'ablation génique de *Ixra* dans la prostate crée un environnement cellulaire favorable à une activation par les androgènes de la transcription de *sbp*.

Dans la prostate sauvages (blanche) la DHT active la transcription de son gène cible *sbp* à un niveau physiologique. Dans la prostate *Ixra*^{-/-} (bleue), la DHT induit une expression très forte de *sbp*. Ainsi, l'effet des androgènes et l'ablation de *Ixra* agissent de façon synergique sur l'expression de *sbp*.

DHEA, provoquant ainsi leur élimination urinaire. A l'inverse, l'expression du gène codant STS (**figure 38**), enzyme qui désulfate les androgènes pour les rendre actifs, est diminuée dans la prostate de souris traitées avec du T0901317. Nos données sont ainsi en accord avec les données de la littérature puisque l'expression de *sts* est augmentée dans le foie et dans la prostate des souris *lxra*^{-/-}. On peut donc envisager une diminution de l'élimination urinaire des androgènes et donc l'augmentation des taux plasmatiques de testostérone des souris *lxra*^{-/-}. Le phénotype d'hyperactivité androgénique prostatique ne peut cependant être expliqué par cette modification de la concentration de testostérone dans le sang. En effet, les modifications des taux plasmatiques de testostérone ne se répercutent pas sur les taux de DHT intra-prostatique, hormone physiologiquement active dans cet organe. Nous pouvons donc considérer ces variations de testostérone circulante comme connexes de l'absence de LXR α dans les souris.

Sachant que ni les niveaux d'accumulation de AR, ni son recrutement sur les régions régulatrices de ses gènes cibles ne sont modifiés dans les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-}, une modification de l'activité intrinsèque du récepteur des androgènes ne permet pas d'expliquer la suraccumulation de SBP observée dans les prostates des souris *lxra*^{-/-}. Une expérience de castration et de complémentation en testostérone, nous a permis de montrer que le promoteur du gène *sbp* est hypersensible à la stimulation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (figure 4C de l'article). L'absence de LXR α dans la prostate semble donc créer un environnement cellulaire, voire tissulaire, favorable à la stimulation androgénique de l'expression du gène *sbp* (**figure 39**). Cette expérience a également révélé qu'en condition castrée, le niveau d'expression basale du gène *sbp* reste plus important dans les prostates des souris *lxra*^{-/-} comparé aux prostates des souris sauvages. Les androgènes seuls activent la transcription de *sbp*. L'ablation de LXR α en absence totale d'androgène (condition castrée) active également la transcription de *sbp*. Ceci est probablement réalisé *via* un ou plusieurs facteur(s) intermédiaire(s), puisque nous avons montré que *sbp* n'était pas une cible transcriptionnelle directe de LXR (**figure 29**). Au final, les effets cumulés d'une stimulation androgénique et de l'absence de LXR α agissent de façon synergique sur l'expression de *sbp*. Comment expliquer ce phénomène ? Dans la prostate, nous savons que les androgènes agissent directement sur l'épithélium d'une part, pour activer la transcription de gènes de la fonction différenciée de la prostate (comme le gène *sbp*) et d'autre part sur le stroma qui va, en réponse, sécréter des facteurs paracrines tels que des facteurs de croissance agissant sur l'épithélium. La modification de la sensibilité aux androgènes du promoteur du gène *sbp* peut donc impliquer des facteurs intrinsèques à la cellule épithéliale et/ou des facteurs paracrines provenant du stroma. Une expérience de recombinaison épithélium/mésenchyme a montré que l'expression de *sbp* par les cellules épithéliales n'est augmentée que lorsque les deux compartiments principaux de la prostate sont déficients en LXR α . L'épithélium intègre donc des signaux paracrines provenant du compartiment adjacent pour le contrôle de l'expression du gène *sbp*. De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence que le dialogue paracrine entre le stroma et l'épithélium se faisait par l'intermédiaire de facteurs de croissance tels que IGF-I (Boudon et al., 1996), KGF (McGarvey and Stearns, 1995, Yan et al.,

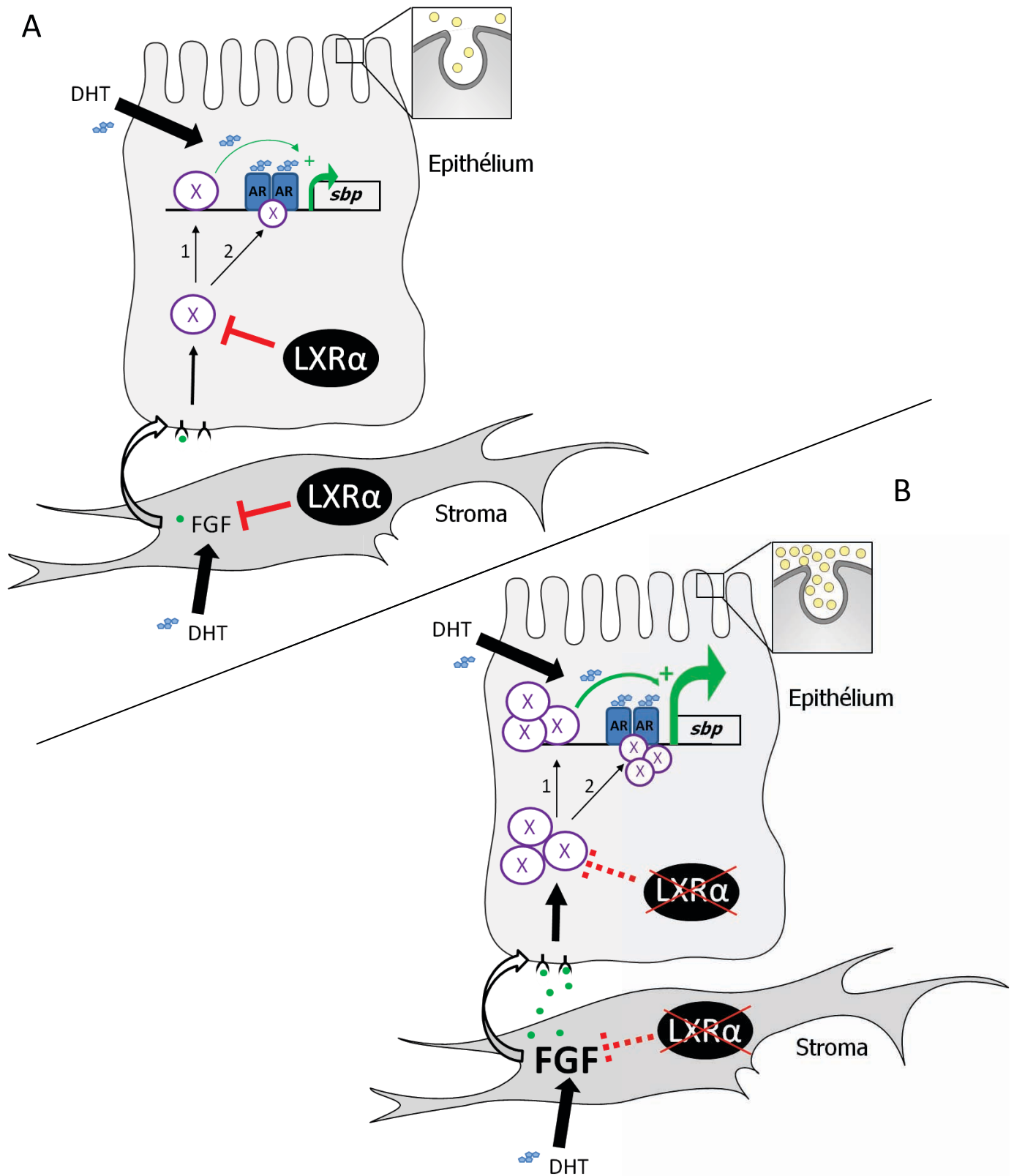


Figure 40 : Modèle intégré de la régulation de *sbp* par LXR α et les androgènes au sein de la prostate

A, Dans les prostatites sauvages, la présence de LXR α dans l'épithélium inhibe la production d'un facteur appelé X. La présence de LXR α dans les cellules stromales va inhiber la production de FGF dont la production et sécrétion sont également largement dépendantes de la DHT. Le FGF va agir de façon paracrine sur les cellules épithéliales. En réponse, ces cellules produisent le facteur X. Ce dernier va agir soit (1) en tant que facteur de transcription en se fixant directement sur une séquence régulatrice du gène *sbp*, (2) en tant que co-facteur de AR, ce qui va permettre la transcription du gène codant SBP de façon basale. B, Dans les prostatites *Lxrα*^{-/-}, l'absence de LXR entraîne une production importante de facteurs de croissance tels que le FGF par les cellules stromales. FGF va agir de façon paracrine sur le compartiment voisin et induire la production de facteurs X en grande quantité. De même l'absence de LXR α dans les cellules épithéliales va induire la production de facteurs X. Ces derniers, produits en grande quantité vont augmenter la transcription du gène *sbp*. Ainsi, une grande quantité de SBP est sécrétée. Les effets combinés des androgènes sur la transcription de *sbp* et sur la production de FGF ainsi que de l'ablation de LXR α dans les deux compartiments agissent de façon synergique sur la synthèse de SBP. : DHT ; : FGF ; : Récepteur du FGF

1992), FGF-8 (Schmitt et al., 1996), EGF (Hiramatsu et al., 1988) ou de molécules de signalisation sécrétées telles que SHH (Freestone et al., 2003). Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence de LXR α entraîne une dérégulation de cette signalisation, conduisant à la mise en place de l'hypertrophie prostatique. La majeure partie des molécules de signalisation paracrines citées ci-dessus sont dépendantes des androgènes et sont produites par le stroma ou l'épithélium, permettant au final un dialogue entre les deux compartiments. Ainsi, LXR α contrôle-t-il l'expression et/ou la production de facteur de croissance ?

- Parmi les candidats envisagés, le facteur FGF21 a été montré comme étant une cible transcriptionnelle de LXR. En effet, l'activation de LXR par le T0901317 inhibe l'expression du gène codant le facteur FGF21 au niveau du foie et dans les modèles de culture d'hépatocytes (Uebanso et al., 2011). Il a été montré que LXR avait un rôle modulateur sur le FGF21, mais cela pourrait également être le cas sur d'autres membres de la famille des FGF et plus généralement sur d'autres facteurs de croissance (IGF, EGF, TGF...). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que LXR α puisse réguler négativement l'expression de gène codant des facteurs de croissance (Schématisé de façon générique : FGF), au niveau de la prostate. Outre la régulation paracrine par le stroma, nous montrons que l'absence de LXR α est nécessaire dans les cellules épithéliales pour induire le phénotype. Le gène *sbp* n'étant pas une cible directe de LXR α , nous proposons le facteur X, comme un (ou plusieurs) intermédiaire(s) pour la régulation de l'expression de *sbp*. Ainsi, nous proposons l'hypothèse suivante afin d'expliquer la régulation de l'expression de *sbp* à la fois par les androgènes et LXR α (**figure 40**). L'ablation génique de LXR α est nécessaire et suffisante pour induire la surexpression de *sbp*. Lorsque LXR α est présent (**A**), il inhiberait la transcription du facteur X. Ce facteur X pourrait se fixer (1) sur le promoteur de *sbp* et agir en tant que facteur de transcription ou alors (2) être recruté par le récepteur des androgènes et agir en tant que co-facteur. En parallèle LXR α stromal diminue la production de FGF. Les cellules du stroma produisent toutefois ce facteur de croissance en la seule présence des androgènes. Le FGF agirait alors au niveau des cellules épithéliales pour activer la production du facteur X. L'action de AR ainsi que du facteur X permettrait une expression basale du gène codant SBP. Dans les cellules épithéliales *lxr α -/-* (**B**), le niveau du facteur X ne serait plus inhibé. En parallèle, l'absence de LXR α au niveau du stroma permettrait une production plus importante de FGF en réponse aux androgènes. FGF augmenterait la synthèse épithéliale du facteur X. Ce facteur, alors présent en grande quantité, va se fixer massivement sur les séquences régulatrices du gène *sbp* pour agir en tant que facteur de transcription ou en tant que co-facteur de AR. Ce mécanisme en boucle associé à l'action permissive des androgènes, permet une action synergique de l'épithélium et du stroma pour l'activation de l'expression de *sbp*.
- Si les facteurs de croissance sont des acteurs importants dans la régulation de l'expression de *sbp*, ils devraient pouvoir (conjointement avec l'action des androgènes) induire l'expression de

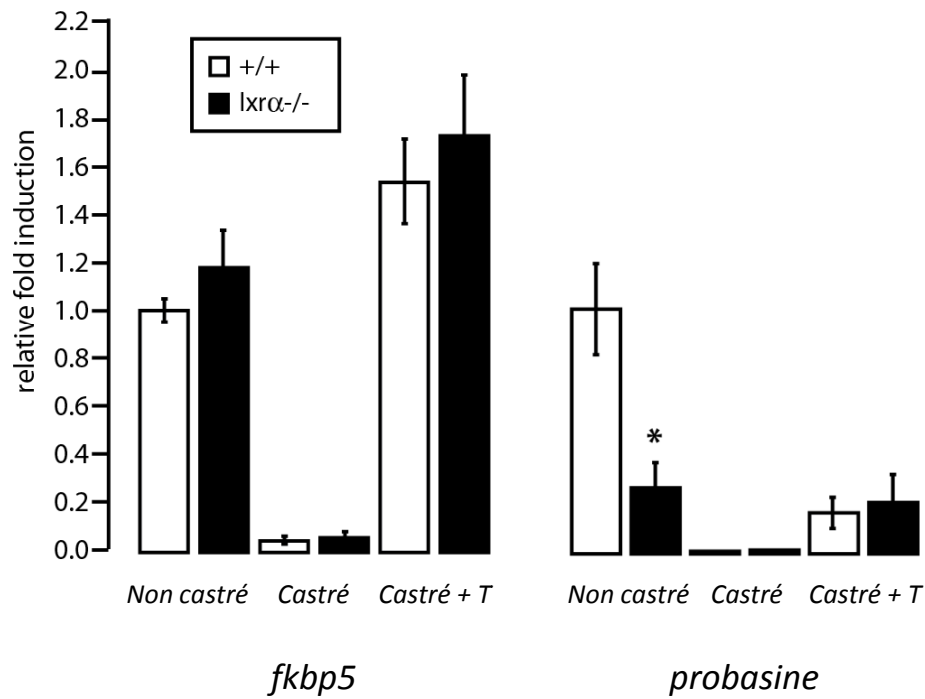


Figure 41 : La transcription des gènes *fkbp5* et *probasine* n'est pas hypersensible à une stimulation androgénique dans les souris *lxrα*^{-/-}.

L'accumulation de *fkbp5* et de la *probasine* a été étudiée dans les prostates ventrales de souris castrées sauvages et *lxrα*^{-/-}. Après trois semaines de castration les souris castrées ont été traitées 2 fois par jour avec 75µg/kg de testostérone (Castré + T). La castration entraîne une diminution drastique de l'accumulation des transcrits *fkbp5* et *probasine*. La complémentation en testostérone augmente l'expression de *fkbp5* et *probasine* de façon comparable entre les souris sauvages et les souris *lxrα*^{-/-}. (n=7). *: p<0,05.

sbp dans les modèles de culture cellulaire de prostates. Nous proposons donc de traiter les lignées épithéliales murines MPE sauvages et *lxra*^{-/-} (qui n'expriment pas le gène *sbp* en condition basale) avec de la DHT associée à un cocktail de facteur de croissance ou des combinaisons de différents facteurs de croissance. Afin de vérifier l'hypothèse du rôle majeur des facteurs paracrines dans la régulation de *sbp in vivo*, nous proposons de quantifier la production des différents facteurs de croissance (préalablement définis en modèle cellulaire), dans les prostates totales des souris *lxra*^{-/-} par rapport aux souris sauvages. Selon le modèle proposé en figure 39, un ou plusieurs facteurs de croissance devrai(ent)(t) être davantage représenté(s) dans les prostates *lxra*^{-/-}.

- Nous proposons également d'identifier dans ce modèle cellulaire le facteur X. Pour cela, nous chercherons par une approche bioinformatique, tous les acteurs potentiellement capables de se fixer à la fois sur les séquences régulatrices du gène *sbp* et sur celles du gène *svs2* dont le profil d'expression est le même que *sbp* dans les prostates ventrales en condition basale (figure 5B de l'article). Cette approche nous permettra d'identifier des gènes candidats. L'expression des candidats potentiels sera enfin analysée en qPCR. Parmi les candidats éventuels, FOXA1 possède des sites de fixation dans le promoteur de *sbp* (Gao et al., 2005). Les souris déficientes pour *foxA1* n'expriment pas *sbp* montrant qu'il s'agit d'un acteur important dans la transcription de ce gène (Gao et al., 2005). Foxa1 est capable de se lier sur différents promoteurs androgéno-régulés dans la prostate comme celui du *PSA* chez l'homme. De plus, la réponse androgénique dépend de la présence de FoxA1 sur le promoteur (Gao et al., 2003). Il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression de *foxA1* dans les prostates des souris sauvages et *lxra*^{-/-}. Des analyses de précipitation de la chromatine permettront en parallèle de déterminer comment FOXA1 se fixe sur le promoteur de *sbp* en fonction de la présence de LXR α .

D'autres gènes dont l'expression est dépendante des androgènes, comme la *probasine* ou *fkbp5*, sont respectivement diminué ou non modifié en condition basale dans les prostates ventrales des souris *lxra*^{-/-} (figure 5B de l'article). L'expérience de castration et de complémentation en testostérone révèle que la transcription de ces gènes n'est pas hypersensible à une stimulation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-} par rapport aux souris sauvages (**figure 41**). La seule signalisation de LXR α ne modifie pas l'expression de ces gènes. Leur mode de régulation est donc différent de celui que nous avons décrit pour le gène *sbp* (**Figure 40**). Les promoteurs des gènes *fkbp5* et *probasine* ne seraient donc pas sensibles à l'action du facteur X évoqué précédemment. Le gène *spp1* est quant à lui augmenté dans les prostates des souris *lxra*^{-/-} (figure 5B de l'article). L'expérience de recombinaison révèle cependant que cette augmentation est dépendante de l'ablation de LXR α dans le compartiment épithélial uniquement (figure 6 de l'article). L'ablation de LXR α dans le stroma n'a aucune répercussion sur l'expression de *spp1*. Bien qu'il soit augmenté dans les prostates *lxra*^{-/-}, l'expression de ce gène n'est pas régulée selon le même mode que *sbp*. Chaque promoteur recrute en effet des cofacteurs différents. La transcription de chaque gène

est dépendante d'un réseau particulier d'acteurs différents en fonction du tissu, du contexte cellulaire, du promoteur et de son environnement chromatinien. Ainsi, dans les souris *lxra*^{-/-}, la signalisation androgénique est dérégulée de façon gène spécifique.

IV. Le phénotype des souris *lxra*^{-/-} est-il prédéterminé dès l'embryogenèse ou s'acquiert-il à l'âge adulte ?

Le poids des prostatites des souris *lxra*^{-/-} augmente avec l'âge de même que le marqueur *sbp* dont l'expression est augmentée de 160 fois à 6 mois et de 3000 fois à 1 an, ce qui révèle une aggravation du phénotype avec le temps. Bien que le phénotype résulte d'une anomalie de la fonction adulte de la glande (anomalie de production de protéines sécrétées comme SBP), la question de la genèse de l'apparition du phénotype est posée. Le phénotype que l'on observe implique une modulation de la signalisation androgénique par LXR à l'âge adulte. Les LXR modulent-ils la signalisation androgénique plus tôt, au cours du développement de la prostate ? Ainsi, le phénotype est-il prédéterminé pendant la morphogenèse de la glande ou s'acquiert-il lors du pic de testostérone pubertaire ? Pour répondre à cette question il serait intéressant de répondre aux points suivants :

1. *Quels sont les profils de LXR α et LXR β dans la prostate sauvage au cours du développement embryonnaire et quelle est leur évolution jusqu'à la puberté ?*

Chez la souris, la testostérone est produite dès le stade embryonnaire E14,5 par les cellules de Leydig. Un premier pic de sécrétion de testostérone a lieu autour du 18^{ème} jour fœtal, un second en période péri-natale puis le troisième au moment de la puberté (45 jours chez la souris). Ainsi serait-il intéressant de cartographier les profils d'expression de LXR α , LXR β et de leurs gènes cibles au cours du développement. LXR α et β s'expriment-ils dans l'UGS dans les premiers stades embryonnaires ? Les pics de production de testostérone influent-ils sur les niveaux d'expression de LXR et de leurs gènes cibles ? Nous envisageons donc d'étudier l'expression lors de l'ontogenèse, de LXR α , LXR β ainsi que leurs gènes cibles, dans l'UGS de souris sauvages avant la production fœtale de testostérone (stade E12), après le début de la production (stade E15), pendant le pic de sécrétion de testostérone (stade E18), après ce pic (entre E18 et E20), en périnatal, au moment de la puberté (à 45 jours), et enfin après l'étape de la puberté (à partir de 50 jours post-natals).

2. *L'absence de LXR pendant l'embryogenèse influe-t-elle sur l'expression de gènes du développement ?*

En plus des signaux androgéniques, de nombreux gènes permettant la différenciation des structures et des compartiments de la prostate (cf. Introduction) : les gènes homéotiques (*hoxa13*, *hoxd13* ou *hoxb13*), les facteurs de transcription (*Nkx3.1*, *FoxA1-A2* ou *Notch1/delta/jagged*), et les ligands de signalisation sécrétés (*Hedgehogs*, *Wnt*, *Fgfs* et *Bmp/Tgf β /Activin*). Afin d'étudier l'influence de

l'ablation génique de LXR α sur la représentation de ces gènes morphogénétiques, nous proposons de quantifier les niveaux d'expression de l'ensemble de ces gènes dans les prostates embryonnaires des souris *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages. Afin, d'analyser si les LXR sont capables de moduler des gènes cibles des androgènes dès l'embryogenèse, il serait également intéressant d'étudier l'expression de gènes cibles directes du récepteur des androgènes dans la prostate embryonnaire de souris *lxra*^{-/-} par rapport aux sauvages. Nous saurons ainsi si la présence/absence de LXR modifie l'expression de gènes directement impliqués dans le développement de la prostate (les gènes du développement) et des gènes androgéno-régulés. Si tel est le cas, il sera intéressant de voir de quelle façon LXR contrôle l'expression de ces gènes et s'il s'agit notamment de cibles transcriptionnelles directes de LXR.

Le phénotype des souris *lxra*^{-/-} résulte notamment de l'altération de l'expression du gène *sbp*, marqueur d'un épithélium bien différencié. Seule une prostate adulte peut être le siège d'un tel phénotype. La question se pose alors de savoir si c'est l'invalidation de LXR α pendant la période embryonnaire qui a des répercussions sur la prostate adulte. Pour répondre à cette question les perspectives à très long terme seraient d'utiliser des modèles de KO conditionnels de LXR. Le but de l'utilisation de ces KO serait de réaliser une invalidation spatio-temporelle de LXR α spécifiquement dans l'épithélium de la prostate ventrale selon une cinétique bien précise : soit dès les premiers stades embryonnaires, soit à l'âge adulte à partir de la puberté. L'outil utilisé pourra être le système de CRE inducible par le tamoxifen, sous le contrôle du promoteur d'un gène qui s'exprime spécifiquement dans l'épithélium des prostates ventrales (comme le gène *spinkt3*, *serine protease inhibitor kazal type 3*). Le principe de la CRE-ERT2 est de produire une CRE non fonctionnelle, activable au moment voulu, par une injection de tamoxifen. L'inconvénient majeur de la CRE-ER^{T2}, réside dans le fait que le tamoxifen est considéré comme un perturbateur endocrinien (Maradonna et al., 2009) dont on connaît désormais les effets délétères sur le développement embryonnaire, en particulier celui du tractus génital. Une alternative au modèle de recombinaison CRE-ER^{T2} serait le modèle TET-on qui permet l'expression d'un gène d'intérêt (en l'occurrence la CRE) suite au traitement à la doxycycline. C'est le croisement de souris CRE avec des souris « floxées » pour LXR α qui va permettre au final, l'obtention de KO LXR α conditionnel. Au final, nous étudierons dans ces modèles de KO conditionnels, la cinétique d'apparition du phénotype prostatique que nous avons décrit dans les modèles de KO totaux de LXR α . En outre, nous montrons que l'absence de LXR α est nécessaire aussi bien au niveau de l'épithélium que du stroma pour la dérégulation du gène *sbp*. L'utilisation de ce type d'outil peut être extrapolée pour l'obtention de KO conditionnels de LXR α spécifiques du mésenchyme prostatique.

V. Peut-on lier les modifications du trafic vésiculaire à des changements du contenu de la cellule en cholestérol ?

Il existe un lien important entre le contenu en cholestérol de la cellule et les mécanismes de trafic vésiculaire (Alonso and Millan, 2001). Le cholestérol libre a plusieurs devenir possibles dans la cellule,

où il entre notamment dans la composition des membranes. Des domaines de la membrane enrichis en cholestérol sont les *rafts* lipidiques, véritables plateformes de signalisation. Il existe un lien très fort entre les taux de cholestérol dans la cellule et l'étendue des *rafts* (Freeman and Solomon, 2004). Ces *rafts* lipidiques sont de plus le lieu d'ancrage de protéines comme les SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein (SNAP) receptor*) qui modulent la fusion des vésicules d'exocytose au niveau de la membrane plasmique (Chamberlain et al., 2001, Lang et al., 2001). Le traitement de cellules CHO avec le U18666A qui inhibe l'export du cholestérol en le séquestrant dans les endosomes, inhibe également la localisation des SNARE à la membrane (Reverter et al., 2011). L'apport exogène de cholestérol dans les cellules restaure la localisation à la membrane des protéines SNARE, comme SNAP23 et la Syntaxine-4 (Reverter et al., 2011). Ainsi, les taux cellulaires de cholestérol, la formation des *rafts* lipidiques et l'ancrage de protéines importantes pour l'exocytose de vésicules de sécrétion sont des phénomènes liés et importants pour le trafic vésiculaire. L'équipe a montré que la dynamique des *rafts* était modifiée par une activation de LXR dans les cellules LNCaP (Pommier et al., 2010). Dans les prostatites des souris *lxra*^{-/-} ainsi que dans les cellules MPE *lxra*^{-/-}, nous observons des altérations des processus de trafic vésiculaire et de sécrétion. Nous montrons que l'expression de gènes codant des protéines importantes dans les processus d'ancrage à la membrane des vésicules d'exocytose, comme la synaptoporine 1 ou la synaptotagmine, est modifiée soit en contexte cellulaire (dans les MPE *lxra*^{-/-}) soit *in vivo* dans les prostatites *lxra*^{-/-}. La synaptotagmine est une protéine localisée à la membrane des cellules sécrétrices, tandis que la synaptoporine 1 est retrouvée dans certaines vésicules d'exocytose. Elles sont toutes deux fortement impliquées dans les mécanismes de sécrétion. Ainsi, les modifications des processus de trafic vésiculaire que nous mettons en évidence sont-ils dus à une modification du contenu de la cellule en cholestérol, en particulier à une modification des *rafts* ? Afin de répondre à cette question, nous proposons les perspectives suivantes :

- mesurer le contenu en cholestérol des cellules MPE *lxra*^{-/-} et des prostatites *lxra*^{-/-}
- analyser la distribution et la taille des *rafts* lipidiques dans les cellules MPE par un marquage de avec la flotilline, marqueur spécifique des *rafts* (Salzer and Prohaska, 2001)
- étudier la localisation membranaire des protéines SNARE et des protéines qui interagissent avec ce complexe comme les synaptoporine 1 et synaptotagmine, en utilisant une technique d'imagerie confocale.

Ces données permettront de caractériser la nature des altérations du trafic vésiculaire, observées en microscopie électronique et de les corrélées à des modifications du contenu de la cellule en cholestérol.

VI. LXR est-il impliqué dans l'étiologie de l'HBP chez l'homme ?

Nous avons réalisé notre étude dans un modèle souris. La prostate ventrale est considérée, d'un point de vue moléculaire, comme homologue à la zone de transition, région siège de l'HBP chez l'homme. Ainsi, pouvons-nous envisager qu'une altération de l'activité et/ou de l'expression de LXR soit un facteur clé dans le développement de l'HBP chez l'homme. Pour vérifier cette hypothèse nous proposons de

mener nos études sur des échantillons de prostate de patients atteints d'HBP. Après une analyse anatomique et pathologique afin de déterminer l'origine glandulaire, fibreuse ou musculaire de l'HBP chez les patients, et l'anamnèse des traitements éventuels nous proposons de :

- vérifier la présence d'éventuelles mutations dans les gènes codant les LXR et/ou rechercher l'existence de polymorphismes (SNP) pouvant être associés à cette pathologie. Bien que les souris *lxrβ*^{-/-} présentent des altérations moins marquées que les souris *lxrα*^{-/-}, elles développent une hypertrophie de la prostate. Etant donné que les mutations de LXR n'ont jamais été recherchées dans la prostate humaine, dans le cadre de ce type de pathologie, il serait intéressant, de rechercher les polymorphismes à la fois au niveau de LXRα et LXRβ.
- analyser le profil d'expression des LXRα et LXRβ et de leurs gènes cibles (*ABCA1*, *SCD1*, *SREBP1C*) dans les échantillons d'HBP et les associer aux différentes composantes altérées de l'HBP.
- doser les différents oxystérols capables d'activer les LXR ainsi que de quantifier l'activité et l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des oxystérols ligands des LXR.
- analyser les profils d'expression de AR et de ses gènes cibles (*PSA*, *FKBP5*) en fonction de la composante de l'HBP. Il serait également intéressant de mesurer les taux de DHT intraprostatiques dans les échantillons de patients.

Le but de ces travaux est de pouvoir établir des corrélations entre les expression/activité des LXR et de AR et également entre les niveaux d'oxystérols et les taux de DHT mesurés sur chaque échantillon. Ces données permettraient éventuellement d'établir pour la première fois un lien entre la signalisation dépendante de LXR et la signalisation androgénique.

Au final, l'obtention de ces données permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes liés à la mise en place de l'HBP chez l'homme, d'identifier de nouveaux marqueurs associés et d'améliorer ainsi les méthodes de diagnostic et les stratégies thérapeutiques.

Annexes

Article 2 : *Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?*

Publié dans *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2011 Feb;15(2):219-32. Epub 2011 Jan 5. Review.

Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JM.

Expert Opinion

1. LXR, two members of the nuclear receptor superfamily
2. Physiological functions of LXR
3. Putative pharmacological targeting
4. Conclusion
5. Expert opinion

Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?

Emilie Viennois, Aurélien JC Pommier, Kévin Mouzat, Abdelkader Oumeddour, Fatim-Zohra El Hajjaji, Julie Dufour, Françoise Caira, David H Volle, Silvère Baron & Jean-Marc A Lobaccaro[†]
[†]"Génétiq ue Reproduction et Développement", Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France

Introduction: Liver X receptors (LXR) are transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. Natural derivatives of cholesterol, known as oxysterols, have been identified as agonistic ligands of LXR. They are thus mainly considered to be intracellular cholesterol 'sensors' whose activation leads to decreased plasma cholesterol. Their implication in other physiologic processes currently prevents their use as therapeutic targets, because of potentially deleterious side effects.

Areas covered: The various LXR agonists and antagonists, along with the physiological functions of LXR. Putative clinical targets including atherosclerosis, diabetes, Alzheimer's disease, skin disorders, reproductive disorders and cancer.

Expert opinion: LXR are promising pharmacological targets because of the high potential to develop ligands owing to the variety of natural or synthetic agonists. Three aspects should be developed to select a LXR-ligand for treatment of human disease: bio-availability; isoform specificity; tissue specificity. This will allow the development of selective liver X modulators (SLiMs). The challenge is to overcome deleterious side effects to establish LXR as new pharmacological targets.

Keywords: cancer, human diseases, LXR, nuclear receptors, pharmacology, reproduction

Expert Opin. Ther. Targets (2011) 15(2):219-232

1. LXR, two members of the nuclear receptor superfamily

Liver X receptor (LXR) α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) belong to a subclass of the nuclear receptor superfamily, that form obligatory heterodimers with retinoid X receptor (RXR) [1], the receptor of 9-*cis* retinoic acid. In humans LXR α and LXR β are encoded by two distinct genes located on chromosomes 11p11.2 and 19q13.3, respectively. LXR were initially isolated from a human liver cDNA library as orphan receptors [1,2]. Later, oxysterols, which are oxidized derivatives of cholesterol, were identified as their natural ligands [3] and the first physiological functions were associated with cholesterol homeostasis.

LXR α was initially described as being highly expressed in a restricted subset of tissues known to play an important role in lipid metabolism such as liver, small intestine, kidney, spleen and adipose tissue whereas LXR β was found to be ubiquitously expressed [4] (for LXR distribution in mouse see [5]).

1.1 Structure

Similar to other nuclear receptors, both LXR isoforms comprise four distinct domains: i) an amino-terminal activation domain (AF-1), recruiting ligand-independent co-activators, ii) a DNA-binding domain containing two zinc

informa
healthcare

Article highlights.

- Liver X receptors (LXR) are nuclear receptors activated by natural and synthetic ligands. The chemical range of these ligands is broad, which opens up various opportunities to design new activators.
- LXR modulate numerous physiological functions: fatty acid and cholesterol synthesis and metabolism, glucose homeostasis, steroidogenesis and immunity.
- LXR-deficiency in mice results in several pathologies mimicking pathological conditions in humans (atherosclerosis, diabetes, Alzheimer's disease, skin disease, male and female reproductive disorders and cancers). This demonstrates that LXR could be potent pharmacological targets.
- The design of new ligands will have to focus on their bioavailability and specificity towards LXR isoforms and target tissues.

This box summarizes key points contained in the article.

fingers, iii) a hinge domain, binding co-repressors in absence of ligand and iv) a multi-functional carboxy-terminal domain, required for dimerization, containing a hydrophobic ligand-binding site and a transactivation domain (AF-2) recruiting co-activators [6,7]. Interestingly, even though both DNA- and ligand-binding pockets share 80% identity, human and mouse LXR β are shorter than LXR α in their N-terminal domain (12 and 11 amino acids, respectively) and longer in the hinge region (23 and 18 amino acids, respectively) (Figure 1). This fact could account for the lack of redundancy *in vivo*, even though both LXR isoforms bind similar DNA sequences and ligands *in vitro*.

1.2 Mechanism of activation

In the absence of ligand, Li *et al.* showed that LXR are acetylated proteins [8] (at residues K432 in LXR α and K433 in LXR β , adjacent to the AF2 domain) and constitutively bound with RXR to their LXR response element (LXRE) localized on target gene promoters. The heterodimer interacts with co-repressors, for example nuclear receptor co-repressor (N-CoR) or silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) [9], which blocks transcription by recruitment of histone deacetylase through the interaction with proteins such as stress activated MAP kinase interacting protein 3A (Sin3A) [10] (step 1, Figure 2). Oxysterol binding to LXR (step 2) leads to modifications of the carboxy-terminal domain that in turn induce the release of the co-repressors. This rearrangement leads to the release of helix 12 that acts as a trap blocking the ligand in its binding pocket. This reinforces interactions of co-activators such as activating signal cointegrator-2, (ASC-2) [11] on the AF-2 domain [12]. This cascade of events sets the chromatin into a permissive state (step 3). Concomitantly, sirtuine 1 induces the deacetylation of LXR (step 4). This is followed by LXR ubiquitylation (step 5) and degradation by the proteasome (steps 6 and 7).

1.3 Ligands

Among the various molecules that can bind LXR, agonists induce the transcriptional activity of LXR while antagonists block their activities on target genes.

1.3.1 Ligands with agonistic activity

A large number of natural LXR ligands have been described. In mammals the physiological LXR agonist ligands are oxysterols, oxidized metabolites of cholesterol (for a review on oxysterols see [13]). Schematically, in mammals, there are two sources of plasmatic oxysterols: i) *in vivo* production by enzymatic or chemical pathways; ii) exogenous nutritional supply [7]. Natural activating oxysterols include 22(*R*)-hydroxycholesterol in steroidogenic tissues, 24(*S*)-hydroxycholesterol in brain and plasma, 24(*S*),25-epoxycholesterol mainly found in the liver and 27-hydroxycholesterol in macrophages. These oxysterols have been reported to activate both LXR α and LXR β [3,7,14]. Besides these oxysterols, other cholesterol derived molecules such as the follicular fluid meiosis activating sterol (FF-MAS) have been described as potent activators of LXR α . Likewise, desmosterol, a cholesterol precursor produced from zymosterol, could also activate LXR [15]. Molecules derived from the bile acid pathway in particular natural 6 α -hydroxylated bile acids have been proposed as putative ligands inducing transcriptional activity of LXR α [16]. Various compounds derived from plants or fungi are potential activators of LXR. These include ergostan4,6,8,22-tetraen-3-one derived from *Toly-pocladium inflatum* [17], a fungus isolated from Norwegian soil that produces cyclosporin in certain conditions; acanthoic acid from rollinia [18], an exotic tropical fruit; gynostemmine from *Gynostemma pentaphyllum* [19], also called jiaogulan, an herbaceous vine of the family Cucurbitaceae; paxillin from *Penicillium paxilli* [19], a fungus. Interestingly these molecules do not necessarily present an oxysterol-like structure, which suggests that the pharmacology of LXR and the discovery of natural ligands are at the beginning of their history.

Many pharmaceutical companies have screened potential LXR ligands (for a review see [20]). Among them T0901317 [21] and GW3965 [22], two nonsteroidal synthetic LXR agonists, are commonly used in experimental studies. T0901317, in contrast with GW3965, is not completely selective for LXR [23-25]. However, a human therapeutic use of these molecules is impossible because of their temporary hypertriglyceridemic effect [26-28]. A promising synthetic ligand was identified by Makishima's group [29]. Derived from ergosterol, a phytosterol of fungal cell membranes, (22E)-ergost-22-ene-1 α ,2 β diol (YT-32) proved to be a potent LXR activator *in vitro* as well as *in vivo*. It induced a reduction in plasma cholesterol concentration and was not associated with the hypertriglyceridemia normally observed with synthetic LXR agonists. To explain this selectivity, Kaneko *et al.* [29] suggested that YT-32 may reduce the

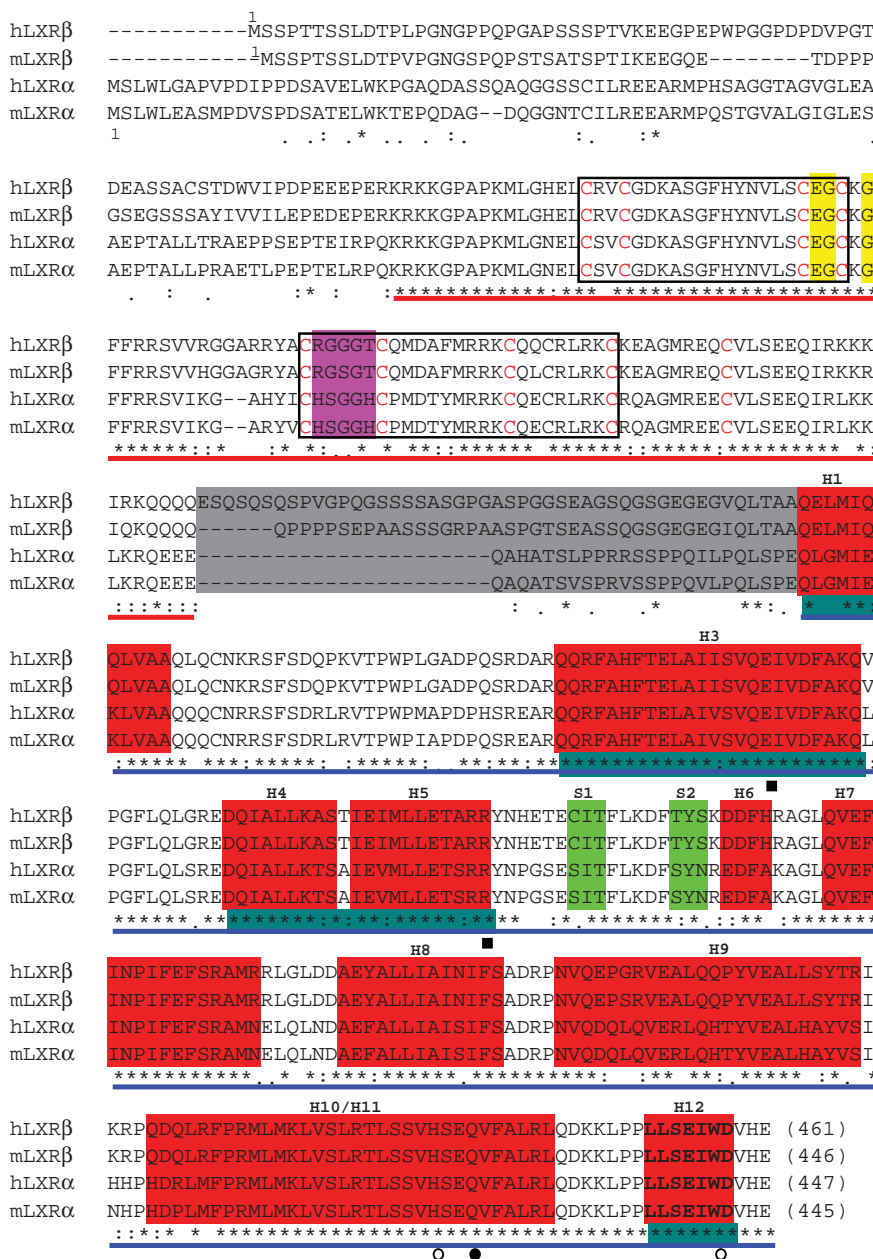


Figure 1. Protein sequence alignments of human (h) and mouse (m) LXR α and LXR β . (*) identical amino acids; (:) similar amino acids; (.) structurally related amino acids. The 9 Cys of the DNA-binding domain are indicated in red type. DNA- and ligand-binding domains are underlined in red and blue, respectively. The two zinc fingers are boxed. P box, D box, hinge region, alpha helices (H) and beta sheet (S) are shadowed in yellow, purple, gray, red and green, respectively. Amino acids LLSEIWD within the AF2 domain are in bold type. The contact surfaces with the cofactor glutamate receptor interacting protein (GRIP) are shadowed in deep turquoise. Amino acids allowing the anchorage/discrimination of agonists (open circles), 22(S) hydroxycholesterol (black circle) and poly unsaturated fatty acids (black squares) are according to [12,109]. The positions of the alpha helices are according to [110]. Colour available online (informahealthcare.com/ebt).

LXR: Liver X receptor; RXR: Retinoid X receptor.

intestinal absorption of cholesterol, by inducing expression of the transporters ATP-binding cassette, sub-family G (ABCG) 5 and ABCG8 (see Section 2.1.1.3), which could excrete the compound from the apical membranes of mucosal cells. A second hypothesis was that YT-32 could be secreted into

the bile by ABCG5 and ABCG8, before it could induce expression of lipogenic genes in the liver. A third explanation could be a tissue-specific agonist activity depending on co-factor recruitment as observed for selective estrogen receptor modulators. GlaxoSmithKline (GSK) has also

Expert Opin. Ther. Targets Downloaded from informahealthcare.com by 83.145.91.68 on 01/11/11
For personal use only.

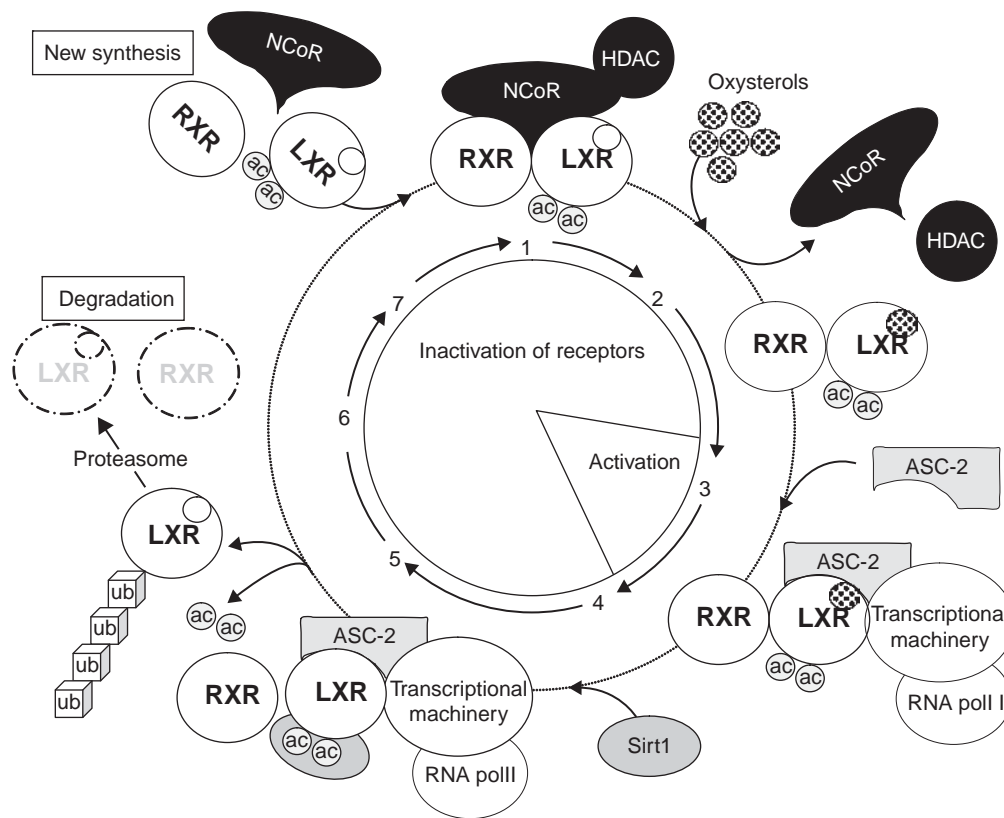


Figure 2. Schematic representation of the activation/inhibition cycle of liver X receptor (LXR) heterodimerizing with retinoid X receptor (RXR). In the absence of ligand, LXR/RXR is bound on DNA together with transcriptional co-repressor. Agonist binding of one of the two receptors will induce departure of co-repressor (for example, NcoR) and recruitment of a large series of co-activator (for example, ASC-2) on the AF2 domain. At the same time, transcriptional machinery proteins and RNA polymerase II will increase the transcription of the target gene, which will finally activate the physiological response. The role of Sirtuine 1 (Sirt1) is to deacetylate LXR, which will be ubiquitinated and directed toward the proteasome.

Adapted from [111].

Ac: Acetylation; ASC-2: Activating signal cointegrator-2; HDAC: Histone deacetylase; LXR: Liver X receptor; NcoR: Nuclear receptor corepressor; RXR: Retinoid X receptor; Sirt1: Sirtuine 1; Ub: Ubiquitin.

developed a non steroidal compound closely related to GW3965 (GW6340) [30], which specifically activates intestinal ABCA1, G5 and G8 expression (see Section 2.1.1.3) in the absence of hepatic target gene induction.

Wyeth's compound (LXR-623, an indazole) was tested in Phase I clinical trials [31,32]: LXR target genes involved in the reverse transport of cholesterol were upregulated in the macrophages of healthy volunteers without any induction of triglyceride synthesis. However, trials were terminated after observation of adverse effects on the central nervous system (CNS). Pharmaceutical companies have focused their efforts on the identification of molecules specific of each LXR isoform. Unfortunately, as described above, there are only minor differences in the LBD of LXR α and LXR β (Figure 1). This high similarity prevents the development of α or β -selective ligands. Nevertheless Wyeth Company has demonstrated that heterocyclic scaffolds such as WYE-672, a phenylsulfone-substituted quinoxaline, are orally active and LXR β selective agonists [33].

1.3.2 Ligands with antagonistic activity

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) known to be PPAR α and PPAR δ agonists, especially arachidonic acid, are the main competitive natural antagonists of the interaction between LXRs and their ligand [34,35]. A physiological role of such antagonistic activity has been found associated with the regulation of hepatic fatty acid elongase 5 (Elovl5; [36]). Indeed, PUFAs could mediate a negative feedback regulation on their own synthesis by blocking the transcription of sterol regulatory element binding protein 1c (*srebp1c*), a master gene involved in fatty acid synthesis, through repression of LXR α (for more details see Section 2.1.2).

Guttiferone from *Garcinia humilis* [37], a fruit commonly known as achacha and traditionally grown in Bolivia, and riccardin, from the liverwort *Blasia pusilla* [38], are natural antagonist compounds. From a therapeutic point of view, there is little need for LXR inhibition. It is therefore not surprising that very few synthetic compounds with antagonist activity have been identified.

22(S)-hydroxycholesterol [39] and esterified-fibrates [40] block LXR activity by occupation of the ligand-binding pocket without induction of co-factor recruitment.

2. Physiological functions of LXR

Over the last two decades, identification of the physiological functions of nuclear receptors has been the main focus of many research teams throughout the world. It has led to the development of new biological concepts such as 'reverse endocrinology' [41]. The development of synthetic agonists and the study of LXR-deficient mice (LXR knock out or LXR^{-/-} mice) have resulted in the discovery of unanticipated nuclear signaling pathways for oxysterols with important physiological and pharmacological ramifications. Altogether, LXR functions can be schematically associated with four physiological functions: i) lipid metabolism including fatty acid and cholesterol homeostasis, ii) glucose homeostasis, iii) steroidogenesis, and iv) immunity (Figure 3).

2.1 LXR and lipid metabolism

2.1.1 Regulation of cholesterol homeostasis

LXR regulate cholesterol homeostasis by acting on three pathways: inhibition of *de novo* synthesis, induction of bile acid synthesis and activation of reverse cholesterol transport.

2.1.1.1 De novo synthesis

LXR α -deficient mice are characterized by a higher basal expression of several genes involved in hepatic cholesterol metabolism such as *srebp2* and its target genes 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl (HMG)-CoA reductase and synthase, farnesyl diphosphatase and squalene synthase [42]. In addition, T0901317 inhibits expression of the genes encoding squalene synthase and HMG-CoA synthase *in vivo* [21].

2.1.1.2 Bile acid synthesis

LXR α -, but not LXR β -, deficient mice, develop hepatic steatosis resulting from cholesteryl ester accumulation when fed a cholesterol-rich diet [42]. This phenotype is caused by hampered upregulation of the *cyp7a1* gene, which encodes the first and rate-limiting enzyme of bile acid synthesis from cholesterol. It is noteworthy that *cyp7a1* regulation by LXR α is only observed in rodents [43].

2.1.1.3 Reverse cholesterol transport

In the reverse transport process, excess cholesterol is carried by high-density lipoproteins (HDL) from peripheral tissues to the liver where it can be metabolized. The ATP-binding cassette (ABC) transporters, involved in cholesterol removal from cells to extracellular acceptors, are essential for the regulation of cellular cholesterol concentrations. Mutations of the *ABCA1* gene are detected in Tangier disease, a familial HDL-deficiency associated with a high risk of developing atherosclerosis [44]. Likewise, mutations of *ABCG5* and *ABCG8* have been described in patients with

β -sitosterolemia, a rare autosomal recessively inherited lipid metabolic disorder, characterized by hyperabsorption and decreased biliary excretion of dietary sterols, leading to hypercholesterolemia. This indicates the role of these proteins in the regulation of cholesterol accumulation in intestine [45]. In fact, LXR activation increases the expression of *ABCA1* [46,47], *ABCG1* [46,47] and *ABCG5/ABCG8* [4] by binding to LXRE in their promoters. *In vivo*, *abca1* regulation is abrogated in macrophages and intestine of LXR $\alpha\beta$ knockout mice, demonstrating that ABC transporters are critical for the ability of LXR to enhance reverse cholesterol transport.

Another mechanism involving LXR and the reverse transport of cholesterol is the induction of apolipoprotein encoding genes, such as *apoE* [48].

2.1.2 LXR and fatty acid metabolism

Repa *et al.* first described the interplay between cholesterol and fatty acid metabolism by demonstrating that the *srebp1c* gene, which encodes a membrane-bound transcription factor of the basic helix-loop-helix-leucine zipper family involved in fatty acid metabolism, was a genuine target gene of LXR. Analysis of the mouse *srebp1c* gene promoter revealed a RXR/LXR DNA-binding site that is essential for this regulation [49]. Schultz *et al.* showed that T09013017 treatment of wild-type mice upregulated *scd1* (stearoyl-CoA desaturase 1), *acc* (acetyl CoA carboxylase) and *fas* (fatty acid synthase), increasing hepatic triglyceride content and plasma triglyceride concentration [21]. These effects are absent in LXR α ^{-/-} but not LXR β ^{-/-} mice, suggesting that LXR α is the main isoform responsible for hepatic lipogenesis and the deleterious effect of LXR activation [26], resulting in elevated levels of circulating triglycerides.

2.2 LXR and glucose homeostasis

Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) is a central regulator of lipid and glucose homeostasis in the liver. It is required for glucose-induced expression of the glycolytic enzyme liver-pyruvate kinase (L-PK) and acts in synergy with SREBP1c to induce lipogenic genes such as ACC and FAS. Even though ChREBP is a LXR target gene [50], LXR stimulation does not promote ChREBP phosphorylation or nuclear localization, unless the intra-hepatic glucose flux is increased [51].

LXR also inhibit gluconeogenesis by downregulating the genes encoding enzymes such as phospho-enolpyruvate-carboxykinase (PEPK), fructose-1,6-biphosphatase (F1-6B) and glucose-6-phosphatase (G6P). Moreover, in white adipose tissue, GW3965 activates expression of the gene encoding GLUT-4, an insulin-sensitive glucose transporter [52]. This results in an increased uptake and utilization of glucose. Murine and human genes encoding GLUT-4 are direct LXR target genes [52]. It has been demonstrated that the activation of LXR β in rat pancreatic islet cells and isolated human islets enhanced glucose-dependent insulin secretion [53,54].

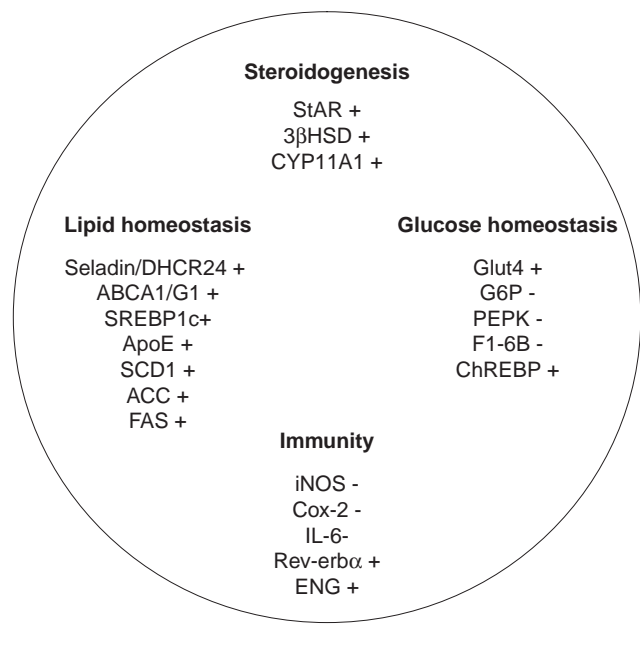


Figure 3. LXR target genes in steroidogenesis, lipid and glucose homeostasis, and immunity. The reported genes correspond to the list mentioned within the text. (+) upregulated gene; (-) down regulated gene.

ABC: ATP-binding cassette; ACC: Acetyl CoA carboxylase; ApoE: Apolipoprotein E; ChREBP: Carbohydrate responsive element binding protein; COX-2: Cyclooxygenase-2; CYP11A1: Cytochrome P450 side-chain cleavage; ENG: Endoglin/CD105; FAS: Fatty acid synthase; F1-6B: Fructose 1,6 biphosphatase; Glut4: Glucose transporter 4; G6P: Glucose-6-phosphatase; 3βHSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; IL-6: Interleukin-6; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; PEPK: Phospho-enol pyruvate kinase; SCD1: Steraoyl-CoA desaturase 1; SREBP1c: Sterol regulatory element binding protein 1c; StAR: Steroidogenic acute regulatory protein.

However, no major effect on circulating insulin concentrations *in vivo* has been reported. LXRβ- but not LXRα-deficient mice develop glucose intolerance and diabetes when fed a high-fat diet [55]. This suggests that insulinemia is mainly controlled by LXRβ *in vivo* [56]. Therefore, activation of LXR lowers circulating glucose concentrations.

2.3 LXR and steroidogenesis

Cummins *et al.* underlined a major role of LXRα in controlling the steroidogenic function of the adrenal [57]. Indeed, corticosterone levels were increased in LXRα-deficient mice as a consequence of upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (*star*), cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 (*cyp11a1*) and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (*3βhsd*), three major steroidogenic genes. Treatment of mice with T0901317 also increased expression of these genes, resulting in enhanced production of corticosterone. Molecular analysis established *star* as a direct target gene of LXR. LXRα also regulates *star* expression in Leydig cells. Indeed T0901317 treatment of wild-type mice induced a strong increase in intra-testicular testosterone as well as *star*

and *3βhsd* transcripts. This effect was abrogated in mice lacking LXRα [58,59]. An induction of *star* transcript by T0901317 was also observed in the ovary [60]. Altogether these data demonstrate that activation of LXRα increases the production of steroids in all the tissues tested so far.

2.4 LXR and immunity

The proinflammatory role of LXR was first described in mouse macrophages where GW3965 reduced LPS-induced expression of proinflammatory factors, including COX-2, iNOS, IL-6 and IL-β [61]. LXR agonists may suppress the transcription of genes encoding iNOS and COX-2 through inhibition of NF-κB [61]. Transcriptional inhibition of the MMP-9-encoding gene was also shown. This enzyme, by degrading extracellular matrix, promotes vascular tissue remodeling and thus development of atherosclerotic plaques. Activation of LXR blocks LPS-induced expression of this gene in macrophages. As expected, this inhibition was lost in LXRαβ^{-/-} mice [62]. Castrillo *et al.* [63] described a cross-talk between LXR and toll-like receptor (TLR) signaling by interferon regulatory factor 3 (IRF3), a specific effector of TLR3/4 that inhibits the transcriptional activity of LXR on its target promoters. When TLR3/4 is enhanced by bacterial or viral pathogens, LXR target genes are inhibited. This modulates cholesterol metabolism in macrophages and their transformation into foam cells. In primary human macrophages, the nuclear receptor Rev-erbα, which inhibits TLR4, is a direct target for LXR [64].

Osteopontin is a proinflammatory cytokine, which stimulates macrophage attraction. T0901317 and GW3965 suppress cytokine-induced osteopontin gene expression in macrophage cell lines and in mice [65].

3. Putative pharmacological targeting

Phenotypic analysis of LXR^{-/-} mice has shown that the lack of one or both LXR isoforms resulted in the development of pathologies mimicking some human diseases. Hence, LXR are thought to be promising pharmacological targets (Figure 4).

3.1 LXR and atherosclerosis

The LXR signaling pathway clearly displays anti-atherogenic properties, both by reducing cholesterol levels and by anti-inflammatory properties. Joseph *et al.* reported that in APOE^{-/-} mice and in LDLR^{-/-} mice fed a high-cholesterol diet, LXR agonists reduce atherosclerotic lesions [66]. Moreover, LXR are also implicated in the physiology of macrophages in which they stimulate the transcription of genes encoding ABC transporters involved in cholesterol efflux (for more details, see 2.1.1.3). This could inhibit their transformation into foam cells in response to lipid loading. WAY-252623 (LXR-623) is a highly selective and orally bioavailable synthetic modulator of LXR, which demonstrated efficacy for reducing the progression of lesions in the mouse LDLR^{-/-} atherosclerosis model. Moschetta's group

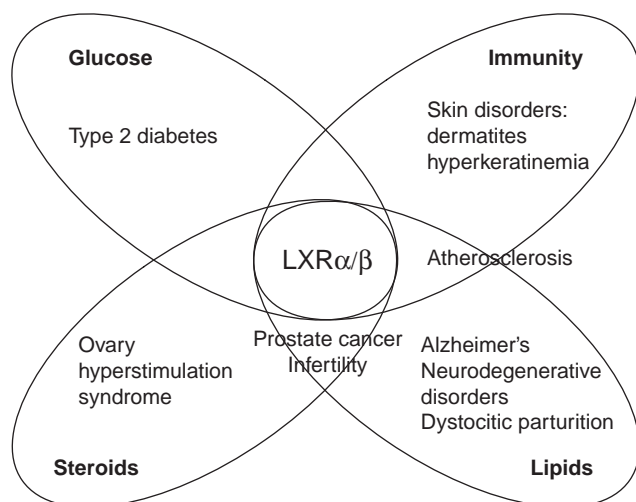


Figure 4. Synthesis of the role of liver X receptor (LXR) in physiology and putative associated diseases. The role of LXR in the control of lipid and glucose homeostasis, immunity and steroidogenesis has been extensively studied. Moreover, careful analysis of LXR-deficient mice led to the proposal of the role of the abnormal LXR-signaling pathway in the development of the indicated diseases. LXR could thus be considered as interesting pharmacological targets, even though many challenges must be solved before the use of LXR agonists in humans.

demonstrated that genetic intestinal-specific LXR activation led to decreased intestinal cholesterol absorption, improved lipoprotein profile, and increased reverse-cholesterol transport *in vivo* in the absence of hepatic steatosis [67]. This protected LDLR-deficient mice from atherosclerosis. This study identified the intestine as a key player in the LXR-driven protective environment against cardiovascular disease [67]. Using a pharmacological approach with GW6340, Yasuda *et al.* [30] showed that intestinal-specific LXR activation promotes macrophage reverse cholesterol transport. ABCA1, ABCG5 and ABCG8 were significantly upregulated in the small intestine, but not in the liver. Two independent mechanisms could account for these observations: increased intestinal HDL production and promotion of intestinal excretion of HDL-derived cholesterol [30]. Hence these data demonstrate that activation of LXR in intestine and macrophages efficiently prevents atherosclerosis.

Likewise, and in contrast with T0901317, LXR-623 treatment was not associated with increased hepatic lipogenesis. In non-human primates with normal lipid levels, LXR-623 significantly reduced total and LDL-cholesterol in a time- and dose-dependent manner. It was also associated with increased expression of the target genes *ABCA1/G1* in peripheral blood cells [68]. These observations suggested that LXR-623 was a promising pharmacological ligand to target atherosclerosis. However, as discussed above, the first clinical trial with this synthetic LXR ligand showed adverse effects [31].

While *ABCA1* and *G1* were upregulated in a dose-dependent manner in peripheral blood, participants presented CNS disorders such as confusion, forgetfulness, palpitations and decreased attention at the highest doses. Although promising, LXR-623 was therefore declared unsuitable for patients.

Human genetics also illuminate LXR as putative pharmacological targets. Indeed analysis of LXR gene sequence in patients with coronary heart disease (CHD) identified, three mutations in the ligand binding domain of *LXRα* [69]. A modeling study revealed that the mutations created conformational changes that could prevent activation of *LXRα* by its natural ligands.

3.2 LXR and diabetes

Diabetes mellitus type 2 is a metabolic disorder that is characterized by high blood glucose in the context of insulin resistance, which is an important contributor to its pathogenesis [70]. Obesity is also a risk factor to the development of this type of diabetes [70]. Treatment of diabetic rodents or mouse models of diet-induced obesity with LXR agonists improves glucose tolerance [52,71]. However, *in vitro* experiments showed that the lipogenic effect of LXR agonists in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes was increased in comparison with healthy control subjects [72]. This study showed that LXR activation could promote triglyceride accumulation in the presence of high glucose concentration in skeletal muscle cells, probably via the induction of the expression of lipogenic enzymes [72], which could represent the dark side of LXR-activation in the muscle. A study on a Swedish population of 559 obese women revealed that one and two single-nucleotide polymorphisms in the non coding regions of *LXRα* and *LXRβ* respectively, were associated with obesity [73]. In conclusion, LXR are key factors in glucose metabolism and could represent alternative targets for clinical management of type 2 diabetes.

3.3 LXR and Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive neuronal degeneration and the accumulation of intracellular inclusions and extracellular deposits of β -amyloid plaques. The main component of these plaques is $A\beta$ peptide produced by the cleavage of the Amyloid precursor protein (APP) by a β -secretase. Epidemiological and biochemical data have suggested a link between cholesterol, APP processing, $A\beta$ peptide, and Alzheimer disease [74]. Indeed, a decreased prevalence of AD is associated with the use of cholesterol-lowering drugs such as statins [75,76], which inhibit HMG-CoA reductase and thus *de novo* synthesis of cholesterol. Koldamova *et al.* evaluated the effect of T0901317 on *abca1* expression in the brain of APP transgenic mice, models of AD. T0901317 significantly enhanced *abca1* expression and downregulated the production of $A\beta$ peptide, suggesting that ABCA1 plays a protective role preventing AD progression [77]. Moreover, the loss of *lrxα* or *lrxβ* in APP23 transgenic mice increases $A\beta$ deposit [78] whereas activation of LXR by T0901317 causes a significant

reduction of the memory deficits observed in the APP23 model, fed a high-fat diet [79]. Zelcer *et al.* [78] also showed that LXR activation decreases the inflammatory response which may be involved in AD. Likewise, seladin-1/DHCR24, a selective AD marker, is a LXR target gene [80]. A recent study has shown that T0901317 significantly decreases amyloid pathology caused by high-cholesterol diet, improving cognitive performance [79]. Altogether these data indicate that LXR may be promising pharmacological targets for the treatment of AD and other neurological conditions characterized by disruption of cholesterol homeostasis. Moreover, two single-nucleotide polymorphisms in LXR β have been associated with AD [81,82], confirming that LXR could be involved in this neurodegenerative disease.

3.4 LXR and skin disorders

LXR is essential for cutaneous barrier function. Both LXR α and LXR β are expressed in human keratinocytes and fetal rat epidermis whereas LXR β is predominantly expressed in mouse epidermis [83,84]. In addition, oxysterols may be formed *de novo* in epidermis by cholesterol oxidation. They could stimulate LXR, resulting in human keratinocytes differentiation through increased expression of involucrin, a protein of the cornified envelope [84]. Studies on LXR $^{-/-}$ mice showed that epidermal differentiation was regulated by LXR β and that oxysterols could induce differentiation and inhibit proliferation through LXR β activation [83]. After acute permeability disruption, ABCA1 expression decreases keratinocyte cholesterol efflux to increase the availability of cholesterol for regeneration of the barrier [85]. *In vivo* studies showed that LXR agonists could reverse aging-associated syndrome in a photo-aging animal model [86] as well as clinical symptoms of atopic dermatitis, an inflammatory chronically relapsing and non-contagious skin disorder, in a mouse model of atopic dermatitis [86,87]. In conclusion, activation of LXR could inhibit skin alterations associated with aging.

3.5 LXR and reproductive tract disorders

In vivo studies have shown that LXR α and LXR β $^{-/-}$ mice had reduced fertility. A decrease in conception and a lower number of pups per litter have been documented [88].

3.5.1 LXR and female reproduction

Although LXR exert a positive effect on steroidogenesis in the adrenal cortex [57], LXR repress steroidogenesis in human ovarian luteal cells [89]. Interestingly, treatment of LXR $^{-/-}$ mice with gonadotropins leads to ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), mimicking the complications observed in women treated for infertility [60]. This syndrome is characterized by ovarian enlargement, associated with an extra vascular fluid concentration, hemorrhagic ovarian *corpora lutea* and elevated estradiol serum levels. It could thus be interesting to investigate the genetic status of LXR in women developing OHSS. LXR may be considered as a new putative target for the prevention of this affection.

LXR are also strongly expressed in mouse and human placenta during development. This suggests a crucial role of LXR in different placental activities such as hormone production, fetomaternal tolerance, lipid metabolism and parturition [90]. Moreover, endoglin/CD105 (ENG), a major gene implicated in placental implantation is a LXR target gene [91]. Endoglin/CD105 is highly expressed in syncytiotrophoblasts and is part of the TGF receptor complex that binds several members of the TGF- β superfamily. In the human placenta, ENG is involved in the inhibition of trophoblast invasion. Treatment of human choriocarcinoma JAR cells with T0901317 leads to a significant increase in ENG mRNA and protein levels. LXR α has been shown to bind and activate the *ENG* promoter in JAR cells. Normal pregnancy is always accompanied by increased oxidation of LDL particles. It could be proposed that increased production of lipid peroxides in the maternal blood during preeclamptic pregnancies may increase internalization of oxLDL in trophoblasts cells. This would activate LXR and increase membrane ENG expression, and, in turn, could enhance the TGF- β 1/3 inhibitory signal, slowing down trophoblast invasion. This would result in precocious disruption of placental adherence and enhancement of the preeclamptic symptoms. Indeed a shallow placentation with abnormal invasion of cytotrophoblasts and incomplete remodeling of uterine spiral arteries is observed in preeclampsia. Interestingly, increased levels of ENG secreted by the placenta have been detected in the maternal circulation before the onset of preeclampsia. It has been postulated that this secreted ENG plays a pathogenic role, contributing to systemic endothelial dysfunction, resulting in hypertension and other systemic manifestations of preeclampsia. In summary, these data suggest that inappropriate expression and/or function of ENG that could result from upregulation by LXR, may contribute to major complications of pregnancy, such as preeclampsia.

LXR β plays a crucial role in the contractile ability of the mouse uterus [92]. Indeed, LXR $^{-/-}$ mice exhibited a marked decrease in *abcg1* accumulation. This change resulted in a phenotype of cholesteryl ester accumulation. Also, a defect in contractile activity induced by oxytocin or prostaglandin F2 α (PGF2 α) was observed in mice lacking LXR β . These results imply that LXR β acts as a safety valve to limit cholesteryl ester levels in the uterus and is necessary for a timely induction of contractions. LXR β is thus a possible novel target to prevent parturition defects in women.

3.5.2 LXR and male reproduction

Male LXR $^{-/-}$ mice show decreased fertility at 5 months of age and complete infertility by the age of 9 months [59,93]. This results in multiple alterations in the male genital tract. Cholesterol ester accumulation induces disorganization of the epithelium of the caput epididymis [93,94]. This accumulation which results from the loss of ABCA1 enhances apoptosis of epithelial cells [95]. LXR are also involved in several testicular functions: i) steroidogenesis, ii) lipid metabolism

and iii) control of the proliferation/apoptosis balance in germ cells. More specifically, $LXR\beta^{-/-}$ mice exhibit cholesterol ester accumulation in Sertoli cells and a decrease in germ cell proliferation. On the other hand, $LXR\alpha^{-/-}$ mice present decreased testosterone synthesis and lower plasma LH concentration as well as an increase in germ cell apoptosis [58,59]. Hence, cooperative functions of $LXR\alpha$ and $LXR\beta$ maintain both testis structure and function. The lack of LXR impairs the fertility of aging, but not of young mice. Therefore, LXR signaling disruption in the male reproductive tract could be considered as a risk factor involved in premature loss of fertility observed in some men. It could be that a drug activating LXR could also improve testicular functions.

3.6 LXR and cancer

Treatment of hormone-dependent cancers by LXR agonists seems promising. Indeed T0901317 shows anti-proliferative (induction of *p21* and *p27* with a concomitant reduction in phospho-RB protein levels) and pro-apoptotic (caspase-3 and B-cell leukemia/lymphoma associated X protein (BAX) gene expression) characteristics on a cell model of ovarian carcinoma [96].

In breast cancer cell lines, activation of LXR significantly reduced proliferation by the suppression of mRNA and/or protein expression of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), cyclin A2, cyclin D1 and estrogen receptor (ER) alpha, whereas it increased the expression of p53 at the protein level and maintained the retinoblastoma protein in a hypophosphorylated active form. The authors suggested that these changes may constitute part of the molecular mechanisms behind the antiproliferative effect of LXR [97]. Interestingly, Kim *et al.* showed that in absence of ligand, $LXR\alpha$ interacts with an ubiquitin E3-ligase protein complex containing breast and ovarian cancer susceptibility 1 (BRCA1)-associated RING domain 1 (BARD1) [98]. As expected, LXR ligand represses ubiquitination and degradation of $LXR\alpha$, and the interaction between $LXR\alpha$ and BARD1. This ligand effect might be critical for the early step of transcriptional activation of ligand-stimulated $LXR\alpha$, through a stable binding of $LXR\alpha$ to the promoters of target genes.

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death in men [99]. It is now well established that androgens play a crucial role in development and progression of prostate cancer [100]. Androgen ablation is the prevalent therapy for this type of cancer. However, several risk factors have also been described, among which are environmental factors. Epidemiological studies have shown that Chinese populations with low risk of developing prostate cancer had an increased risk of prostate cancer after migration to the USA. This environmental effect was attributed to the deleterious effect of lipids on this cancer [101]. Consistent with this hypothesis, a clinical study revealed that hypercholesterolemia increases prostate cancer risk [102] while statin treatment was associated with a lower risk of metastatic prostate cancer [103,104]. Several groups have thus investigated

the roles of LXR in prostate physiology. T0901317 decreases the number of proliferating cells [105,106] and induces apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP [105,106]. *In vivo* oral administration of T0901317 slows tumor growth of LNCaP cells transplanted into athymic mice [107]. These activities have been attributed to induction of ABC transporters [107] and disruption of lipid raft signaling activity [106]. Taken together, these data suggest that impaired LXR signaling contributes to prostate cancer progression and indicate the potential use of LXR agonists as pharmacological agents in cancer prevention.

Another frequent prostatic pathology is the benign prostate hyperplasia (BPH) that affects 80% of men over the age of 50 years. $LXR\alpha^{-/-}$ mice present BPH-like features in the ventral prostate. They are characterized by proliferative epithelial cells, multiple layers of dense stroma surrounding the prostatic ducts and dilated prostatic ducts [108]. Therefore, LXR agonists could also prevent or control BPH in patients.

4. Conclusion

In the last decade, phenotype analyses of LXR-deficient mice have allowed the association of LXR-signaling pathways dysfunction with several human pathologies. These include reproductive (germ cell apoptosis, parturition defects, *in vitro* fertilization side-effects) and metabolic disorders (type 2 diabetes, hypercholesterolemia), nervous system alterations (Alzheimer disease, neurodegenerative diseases), dermatological affections (skin aging, atopic dermatitis) and hormone-dependent cancers (ovarian, breast and prostate). Development of LXR synthetic agonists has allowed the identification of new target genes. These are involved in the control of various physiological processes such as cholesterol and triglyceride synthesis, glycemia, steroidogenesis and inflammation. Although *in vitro* studies showed that $LXR\alpha$ and $LXR\beta$ could be considered as interchangeable isoforms, *in vivo* analyses have shown that they do not have redundant functions even when expressed in the same cell type at similar levels.

5. Expert opinion

Before considering acting directly on LXR transactivation capacities in human, several questions still have to be addressed. A good pharmacological agonist should be efficient at low plasma concentration and should provide the highest specificity of action. At least, three aspects should be taken into account: i) bio-availability of the ligands; ii) LXR isoform specificity; iii) tissue specificity. If this is to be achieved, it becomes quite obvious that the screening of new ligands solely by hybrid reporter gene systems is inappropriate.

- 1) As LXR are ligand-activated transcription factors, the availability of the agonists, natural or not, is of primary importance. Indeed, when YT-32 was initially

identified as a cholesterol-lowering agent in the absence of hypertriglyceridemic effect [29], Makishima's group suspected the inability of YT-32 to be transported to the liver. Similarly GW6340 has been described to be an intestine-specific LXR activator [30]. Building on these observations it can be suggested that an oxysterol-like molecule has a good chance of being efficient in the intestinal regulation of cholesterol absorption. In contrast, a topical agonist must be engineered to prevent systemic distribution, to avoid any side-effects such as increased hepatic triglyceride production or elevated steroid synthesis by the gonads.

- 2) Enumeration of the physiological roles of LXR shows that LXR α and LXR β are not fully interchangeable. It is thus important to develop isoform-specific ligands. For example, the development of a brain-available ligand, specific to LXR β , would be indicated for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Conversely, development of LXR α -specific ligands would be useful for the treatment of atherosclerosis. From an academic point of view, the development of isoform-specific ligands would also facilitate the screening of new isoform-specific target genes.
- 3) Crystallographic analyses showed that T0901317 and GW3965 were both able to stabilize LXR β helix 12 and to maintain the receptor in a favorable conformation [109]. In both cases, the position of helix 12 is similar. However the remaining ligand-binding domain presents a different conformation demonstrating its plasticity. Hence, the activity of a ligand could be modulated by specific cofactors that would alter its effects. Such a phenomenon has already been described for the SERMs raloxifen and tamoxifen. It thus seems important to understand how the cellular context could modulate LXR activation by a given molecule. This

would allow the development of selective LXR modulators (SLiMs) to bypass any potential side effects. As in the case of SERMs, SLiMs would have the possibility of activating LXR in specific tissues, for example in the intestine, but not in others. So far, the available SLiMs seem to be YT-32 [29] and GW6340 [30].

Some of the putative LXR target diseases can be considered long-term chronic pathologies (neuron degeneration, type 2 diabetes or cancers). Their incidence could be lowered by the development of prophylactic treatments such as preventive nutrition. Natural LXR agonist compounds have been described in fungi, plants and sea organisms (see section 1.3). Screening of new molecules considered as nutraceuticals could be of interest in order to subtly alter LXR activity and thus take full advantage of the therapeutic and protective effects of LXR agonists.

Acknowledgements

We thank Dr Pradeep A Val (UMR GReD CNRS 6247, Aubière, France) for his help in manuscript editing and fruitful scientific discussions.

Declaration of interest

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue Allier contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Fondation BNP-Paribas research grants. E Viennois is funded by Région Auvergne and Fond Européen de Développement Régional (FEDER). AJC Pommier and J Dufour are funded by Ministry of Education, Research and Technology (MNERT). A Oumeddour is a recipient of a grant from the Algerian Government (Programme National Exceptionnel). The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

Papers of specials note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

1. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:459-81
2. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995;9:1033-45
3. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, et al. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383:728-31
- **This is a paper demonstrating that oxysterols activate LXR. It suggested that they could be the physiological ligands for LXR.**
4. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, et al. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002;277:18793-800
5. Nuclear Receptors Signaling Atlas. Bethesda, MD: Nuclear Receptors Signaling Atlas consortium, 2003 - 2010 Available from: www.nursa.org [Last accessed 14 December 2010]
6. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, et al. Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2004;28:279-93
7. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997;272:3137-40
8. Li X, Zhang S, Blander G, et al. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 2007;28:91-106
9. Hu X, Li S, Wu J, et al. Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol* 2003;17:1019-26
10. Lazar MA. Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 2003;1:e001
11. Lee S, Lee J, Lee SK, et al. Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. *Mol Endocrinol* 2008;22:1312-19
12. Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, et al. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J* 2003;22:4625-33
13. Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 2000;80:361-554
14. Bjorkhem I. Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo? *J Lipid Res* 2009;50(Suppl):S213-18
15. Yang C, McDonald JG, Patel A, et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 2006;281:27816-26
16. Song C, Hiipakka RA, Liao S. Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* 2000;65:423-7
17. Ondeyka JG, Jayasuriya H, Herath KB, et al. Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors. *J Antibiot (Tokyo)* 2005;58:559-65
18. Jayasuriya H, Herath KB, Ondeyka JG, et al. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J Nat Prod* 2005;68:1247-52
19. Huang TH, Razmovski-Naumovski V, Salam NK, et al. A novel LXR-alpha activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1298-308
20. Li X, Yeh V, Molteni V. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007 - 2009). *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:535-62
21. Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:2831-8
22. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 2002;45:1963-6
23. Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, et al. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab* 2004;83:184-7
24. Shenoy SD, Spencer TA, Mercer-Haines NA, et al. CYP3A induction by liver X receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 2004;32:66-71
25. Mitro N, Vargas L, Romeo R, et al. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 2007;581:1721-6
26. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002;277:11019-25
27. Lund EG, Peterson LB, Adams AD, et al. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol* 2006;71:453-63
28. Bradley MN, Hong C, Chen M, et al. Ligand activation of LXRbeta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXRalpha and apoE. *J Clin Invest* 2007;117:2337-46
29. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, et al. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003;278:36091-8
- **This study presents for the first time, to our knowledge, a compound (YT-32) lowering the plasma cholesterol level without any hypertriglyceridemic effect. This compound could be considered as the first SLiM.**
30. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:781-6
- **This article reports the first intestine-specific LXR agonist, to our knowledge. This compound could also be considered as a SLiM.**
31. Katz A, Udata C, Ott E, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 2009;49:643-9
- **This is the first trial, to our knowledge, performed on human with the LXR agonist LXR-623.**

Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?

32. DiBlasio-Smith EA, Arai M, Quinet EM, et al. Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J Transl Med* 2008;6:59
33. Hu B, Unwalla RJ, Goljer I, et al. Identification of phenylsulfone-substituted quinoxaline (WYE-672) as a tissue selective liver X-receptor (LXR) agonist. *J Med Chem* 2010;53:3296-304
34. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 2002;277:1705-11
35. Ou J, Tu H, Shan B, et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6027-32
36. Qin Y, Dalen KT, Gustafsson JA, et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:140-7
37. Herath K, Jayasuriya H, Ondeyka JG, et al. Guttiferone I, a new prenylated benzophenone from *Garcinia humilis* as a liver X receptor ligand. *J Nat Prod* 2005;68:617-9
38. Tamehiro N, Sato Y, Suzuki T, et al. Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) alpha agonist and an LXRbeta antagonist. *FEBS Lett* 2005;579:5299-304
39. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:266-71
40. Thomas J, Bramlett KS, Montrose C, et al. A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) versus liver X receptor. *J Biol Chem* 2003;278:2403-10
41. Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 1999;284:757-60
42. Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXRalpha. *Cell* 1998;93:693-704
- **This article elucidated for the first time the physiological role of LXR in the regulation of cholesterol homeostasis.**
43. Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 2001;262:257-65
44. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999;22:336-45
45. Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, et al. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat* 2001;18:359-60
46. Costet P, Luo Y, Wang N, et al. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000;275:28240-5
47. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, et al. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 2001;276:39438-47
48. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:507-12
49. Repa JJ, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000;14:2819-30
50. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007;282:743-51
51. Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, et al. ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 2008;118:956-64
52. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5419-24
53. Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, et al. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2004;53(Suppl 3):S75-8
54. Ogiwara T, Chuang JC, Vestermark GL, et al. Liver X receptor agonists augment human islet function through activation of anaplerotic pathways and glycerolipid/free fatty acid cycling. *J Biol Chem* 2010;285:5392-404
55. Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, et al. LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 2005;280:23024-31
56. Zitzer H, Wente W, Brenner MB, et al. Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 2006;147:3898-905
57. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, et al. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 2006;116:1902-12
58. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007;21:1014-27
59. Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, et al. The liver X receptor-beta is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* 2005;146:2519-30
60. Mouzat K, Volat F, Baron S, et al. Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* 2009;150:3369-75
61. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003;9:213-9
62. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, et al. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 2003;278:10443-9
63. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, et al. Crosstalk between LXR and toll-like

- receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2003;12:805-16
64. Fontaine C, Rigamonti E, Pourcet B, et al. The nuclear receptor Rev-erbalpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol Endocrinol* 2008;22:1797-811
65. Ogawa D, Stone JF, Takata Y, et al. Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ Res* 2005;96:e59-67
66. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7604-9
67. Lo Sasso G, Murzilli S, Salvatore L, et al. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* 2010;12:187-93
- **This article underlines that LXR activation in macrophage and intestine prevents atherosclerosis.**
68. Quinet EM, Basso MD, Halpern AR, et al. LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. *J Lipid Res* 2009;50:2358-70
69. Dave VP, Kaul D, Sharma Y, et al. Functional genomics of blood cellular LXR-alpha gene in human coronary heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:536-44
70. Misra A, Khurana L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:S9-S30
71. Cao G, Liang Y, Broderick CL, et al. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:1131-6
72. Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, et al. Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* 2005;54:1108-15
73. Dahlman I, Nilsson M, Jiao H, et al. Liver X receptor gene polymorphisms and adipose tissue expression levels in obesity. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:881-9
74. Martin M, Dotti CG, Ledesma MD. Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochim Biophys Acta* 2010;1801:934-44
75. Jick H, Zornberg GL, Jick SS, et al. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000;356:1627-31
76. Wolozin B, Kellman W, Russeau P, et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 2000;57:1439-43
77. Koldamova RP, Lefterov IM, Staufenbiel M, et al. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2005;280:4079-88
78. Zelcer N, Khanlou N, Clare R, et al. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver X receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:10601-6
79. Fitz NF, Cronican A, Pham T, et al. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci* 2010;30:6862-72
80. Wang Y, Rogers PM, Stayrook KR, et al. The selective Alzheimer's disease indicator-1 gene (Seladin-1/DHCR24) is a liver X receptor target gene. *Mol Pharmacol* 2008;74:1716-21
81. Adighibe O, Arepalli S, Duckworth J, et al. Genetic variability at the LXR gene (NR1H2) may contribute to the risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006;27:1431-4
- **This article describes for the first time, to our knowledge, an association between a LXRbeta polymorphism and Alzheimer disease.**
82. Infante J, Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, et al. Gene-gene interaction between heme oxygenase-1 and liver X receptor-beta and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging* 2010;31:710-14
83. Komuves LG, Schmutz M, Fowler AJ, et al. Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 2002;118:25-34
84. Hanley K, Ng DC, He SS, et al. Oxysterols induce differentiation in human keratinocytes and increase Ap-1-dependent involucrin transcription. *J Invest Dermatol* 2000;114:545-53
85. Jiang YJ, Lu B, Kim P, et al. Regulation of ABCA1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J Lipid Res* 2006;47:2248-58
86. Chang KC, Shen Q, Oh IG, et al. Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol Endocrinol* 2008;22:2407-19
87. Hatano Y, Man MQ, Uchida Y, et al. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:160-9 e1-5
88. Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, et al. Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. *Mol Cell Endocrinol* 2006;256:9-16
89. Drouineaud V, Sagot P, Garrido C, et al. Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol Hum Reprod* 2007;13:373-9
90. Marceau G, Volle DH, Gallot D, et al. Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;283:175-81
91. Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, et al. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod* 2008;78:968-75
92. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, et al. Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 2007;282:4693-701
93. Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, et al. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 2004;33:361-75
94. Saez F, Chabory E, Cadet R, et al. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J Androl* 2007;9:574-82
95. Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, et al. LXR and ABCA1 control cholesterol

Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?

- homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J Lipid Res* 2009;50:1766-75
96. Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, et al. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res* 2010;3:13
97. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, et al. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2009;30:575-9
98. Kim KH, Yoon JM, Choi AH, et al. Liver X receptor ligands suppress ubiquitination and degradation of LXRalpha by displacing BARD1/BRCA1. *Mol Endocrinol* 2009;23:466-74
99. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361:859-64
100. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin* 1972;22:232-40
101. Watanabe M, Nakayama T, Shiraishi T, et al. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol Oncol* 2000;5:274-83
102. Magura L, Blanchard R, Hope B, et al. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 2008;19:1259-66
103. Platz EA, Leitzmann MF, Visvanathan K, et al. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1819-25
104. Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, et al. Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 2005;162:318-25
105. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, et al. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:7686-9
106. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 2010;29:2712-23
- **This article shows that apoptosis could be targeted in prostate cancer using an LXR agonist.**
107. Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, et al. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004;64:7682-5
108. Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, et al. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:558-63
109. Farnegardh M, Bonn T, Sun S, et al. The three-dimensional structure of the liver X receptor beta reveals a flexible ligand-binding pocket that can accommodate fundamentally different ligands. *J Biol Chem* 2003;278:38821-8
110. Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, et al. Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-function study. *J Biol Chem* 2000;275:24022-31
111. Mouzat K, Alves G, Pommier A, et al. Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction. *Med Sci (Paris)* 2009;25:141-4

Affiliation

Emilie Viennois^{1,2,3}, Aurélien JC Pommier^{1,2,3}, Kévin Mouzat⁴, Abdelkader Oumeddour^{1,2,3,5}, Fatim-Zohra El Hajjaji^{1,2,3}, Julie Dufour^{1,2,3}, Françoise Caira^{1,2,3}, David H Volle^{1,2,3}, Silvère Baron^{1,2,3} & Jean-Marc A Lobaccaro^{†1,2,3,6}
†Author for correspondence
¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
²CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 Aubiere, France
³Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France
⁴Laboratoire de Biochimie, Hôpital Universitaire Carémeau - Place du Pr. Robert Debré - F-30029 Nîmes, France
⁵Laboratoire d'Endocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria
⁶“Génétique Reproduction et Développement”, Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France
E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

Article 3 : *Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health?*

Publié dans *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2011 Sep 1. [Epub ahead of print]

Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Review

Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health?

Emilie Viennois^{a,b,c}, Kevin Mouzat^d, Julie Dufour^{a,b,c}, Laurent Morel^{a,b,c}, Jean-Marc Lobaccaro^{a,b,c,*},
Silvère Baron^{a,b,c}^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France^b CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 Aubière, France^c Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France^d Laboratoire de Biochimie, Hôpital Universitaire Carêmeau, Place du Pr. Robert Debré, F-30029 Nîmes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxx

Keywords:

Liver X receptors
Pharmacology
SLiMs
Human pathologies
Cholesterol
Nuclear receptors

ABSTRACT

Liver X receptors (LXR) are members of the nuclear receptor family. As activated transcription factors, their putative association with human diseases makes them promising pharmacological targets because of the large potential to develop ligands. LXR are mainly considered as intracellular cholesterol “sensors” whose activation leads to decreased plasma cholesterol. They also modulate numerous physiological functions: fatty acid synthesis and metabolism, glucose homeostasis, steroidogenesis, immunity, and neurological homeostasis. LXR-deficiency in mouse results in several phenotypes mimicking pathological conditions in humans. This review will be focused on the various natural and synthetic LXR agonists and antagonists. Putative clinical targets including atherosclerosis, diabetes, Alzheimer's disease, skin disorders, and cancer will be covered.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
1.1. LXR structure	00
1.2. Mechanism of action	00
2. Activator ligands	00
2.1. Endogenous agonists: oxysterols and other sterols	00
2.2. Ligands from microbial and plants	00
2.3. Synthetic agonists	00
3. Antagonists and inhibitors ligands	00
3.1. Natural antagonists	00
3.2. Synthetic antagonists	00
4. From physiological function to pathology	00
4.1. LXR and cancer	00
4.1.1. LXR and hormone-dependant cancer	00
4.1.2. LXR and colon cancer	00
4.2. LXR and skin disorders	00
4.3. LXR and Alzheimer's disease	00
4.4. LXR and atherosclerosis	00
4.5. LXR and inflammation	00
4.6. LXR and diabetes	00
5. Conclusion	00
Acknowledgments	00
References	00

* Corresponding author. Address: Génétique Reproduction et Développement, Unité Mixte de Recherche CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. Tel.: +33 4 73 40 74 16; fax: +33 4 73 40 70 42.

E-mail address: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr (J.-M. Lobaccaro).

0303-7207/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.mce.2011.08.036

Please cite this article in press as: Viennois, E., et al. Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? Molecular and Cellular Endocrinology (2011), doi:10.1016/j.mce.2011.08.036

1. Introduction

Nuclear receptors are molecular regulators of gene transcription and intracellular function. Some of them are ligand-activated proteins that control various biological events varying from cell differentiation and development to lipid metabolism and energy homeostasis. Among the nuclear receptors, liver X receptors (LXR) α (Willy et al., 1995; NRIH3) and β (Shinar et al., 1994; Song et al., 1994; NRIH2) were discovered in the mid 90's. Although originally discovered as pivotal regulators of cholesterol homeostasis (Peet et al., 1998), the known roles of LXRs continue to grow with the study of many cell types and animal models. Thus far, there is evidence that LXR is involved in the following physiological functions: *de novo* synthesis of cholesterol (Wang et al., 2008a,b), excretion (reviewed in Repa and Mangelsdorf, 2000) and detoxification of bile acids (Barbier et al., 2009) or lipids (Volle et al., 2004), glucose homeostasis (Cha and Repa, 2007), immunity (reviewed in Zeller and Tontonoz, 2006), skin development and homeostasis (Demerjian et al., 2009) and neurological functions (Koldamova and Lefterov, 2007) and reviewed in (Leoni and Caccia, 2011). LXR α was initially described as highly expressed in a restricted subset of tissues known to play an important role in lipid metabolism such as liver, small intestine, kidney, spleen and adipose tissue whereas LXR β was found to be expressed more ubiquitously (www.nursa.org). Since their identification as orphan receptors, oxidized derivatives of cholesterol, known as oxysterols (for a review see Schroepfer, 2000), deorphanized both LXRs (Janowski et al., 1996; Janowski et al., 1999). Because LXR deficiency has been associated with various human-like diseases in mice, these receptors are promising pharmacological targets due to the enormous potential to develop ligands. The present review will thus be focused on the various known LXR ligands and their potential use in human health.

1.1. LXR structure

As members of the nuclear receptor superfamily, LXRs are composed of four independent domains (for an extensive review about

LXR structure see (Viennois et al., 2011): (i) an amino-terminal domain (A/B domain) containing an activating function AF1, which permits the recruitment of ligand-independent co-activators; (ii) a DNA-Binding Domain (DBD) characterized by two zinc fingers; (iii) a hinge domain that permits the recruitment of co-repressors in absence of ligands; and (iv) a carboxy-terminal domain, containing a hydrophobic ligand-binding domain (LBD), which is required for dimerization, and a transactivation domain (AF-2), which recruits co-activators.

1.2. Mechanism of action

(Fig. 1) LXR α and LXR β usually form obligatory heterodimers with retinoid X receptor, the receptor of 9-*cis* retinoid acid (Willy et al., 1995; Willy and Mangelsdorf, 1997). Both also bind to a non-canonical responsive element on the renin promoter to regulate renin transcription (Morello et al., 2005). In this conformation LXR α functions as a cAMP activated factor (Tamura et al., 2000) while LXR β seems to be inversely affected by cAMP (Morello et al., 2005). When bound to RXR in absence of ligand, acetylated LXR is located on LXR responsive element (LXRE) in the promoter of the target genes. The consensus LXRE sequence consists of two direct repeats of hexameric nucleotides, AGGTCA, separated by four or one nucleotide(s) (DR4 or DR1). The heterodimer interacts with either a co-repressors, nuclear receptor co-repressor (N-CoR), or silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptors (SMRT) (Hu et al., 2003), which block transcription by recruitment of histone deacetylase through the interaction with proteins such as stress activated MAP kinase interacting protein 3A (Sin3A) (Lazar, 2003). When the ligand of one of the two partners binds to the heterodimer, it leads to conformational changes that induce the release of the co-repressors, the recruitment of specific co-activators such as activating signal cointegrator-2 (ASC-2) (Lee et al., 2008) on the AF-2 domain (Svensson et al., 2003), the interaction with histone acetyl transferase leading to the transcription of the target genes (reviewed in Viennois et al., 2011).

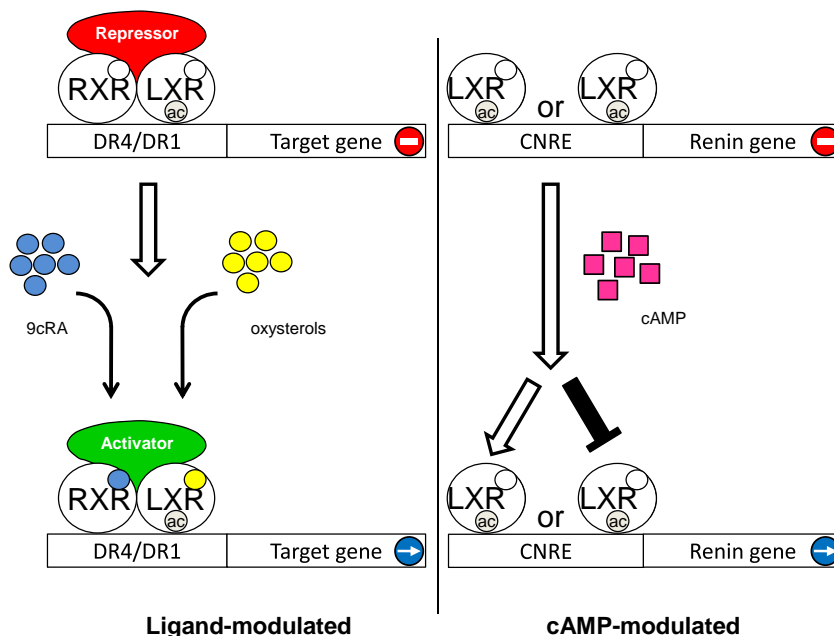


Fig. 1. Schematic view of LXR modulation of gene transcription. LXR α or LXR β usually bind RXR, the receptor for 9-*cis* retinoid acid, on a DR4 or a DR1 element. In absence of ligand RXR/LXR heterodimer is silenced by corepressors. The binding of their respective ligands (9 *cis* RA and/or oxysterols) induces conformational changes that allow corepressor departure and coactivator recruitment. On the renin promoter, both LXR can bind as a monomer on a CNRE. Their transcriptional activity is modulated by cAMP. For more details, see text.

2. Activator ligands

Traditional pharmacology states that a ligand can be either classified as agonist (full or partial), antagonist or inverse agonist, though this last type has never been described in either of the LXR. Due to the various diseases LXR α and/or LXR β are associated with (see above), these nuclear receptors are promising pharmacological targets. This explains why numerous drug companies have been developing a large variety of natural or synthetic agonists. However, LXR α and LXR β could be expressed in the same cells. It is thus important to have molecules that could selectively modulate each isoform. The other important point is the necessity to target this modulation specifically in the affected organ and make the ligand bio-available. Hence, the development of such *selective Liver X modulators* (SLiMs) will be the challenge in the future. This will prevent deleterious side effects. From previous studies, it appears that activating or inhibiting characteristics of LXR-ligands are dependent of the amino acid sequence of each LXR isoform, despite a clear homology. The cellular context should also be taken into account: for example, the sequence of the response elements within the promoter or the intracellular enzymes that could modify ligand activity. In general, SLiMs may apply a similar philosophy as that of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) such as raloxifen and tamoxifen.

2.1. Endogenous agonists: oxysterols and other sterols

Oxidized or hydroxylated metabolites of cholesterol known as oxysterols (Schroepfer, 2000) have been described to be the *bona fide* ligands for LXRs (Janowski et al., 1996). Two sources of oxysterols should be considered on mammals: (i) endogenous, by enzymatic or chemical synthesis; (ii) exogenous, by nutritional supply. The first screenings of LXR ligand have been performed by double hybrid

experiments using the LXR α LBD associated with the DBD of GAL-4 (Janowski et al., 1996). Oxysterols showing the greatest induction factors were 22(R)-hydroxycholesterol, 20(S)-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol, 7 α -hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol (Fig. 2). Besides, 24-cetocholesterol, 25-hydroxycholesterol and 24(S),25-epoxycholesterol have also been shown to be good LXR α and LXR β activators (Lehmann et al., 1997) (Fig. 2). Interestingly, the nature of oxysterols depends on the site of synthesis: 22(R)-hydroxycholesterol in steroidogenic tissues, 24(S)-hydroxycholesterol (or cerebrosterol) in brain and plasma, 24(S),25-epoxycholesterol in liver, and 27-hydroxycholesterol in plasma and macrophages. In 1999, Janowski et al. (1999) synthesized and tested a series of related compounds. Their work revealed that position-specific monooxidation of the sterol side chain was requisite for LXR high-affinity binding and activation. Enhanced binding and activation could also be achieved through the use of 24-oxo ligands that act as hydrogen bond acceptors in the side chain. In addition, introduction of an oxygen on the sterol B-ring results in a ligand with LXR α selectivity. The ultimate demonstration that oxysterols were the true LXR ligands *in vivo* came from Russell's group (Chen et al., 2007): forced expression of cholesterol sulfotransferase, an enzyme that metabolizes oxysterol ligands, led to inactivation of LXR signaling in cell lines and cholesterol-fed mice. Also, genetic elimination of three oxysterol biosynthetic enzymes attenuated the response of some, but not all, LXR target genes in mouse liver.

Other cholesterol-derived molecules, such as follicular fluid meiosis activating sterol (FF-MAS), may also activate LXR α (Ruan et al., 1998). Likewise, desmosterol, a cholesterol precursor produced from zymosterol, could also activate LXR (Yang et al., 2006) (Fig. 3A).

Bile acid pathway-derived molecules have also been proposed as putative LXR ligands. Indeed, even though bile acids are the nuclear receptor FXR ligands (Makishima et al., 1999), cholestenic

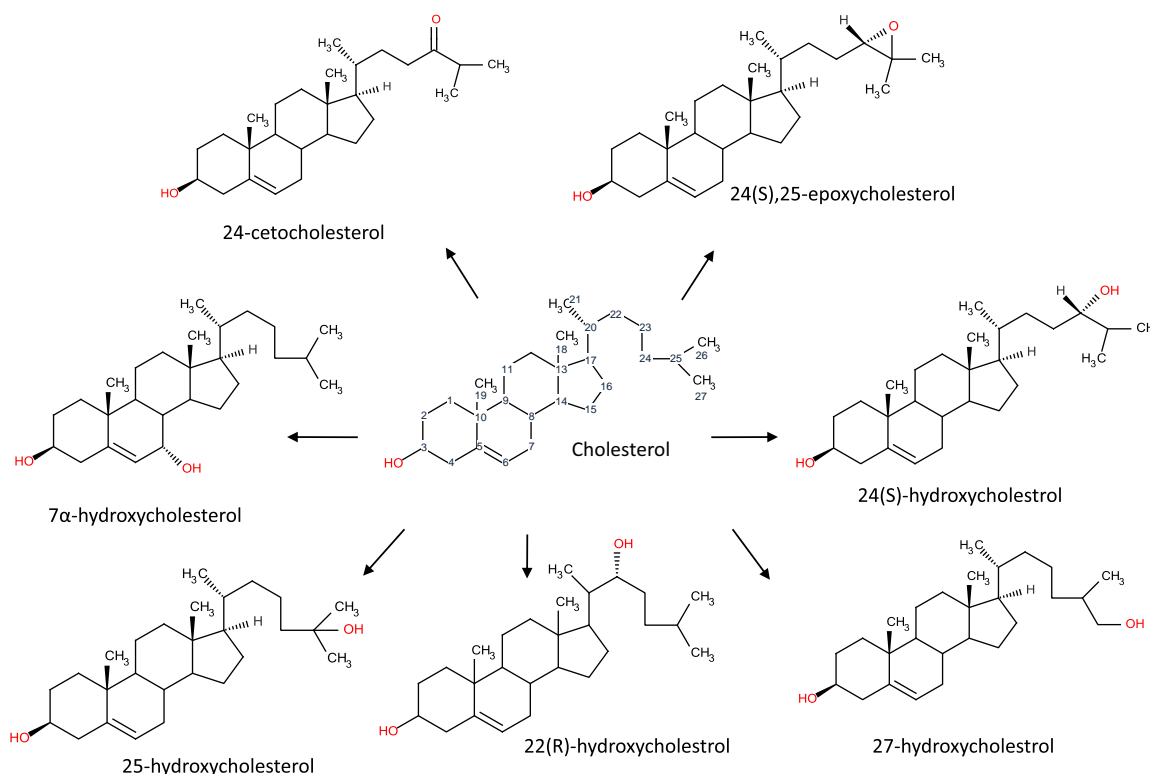


Fig. 2. Natural agonist ligands, the oxysterols. Cholesterol chemical structure is represented and carbon atoms are numbered. The name of each oxysterol depends on the hydroxyl group position.

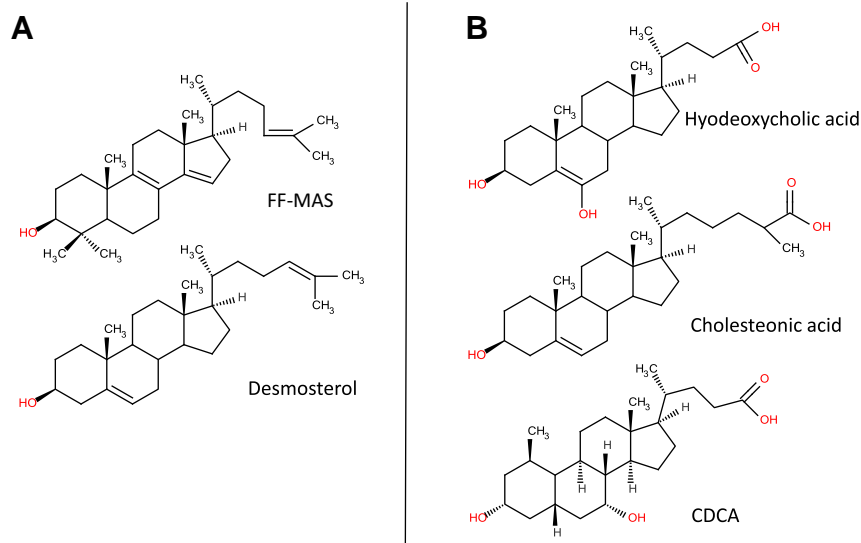


Fig. 3. Natural agonists, other cholesterol deriving sterols. (A) FF-MAS and demosterol chemical structure, molecules derived from cholesterol biosynthesis pathway, upstream cholesterol. FF-MAS, Follicular Fluid Meiosis Activating Sterol. (B) LXR agonists derived from Bile acids biosynthesis pathway. CDCA, chenodeoxycholic acid. Note that CDCA does not activate LXR.

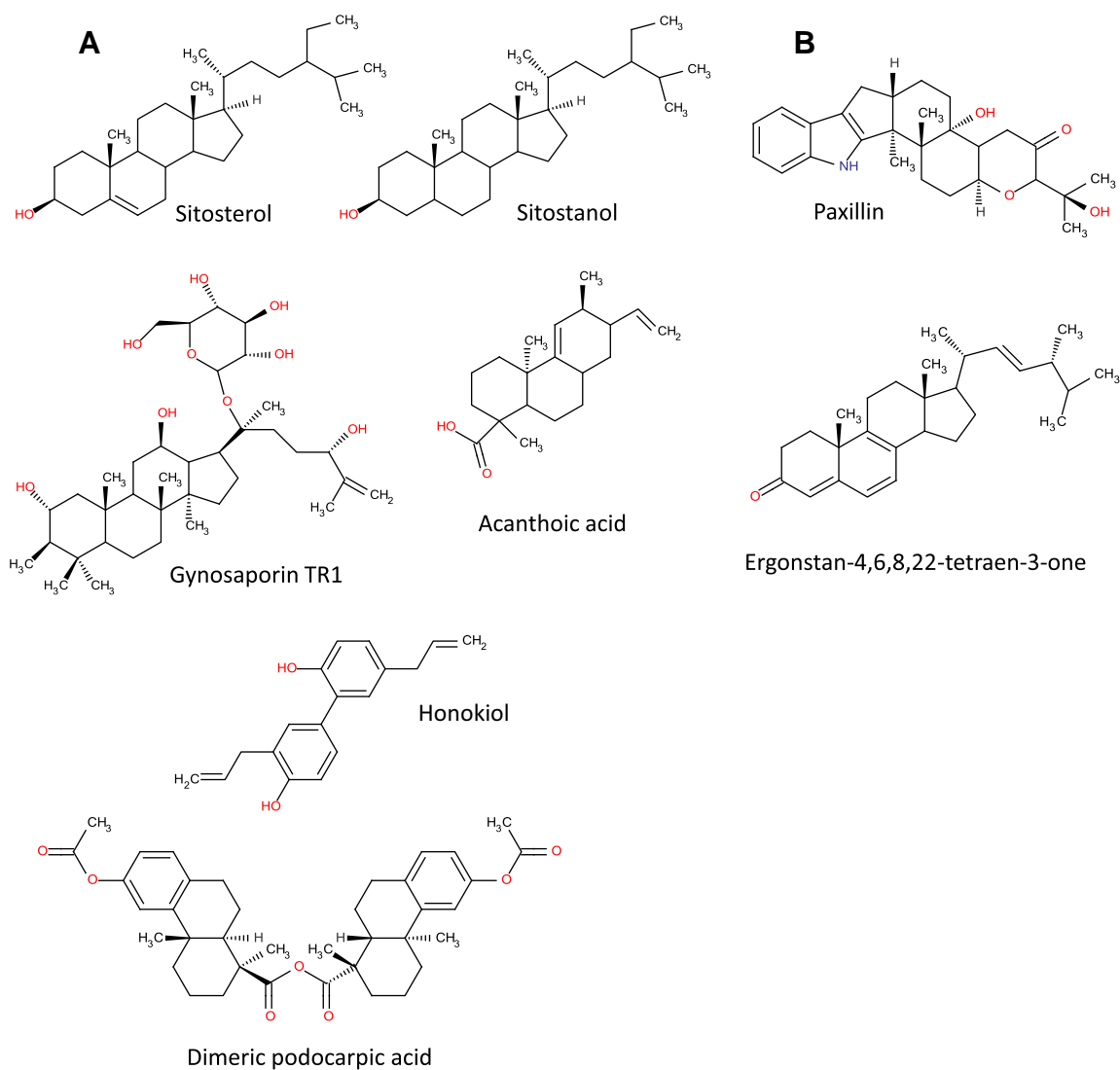


Fig. 4. LXR activators derived from plants (A) and fungi (B).

acid, chenodeoxycholic acid (CDCA) precursor, is able to induce transcriptional activity of LXR α and β on gene reporter assay (Song and Liao, 2000). Likewise, the same group described 6 α -hydroxylated bile acids (notably hyodeoxycholic acid) as selective activators of LXR α (Song et al., 2000) (Fig. 3B).

2.2. Ligands from microbial and plants

Over the last decade various plant sterols and stanols, which are structurally related to cholesterol, have been identified as LXR activators since they are the natural occurring equivalent of mammalian cholesterol (Fig. 4). Therefore, sitosterol and sitostanol, derived from the 4-desmethylsterol family, activated both LXR α and LXR β and increased expression of ATP Binding Cassette A1, ABCA1 in Caco-2 cells (Plat et al., 2005). Gynosaponin TR1, isolated from the herbal medicine, *Gynostemma pentaphyllum*, an herbaceous vine of the *Cucurbitacea* family, demonstrated greater selectivity toward activation of the LXR α isoform than LXR β in HEK293 cells (Huang et al., 2005). Acanthoic acid from *rollinia*, an exotic tropical fruit, selectively activates LXR α in HEK-293 cells (Jayasuriya et al., 2005) and both isoforms in macrophages lead to cholesterol efflux (Traves et al., 2007). Podocarpic acid is a natural activator derived from plant resins. This molecule gets its name from Podocarpus from which it was extracted. It has been reported that podocarpic acid is able to bind to LXR α and β . In hamster and mice models, it increases plasma HDL with concomitant decrease of plasma LDL (Singh et al., 2005). More recently, honokiol, extracted from the bark of *Magnolia abovata*, a native Japanese Magnioli, has been showed to be an activator of the LXR/RXR heterodimer and its ABCA1 target gene in peritoneal macrophages, excluding foam cells (Kotani et al., 2010). However, it is not known whether honokiol directly binds RXR and/or LXR α . Besides plants, some fungal derivatives may also activate LXR (Fig. 4), such as Paxillin from *Penicillium paxilli* (Bramlett et al., 2003), or ergostan-4,6,8,22-tetraen-3-one, a ergostane derviate from *Tolypocladium niveum*, a Norwegian soil fungus (Ondeyka et al., 2005).

2.3. Synthetic agonists

The discovery of the hypocholesterolemia potency of LXR at the end of the 90's (Peet et al., 1998) motivated many pharmacological companies to develop LXR ligands (for an exhaustive review see Li et al., 2010). Among them, a non steroidal compound, T0901317 (Fig. 5) is the most commonly used synthetic ligand in fundamental research. However, this compound is not completely selective for LXR since it is able to activate PXR or FXR at high concentrations (Houck et al., 2004; Mitro et al., 2007; Shenoy et al., 2004). T0901317 has also been found to be a very effective ROR α and ROR γ inhibitor (Kumar et al., 2010). A screening of GlaxoSmithKline (GSK) compounds has permitted the identification of the GW3965 (Fig. 5) as a strong agonist of LXR α and LXR β . In contrast with T0901317, GW3965 is more selective for LXR (Mitro et al., 2007). Unfortunately, human therapeutic use of these molecules is impossible because of their temporary hypertriglyceridemic effects (Joseph et al., 2002a,b). More recently, GSK has also developed an intestinal-specific LXR agonist closely related to GW3965, GW6340, which specifically activates LXR target genes (ABCA1, G5 and G8) in small intestine without modification of hepatic target genes expression or hepatic triglyceride content (Yasuda et al., 2010).

A promising synthetic ligand was also identified by Makishima's group: (22E)-ergost-22-ene-1 α ,2 β diol (YT-32) (Fig. 5), derived from ergosterol, shows strong LXR agonist activity (Kaneko et al., 2003). In mice, the oral administration of YT-32 leads to an intestinal accumulation of the ABCA1, ABCG5 and ABCG8 encoding genes, and a reduction of plasma cholesterol without any modification of expression of these genes in liver. This ligand is the first tissue-specific LXR agonist. To explain this specificity, Kaneko et al. suggested that YT-32 may reduce the intestinal absorption of cholesterol, by inducing expression of ABCG5 and G8, which could excrete the compound from the apical membranes of mucosal cells. A second hypothesis was that YT-32 is secreted into bile by ABCG5 and G8 before it has a chance to induce expression of lipogenic

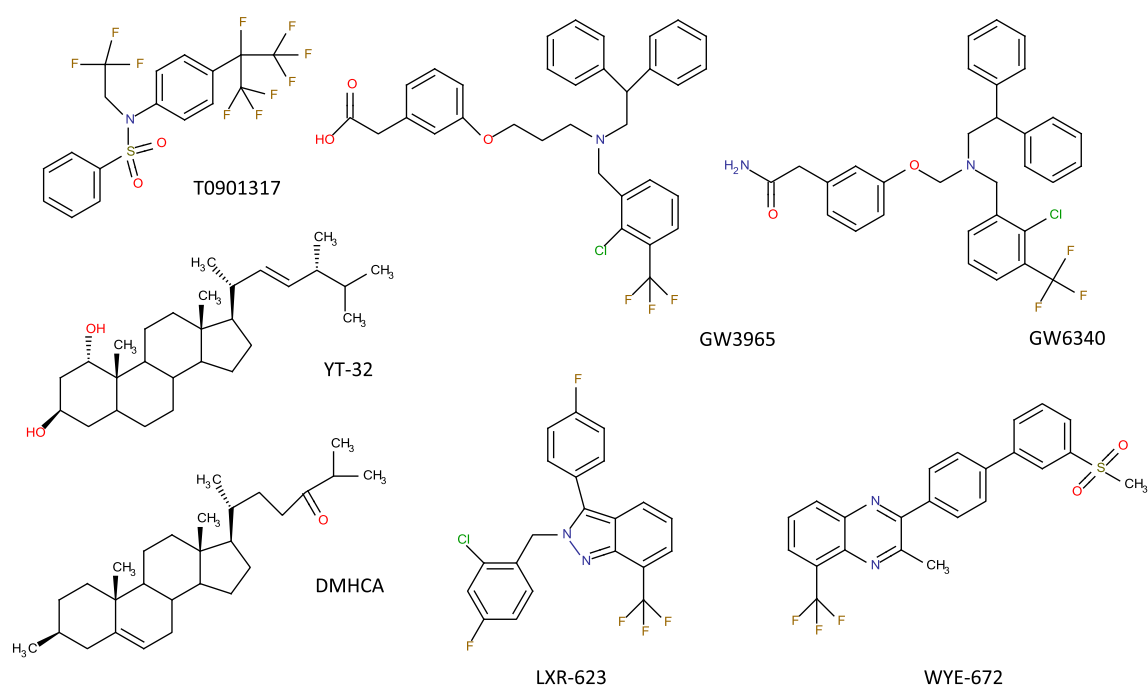


Fig. 5. Synthetic LXR agonists.

genes in liver. A third explanation could be a tissue-specific agonist activity depending on co-factor recruitment as observed for selective estrogen receptor modulators.

In the same way as YT-32, DMHCA (N,N-Dimethyl-3 β -hydroxy-cholenamide) (Fig. 5) is an LXR agonist that is able to stimulate cholesterol transport through upregulation of LXR target genes, including ABCA1, in liver, small intestine, and peritoneal macrophages (Quinet et al., 2004). DMHCA's binding affinity to both LXR isoforms was calculated by scintillation proximity assay at 100–200 nM (Janowski et al., 1999). Compared with known nonsteroidal LXR agonists, DMHCA exhibits only limited activity to increase hepatic Sterol-response element binding protein 1c (srebp-1c) and Fatty acid synthase (fas) mRNA and does not alter circulating plasma triglycerides (Quinet et al., 2004). A recent study shows that DMHCA significantly reduces cholesterol absorption and uptake in the duodenum and jejunum of the small intestine and, in turn, leads to a reduction of plasma cholesterol. Interestingly, this study reveals that DMHCA also suppresses endogenous cholesterol biosynthesis (Pfeifer et al., 2011).

The first LXR agonist tested in human in a phase I clinical trial was a Wyeth's compound, the LXR-623 (Fig. 5): an orally bioavailable indazole highly selective for LXR (DiBlasio-Smith et al., 2008; Katz et al., 2009). After administration of LXR-623 to healthy volunteers, LXR target genes involved in the reverse cholesterol transport were upregulated in the macrophages without any induction of triglyceride synthesis. Unfortunately, adverse effects were observed on the central nervous system, ending the trial. Pharmaceutical companies have focused their efforts on the identification of molecules specific of each LXR isoform. Wyeth group developed a phenylsulfone-substituted quinoxaline, WYE-672 (Fig. 5) as an oral and tissue active LXR β isoform selective agonist (Hu et al., 2010). Recently, a novel synthetic steroidal LXR agonist, ATI-111 compound, has been described to significantly decrease cholesterol and triglyceride levels in plasma in LDLR $-/-$ mice. This observation is correlated to an increased expression of ABCA1, ABCG1 and ABCG5/G8 in intestine and macrophages without modification of acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) and FAS expressions in liver and intestine (Peng et al., 2011).

3. Antagonists and inhibitors ligands

Given the hypocholesterolemia potency of LXR, pharmaceutical companies have focused their effort on the discovery of LXR activators rather than LXR antagonists. Thus, very few natural or synthetic antagonist compounds have been identified or developed. However, use of LXR-isoform antagonists could help in further deciphering the physiological roles of LXR α and LXR β .

3.1. Natural antagonists

One of the most potent endogenous LXR α antagonists to date is 5 α ,6 α -epoxycholesterol. This oxysterol, present in high quantities in food, has been detected in atherosclerotic plaques. This compound induces the recruitment of cofactor peptides to both LXR α and LXR β . Radiolabeled ligand displacement assay demonstrated that 5 α ,6 α -epoxycholesterol binds to LXR α . This molecule is able to antagonize LXR-mediated gene expression in different cell culture systems and notably in keratinocytes (Berrodin et al., 2010). Initially, it was only the sulfated form of this compound, 5 α ,6 α -epoxycholesterol-3-sulfate which was described to antagonize LXR transactivation on a LXR reporter gene assay (Song et al., 2001). It has been demonstrated to disturb the recruitment of certain co-activators and to bind directly to LXR-LBD. In the same study the authors have described another sulfated oxysterol, 7-

cetocholesterol-3-sulfate, as a LXR antagonist (Song et al., 2001) (Fig. 6).

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are known to be PPAR α and PPAR δ agonists. Several PUFAs, especially arachidonic acid (Fig. 6), have a LXR-LBD-dependent antagonist effect on LXR α (Ou et al., 2001) and LXR β (Yoshikawa et al., 2002). The physiological role of such antagonist activity has been found associated with the regulation of hepatic fatty acid elongase 5 (Qin et al., 2009). Indeed, PUFAs may feedback inhibit their own synthesis through repression of LXR α and blocking of *srebp1c* transcription, a master gene involved in fatty acid synthesis.

Herath et al. (2005) revealed, using a scintillation binding assay, that a new polyisoprenylated benzophenone named guttiferone I extract from *Garcinia humilis*, a small fruiting tree growing in Bolivia, is able to selectively bind LXR α (Herath et al., 2005) (Fig. 6). However, this compound is unable to provoke the recruitment of co-activators.

Riccardin is a compound deriving from the liverwort *Blasia pusilla*. Riccardin C is a natural antagonist of LXR β and riccardin F is a natural antagonist of both LXR isoforms. Both compete with the endogenous or synthetic LXR ligand for LXR activation (Tamehiro et al., 2005) (Fig. 6).

A recent study highlights the LXR α antagonizing effect of naringenin (Fig. 6), a flavanone found in grapefruit, oranges and tomatoes (Goldwasser et al., 2010). Naringenin activates the ligand-binding domain of both PPAR α and PPAR δ while inhibiting LXR α in GAL4-fusion reporters. It inhibits LXR α association with the co-activator TRAP-222 in presence of T0901317. It also leads to an inhibition of LXR α target genes such as *fas*, *abca1*, *abcg1*, resulting in an increase of fatty acid oxidation in primary rat hepatocytes and a decrease of bile acid synthesis.

Whole leaf extract of *Parthenocissua tricuspidata* Virginia creeper from Japan, and *Euscaphis japonica*, a small Japanese tree, suppressed the transcriptional activity of LXR α as well as the expression of LXR α target genes (Kim et al., 2006). Furthermore, both extracts exerted repressive effects on adipocyte differentiation and on lipid metabolism *in vitro* without identification of the active compound.

3.2. Synthetic antagonists

The 22(S)-hydroxycholesterol is able to interfere with the binding of other oxysterols (Janowski et al., 1999) to LXR-LBD and to inhibit the lipogenic activity of T0901317 (Lehmann et al., 1997) (Fig. 6).

Motoshima et al. (Motoshima et al., 2009) focused on the creation of LXR antagonists using a multi-template approach based on thalidomide. They found that several thalidomide-related phthalimide derivatives, including PP2P (Fig. 6), possess LXR-antagonistic activity (Noguchi-Yachide et al., 2007). This is based on the agonist property of glucose on LXR. This group develops other phenethyl-phenyl phthalimide derivatives (Motoshima et al., 2009). Likewise, GSK group identified GSK2033, a tertiary sulfonamide, as the first potent cell-active LXR antagonist described to date (Zuercher et al., 2010) (Fig. 6).

Finally, fibrates have been identified as PPAR α ligand leading to inhibition of circulating triglycerides. Esterified-fibrates such as fenofibrate (Fig. 6) block LXR α activity by occupation of the ligand-binding pocket without induction of co-factor recruitment (Thomas et al., 2003).

4. From physiological function to pathology

LXR functions have been schematically associated with several various physiological fields from reproduction to energy

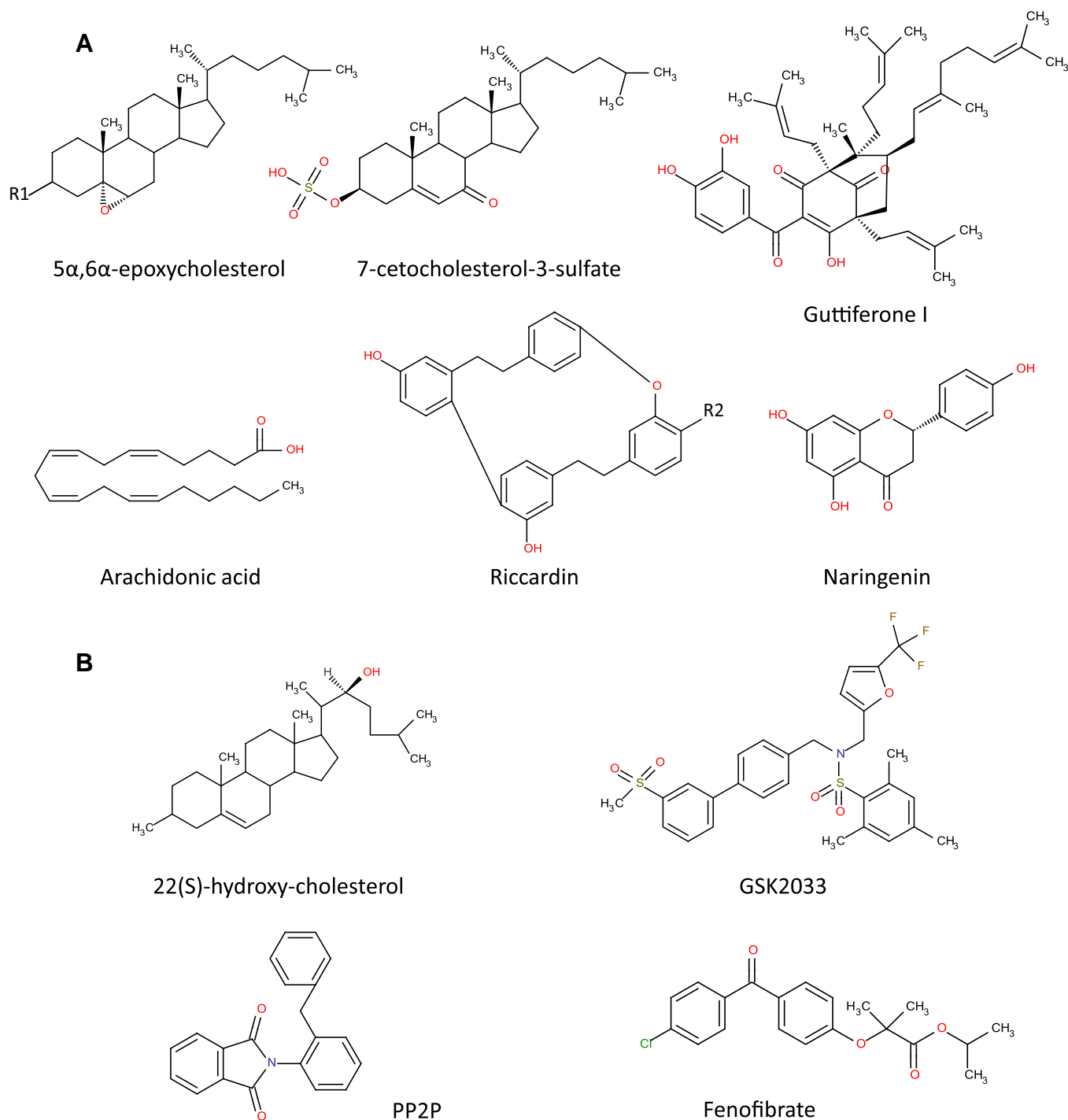


Fig. 6. Natural (A) or synthetic (B) LXR antagonists. (A) The R1 group is OH for 5 α ,6 α -epoxycholesterol and H₂SO₄ for the 5 α ,6 α -epoxycholesterol-3-sulfate, the compound initially described as LXR antagonist, R2 is OCH₃ for Riccardin F and OH for Riccardin C.

homeostasis, neuron physiology, immunity, skin development and apoptosis. Implication of LXR on these processes has been well documented (Cao et al., 2003; Cummins et al., 2006; El-Hajjaji et al., 2011; Joseph et al., 2004; Laffitte et al., 2003; Repa and Mangelsdorf, 2000; Schultz et al., 2000; Viennois et al., 2011; Volle and Lobaccaro, 2007). LXR^{-/-} mouse analysis also pointed out that the lack of one or both isoform could be associated to the development of symptoms linked to human disease (Fig. 7). Hence, LXR are promising pharmacological targets.

4.1. LXR and cancer

4.1.1. LXR and hormone-dependant cancer

Breast and prostate cancers are the leading causes of cancer in women and men, respectively. They share many characteristics (Coffey, 2001). Incidence rates for both prostate and breast cancer are less than 10% compared to those observed in Occidental countries. As people migrate from Asia to the United States, the low rates observed in Asia begin to rise with time and subsequent generations toward those observed commonly in the general American

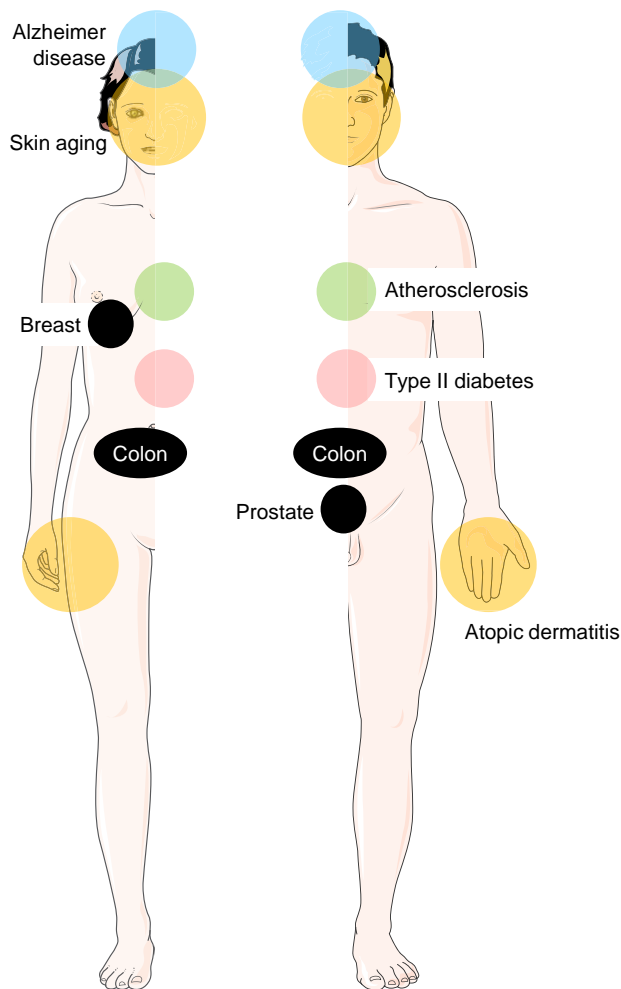


Fig. 7. Schematic representation of the diseases potentially targets of LXR ligands. Black circle, cancer.

population. Furthermore, as Asian countries adopt Western-style diets, their incidencies of prostate and breast cancer rise. In all of these situations, there is a close correlation between responses in the prostate and breast cancer rates. Moreover, the emergence of resistance is common, especially for locally advanced tumors and metastatic tumors (Rau et al., 2005).

4.1.1.1. LXR α and prostate cancer. As previously stated, prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the second leading cause of cancer death in men (Gronberg, 2003). Among the various genetic and environmental risk factors, epidemiological analyses revealed a clear positive association between hypercholesterolemia and the development of prostate cancer (Bravi et al., 2006; Magura et al., 2008). Indeed, epidemiological studies have shown that Chinese populations, with initially low risk of prostate cancer, have an increased risk after migration to the United States. This environmental effect was mainly attributed to the deleterious impact of lipid consumption (Watanabe et al., 2000). Consistent with this hypothesis, a clinical study revealed that hypercholesterolemia increases prostate cancer risk while a statin treatment, inhibiting *de novo* cholesterol biosynthesis, is associated with lower risk of metastatic prostate cancer (Platz et al., 2006; Shannon et al., 2005). Even though LXR are key regulators of cholesterol homeostasis, their roles in prostate pathophysiology remain little known. Fukushi's group first reports the control of proliferation by LXR on LNCaP human prostate carcinoma cell line (Fukuchi

et al., 2004a,b). In their experiments, T0901317 decreases the number of cells in S-phase and induces the expression of ABCA1 (Fukuchi et al., 2004a,b). *In vitro* and *in vivo* analyses also revealed that modulation of LXR activity also triggers apoptosis in prostate cancer cells. This effect involves both increased cholesterol efflux by ABCA1 and the disruption of lipid-raft signaling activity (Pommier et al., 2010). Androgens also play a crucial role on prostate cancer development. Androgen ablation is also a common therapy for this type of cancer. Recently, androgens have been demonstrated to crosstalk with LXR in prostate cancer cell line LNCaP (Krycer and Brown, 2011). Hence LXR may also modulate prostate cancer development by decreasing the androgenic pathway.

4.1.1.2. LXR and breast cancer. Several studies have described LXR activity on modulation of breast cancer cell line proliferation and apoptosis. In several estrogen dependent breast cancer cell lines, Vedin et al. demonstrated that T0901317 treatment decreases the number of proliferating cells independently of their lipogenic activity (Vedin et al., 2009). In estrogen independent cell lines, this effect is abolished suggesting a crucial role of estrogen on this LXR effect. *In vivo*, LXR activation increases estrogen catabolism leading to estrogen deprivation. In this way, LXR inhibits estrogen-dependent breast cancer growth (Gong et al., 2007). Among the other female cancers, studies enlighten the anti-proliferative effects of LXR-ligand on ovarian cancer models (Rough et al., 2010).

4.1.2. LXR and colon cancer

Several studies have described a correlation between colon cancer and LXR modulation. Uno et al. pointed that LXR ligand activation decreases the expression of several endogenous β -catenin target genes such as *myc*, *bmp4* and *mmp7* in colon cancer cells. This correlates with a reduction of cell proliferation without modification of apoptosis (Uno et al., 2009). In a recent review, Chuu (2011) hypothesized that LXR could be a biomarker or a therapeutic target in colon cancers. Phytosterol-rich diets were reported to decrease incidence of several cancer and β -sitosterol were shown to suppress proliferation of HT-29 colon cancer cells. Since β -sitosterol is an efficient LXR agonist, phytosterols may possibly suppress tumor growth partially through activation of LXR signaling (Chuu, 2011). A case-control study that associates soy (containing phytosterols) consumption and colon cancer onset supports this hypothesis (Spector et al., 2003).

4.2. LXR and skin disorders

Both LXR α and LXR β are expressed in human keratinocytes and fetal rat epidermis and LXR β is predominantly expressed in mouse epidermis (Hanley et al., 2000; Komuves et al., 2002). Studies on LXR $-/-$ mice pointed out that epidermal differentiation is regulated by LXR β and that oxysterols can induce differentiation and inhibit proliferation through LXR β activation (Komuves et al., 2002). Cholesterol homeostasis is essential for cutaneous barrier function. A study demonstrated that an increase in cholesterol stimulates both ABCA1 (Jiang et al., 2006) and ABCG1 (Jiang et al., 2010) expression, whereas inhibition of cholesterol synthesis by statins decreases ABCA1 and ABCG1 expression in cultured human keratinocytes. After acute permeability disruption, ABCA1 expression decreases keratinocyte cholesterol efflux to make more cholesterol available for regeneration of the barrier (Jiang et al., 2006). Topical treatment of murine skin with LXR activators also increases ABCG1 expression in murine epidermis (Jiang et al., 2010). In case of skin-aging resulting from photo-aging and normal chronological skin aging, an *in vivo* study showed that LXR agonists reverse aging associated syndrome in a photo-aging animal model. Moreover, LXR $-/-$ mice could represent a great model of chronologically aged human skin (Chang et al., 2008). Furthermore, LXR

ligands reverse clinical symptoms of atopic dermatitis, an inflammatory, chronically relapsing and non-contagious skin disorder (Chang et al., 2008; Hatano et al., 2010).

Interestingly, Sticozzi et al. made a connection between cigarette smoke and LXR activity on the skin (Sticozzi et al., 2010). They showed an increase of ABCA1 expression on human keratinocytes, HaCaT cell line, after cigarette smoke exposure. This is the first study describing the negative potential effect of cigarette smoke on cholesterol skin content (Sticozzi et al., 2010). Finally, locally administrated LXR agonists may be potentially useful in the treatment of skin conditions such as dermatitis or aging.

4.3. LXR and Alzheimer's disease

The link between cholesterol and Alzheimer's disease (AD), an age-related dementia disorder, has been well established by two groups after they treated their patients with statins (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Koldamova et al. evaluated the effect of the synthetic LXR ligand T0901317 on ABCA1 expression in the brain of APP transgenic mouse model of AD. T0901317 significantly enhanced ABCA1 expression and downregulated the production of A β peptide, whose deposit leads to neuronal degeneration, suggesting that ABCA1 plays a protective role in AD progression (Koldamova et al., 2005). Likewise, the loss of *lrx α* or *lrx β* in APP23 transgenic mice increases A β deposit (Zelcer et al., 2007) while activation of LXR by T0901317 causes a significant reduction of memory deficits observed in APP23 model fed a high fat diet (Fitz et al., 2010). Recently, it has been demonstrated that beneficial effects, like memory recovery, of LXR agonists in an APP/presenilin1 (whose mutations are the most common cause of familial early-onset Alzheimer's disease) model of amyloidogenesis, is mediated by ABCA1 (Donkin et al., 2010). Zelcer et al. (2007) showed that LXR activation decreases the inflammatory response likely involved in AD. Likewise, seladin-1/DHCR24, a selective AD marker, is a LXR target gene (Wang et al., 2008a,b). At last, T0901317 significantly decreases amyloid pathology caused by a high-cholesterol diet and improves cognitive performance (Fitz et al., 2010).

Altogether, these data suggest that LXR may be promising pharmacological targets for the treatment of AD and other neurological disorders involving the disruption of cholesterol homeostasis. It is worthwhile to note that two single-nucleotide polymorphisms in LXR β have been associated with AD (Adighibe et al., 2006; Infante et al., 2010), further suggesting that LXR is involved in this neurodegenerative disease in human. Leoni and Caccia (Leoni and Caccia, 2011) showed that 24(S)-hydroxycholesterol, a LXR-ligand (see above) is reduced in plasma and in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disease, while 27-hydroxycholesterol is increased. This study highlights the potential use of LXR endogenous ligand not only as a pharmacological compound to treat symptoms, but also as a biomarker of certain diseases.

4.4. LXR and atherosclerosis

The LXR signaling pathway clearly displays anti-atherogenic properties, both by reducing cholesterol levels and by anti-inflammatory properties. Studies in various models of atherosclerosis such as LDLR $-/-$ or APOE $-/-$ mice have now clearly established that treatment with LXR agonist leads to a regression of atherosclerosis *in vivo*. Joseph et al. initially demonstrated that GW3965 treatment inhibited atherosclerotic lesions in APOE $-/-$ or in LDLR $-/-$ mice fed a high-cholesterol diet (Joseph et al., 2002a,b). LXR is also involved in the stimulation of macrophages transcription of ABC transporters resulting in release of cholesterol from the cells. This prevents the transformation of macrophages into foam cells in response to lipid loading. Moschetta's group (Lo Sasso et al., 2010) demonstrated that genetic intestinal-specific LXR acti-

vation led to decreased intestinal cholesterol absorption, improved lipoprotein profile, and increased reverse cholesterol transport *in vivo* in the absence of hepatic steatosis thus protecting LDLR $-/-$ mice from atherosclerosis. Lo Sasso et al. identified the intestines as a key player in the LXR-driven protective environment against cardiovascular disease (Lo Sasso et al., 2010). The athero-protective role of LXR may also be mediated by the inhibition of platelet function and thrombus formation (Spyridon et al., 2011): LXR β is present in human platelets and its ligand activation inhibits platelet aggregation, suggesting the anti-thrombotic role LXR β .

Using a pharmacological approach with GW6340, Yasuda et al. (2010) showed that intestinal-specific LXR activation promotes macrophage reverse cholesterol transport. ABCA1, ABCG5 and ABCG8 were significantly upregulated in the small intestine, but not in the liver. Two independent mechanisms could account for these observations: increased intestinal HDL production and promotion of intestinal excretion of HDL-derived cholesterol (Yasuda et al., 2010). These data demonstrate that activation of LXR in intestine and macrophages efficiently prevents atherosclerosis. Likewise, and in contrast with T0901317, LXR-623 treatment is not associated with increased hepatic lipogenesis. In non-human primates with normal lipid levels, LXR-623 significantly reduces total and LDL-cholesterol in a time and dose-dependent manner. LXR-623 is also associated with increased expression of the target genes ABCA1/G1 in peripheral blood cells (Quinet et al., 2009). These observations suggest that LXR-623 is a promising pharmacological ligand in atherosclerosis. However, as discussed above, the first clinical trial with this synthetic LXR ligand showed adverse effects (Katz et al., 2009). In the rabbit model of atherosclerosis, LXR-623 and simvastatin, which inhibits endogenous synthesis of cholesterol, reduce the progression of atherosclerosis and induce plaque regression (Giannarelli et al., 2011). A novel LXR therapeutic approach could involve combination therapy for synergistic anti-atherotic effects.

Stein and Matter recently compiled data concerning the protective role of SIRT1 in atherosclerosis (Stein and Matter, 2011). SIRT1 directly deacetylates LXR α , regulating its transcriptional activity. In SIRT1 $-/-$ macrophages, cholesterol efflux is lower than in SIRT1 $+/-$ macrophages (Li et al., 2007). This study highlights the potential use of activators or inhibitors of LXR co-factors as a new way to modulate LXR.

Human genetics also illuminate LXR as putative pharmacological targets. Analysis of LXR gene sequences in patients with coronary heart disease identified three mutations in the LBD of LXR α (Dave et al., 2009). These mutations create conformational changes that may prevent activation of LXR α by its natural ligands.

4.5. LXR and inflammation

Besides the anti-inflammatory impact of LXR in Alzheimer's disease, dermatitis or atherosclerosis, LXR has also a suppressive role in numerous inflammatory diseases such as, stroke, lung inflammation or rheumatoid arthritis.

Stroke or cerebrovascular accident causes irreversible neuronal injury. It can be due to ischemia (caused by thrombosis or arterial embolism) or hemorrhages. Recently, anti-inflammatory agents have shown to restraint inflammation during a stroke, enhancing neurogenesis and tissue repair. Previously in this review, we discussed about the anti-inflammatory role of LXR and their functional amelioration in Alzheimer's disease. Interestingly, Sironi et al. demonstrated that LXR activation with a single dose of GW3965 blocks ischemia-induced brain damage two hours after the induction of ischemia in rat model (Sironi et al., 2008). In another study, it has been shown that GW3965 or T0901317 improves stroke outcome in rats after ischemic occlusion. This

neuroprotection is correlated with a decrease of proinflammatory factors in brain, like *cox-2*, *iNos* or NF- κ B (Morales et al., 2008).

Using a pre-clinical rat model of endotoxin-induced lung inflammation it has also been shown that LXR activation leads to a suppression of lung inflammatory response (Birrell et al., 2007). In a mouse model of carrageenan-induced pleurisy, LXR activation induces a significant reduction of numerous parameters of inflammation such as cytokine, *iNOS* formation in lung, lipid peroxidation and apoptosis (Crisafulli et al., 2010).

GW3965 prophylaxis significantly reduced arthritis incidence and attenuated the clinical and histological severity in collagen-induced arthritis mice. Moreover, GW3965 prophylaxis also significantly attenuated inflammatory mediator production in joint sections and serum pro-inflammatory cytokine levels in a dose-dependent manner (Park et al., 2010).

It can be noted that oxysterols may act as EBI2 (*Epstein-Barr virus-induced gene 2*, an orphan G-protein-coupled receptor) ligands and have an important role on adaptative immune response. By this way, oxysterols act as chemoattractant for immune cells, directing cell migration (Hannedouche et al., 2011; Liu et al., 2011).

Altogether, LXR agonists play various anti-inflammatory roles on different tissues like brain, lung immune cells. One way by which LXR exert its anti-inflammatory effect is by SUMOylation. Especially, LXR ligands inhibited STAT1-mediated inflammatory responses in IFN γ -stimulated brain astrocytes. Ligand-dependent SUMOylations of LXRs are required for inhibitory action on STAT1, as STAT1 complexed with SUMOylated LXR become unable to bind to promoter regions of target genes, resulting in transcriptional failure (Lee et al., 2009 #136).

4.6. LXR and diabetes

Diabetes mellitus type 2 is a metabolic disorder whose main risk factor is obesity. It is characterized by high blood glucose in the context of insulin resistance (Misra and Khurana, 2008). Treatment of diabetic rodents or mouse models of diet-induced obesity with LXR agonists improves glucose tolerance (Cao et al., 2003; Lafitte et al., 2003). However, *in vitro* experiments showed that the lipogenic effect of LXR agonists in the skeletal muscle of patients with type 2 diabetes is increased compared to healthy control patients (Kase et al., 2005). This study shows that LXR activation may promote triglyceride accumulation in the presence of high glucose concentration in skeletal muscle cells probably via induction lipogenic enzymes expression (Kase et al., 2005). This may prove to be problematic effect of LXR activation in muscle. Genetic linkage analyses suggest role of LXR in obesity (Dahlman et al., 2006) or pancreatic β -cell dysfunction (Ketterer et al., 2011).

5. Conclusion

This review enlightened the potential applications of LXR ligands as therapeutic agents in various pathologies. Thus far, few studies have addressed the effect of such agonists in human because of their adverse effects on lipogenesis. The first clinical trial in human was the use of LXR-623 against atherosclerosis in healthy patients. This compound does not activate the lipogenic enzymes in liver and acts specifically in macrophages. Unfortunately, this trial was rapidly aborted because of the adverse side effects of this compound on the central nervous system. Nonetheless, the way has been opened for the use of LXR agonists in human. The goal is to be able to activate LXR specifically in the target tissue. It is precisely the concept of develop new SLiMs that could activate or inhibit LXR α or LXR β depending on the tissue. Future studies will be necessary to determine whether manipulations of these

pathways have utility in the treatment of the human diseases described above.

Acknowledgments

We thank David H. Jiang, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, for critically reading the manuscript.

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue Allier contre le Cancer, Association de Recherches contre le Cancer, FRM and Fondation BNP-Paribas Research Grants, Contrat Nouveau Chercheur Auvergne (to S.B.). E. Viennois is funded by Région Auvergne and Fond Européen de Développement Régional (FEDER); J. Dufour is funded by MNERT.

References

- Adighibe, O., Arepalli, S., Duckworth, J., Hardy, J., Wavrant-De Vrieze, F., 2006. Genetic variability at the LXR gene (NR1H2) may contribute to the risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27, 1431–1434.
- Barbier, O., Trottier, J., Kaeding, J., Caron, P., Verreault, M., 2009. Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol. Cell. Biochem.* 326, 3–8.
- Berrodin, T.J., Shen, Q., Quinet, E.M., Yudit, M.R., Freedman, L.P., Nagpal, S., 2010. Identification of 5 α ph, 6 α ph-epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol. Pharmacol.* 78, 1046–1058.
- Birrell, M.A., Catley, M.C., Hardaker, E., Wong, S., Willson, T.M., McCluskie, K., Leonard, T., Farrow, S.N., Collins, J.L., Haj-Yahia, S., Belvisi, M.G., 2007. Novel role for the liver X nuclear receptor in the suppression of lung inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* 282, 31882–31890.
- Bramlett, K.S., Houck, K.A., Borchert, K.M., Dowless, M.S., Kulanthaivel, P., Zhang, Y., Beyer, T.P., Schmidt, R., Thomas, J.S., Michael, L.F., Barr, R., Montrose, C., Eacho, P.I., Cao, G., Burris, T.P., 2003. A natural product ligand of the oxysterol receptor, liver X receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 291–296.
- Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Talamini, R., Negri, E., Montella, M., Franceschi, S., La Vecchia, C., 2006. Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann. Oncol.* 17, 1014–1017.
- Cao, G., Liang, Y., Broderick, C.L., Oldham, B.A., Beyer, T.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Stayrook, K.R., Suen, C., Otto, K.A., Miller, A.R., Dai, J., Foxworthy, P., Gao, H., Ryan, T.P., Jiang, X.C., Burris, T.P., Eacho, P.I., Etgen, G.J., 2003. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 1131–1136.
- Cha, J.Y., Repp, J.J., 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* 282, 743–751.
- Chang, K.C., Shen, Q., Oh, I.G., Jelinsky, S.A., Jenkins, S.F., Wang, W., Wang, Y., LaCava, M., Yudit, M.R., Thompson, C.C., Freedman, L.P., Chung, J.H., Nagpal, S., 2008. Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol. Endocrinol.* 22, 2407–2419.
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W., 2007. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5, 73–79.
- Chuu, C.P., 2011. Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med. Hypotheses* 76, 697–699.
- Coffey, D.S., 2001. Similarities of prostate and breast cancer: evolution, diet, and estrogens. *Urology* 57, 31–38.
- Crisafulli, C., Mazzon, E., Paterniti, I., Galuppo, M., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., 2010. Effects of liver X receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. *Respir. Res.* 11, 19.
- Cummins, C.L., Volle, D.H., Zhang, Y., McDonald, J.G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M., 2006. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J. Clin. Invest.* 116, 1902–1912.
- Dahlman, I., Nilsson, M., Jiao, H., Hoffstedt, J., Lindgren, C.M., Humphreys, K., Kere, J., Gustafsson, J.A., Arner, P., Dahlman-Wright, K., 2006. Liver X receptor gene polymorphisms and adipose tissue expression levels in obesity. *Pharmacogenet. Genomics* 16, 881–889.
- Dave, V.P., Kaul, D., Sharma, Y., Bhattacharya, R., 2009. Functional genomics of blood cellular LXR-alpha gene in human coronary heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 536–544.
- Demerjian, M., Choi, E.H., Man, M.Q., Chang, S., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2009. Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis. *Exp. Dermatol.* 18, 643–649.
- DiBlasio-Smith, E.A., Arai, M., Quinet, E.M., Evans, M.J., Kornaga, T., Basso, M.D., Chen, L., Feingold, I., Halpern, A.R., Liu, Q.Y., Nambi, P., Savio, D., Wang, S., Mounds, W.M., Isler, J.A., Slager, A.M., Burczynski, M.E., Dorner, A.J., LaVallie, E.R., 2008. Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J. Transl. Med.* 6, 59.
- Donkin, J.J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, D., May, S., Chan, J., Fan, J., Collins, J., Wellington, C.L., 2010. ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J. Biol. Chem.* 285, 34144–34154.

- El-Hajjaji, F.Z., Oumeddour, A., Pommier, A.J., Ouvrier, A., Viennois, E., Dufour, J., Cairra, F., Drevet, J.R., Volle, D.H., Baron, S., Saez, F., Lobaccaro, J.M., 2011. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 974–981.
- Fitz, N.F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I., Koldamova, R., 2010. Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J. Neurosci.* 30, 6862–6872.
- Fukuchi, J., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Hsu, S., Ko, A.L., Fitzgerald, M.L., Liao, S., 2004a. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64, 7682–7685.
- Fukuchi, J., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Chuu, C.P., Liao, S., 2004b. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64, 7686–7689.
- Giannarelli, C., Cimmino, G., Connolly, T.M., Ibanez, B., Garcia Ruiz, J.M., Alique, M., Zafar, M.U., Fuster, V., Geerstein, G., Badimon, J.J., 2011. Synergistic effect of liver X receptor activation and simvastatin on plaque regression and stabilization: an magnetic resonance imaging study in a model of advanced atherosclerosis. *Eur Heart J.* [Epub ahead of print].
- Goldwasser, J., Cohen, P.Y., Yang, E., Balaguer, P., Yarmush, M.L., Nahmias, Y., 2010. Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPARalpha, PPARgamma and LXRalpha. *PLoS One* 5, e12399.
- Gong, H., Guo, P., Zhai, Y., Zhou, J., Uppal, H., Jarzynka, M.J., Song, W.C., Cheng, S.Y., Xie, W., 2007. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* 21, 1781–1790.
- Gronberg, H., 2003. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 361, 859–864.
- Hanley, K., Ng, D.C., He, S.S., Lau, P., Min, K., Elias, P.M., Bikle, D.D., Mangelsdorf, D.J., Williams, M.L., Feingold, K.R., 2000. Oxysterols induce differentiation in human keratinocytes and increase Ap-1-dependent involucrin transcription. *J. Invest. Dermatol.* 114, 545–553.
- Hannedouche, S., Zhang, J., Yi, T., Shen, W., Nguyen, D., Pereira, J.P., Guerini, D., Baumgarten, B.U., Roggo, S., Wen, B., Knochenmuss, R., Noel, S., Gessier, F., Kelly, L.M., Vanek, M., Laurent, S., Preuss, I., Miault, C., Christen, I., Karuna, R., Li, W., Koo, D.I., Suply, T., Schmedt, C., Peters, E.C., Falchetto, R., Katopodis, A., Spanka, C., Roy, M.O., Dethoux, M., Chen, Y.A., Schultz, P.G., Cho, C.Y., Seuwen, K., Cyster, J.G., Sailer, A.W., 2011. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature* 475, 524–527.
- Hatanou, Y., Man, M.Q., Uchida, Y., Crumrine, D., Mauro, T.M., Feingold, K.R., Elias, P.M., Holleran, W.M., 2010. Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta/delta (but not gamma) and liver X receptor activators. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, 160 e-1–169 e-5.
- Herath, K., Jayasuriya, H., Ondeyka, J.G., Guan, Z., Borris, R.P., Stijfhoorn, E., Stevenson, D., Wang, J., Sharma, N., Macnaul, K., Menke, J.G., Ali, A., Schulman, M.J., Singh, S.B., 2005. Guttiferone I, a new prenylated benzophenone from *Garcinia humilis* as a liver X receptor ligand. *J. Nat. Prod.* 68, 617–619.
- Houck, K.A., Borchert, K.M., Hepler, C.D., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Michael, L.F., Burris, T.P., 2004. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol. Genet. Metab.* 83, 184–187.
- Hu, B., Unwalla, R.J., Goljer, I., Jetter, J.W., Quinet, E.M., Berrodin, T.J., Basso, M.D., Feingold, I.B., Nilsson, A.G., Wilhelmsson, A., Evans, M.J., Wrobel, J.E., 2010. Identification of phenylsulfone-substituted quinoxaline (WYE-672) as a tissue selective liver X-receptor (LXR) agonist. *J. Med. Chem.* 53, 3296–3304.
- Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., Lala, D.S., 2003. Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol. Endocrinol.* 17, 1019–1026.
- Huang, T.H., Razmovski-Naumovski, V., Salam, N.K., Duke, R.K., Tran, V.H., Duke, C.C., Roufogalis, B.D., 2005. A novel LXR-alpha activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1298–1308.
- Infante, J., Rodriguez-Rodriguez, E., Mateo, I., Llorca, J., Vazquez-Higuera, J.L., Berciano, J., Combarros, O., 2010. Gene-gene interaction between heme oxygenase-1 and liver X receptor-beta and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol. Aging* 31, 710–714.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–731.
- Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., Mangelsdorf, D.J., 1999. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 266–271.
- Jayasuriya, H., Herath, K.B., Ondeyka, J.G., Guan, Z., Borris, R.P., Tiwari, S., de Jong, W., Chavez, F., Moss, J., Stevenson, D.W., Beck, H.T., Slattery, M., Zamora, N., Schulman, M., Ali, A., Sharma, N., MacNaul, K., Hayes, N., Menke, J.G., Singh, S.B., 2005. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J. Nat. Prod.* 68, 1247–1252.
- Jiang, Y.J., Lu, B., Kim, P., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2006. Regulation of ABCA1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J. Lipid Res.* 47, 2248–2258.
- Jiang, Y.J., Lu, B., Tarling, E.J., Kim, P., Man, M.Q., Crumrine, D., Edwards, P.A., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2010. Regulation of ABCG1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J. Lipid Res.* 51, 3185–3195.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A., 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627–1631.
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., Tontonoz, P., 2002a. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 11019–11025.
- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., Tran, J., Tippin, T.K., Wang, X., Lusis, A.J., Hsueh, W.A., Law, R.E., Collins, J.L., Willson, T.M., Tontonoz, P., 2002b. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7604–7609.
- Joseph, S.B., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bruhn, K.W., Mak, P.A., Pei, L., Hogenesch, J., O'Connell, R., Cheng, G., Saez, E., Miller, J.F., Tontonoz, P., 2004. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119, 299–309.
- Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I., Makishima, M., 2003. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J. Biol. Chem.* 278, 36091–36098.
- Kase, E.T., Wensaas, A.J., Aas, V., Hojlund, K., Levin, K., Thoresen, G.H., Beck-Nielsen, H., Rustan, A.C., Gaster, M., 2005. Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* 54, 1108–1115.
- Katz, A., Udata, C., Ott, E., Hickey, L., Burczynski, M.E., Burghart, P., Vesterqvist, O., Meng, X., 2009. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J. Clin. Pharmacol.* 49, 643–649.
- Ketterer, C., Mussig, K., Machicao, F., Stefan, N., Fritsche, A., Haring, H.U., Staiger, H., 2011. Genetic variation within the NR1H2 gene encoding liver X receptor beta associates with insulin secretion in subjects at increased risk for type 2 diabetes. *J. Mol. Med.* 89, 75–81.
- Kim, K.H., Choi, S.H., Lee, T.S., Oh, W.K., Kim, D.S., Kim, J.B., 2006. Selective LXRalpha inhibitory effects observed in plant extracts of MEH184 (*Parthenocissua tricuspidata*) and MEH185 (*Euscaphis japonica*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 513–518.
- Koldamova, R., Lefterov, I., 2007. Role of LXR and ABCA1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease – implications for a new therapeutic approach. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 171–178.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Staufenbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J.C., Walter, M., Roth, M.G., Lazo, J.S., 2005. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 280, 4079–4088.
- Komuves, L.G., Schmutz, M., Fowler, A.J., Elias, P.M., Hanley, K., Man, M.Q., Moser, A.H., Lobaccaro, J.M., Williams, M.L., Mangelsdorf, D.J., Feingold, K.R., 2002. Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 118, 25–34.
- Kotani, H., Tanabe, H., Mizukami, H., Makishima, M., Inoue, M., 2010. Identification of a naturally occurring retinoid, honokiol, that activates the retinoid X receptor. *J. Nat. Prod.* 73, 1332–1336.
- Krycer, J.R., Brown, A.J., 2011. Crosstalk between the androgen receptor and the liver X receptor: implications for cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286, 20637–20647.
- Kumar, N., Solt, L.A., Conkright, J.J., Wang, Y., Istrate, M.A., Busby, S.A., Garcia-Ordenez, R.D., Burris, T.P., Griffin, P.R., 2010. The benzenesulfonamide T0901317 [N-(2,2,2-trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] is a novel retinoic acid receptor-related orphan receptor-alpha/gamma inverse agonist. *Mol. Pharmacol.* 77, 228–236.
- Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S.B., Castrillo, A., Willpitz, D.C., Mangelsdorf, D.J., Collins, J.L., Saez, E., Tontonoz, P., 2003. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5419–5424.
- Lazar, M.A., 2003. Nuclear receptor corepressors. *Nucl. Recept. Signal* 1, e001.
- Lee, S., Lee, J., Lee, S.K., Lee, J.W., 2008. Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. *Mol. Endocrinol.* 22, 1312–1319.
- Lee, J.H., Park, S.M., Kim, O.S., Lee, C.S., Woo, J.H., Park, S.J., Joe, E.H., Jou, I., 2009. Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in LFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol. Cell.* 35, 806–817.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., Willson, T.M., 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 3137–3140.
- Leoni, V., Caccia, C., 2011. Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 164, 515–524.
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., Guarente, L., 2007. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28, 91–106.
- Li, X., Yeh, V., Molteni, V., 2010. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007–2009). *Expert Opin. Ther. Pat.* 20, 535–562.
- Liu, C., Yang, X.V., Wu, J., Kuei, C., Mani, N.S., Zhang, L., Yu, J., Sutton, S.W., Qin, N., Banie, H., Karlsson, L., Sun, S., Lovenberg, T.W., 2011. Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature* 475, 519–523.
- Lo Sasso, G., Murzilli, S., Salvatore, L., D'Errico, I., Petruzzelli, M., Conca, P., Jiang, Z.Y., Calabresi, L., Parini, P., Moschetta, A., 2010. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab.* 12, 187–193.
- Magura, L., Blanchard, R., Hope, B., Beal, J.R., Schwartz, G.G., Sahnoun, A.E., 2008. Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 19, 1259–1266.

- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B., 1999. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.
- Misra, A., Khurana, L., 2008. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, S9–30.
- Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A., Saez, E., 2007. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* 581, 1721–1726.
- Morales, J.R., Ballesteros, I., Deniz, J.M., Hurtado, O., Vivancos, J., Nombela, F., Lizasoain, I., Castrillo, A., Moro, M.A., 2008. Activation of liver X receptors promotes neuroprotection and reduces brain inflammation in experimental stroke. *Circulation* 118, 1450–1459.
- Morello, F., de Boer, R.A., Steffensen, K.R., Gnecci, M., Chisholm, J.W., Boomsma, F., Anderson, L.M., Lawn, R.M., Gustafsson, J.A., Lopez-Illasaca, M., Pratt, R.E., Dzau, V.J., 2005. Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J. Clin. Invest.* 115, 1913–1922.
- Motoshima, K., Noguchi-Yachide, T., Sugita, K., Hashimoto, Y., Ishikawa, M., 2009. Separation of alpha-glucosidase-inhibitory and liver X receptor-antagonistic activities of phenethylphenyl phthalimide analogs and generation of LXRalpha-selective antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 5001–5014.
- Noguchi-Yachide, T., Aoyama, A., Makishima, M., Miyachi, H., Hashimoto, Y., 2007. Liver X receptor antagonists with a phthalimide skeleton derived from thalidomide-related glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 3957–3961.
- Ondeyka, J.G., Jayasuriya, H., Herath, K.B., Guan, Z., Schulman, M., Collado, J., Dombrowski, A.W., Kwon, S.S., McCallum, C., Sharma, N., MacNaul, K., Hayes, N., Menke, J.G., Singh, S.B., 2005. Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors. *J. Antibiot. (Tokyo)* 58, 559–565.
- Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2001. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6027–6032.
- Park, M.C., Kwon, Y.J., Chung, S.J., Park, Y.B., Lee, S.K., 2010. Liver X receptor agonist prevents the evolution of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology (Oxford)* 49, 882–890.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704.
- Peng, D., Hiipakka, R.A., Xie, J.T., Dai, Q., Kokontis, J.M., Reardon, C.A., Getz, G.S., Liao, S., 2011. A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(–/–) mice. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1792–1804.
- Pfeifer, T., Buchebner, M., Chandak, P.G., Patankar, J., Kratzer, A., Obrowsky, S., Rechberger, G.N., Kadam, R.S., Kompella, U.B., Kostner, G.M., Kratky, D., Levak-Frank, S., 2011. Synthetic LXR agonist suppresses endogenous cholesterol biosynthesis and efficiently lowers plasma cholesterol. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 285–292.
- Plat, J., Nichols, J.A., Mensink, R.P., 2005. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J. Lipid Res.* 46, 2468–2476.
- Platz, E.A., Leitzmann, M.F., Visvanathan, K., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C., Giovannucci, E., 2006. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1819–1825.
- Pommier, A.J., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., Baron, S., Lobaccaro, J.M., 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 2712–2723.
- Qin, Y., Dalen, K.T., Gustafsson, J.A., Nebb, H.I., 2009. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXRalpha-SREBP-1c. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 140–147.
- Quinet, E.M., Savio, D.A., Halpern, A.R., Chen, L., Miller, C.P., Nambi, P., 2004. Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J. Lipid Res.* 45, 1929–1942.
- Quinet, E.M., Basso, M.D., Halpern, A.R., Yates, D.W., Steffan, R.J., Clerin, V., Resmini, C., Keith, J.C., Berrodin, T.J., Feingold, I., Zhong, W., Hartman, H.B., Evans, M.J., Gardell, S.J., DiBlasio-Smith, E., Mounds, W.M., LaVallie, E.R., Wrobel, J., Nambi, P., Vlasuk, G.P., 2009. LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. *J. Lipid Res.* 50, 2358–2370.
- Rau, K.M., Kang, H.Y., Cha, T.L., Miller, S.A., Hung, M.C., 2005. The mechanisms and managements of hormone-therapy resistance in breast and prostate cancers. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 511–532.
- Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 459–481.
- Rough, J.J., Monroy, M.A., Yerrum, S., Daly, J.M., 2010. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J. Ovarian Res.* 3, 13.
- Ruan, B., Wilson, W.K., Schroeffer Jr., G.J., 1998. An alternative synthesis of 4,4-dimethyl-5alpha-cholesta-8,14,24-trien-3beta-ol, an intermediate in sterol biosynthesis and a reported activator of meiosis and of nuclear orphan receptor LXR alpha. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 233–236.
- Schroeffer Jr., G.J., 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D., Shan, B., 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831–2838.
- Shannon, J., Tewoderos, S., Garzotto, M., Beer, T.M., Derenick, R., Palma, A., Farris, P.E., 2005. Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 162, 318–325.
- Shenoy, S.D., Spencer, T.A., Mercer-Haines, N.A., Alipour, M., Gargano, M.D., Runge-Morris, M., Kocarek, T.A., 2004. CYP3A induction by liver X receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab. Dispos.* 32, 66–71.
- Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., Schmidt, A., 1994. NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* 147, 273–276.
- Singh, S.B., Ondeyka, J.G., Liu, W., Chen, S., Chen, T.S., Li, X., Bouffard, A., Dropinski, J., Jones, A.B., McCormick, S., Hayes, N., Wang, J., Sharma, N., MacNaul, K., Hernandez, M., Chao, Y.S., Baffic, J., Lam, M.H., Burton, C., Sparrow, C.P., Menke, J.G., 2005. Discovery and development of dimeric podocarpic acid leads as potent agonists of liver X receptor with HDL cholesterol raising activity in mice and hamsters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 2824–2828.
- Sironi, L., Mitro, N., Cimino, M., Gelosa, P., Guerrini, U., Tremoli, E., Saez, E., 2008. Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage. *FEBS Lett.* 582, 3396–3400.
- Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Liao, S., 1994. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10809–10813.
- Song, C., Hiipakka, R.A., Liao, S., 2000. Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* 65, 423–427.
- Song, C., Liao, S., 2000. Cholestenoid acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology* 141, 4180–4184.
- Song, C., Hiipakka, R.A., Liao, S., 2001. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66, 473–479.
- Spector, D., Anthony, M., Alexander, D., Arab, L., 2003. Soy consumption and colorectal cancer. *Nutr. Cancer* 47, 1–12.
- Spyridon, M., Moraes, L.A., Jones, C.I., Sage, T., Sasikumar, P., Bucci, G., Gibbins, J.M., 2011. LXR as a novel antithrombotic target. *Blood* 117, 5751–5761.
- Stein, S., Matter, C.M., 2011. Protective roles of SIRT1 in atherosclerosis. *Cell Cycle* 10, 640–647.
- Sticozzi, C., Pecorelli, A., Belmonte, G., Valacchi, G., 2010. Cigarette smoke affects ABCA1 expression via liver X receptor nuclear translocation in human keratinocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 3375–3386.
- Svensson, S., Ostberg, T., Jacobsson, M., Norstrom, C., Stefansson, K., Hallen, D., Johansson, I.C., Zachrisson, K., Ogg, D., Jendeborg, L., 2003. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J.* 22, 4625–4633.
- Tamehiro, N., Sato, Y., Suzuki, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Yokoyama, S., Kawanishi, T., Ohno, Y., Inoue, K., Nagao, T., Nishimaki-Mogami, T., 2005. Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR)alpha agonist and an LXRbeta antagonist. *FEBS Lett.* 579, 5299–5304.
- Tamura, K., Chen, Y.E., Horiuchi, M., Chen, Q., Daviet, L., Yang, Z., Lopez-Illasaca, M., Mu, H., Pratt, R.E., Dzau, V.J., 2000. LXRalpha functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8513–8518.
- Thomas, J., Bramlett, K.S., Montrose, C., Foxworthy, P., Eacho, P.I., McCann, D., Cao, G., Kiefer, A., McCowan, J., Yu, K.L., Grese, T., Chin, W.W., Burris, T.P., Michael, L.F., 2003. A chemical switch regulates fibrin specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) versus liver X receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 2403–2410.
- Traves, P.G., Hortelano, S., Zeini, M., Chao, T.H., Lam, T., Neuteboom, S.T., Theodorakis, E.A., Palladino, M.A., Castrillo, A., Bosca, L., 2007. Selective activation of liver X receptors by acanthoid acid-related diterpenes. *Mol. Pharmacol.* 71, 1545–1553.
- Uno, S., Endo, K., Jeong, Y., Kawana, K., Miyachi, H., Hashimoto, Y., Makishima, M., 2009. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem. Pharmacol.* 77, 186–195.
- Vedin, L.L., Lewandowski, S.A., Parini, P., Gustafsson, J.A., Steffensen, K.R., 2009. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 575–579.
- Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F.Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., Lobaccaro, J.M., 2011. Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert. Opin. Ther. Targets* 15, 219–232.
- Volle, D.H., Repa, J.J., Mazur, A., Cummins, C.L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veysiére, G., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M., 2004. Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol. Endocrinol.* 18, 888–898.
- Volle, D.H., Lobaccaro, J.M., 2007. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the “foie gras”, the steroids and sex? *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 183–189.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Stayrook, K.R., Su, C., Varga, G., Shen, Q., Nagpal, S., Burris, T.P., 2008a. The selective Alzheimer's disease indicator-1 gene (*Seladin-1/DHCR24*) is a liver X receptor target gene. *Mol. Pharmacol.* 74, 1716–1721.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., Burris, T.P., 2008b. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Watanabe, M., Nakayama, T., Shiraishi, T., Stemmermann, G.N., Yatani, R., 2000. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol. Oncol.* 5, 274–283.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033–1045.

- Willy, P.J., Mangelsdorf, D.J., 1997. Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev.* 11, 289–298.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., Siegel, G., 2000. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57, 1439–1443.
- Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2006. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 281, 27816–27826.
- Yasuda, T., Grillot, D., Billheimer, J.T., Briand, F., Delerive, P., Huet, S., Rader, D.J., 2010. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 781–786.
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Takahashi, A., Sone, H., Osuga, J., Gotoda, T., Ishibashi, S., Yamada, N., 2002. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J. Biol. Chem.* 277, 1705–1711.
- Zelcer, N., Tontonoz, P., 2006. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* 116, 607–614.
- Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E.G., Landreth, G.E., Vinters, H.V., Tontonoz, P., 2007. Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver X receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 10601–10606.
- Zuercher, W.J., Buckholz, R.G., Campobasso, N., Collins, J.L., Galardi, C.M., Gampe, R.T., Hyatt, S.M., Merrihew, S.L., Moore, J.T., Oplinger, J.A., Reid, P.R., Spearing, P.K., Stanley, T.B., Stewart, E.L., Willson, T.M., 2010. Discovery of tertiary sulfonamides as potent liver X receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 53, 3412–3416.

Article 4 : *Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells.*

Publié dans *Oncogene*. 2010 May 6;29(18):2712-23. Epub 2010 Mar 1.

Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM.

ORIGINAL ARTICLE

Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cellsAJC Pommier^{1,2,3}, G Alves^{1,2,3}, E Viennois^{1,2,3}, S Bernard⁴, Y Communal⁵, B Sion⁶, G Marceau^{2,7,8}, C Damon^{1,2}, K Mouzat⁹, F Caira^{1,2,3}, S Baron^{1,2,3,10} and JMA Lobaccaro^{1,2,3,10}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, Clermont-Ferrand, France; ²CNRS, UMR 6247, GReD, Aubiere, France; ³Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ⁴UPR 2228 CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁵Département d'Oncogénétique, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France; ⁶Equipe d'Accueil EA975, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ⁷Clermont Université, Université d'Auvergne, Génétique Reproduction et Développement, Clermont-Ferrand, France; ⁸Service de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France and ⁹Service de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire, Nîmes, France

Cholesterol is a structural component of lipid rafts within the plasma membrane. These domains, used as platforms for various signaling molecules, regulate cellular processes including cell survival. Cholesterol contents are tightly correlated with the structure and function of lipid rafts. Liver X receptors (LXRs) have a central role in the regulation of cholesterol homeostasis within the cell. Therefore, we investigated whether these nuclear receptors could modulate lipid raft signaling and consequently alter prostate cancer (PCa) cell survival. Treatment with the synthetic LXR agonist T0901317 downregulated the AKT survival pathway and thus induced apoptosis of LNCaP PCa cells in both xenografted nude mice and cell culture. The decrease in tumor cholesterol content resulted from the upregulation of ABCG1 and the subsequent increase in reverse cholesterol transport. RNA interference experiments showed that these effects were mediated by LXRs. Atomic force microscopy scanning of the inner plasma membrane sheet showed smaller and thinner lipid rafts after LXR stimulation, associated with the downregulation of AKT phosphorylation in these lipid rafts. Replenishment of cell membranes with exogenous cholesterol antagonized these effects, showing that cholesterol is a key modulator in this process. Altogether, pharmacological modulation of LXR activity could thus reduce prostate tumor growth by enhancing apoptosis in a lipid raft-dependent manner.

Oncogene advance online publication, 1 March 2010; doi:10.1038/onc.2010.30

Keywords: LXRs; cholesterol; lipid rafts; apoptosis; prostate

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of death from cancer in men over the age of 50 years. Among the various genetic and environmental risk factors, epidemiological analyses have revealed a positive association between hypercholesterolemia and the development of PCa (Bravi *et al.*, 2006; Magura *et al.*, 2008). It is well known that cancer cells produce more cholesterol and sphingolipids than do normal cells, especially in solid tumors (White, 1909; Swyer, 1942). This phenomenon has been explained by the rapidly proliferating cancer cells requiring new components to build *de novo* plasma membrane. In agreement with this, statins, a class of HMG-CoA reductase inhibitors, and their derivatives block PCa cell growth *in vitro* (Ukomadu and Dutta, 2003; Mo and Elson, 2004) and have been suspected to have benefits in PCa progression in patients undergoing long-term treatment (Shannon *et al.*, 2005; Murtola *et al.*, 2008).

Extensive studies on lipid rafts have underlined the crucial role of free cholesterol present in plasma membranes in raft-dependent signaling. Lipid rafts are characterized by liquid-ordered microdomains enriched in phospholipids and sphingolipids with highly saturated hydrocarbon chains (Simons and Toomre, 2000). Cholesterol is an important component of lipid rafts and is proposed to induce their coalescence and thus to determine the size of raft platforms (Solomon *et al.*, 1996; Lawrence *et al.*, 2003; Freeman and Solomon, 2004). This last point seems to be an important step in the distribution of membrane-associated proteins, in particular those involved in transduction signaling such as AKT/PKB. High levels of phosphorylated AKT protein, which has a crucial role in cell survival signaling, have been correlated with Gleason score (Liao *et al.*, 2003) and associated with resistance to chemotherapy (Yuan and Whang, 2002). Consistent with this, LNCaP xenografts in athymic mice showed that both phospho-signaling and apoptotic resistance were strengthened by a cholesterol-rich diet (Zhuang *et al.*, 2005), pointing out the crucial role of cholesterol in cell apoptosis resistance and cancer development.

Correspondence: Dr JMA Lobaccaro, UMR GReD CNRS 6247, Clermont Université, Campus des Cèzeaux, 24 avenue des Landais, Aubière 63177, France.

E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

¹⁰These authors contributed equally to this work.

Received 29 July 2009; revised 5 January 2010; accepted 15 January 2010

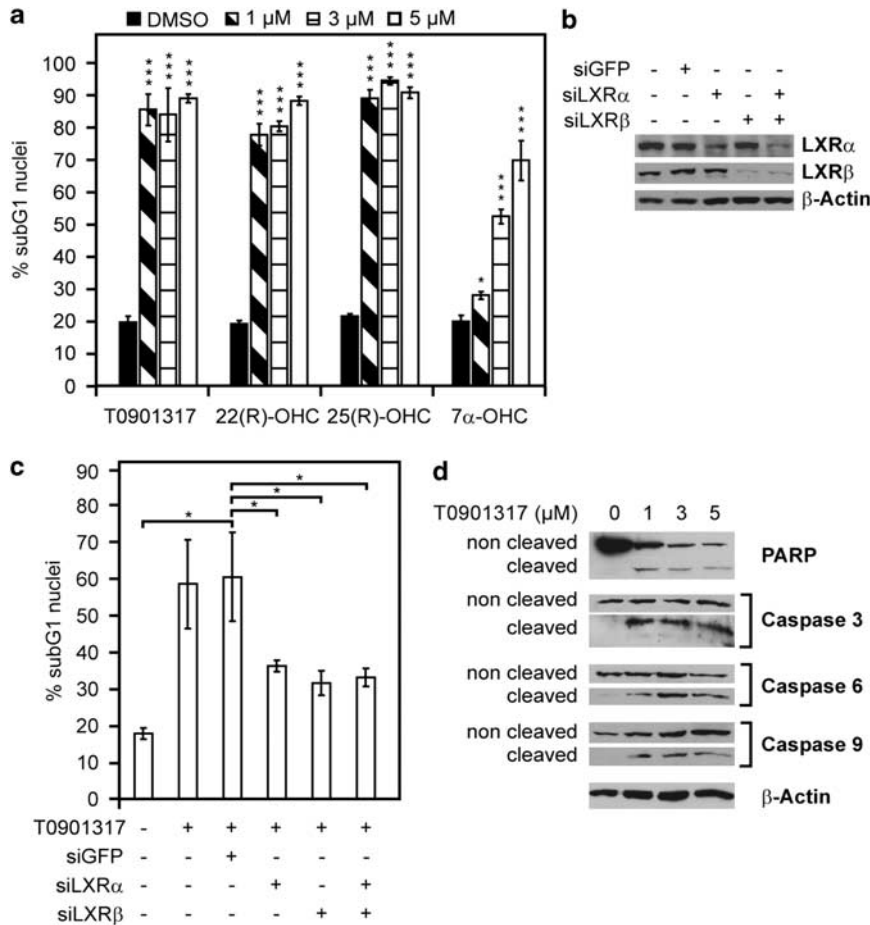


Figure 1 LXR activation induces apoptosis of LNCaP cells. (a) Percentage of subG1 nuclei from LNCaP cells treated with DMSO versus 1, 3, 5 μM T0901317, 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-OHC), 25(R)-hydroxycholesterol (25(R)-OHC) or 7α-hydroxycholesterol (7α-OHC) was quantified by flow cytometry. (b) LNCaP cells were transfected with small interfering RNA against LXRα and LXRβ for 48 h. Silencing was checked by western blot using LXRα and LXRβ antibodies. (c) After 48 h of *lxr* silencing, LNCaP cells were treated with T0901317 during 36 h and apoptosis was analyzed by flow cytometry. (d) Protein lysates from LNCaP cells incubated with DMSO or 1, 3 or 5 μM of T0901317 for 72 h were detected by western blot using anti-poly-ADP-ribose-polymerase, caspase 3, 6, 9 and β-actin antibodies. Data are means ± s.d. bars ($n=3$) and are representative of three independent experiments. Student's *t*-test: * $P<0.05$; *** $P<0.001$.

Liver X receptor-α (LXRα) (NR1H3) and LXRβ (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily, bind to naturally occurring oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols, and stimulate expression of target genes essentially involved in lipid metabolism (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003; Volle and Lobaccaro, 2007). Investigation of *lxr* knockout mice revealed prostatic stromal hyperplasia (Kim *et al.*, 2009). LXR activation by synthetic ligands such as T0901317 can repress growth of human prostatic cell lines *in vitro* and slow down tumoral prostatic cell xenograft expansion *in vivo* (Fukuchi *et al.*, 2004b). Given that LXRs are involved in cholesterol metabolism and that cholesterol has a crucial role in tumor development, we examined the effects of LXR ligands on LNCaP cells *in vitro* and *in vivo* in xenografted mice. We focused our investigations on lipid raft topography, AKT raft-dependent transduction pathway and apoptosis. We found that LXR activation resulted in stimulation of apoptosis that occurred after raft disruption and AKT dephosphorylation.

Results

LXR activation induces apoptosis by inhibition of the AKT survival pathway through an indirect mechanism
Cell death regulation is a key process in Pca development. We thus analyzed the effect of LXR agonist treatments on LNCaP apoptosis. LNCaP cells were treated for 72 h with increasing amounts of T0901317, 22(R)-hydroxycholesterol, 25(R)-hydroxycholesterol and 7α-hydroxycholesterol. All LXR ligands increased the subG1 nuclei fraction from 20 to 85% (Figure 1a). Even 7α-hydroxycholesterol, known to be a weak LXR agonist, significantly enhanced accumulation of subG1 nuclei. To determine which LXR isoform was involved and to confirm that apoptosis was mediated by LXRs, we silenced either LXRα or LXRβ using small interfering RNAs for each endogenous isoform (Figure 1b). LXRα and/or LXRβ knockdown significantly reduced accumulation of subG1 nuclei induced by T0901317. This showed that the effect of T0901317 was mediated by LXRs and that both isoforms were involved in

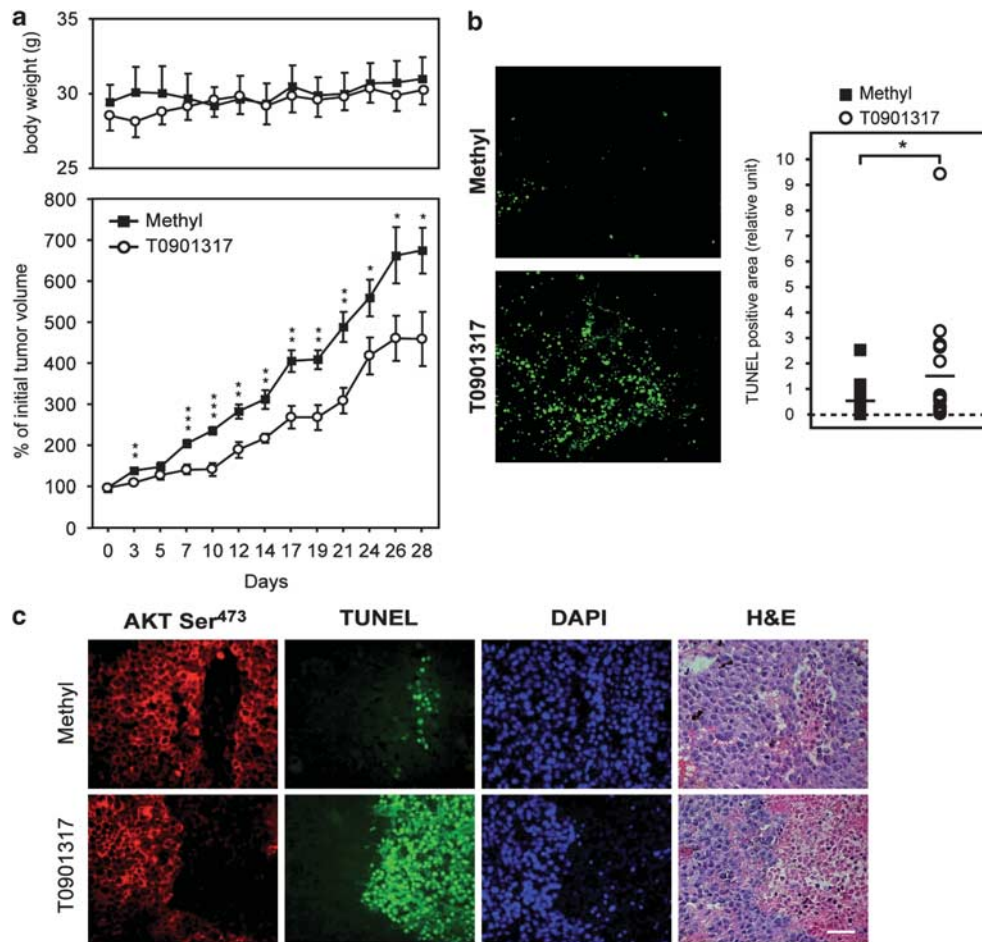


Figure 2 LXRs induce apoptosis in LNCaP xenografts and inhibit the AKT survival pathway. (a) Nude male mice were injected with LNCaP cells. Three weeks later, mice were treated with vehicle (methylcellulose) or T0901317 (20 mg/kg) once a day for a month. Mice were weighed (upper graph) and tumors were measured (lower graph) every 3 days. Data are means \pm s.d. bars ($n = 16$). Student's *t*-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (b) Apoptotic rate was analyzed by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method into xenografts after necropsy. Positive TUNEL-labeled area was quantified and reported to the total area by the signal threshold method. Data are means \pm s.d. bars ($n = 13$). Mann-Whitney test: * $P < 0.05$. (c) LNCaP xenografts obtained from methylcellulose (top) or T0901317 (bottom) were (left to right): immunodetected for AKT Ser⁴⁷³, TUNEL stained, 4,6-diamidino-2-phenylindole labeled and hematoxylin and eosin (H&E) colored (adjacent slides). Scale bar represents 40 μ m.

induction of apoptosis (Figure 1c). Hence, in the following experiments we only used the T0901317 agonist to investigate LXR activation. Accumulation of cleaved caspases 3, 6, 9 and cleaved form of poly-ADP-ribosyl-polymerase indicated that T0901317 treatment activated cell death through the canonical apoptotic pathway (Figure 1d).

We next analyzed the effect of LXR activation *in vivo* on the basis of the growth of xenografted LNCaP cells. As previously described (Fukuchi *et al.*, 2004b), T0901317-treated mice showed a significantly slower tumor growth without any effect on the body weight (Figure 2a). Decrease in tumor growth was confirmed by xenograft analysis during necropsy (Supplementary Data 1). TdT-mediated dUTP nick end labeling assay showed that the apoptotic cell index was significantly increased in tumors from T0901317-treated mice compared with vehicle-treated mice (Figure 2b). Nevertheless, even T0901317-treated xenografts exhibit more apoptotic staining (Figure 2b), and there is no

correlation between the volume of the xenograft and the apoptotic index (data not shown). This indicates that T0901317 reduced xenograft growth not only by targeting apoptosis but also by other processes such as proliferation (Fukuchi *et al.*, 2004b; Chuu *et al.*, 2006) or angiogenesis (Walczak *et al.*, 2004; Mouzat *et al.*, 2009). PCa cells are characterized by a strong resistance to apoptosis involving deregulation of various key cell survival transduction pathways such as AKT signaling. LNCaP cells exhibit PTEN inactivation, leading to constitutive activation of the AKT pathway (Carson *et al.*, 1999). We analyzed AKT phosphorylation on Ser⁴⁷³ as a marker of AKT activation in LNCaP xenografts. As observed in Figure 2c, AKT survival pathway was inhibited in apoptotic areas strongly suggesting that this event was concomitant with apoptotic program activation.

To investigate the relationship between LXRs, AKT and apoptosis, a time course experiment was performed with T0901317 on LNCaP cell cultures. SubG1 nuclei

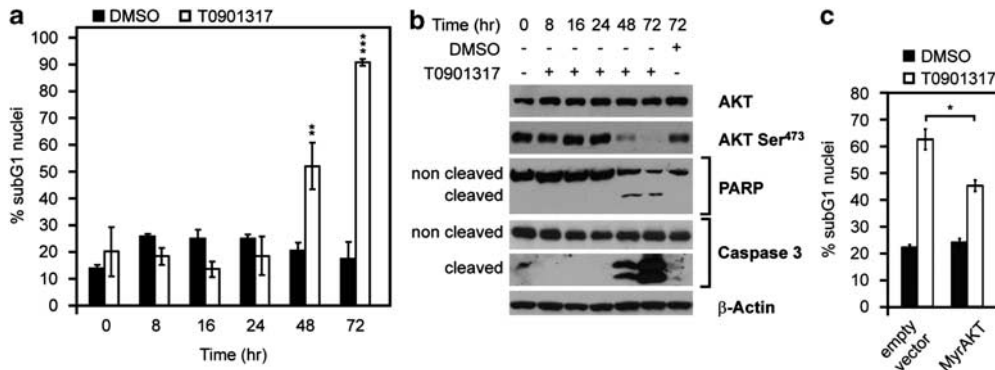


Figure 3 AKT transduction pathway is repressed by LXRs through an indirect mechanism. (a) Sub-G1 nuclei accumulation from LNCaP cells treated during a time course experiment with DMSO or T0901317 (3 μ M). Data are means \pm s.d. bars ($n=3$) and are representative of three independent experiments. Student's *t*-test: ** $P<0.01$; *** $P<0.001$. (b) Total proteins were analyzed by western blot to detect AKT, AKT ser⁴⁷³, poly-ADP-ribosyl-polymerase, caspase 3 and β -actin proteins. (c) LNCaP cells were transfected with myrAKT expression vector or the corresponding empty vector and induced with DMSO or T0901317 (3 μ M). Sub-G1 nuclei accumulation was analyzed by flow cytometry. Student's *t*-test: * $P<0.05$.

accumulation, poly-ADP-ribosyl-polymerase and caspase 3 cleavage were observed, concomitantly with a decrease in AKT phosphorylation on Ser⁴⁷³ (Figures 3a and b), only after 48 h of treatment, suggesting an indirect mechanism. Consistent with this, LNCaP transfection with a plasmid encoding a myristoylated AKT (constitutive positive AKT) resulted in a significant decrease in T0901317-induced apoptosis (Figure 3c). We concluded that LXRs induced apoptosis in part through a downregulation of the AKT cell survival signaling pathway in LNCaP cell cultures and xenografts, and presumably using an indirect mechanism.

LXRs stimulate cholesterol efflux through ABCG1 upregulation

Cholesterol is known to stimulate AKT phosphorylation (Zhuang *et al.*, 2005). We therefore evaluated whether the effect of LXR activation on AKT signaling could be mediated by the modulation of the intracellular cholesterol contents. Cholesterol transporters ABCA1 and ABCG1 expression levels were analyzed by quantitative PCR and western blot. T0901317 treatment for 72 h induced ABCG1 but not ABCA1 mRNA and protein accumulation levels in LNCaP cells (Figure 4a). Time course analysis showed an increase in ABCG1 accumulation after 8 h of treatment (Figure 4b; Supplementary Data 2). Similar results were obtained from LNCaP xenografts: *abcg1* expression level exhibited a 2.7-fold increase, whereas *abca1* expression remained unchanged (Figure 4c). This upregulation was confirmed by immunohistochemistry for ABCG1 in xenografts (Figure 4d). Increase in ABCG1 expression strongly suggested that intracellular cholesterol concentration was reduced in T0901317-treated cells.

To confirm this hypothesis, free cholesterol levels were determined during a time course experiment in the presence of T0901317 in LNCaP cells. A significant and stable decrease in free cholesterol concentration was observed starting at 16 h (Figure 5a), which was consistent with earlier accumulation of *abcg1* at 8 h

(Figure 4b and Supplementary Data 2). Increased cholesterol accumulation in the T0901317-treated cell culture supernatant indicated an increase in the cholesterol efflux (Figure 5b). Levels of both cholesterol esters and free cholesterol decreased in T0901317-treated mice tumors (Figure 5c). This decrease was correlated with the reverse cholesterol transport to the liver as indicated by higher total and high-density lipoprotein-cholesterol levels in the plasma of T0901317-treated mice (Figure 5d). Taken together, these results showed that LXRs stimulated early cholesterol efflux through ABCG1 transporter upregulation, which resulted in a subsequent inactivation of AKT pathways and stimulation of apoptosis.

LXR activation reduces lipid raft size in a cholesterol-dependent manner

Given that free cholesterol is the main component of lipid raft, we suspected that reduction of free cholesterol content in T0901317-treated cells could decrease the lipid raft domain size and subsequently downregulate AKT signaling. To confirm this hypothesis, we examined the topography of the inner membrane sheet of LNCaP cells using atomic force microscopy (AFM) to analyze membrane domain height and width. In control cells, membrane domains were abundant. Most of them displayed flotillin-2 staining (Figure 6a, top), indicating that they were lipid rafts. Repeated measurements, summarized in Figure 6b, revealed that, in dimethylsulfoxide (DMSO) conditions, the width and height of these domains range from 451 ± 126 and 52 ± 12 nm, respectively. These observations were consistent with previous studies on RBL-2H3 cells (Frankel *et al.*, 2006). Inter-domain membrane regions had an average thickness of ~ 7 nm, measured relative to the poly-L-lysine-coated substrate, thus corresponding to the phospholipid bilayer (Supplementary Data 3A). T0901317 treatment resulted in a dispersion of both membrane domains and flotillin-2 staining, thus leading to membrane flattening (Figure 6a, bottom). Given that flotillin-2 is a raft

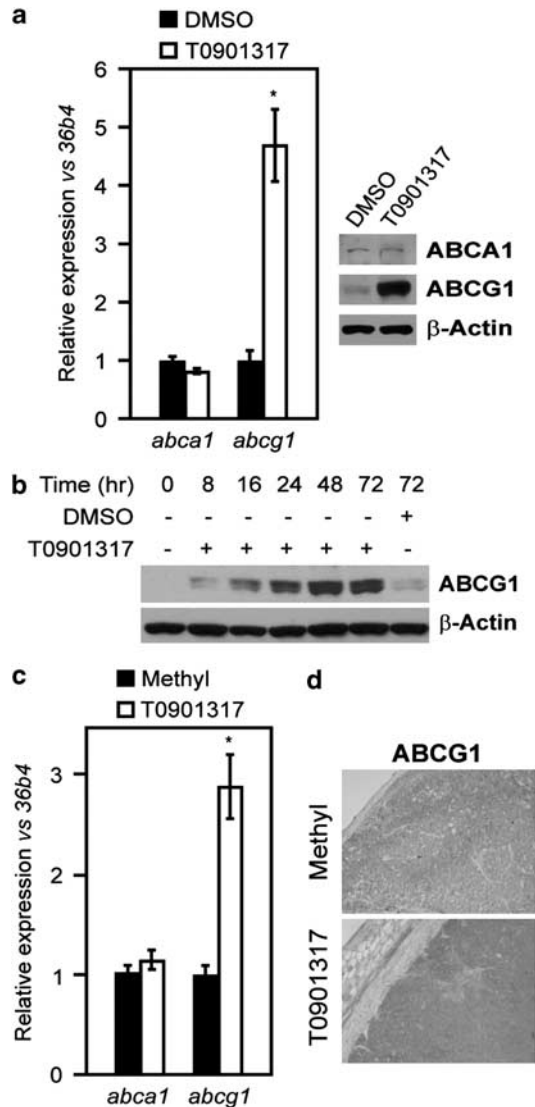


Figure 4 LXR activation enhances *abcg1* expression in LNCaP cells. (a) *abca1* and *abcg1* expression levels were analyzed in LNCaP cells treated with DMSO or T0901317 (3 μ M) by qPCR and western blot. (b) ABCG1 protein accumulation during a T0901317 time course induction was analyzed by western blot. (c) *abca1* and *abcg1* expression levels were analyzed by qPCR in LNCaP xenografts. (d) Immunohistochemistry against ABCG1 on LNCaP xenografts. Student's *t*-test: **P* < 0.05.

resident protein, the decrease in its signal indicates raft dispersion in T0901317 conditions and strongly suggests structural changes in lipid rafts. Quantification of membrane domain sizes revealed that T0901317-treated cells harbored smaller domains compared with DMSO-treated cells regarding both width and height (Figure 6b, Supplementary Data 3B). Although domains exhibited a median width of 451 ± 126 nm and height of 52 ± 12 nm in DMSO conditions, T0901317 stimulation resulted in a reduction in size domains, 259 ± 88 for width and 24 ± 10 for height. These alterations were reversed by co-treatment with cholesterol with a width range of 512 ± 122 and a height range of 46 ± 18 nm. This emphasized that cholesterol was the central component

by which LXRs could modulate the size of raft domains. Interestingly, cholesterol alone was also able to increase domain height (89 ± 26 vs 52 ± 12 nm) but did not appear to significantly alter domain width. Taken together, these results showed that LXR activation inhibited lipid raft coalescence by a mechanism involving cholesterol efflux.

Lipid raft alteration by LXRs blocks the AKT raft-dependent survival pathway

Raft coalescence is tightly associated with survival signaling transduction (Freeman and Solomon, 2004). For this reason, we investigated the raft-dependent signaling pathway phosphoinositide-3 kinase/AKT as a marker of survival signals inside lipid rafts. Lipid rafts were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation (Supplementary Data 4). Enrichment and contamination of cytosol/membrane and raft fractions were analyzed by flotillin-2 and β -tubulin detection. T0901317 treatment for 24h dramatically decreased AKT phosphorylation in the raft fraction, whereas AKT phosphorylation was unaltered in the cytosolic and membrane fractions (Figure 7). This slowing of AKT phosphorylation in the lipid raft fraction was consistent with the timing of the membrane cholesterol depletion observed (Figure 5a) after 16h of T0901317 induction.

Cholesterol antagonizes LXR-induced apoptosis by reactivation of the AKT survival pathway in lipid raft

We showed that cholesterol addition prevented raft disruption in T0901317-treated cells (Figure 6b). Thus, we hypothesized that, by maintaining AKT signaling activity in lipid rafts, cholesterol supplementation could antagonize LXR-induced apoptosis. We investigated phosphoAKT Ser⁴⁷³ and flotillin-2 subcellular localization by confocal microscopy. In control conditions, phosphoAKT Ser⁴⁷³ colocalized with lipid rafts as shown by flotillin-2 staining (Figure 8a), whereas T0901317 treatment decreased phosphoAKT Ser⁴⁷³ signal within the plasma membrane. Cholesterol supplementation restored the localization of phosphoAKT Ser⁴⁷³ within the rafts (see 'colocalization' column on Figure 8a). In parallel, western blot analysis indicated that cholesterol addition partially prevented AKT dephosphorylation on Ser⁴⁷³, reduced accumulation of cleaved poly-ADP-ribosyl-polymerase (Figure 8b) and reversed the effect of T0901317 on sub-G1 nuclei accumulation (Figure 8c). Altogether, these results showed that the proapoptotic effects of activated LXRs were mediated by cholesterol depletion in rafts, which in turn inhibited activity of the AKT survival pathway and induced apoptosis.

Discussion

This study points out LXR isoforms and their ligands as key modulators of PCa cell survival. Our *in vitro* and *in vivo* analyses revealed that modulation of LXR

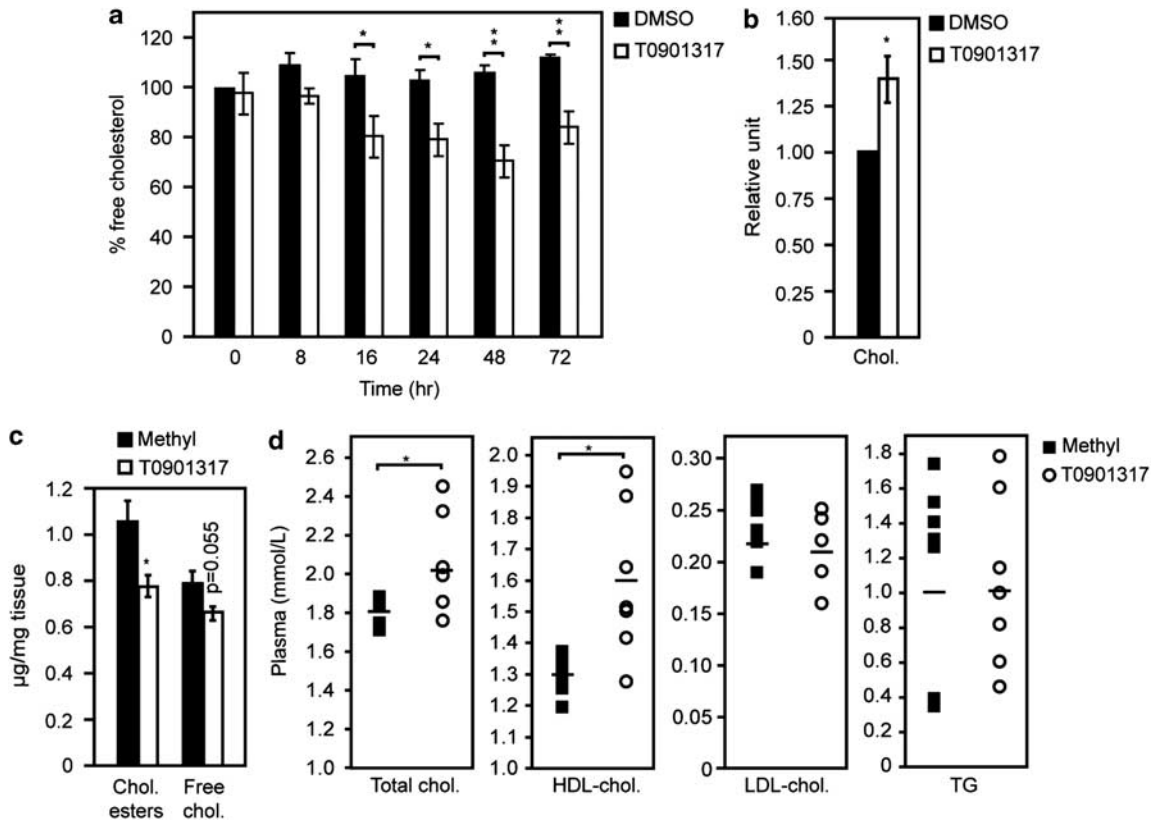


Figure 5 Upregulation of *abcg1* decreases free cholesterol content by activation of reverse cholesterol transport in xenografts. (a) Time course induction was performed on LNCaP cells treated with DMSO or T0901317 (3 μ M) to analyze free cholesterol relative amount. (b) Cholesterol (Chol.) was measured in the medium after 48 h of T0901317 exposure to analyze cholesterol efflux. (c) Free and cholesteryl esters were quantified in LNCaP xenografts of methyl cellulose and T0901317-treated mice. Student's *t*-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (d) Total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride (TG) contents were analyzed by enzymatic colorimetric assay in plasma of nude mice. Data are means \pm s.d. bars ($n = 8$). Mann-Whitney test: * $P < 0.05$.

activity triggered apoptosis of PCa cells. This effect involves both the increase in cholesterol efflux and the subsequent disruption of lipid rafts. We showed that LXR-mediated upregulation of ABCG1 stimulated reverse cholesterol transport. This resulted in a reduction in plasma membrane cholesterol steady-state levels. These observations were correlated with a decrease in the phosphorylated fraction of raft-associated AKT. We showed that cholesterol replenishment or MyrAKT expression prevented the cells from apoptosis in the presence of T0901317. Consistent with this mechanism, chronic T0901317 treatment induces downregulation of AKT and stimulates apoptosis of LNCaP-derived tumors in xenografted mice.

The major finding of this work is the role of LXRs as modulators of lipid raft signaling. Freeman and Solomon (2004) proposed that a critical cholesterol concentration in the membrane was required to allow raft coalescence. Sequestration of 'oncogenic' signaling proteins in a restricted area through raft coalescence could enhance their activity by exclusion of negative regulators outside the rafts (Yang *et al.*, 1998). Moreover, expansion of the raft could tether AKT with upstream regulators such as DNA-dependent protein

kinase. This kinase is known to be associated with the raft fraction and to phosphorylate AKT on ser⁴⁷³ residue (Hill *et al.*, 2002). Transfecting LNCaP cells with MyrAKT partially, but not completely, blocked T0901317-induced apoptosis (Figure 3c). Consistent with this, MyrAKT has been described to be over-represented in lipid raft fractions indicating that myristoylation preferably anchored the kinase in rafts (Adam *et al.*, 2007). Similar to MyrAKT, the sub-population of AKT, which is cholesterol sensitive (raft resident), has been shown to phosphorylate distinct substrates from those targeted by AKT located elsewhere in the cell. These substrates have been shown to support most of the prosurvival effects of AKT (Adam *et al.*, 2007). These observations could explain why MyrAKT expression failed to completely abolish apoptosis in T0901317-treated cells. Another possibility could be that LXR activation interferes with others raft-dependent survival pathways and acts by an AKT-independent mechanism.

As previously shown, inhibition of *de novo* cholesterol synthesis by simvastatin results in a decrease in raft-associated AKT phosphorylation without a concomitant effect on other AKT protein fractions (Zhuang

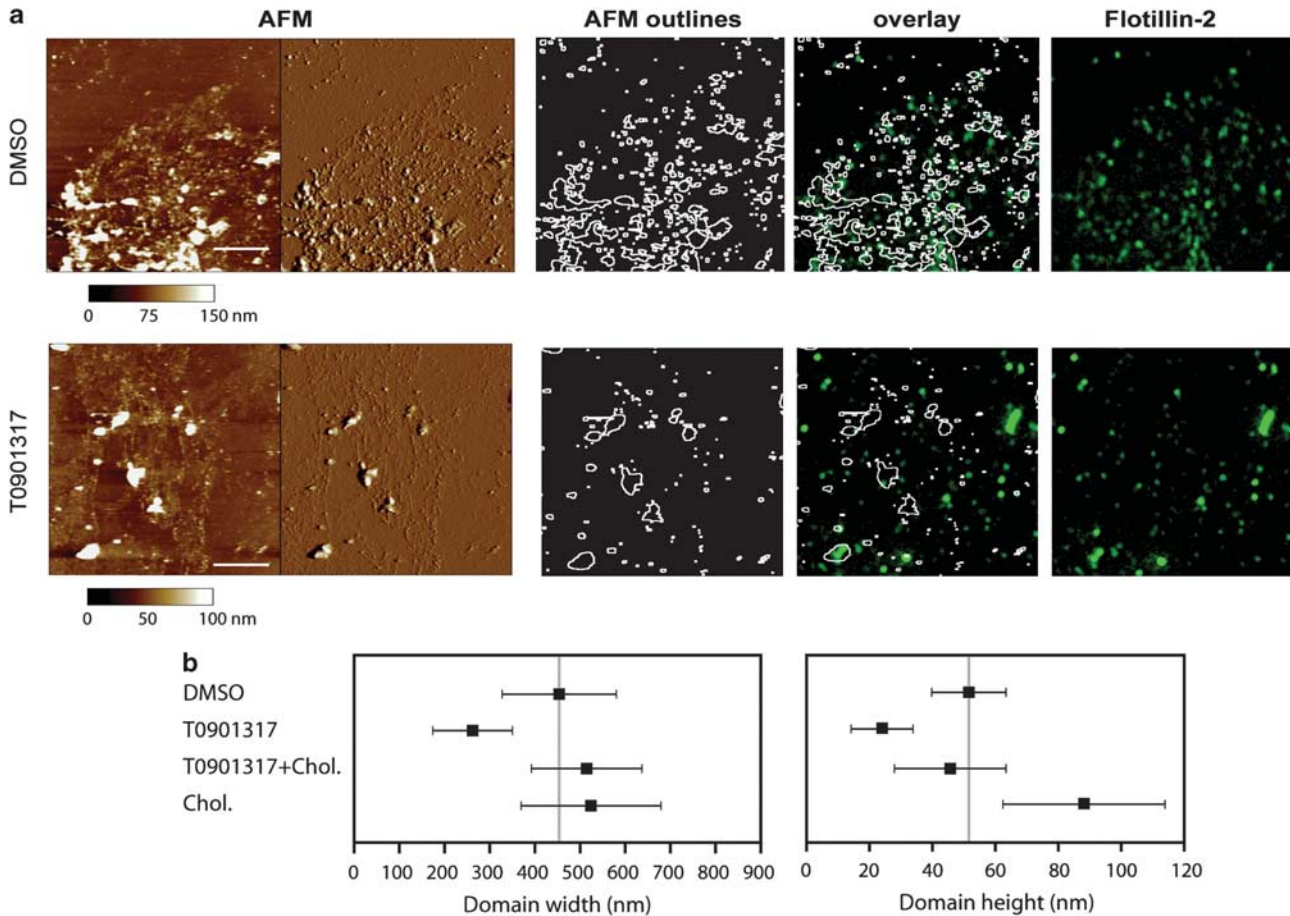


Figure 6 LXRs control lipid raft coalescence. (a) Simultaneous atomic force microscopy (AFM) and fluorescence images of inner membrane sheets were obtained after LNCaP cell preparation. Flotillin-2 detection and AFM scanning were performed on LNCaP cells treated with DMSO (top) or T0901317 (1 μ M) (bottom); AFM pictures were outlined and overlaid with flotillin-2 staining. Scale bar represents 5 μ m. (b) Means \pm s.d. of height and width domains, measured by cross-section ($n = 30$), from LNCaP cells treated with DMSO, T0901317 (1 μ M), T0901317 + Chol. (10 μ M) or Chol. (10 μ M) alone.

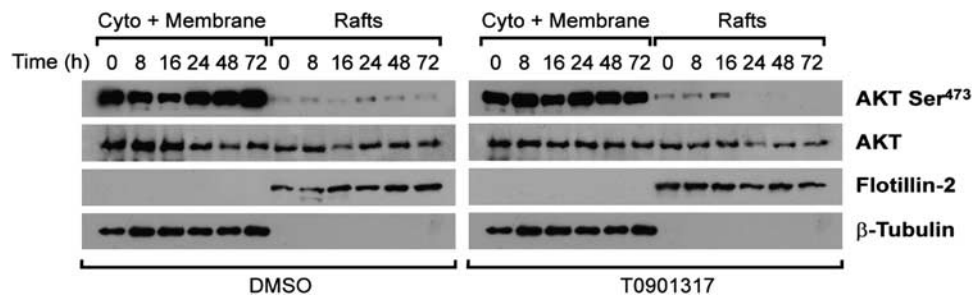


Figure 7 LXR activation inhibits AKT survival pathway in lipid raft. Cells were treated with DMSO or T0901317 (3 μ M) during a time course experiment. After ultracentrifugation on a sucrose gradient, raft fractions and cytosolic + membrane fractions were collected and detected by western blot using antibodies against AKT Ser⁴⁷³, AKT, flotillin-2 and β -tubulin.

et al., 2005). We observed a similar effect of T0901317 on LNCaP cells and consequently postulated that activation of LXRs could hamper raft coalescence. Chemical or RNA interference inhibition of squalene synthase, which switches the mevalonate/isoprenoid pathway toward sterol biosynthesis, was shown to decrease cholesterol concentration within lipid rafts and to induce growth arrest and cell death in LNCaP

cells (Brusselmans *et al.*, 2007). A potential target of raft dynamics modulation is the Hedgehog pathway. The Hedgehog receptor Patched and its positive regulator Smoothened localize to lipid rafts and this complex can be altered by depletion of membrane cholesterol (Karpen *et al.*, 2001). Interestingly, this pathway is frequently activated in PCA and favors proliferation and metastasis (Fan *et al.*, 2004; Karhadkar *et al.*, 2004;

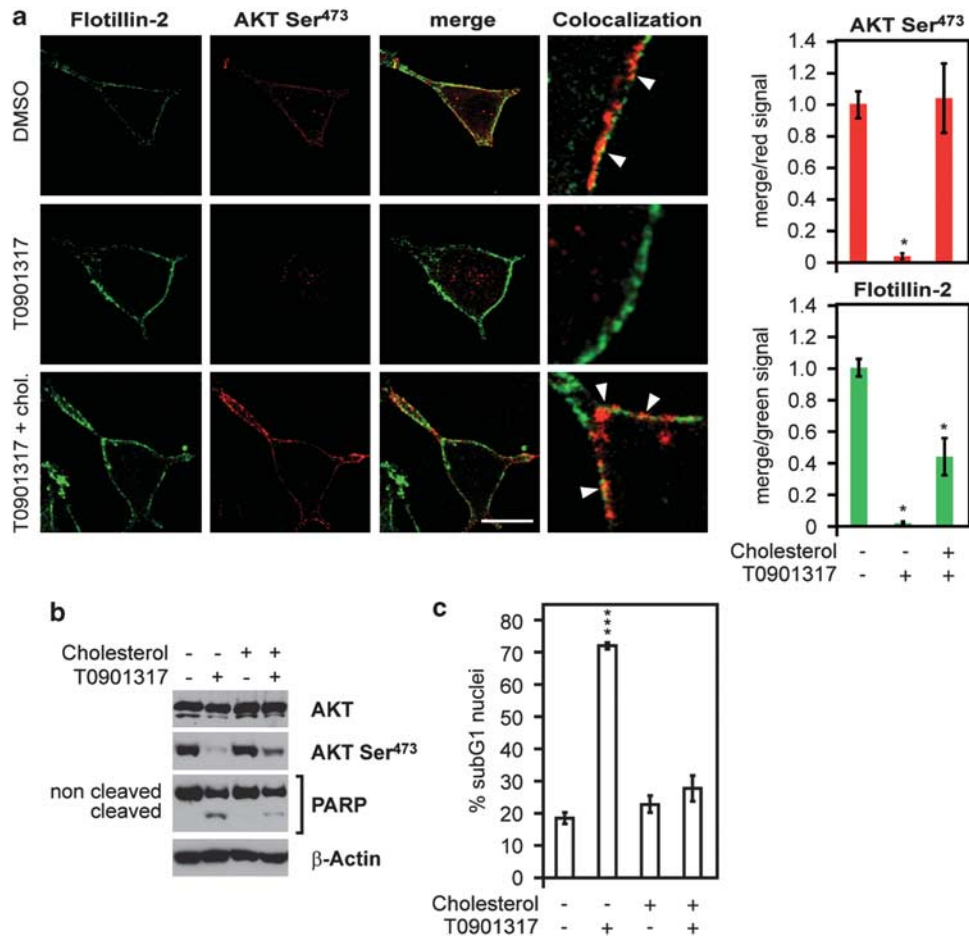


Figure 8 Cholesterol antagonizes LXR-induced apoptosis by 'reactivation' of the AKT survival pathway in lipid raft. (a) Flotillin-2 and AKT Ser⁴⁷³ subcellular localizations were analyzed by immunofluorescence staining, labeled in green and red colors, respectively, and observed by confocal microscopy. Experiments were obtained from LNCaP cells treated with DMSO, T0901317 (3 μ M) or T0901317 + Chol. (10 μ M). Scale bar represents 20 μ m. Pictures represent a compilation of central slices of the Z stacks. Right column (named colocalization) illustrates magnification of only one slice of the central stack. Yellow dots indicate colocalization of both markers. Quantification of colocalized signals was realized using ImageJ software by quantifying the colocalized signal reported to AKT Ser⁴⁷³ staining (graph with red columns) or to flotillin-2 staining (graph with green columns). Student's *t*-test: * $P < 10^{-7}$. (b) LNCaP cells were incubated for 48 h in the presence or absence of T0901317 (3 μ M). After 24 h of treatment, 10 μ M cholesterol was added to the cell medium. Proteins were collected and AKT, AKT Ser⁴⁷³, poly-ADP-ribosyl-polymerase and β -actin were analyzed by western blot. (c) Sub-G1 nuclei accumulation was quantified by flow cytometry. Student's *t*-test: *** $P < 0.001$.

Sanchez *et al.*, 2004). Covalent binding of cholesterol to the Hedgehog family signaling molecules is essential for pathway activity. Moreover, oxysterols have been reported to stimulate expression of two direct target genes of the Hedgehog pathway, glioma-associated oncogene homolog 1 and patched (Dwyer *et al.*, 2007).

Fukuchi *et al* (2004b) reported the control of cell proliferation by LXRs. In their experiments, T0901317 decreased the percentage of cells in the S phase through an upregulation of p27kip1. The induction of ABCA1 expression by T0901317 led to the assumption that ABCA1 was the key regulator of the cell cycle in response to LXR activation (Fukuchi *et al.*, 2004a). We observed induction of ABCG1 but not of ABCA1 in treated cells. Despite that difference, cholesterol efflux seems to be the common mechanism targeted by LXRs in both cases. This hypothesis was supported by experiments where cholesterol complementation

prevented apoptosis of cells treated with T0901317 (Figure 8). This was further substantiated by the effect of methyl- β cyclodextrin, a cholesterol-depleting agent, which induces raft disruption and inactivation of AKT signaling (Li *et al.*, 2006).

Beyond LXR activation, oxysterols are also known to regulate apoptosis in various tissues. It is noted that 25-OHC and 7-ketocholesterol induce macrophage apoptosis by targeting AKT degradation. This degradation stimulates the cleavage of mitochondrial BCL family proteins involved in apoptosis through cytoplasmic cytochrome *c* release (Yang and Sinensky, 2000; Rusinol *et al.*, 2004). Oxysterols have also been identified as inducing apoptosis in a wide range of models such as human leukemia cell lines (Laffitte *et al.*, 2003) or pancreatic β -cells (Choe *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2009). In these cells, the master lipogenic genes SREBP1c, fatty acid synthase and acyl CoA-carboxylase- α drive an increase in intracellular lipid accumulation, which

results in cell lipotoxicity. Paradoxically, PCa cells exhibit a high activation of the lipogenic pathway, which stimulates growth and proliferation. Accordingly, lipogenic enzymes have been found to be overexpressed in the earliest stages of PCa and in invasive carcinoma (Pizer *et al.*, 2001; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003). Likewise, inhibition of acyl CoA-carboxylase- α by soraphen A as well as RNA interference against acyl CoA-carboxylase- α or fatty acid synthase induces growth inhibition and apoptosis (Brusselmans *et al.*, 2005; Beckers *et al.*, 2007). Production of long-chain fatty acids is thus required for cancer cell promotion. Altogether, these observations indicate that PCa progression is tightly linked to the activation of lipogenesis and concomitant inhibition of cholesterol efflux.

Our data raise the question of the role of circulating cholesterol levels in PCa progression. Epidemiological analyses revealed a positive association between hypercholesterolemia and PCa (Bravi *et al.*, 2006; Magura *et al.*, 2008). *In vitro*, statins and their derivatives block PCa cell growth (Ukomadu and Dutta, 2003; Mo and Elson, 2004; Sekine *et al.*, 2008). Observational studies show a decreased risk of advanced PCa in patients using statins depending on the duration and dosage of the treatment (Demierre *et al.*, 2005; Poynter *et al.*, 2005; Shannon *et al.*, 2005; Murtola *et al.*, 2008). Thus, our present study highlights LXR agonists as potent mediators to stimulate cholesterol reverse transport and subsequently to lower cholesterol supply in PCa cells. As already described for statins, decreasing free cholesterol within the cell appears to be a promising way to control prostatic tumor cell survival. Given that reverse cholesterol transport induced by LXRs results in the disruption of lipid rafts and downregulates raft-associated signaling in PCa cells, our findings reinforce the potential use of LXR agonists as pharmacological agents in cancer prevention and anticancer therapy.

Materials and methods

Reagents

The ligands 22(R)-hydroxycholesterol, 25(R)-hydroxycholesterol and 7 α -hydroxycholesterol were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France), and T0901317 from Cayman Chemical (Montigny-le-Bretonneux, France). All the ligands used in the cell culture were diluted in DMSO. Water-soluble cholesterol was purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection

LNCaP cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in RPMI medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing penicillin and streptomycin (100 μ g/ml) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France). For LXR RNA interference, LNCaP cells were transfected twice using the Metafecten transfectant reagent (Biontex Martinsried, Planegg, Germany) in 10% fetal bovine serum-supplemented medium with a single 400 pmol/ml small interfering RNA solution alone or in combination during 72 h. Cells were trypsinized and seeded at 2×10^5 in six-well plates. After 12 h, cells were incubated in a fetal bovine serum-depleted medium containing a DMSO or T0901317 solution for 36 h. To silence

genes, the following primers were used: siLXR α 5'-AGCA GGGCUGCAAGUGGAATT-3'; siLXR β 5'-CAGAUCCGG AAGAAGAAGATT-3'; siGFP 5'-ACUACCAGCAGAACA CCCCUUTT-3'. Cells were harvested and protein extraction or flow cytometry analyses were performed. For Myr AKT expression, 12 h after seeding at 2×10^5 cells in six-well plates, cells were transfected using Metafecten with 1 μ g of the pCMV6-HA-myrAKT vector (kindly provided by Dr Nahed N Ahmed (Ahmed *et al.*, 1997)). After 5 h of transfection, cells were treated for 48 h with 3 μ M of T0901317 and the sub-G1 nuclei level analyzed by flow cytometry.

Western blot analysis

Proteins were extracted in HEPES 20 mM, NaCl 0.42 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, NP40 1%, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, Na₃VO₄ 0.1 mM, NaF 0.1 mM and complete 1X (Roche Diagnostics, Meylan, France). Lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 15000g. Forty μ g of total protein were subjected to denaturing SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against either human anti-ABCA1 or ABCG1 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), β -actin or β -tubulin (Sigma-Aldrich), AKT, caspase-3, cleaved-caspase-3, caspase-6, cleaved caspase-6, caspase-9 and cleaved caspase-9 (Cell Signaling, Montigny-le-Bretonneux, France), endothelial growth factor receptor (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), Flotillin-2/ESA (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), poly-ADP-ribosyl-polymerase (Invitrogen), LXR α or LXR β (Perseus Proteomics, Tokyo, Japan) or Phospho-AKT (Epitomics, Burlingame, CA, USA). A second 1h-incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit or mouse immunoglobulin G (P.A.R.I.S, Compiègne, France) was performed. Peroxidase activity was detected with the Western Lightning System (Perkin-Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France).

Quantitative PCR

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with MMLV-RT (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. The quantitative PCR was performed on an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France). Four μ l of 1:50 diluted cDNA template were amplified by 0.75 U of HotMaster TaqDNA polymerase (Eppendorf, Brumath, France) using SYBR Green dye to measure duplex DNA formation. Primer sequences were as follows: ABCA1 5'-GCACTGAGGAAGATGCTGAA-3' and 5'-AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTTC-3'; ABCG1 5'-CAGG AAGATTAGACACTGTG-3' and 5'-GAAAGGGGAATGG AGAGAAG-3'; 36b4 5'-GTCAGTGTGCCAGCTCAGAA-3' and 5'-TCAATGGTGCCTCTGGAGAT-3'. 36b4 was used as a housekeeping gene.

Cell immunofluorescence labeling

Cells were treated for 48 h with T0901317 or vehicle with or without cholesterol added for the last 24 h, rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS), and fixed in -20°C methanol/acetone mixture (50/50: v/v) for 10 min. After rapid washes in PBS, cells were incubated in PBS Triton X-100 0.1% for 10 min. Anti-pAKT Ser473 (Epitomics) and/or anti-Flotillin-2/ESA (BD Transduction Laboratories) immunocytochemistry was performed in 1.5% normal goat serum/PBS at 4°C overnight. After washing, the secondary Alexa 555

conjugated anti-rabbit immunoglobulin G and/or Alexa 488 conjugated anti-mouse immunoglobulin G (Invitrogen) was added in 1.5% normal goat serum/PBS for 2 h at room temperature. Slides were mounted with VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and were visualized by Zeiss LSM 510 Meta Confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Xenograft immunostaining and TdT-mediated dUTP nick end labeling analysis

Xenograft immunostaining was performed as follows: paraffin sections were dewaxed and rehydrated through a graded series of ethanol and double distilled water baths. Tissue sections were incubated in 0.1 M citrate buffer pH 6.0 for 5 min in microwave at 350 W. Unspecific epitopes were saturated using bovine serum albumin 1%, fetal bovine serum 1% diluted in PBS 1X at room temperature. Primary antibodies were diluted in PBS 1X, bovine serum albumin 0.1% and incubated at 4 °C overnight. Secondary Alexa 555 conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (Invitrogen) was incubated 1 h at room temperature. To identify apoptosis in tumor sections, TdT-mediated dUTP nick end labeling method was applied using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics). Cell nuclei staining was obtained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 µg/ml. Picture analysis was performed using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope. For apoptotic quantification, the ratio of apoptotic cells to total cells was measured by a threshold method using Image J 1.37v software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Flow cytometry analysis

Cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in RNase A (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1 h at 4 °C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter fluorescence-activated cell sorter (Beckman Coulter, Roissy, France). The percentage of apoptotic cells was determined by evaluating sub-G1 nuclei accumulation. At least 15 000 events were measured for each sample.

Lipid analysis

Lipids were extracted as previously described (Grizard *et al.*, 2000). Blood concentrations of triglycerides, cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol were determined on an automated clinical chemistry analyzer (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Lipid raft analysis

Membrane lipid rafts were isolated by ultracentrifugation on sucrose gradients. Cells were washed twice in PBS, scraped into 350 µl of TNE-Triton X-100 1% buffer (10 mM TRIS, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA). After 5 s of sonication, 2 mg of protein were mixed with 85% sucrose in TNE buffer. A discontinuous sucrose gradient in TNE buffer was then formed by sequential layering, 42.5, 35 and 5% sucrose. Tubes were subjected to ultracentrifugation at 3 000 000 g for 19 h in Beckman Coulter Optima LE-80K swinging rotor SW 40Ti (Beckman) at 4 °C. Eleven fractions were collected from the top of the gradient. Samples were concentrated by methanol/chloroform precipitation (Wessel and Flugge, 1984) and analyzed by western blotting.

Athymic nude mice study

Six- to 8-week-old male Swiss nu/nu mice (Charles River, Chatillon-sur-Chalaronne, France) received subcutaneous injections of 3.10⁶ LNCaP cells suspended in Matrigel (BD

Bioscience). Three weeks after tumor implantation, either T0901317 or methyl-cellulose vehicle was daily *per os* administered during 1 month. Tumors were measured every 3 days using a caliper, and their volumes were calculated using the formula length × width × height × 0.52 (Umekita *et al.*, 1996). Initial tumor volumes were 181 ± 74 mm³ before treatment. Mice were killed after 1-month treatment. Xenografts were removed and divided into several parts: one was fixed in an ethanol, formaldehyde 37% and acetic acid mixture (7.5:2:0.5; v/v) and embedded in paraffin for histological analysis, and others were snap-frozen in liquid nitrogen for lipid and RNA analyses. Blood plasma samples were obtained just before necropsy by heart puncture on anesthetized mice. All animals were maintained in a controlled environment and animal care was conducted in compliance with the national standards and policies (C 63 014.19). All experiments were approved by the Regional Ethics Committee (protocol CE11-08).

Preparation of plasma membrane sheets for atomic force microscopy/fluorescence

Plasma membranes were prepared as previously described (Frankel *et al.*, 2006). Briefly, cleaned glass coverslips were coated with 0.2 mg/ml of poly-L-lysine for 30 min. Living cells were fixed in 0.5% paraformaldehyde in PBS in the presence of Hoechst 33942 for 10 min in the dark at room temperature. The monolayer of cells was inverted and applied onto the coated coverslip in the presence of HEPES buffer (25 mM Hepes pH 7, 25 mM KCl) for 10 min at room temperature in a wet atmosphere to make a 'sandwich.' Coverslips were then separated by flotation, producing a monolayer of membrane sheets, all oriented with the cytoplasmic face-up for simultaneous AFM/fluorescence imaging. Before AFM and fluorescence analyses, flotillin-2 was detected as described above.

Simultaneous AFM and fluorescence imaging

Atomic force microscopy was performed using a commercial AFM Bioscope (Nanoscope IIIa, Digital Instruments, Veeco, Santa Barbara, CA, USA) combined with an inverted optical microscope (Olympus IX 70, Rungis, France) and a fluorescence setup (Leica Camera DFC500, Leica Microsysteme, Nanterre, France). The coverslips with membrane sheets were mounted on a manual XY stage that allowed large range viewing of the sample with an Hg lamp. AFM was operated in contact mode in PBS using a long V-shape silicon nitride cantilever (320 µm in length), with a nominal spring constant of 0.01 mN/m (MLCT-AU microlevers, Veeco) to minimize the force applied to the sample (<1 nN). The image fields (20 × 20 µm) were obtained at 0.5 Hz; thus, 5–10 min were required to scan the entire sample. The heights and widths of the domains were determined from the AFM topography images using the line profiling routines in Nanoscope software (v5.12, Veeco). The heights of domains (*n* = 30) were measured relative to the surrounding membrane, not relative to the substrate.

Statistical analysis

Student's *t*-test or Mann-Whitney's test was performed to determine whether there were significant differences between the groups. A *P*-value <0.05 was considered significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue Allier contre le Cancer, FRM and Fondation BNP-Paribas research grants. A Pommier and E Viennois are funded by MNERT and Région Auvergne grants, respectively, and G Alves is funded by Région

Auvergne program. We are grateful to ICCF—Imagerie Confocale Clermont-Ferrand—for the help in confocal analyses. We thank JP Saru and A De Haze for molecular biology technical assistance, and C Puchol and S Plantade for animal facilities. We also thank Dr P Val, Dr A Martinez, Dr L Morel and Dr C White for their help in the editing of the paper and for fruitful scientific discussions.

References

- Adam RM, Mukhopadhyay NK, Kim J, Di Vizio D, Cinar B, Boucher K *et al.* (2007). Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt. *Cancer Res* **67**: 6238–6246.
- Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO, Tschlis PN. (1997). Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3627–3632.
- Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, Brusselmans K *et al.* (2007). Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* **67**: 8180–8187.
- Bravi F, Scotti L, Bosetti C, Talamini R, Negri E, Montella M *et al.* (2006). Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann Oncol* **17**: 1014–1017.
- Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. (2005). RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- α gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* **65**: 6719–6725.
- Brusselmans K, Timmermans L, Van de Sande T, Van Veldhoven PP, Guan G, Shechter I *et al.* (2007). Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J Biol Chem* **282**: 18777–18785.
- Carson JP, Kulik G, Weber MJ. (1999). Antiapoptotic signaling in LNCaP prostate cancer cells: a survival signaling pathway independent of phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt/protein kinase B. *Cancer Res* **59**: 1449–1453.
- Choe SS, Choi AH, Lee JW, Kim KH, Chung JJ, Park J *et al.* (2007). Chronic activation of liver X receptor induces β -cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis. *Diabetes* **56**: 1534–1543.
- Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, Liao S. (2006). Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* **66**: 6482–6486.
- Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. (2005). Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* **5**: 930–942.
- Dwyer JR, Sever N, Carlson M, Nelson SF, Beachy PA, Parhami F. (2007). Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* **282**: 8959–8968.
- Fan L, Pepicelli CV, Dibble CC, Catbagan W, Zarycki JL, Laciak R *et al.* (2004). Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology* **145**: 3961–3970.
- Frankel DJ, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Johnson AE, Oliver JM, Wilson BS *et al.* (2006). Revealing the topography of cellular membrane domains by combined atomic force microscopy/fluorescence imaging. *Biophys J* **90**: 2404–2413.
- Freeman MR, Solomon KR. (2004). Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* **91**: 54–69.
- Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. (2004a). Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**: 7686–7689.
- Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Hsu S, Ko AL, Fitzgerald ML *et al.* (2004b). Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**: 7682–7685.
- Grizard G, Sion B, Bauchart DD, Boucher D. (2000). Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **740**: 101–107.
- Hill MM, Feng J, Hemmings BA. (2002). Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1. *Curr Biol* **12**: 1251–1255.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A *et al.* (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**: 707–712.
- Karpen HE, Bukowski JT, Hughes T, Gratton JP, Sessa WC, Gailani MR. (2001). The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem* **276**: 19503–19511.
- Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA. (2009). Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 558–563.
- Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB *et al.* (2003). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5419–5424.
- Lawrence JC, Saslowsky DE, Edwardson JM, Henderson RM. (2003). Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. *Biophys J* **84**: 1827–1832.
- Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN. (2006). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* **168**: 1107–1118 (quiz 1404–5).
- Liao Y, Grobholz R, Abel U, Trojan L, Michel MS, Angel P *et al.* (2003). Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer. *Int J Cancer* **107**: 676–680.
- Magura L, Blanchard R, Hope B, Beal JR, Schwartz GG, Salmoun AE. (2008). Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* **19**: 1259–1266.
- Meng ZX, Nie J, Ling JJ, Sun JX, Zhu YX, Gao L *et al.* (2009). Activation of liver X receptors inhibits pancreatic islet beta cell proliferation through cell cycle arrest. *Diabetologia* **52**: 125–135.
- Mo H, Elson CE. (2004). Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**: 567–585.
- Mouzat K, Volat F, Baron S, Alves G, Pommier AJ, Volle DH *et al.* (2009). Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* **150**: 3369–3375.
- Murtola TJ, Visakorpi T, Lahtela J, Syvala H, Tammela T. (2008). Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions. *Nat Clin Pract Urol* **5**: 376–387.
- Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB. (2001). Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* **47**: 102–110.
- Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS *et al.* (2005). Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* **352**: 2184–2192.
- Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T *et al.* (2003). Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res* **1**: 707–715.

- Rusinol AE, Thewke D, Liu J, Freeman N, Panini SR, Sinensky MS. (2004). AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 1392–1399.
- Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A *et al*. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12561–12566.
- Sekine Y, Furuya Y, Nishii M, Koike H, Matsui H, Suzuki K. (2008). Simvastatin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via down-regulation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **372**: 356–361.
- Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, Beer TM, Derenick R, Palma A *et al*. (2005). Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* **162**: 318–325.
- Simons K, Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31–39.
- Solomon KR, Rudd CE, Finberg RW. (1996). The association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and heterotrimeric G protein alpha subunits in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 6053–6058.
- Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L *et al*. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* **98**: 19–22.
- Swyer G. (1942). The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* **2**: 372–375.
- Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* **17**: 985–993.
- Ukomadu C, Dutta A. (2003). Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J Biol Chem* **278**: 4840–4846.
- Umekita Y, Hiiipakka RA, Kokontis JM, Liao S. (1996). Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11802–11807.
- Volle DH, Lobaccaro JM. (2007). Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the ‘foie gras’, the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* **265-266**: 183–189.
- Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L, Tontonoz P. (2004). Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J Biol Chem* **279**: 9905–9911.
- Wessel D, Flugge UI. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141–143.
- White C. (1909). On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* **13**: 3–10.
- Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH *et al*. (1998). Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* **4**: 1873–1880.
- Yang L, Sinensky MS. (2000). 25-Hydroxycholesterol activates a cytochrome *c* release-mediated caspase cascade. *Biochem Biophys Res Commun* **278**: 557–563.
- Yuan XJ, Whang YE. (2002). PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* **21**: 319–327.
- Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* **115**: 959–968.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Article 5 : *Diet-induced intracellular cholesterol overload initiates prostate cancer development in lxr^{-/-} mice.*

Pommier A, Dufour J, Alves G, Viennois E, Trousson A, Volle D, Caira F, Val P, Manin M, Arnaud P, Lobaccaro JM.A and Baron S.

En préparation.

Diet-induced intracellular cholesterol overload initiates prostate cancer development in *Ixr*^{-/-} mice.

Aurélien Pommier^{1,2,3}, Julie Dufour^{1,2,3}, Georges Alves^{1,2,3}, Emilie Viennois^{1,2,3}, Amalia Trousson^{1,2,3}, David Volle^{1,2,3}, Françoise Caira^{1,2,3}, Pierre Val^{1,2}, Michèle Manin^{1,2,3}, Philippe Arnaud⁴, Jean-Marc Lobaccaro^{1,2,3} and Silvère Baron^{1,2,3}.

¹Clermont université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F63000 CLERMONT-FERRAND, France

²CNRS, UMR 6247, GRéD, F-63177 AUBIERE, France

³Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

⁴Institut de Génétique Moléculaire, CNRS-5535 and Universités de Montpellier, 1919, route de Mende, F-34090 MONTPELLIER, France

Running title: Cholesterol homeostasis and prostate cancer

Address correspondence to: Dr Silvère Baron, "Génétique Reproduction et Développement", UMR CNRS 6247 Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France

Phone: (33) 4 7340 7412; Fax: (33) 4 7340 7042

E-mail: Silvere.BARON@univ-bpclermont.fr

Final character count : 55 081

Abstract

Several pieces of evidence suggest that the presence of high amounts of cholesterol promotes prostate cancer. Ablation of the Liver X receptors is known to result in cholesterol homeostasis disruption. Thus, we analyzed the effect of a cholesterol-rich diet on the prostates of mice invalidated for both *Ixr α* and *Ixr β* (*Ixr*^{-/-}) genes. We show that *Ixr*^{-/-} mice fail to regulate *idol* and *abca1* expression in dorso-lateral prostatic lobes, resulting in disruption of LDL-uptake and cholesterol efflux. Consequent cholesterol overload is correlated with a neoplastic-like phenotype. Microarray analysis reveals that gene expression patterns of prostates from *Ixr*^{-/-} mice fed a high cholesterol diet are closely related to cancer. Cholesterol-overloaded prostates exhibit a repression of prostatic tumor suppressor genes *nkx3.1* and *msmb*. Concomitantly, the principal upstream modulator of *nkx3.1* and *msmb*, the histone methyltransferase *ezh2*, is deregulated. Consistent with these results, we show that PC3 human prostate cancer cells have increased expression of *ezh2* when exposed to LDL-cholesterol. Collectively, these results establish a new connection between LXRs, cholesterol homeostasis and prostate cancer initiation.

Key words: Cholesterol/LXR/prostate cancer.

Introduction

Prostate cancer is the most common cancer in men. Etiology of the disease is still elusive. Among the various environmental risk factors of the western lifestyle associated with the occurrence of prostate cancer, epidemiological analyses highlight lipid consumption. Clinical and basic evidence point out the effect of cholesterol accumulation in tumor progression. Hypercholesterolemia has been reported to increase risk of advanced prostate cancers (Bravi et al., 2006, Magura et al., 2008). Conversely, patients with cardio-vascular disorders treated on the long term with hypocholesterolemic agents such as statins, exhibit a lower risk of aggressive prostate cancer (Murtola et al., 2008). Consistent with these clinical observations, a high cholesterol diet increases tumor growth in a mouse model of xenografted LNCaP cells, whereas statin exposure leads to LNCaP cell death (Zhuang et al., 2005). This correlates with previous observations that showed a high cholesterol content in solid tumors (Swyer 1942, White 1909). Cell cholesterol accumulation may be the result of several deregulations in cholesterol homeostasis such as a high synthesis level through the mevalonate pathway or a low reverse transport and an increase of cholesterol uptake by tumor cells. In plasma, cholesterol is transported as low-density lipoprotein (LDL) to peripheral tissues where uptake is mediated through the LDL receptor (LDLR). Previous studies showed that aggressive prostate cancer cells lack the feedback regulatory system to control LDL uptake by LDLR (Chen & Hughes-Fulford 2001) and suggested that high intracellular levels of cholesterol could be involved in the aggressiveness of tumor cells. Regulation of cholesterol uptake by LDLR is controlled by a molecular pathway involving liver X receptors (LXRs), known to play a crucial role in cholesterol homeostasis (Zelcer et al., 2009). LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily and bind to naturally occurring oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols (Tontonoz & Mangelsdorf 2003, Viennois et al., 2011). Interestingly, pharmacological activation of LXRs leads to tumor growth reduction in a xenograft model by both inhibition of proliferation (Fukuchi et al., 2004) and induction of cell apoptosis (Pommier et al., 2010). This is associated with LXR-dependent upregulation of ABC cassette expression and reverse cholesterol transport, which results in decreased cholesterol accumulation in tumor cells. These data support previous observations that cholesterol could be involved in prostate cancer progression (Freeman & Solomon 2004) and suggest a crucial impact of LXR-regulated pathways in preventing the deleterious effects of cholesterol.

Despite increasing evidence highlighting the association between cholesterol and LXR target genes in prostate cancer progression, the role of cholesterol during the initiation steps is unknown. In this study we analyzed the effect of a high cholesterol diet (HCD) vs control diet (CD) on the prostates of wild type and LXR α ; β -knockout (*lxr*^{-/-}) mice. We showed that association of HCD and LXRs ablation results in increased cholesterol esters accumulation in the prostate. Cholesterol overload is correlated with a neoplastic-like phenotype within the epithelium. *Lxr*^{-/-} mice fed a HCD exhibit prostatic hyperplasia and aberrant epithelial cell-renewal. Microarray and gene ontology analyses show that the phenotype is associated with a molecular signature reminiscent of prostate cancer. Accordingly, expressions of the tumor suppressors *nkx3.1* and *msmb* and of the histone methyltransferase *ezh2* are deregulated in these lesions. These observations suggest that the genetic ablation of LXRs and

the resulting increased cholesterol accumulation affect prostate epithelial homeostasis and lead to deregulation of epigenetic pathways.

Results

Mice lacking LXRs showed LDLR-IDOL regulation defects, ABCA1 down-regulation and cholesterol accumulation in the prostate.

Given that LXRs act as central sensors of intracellular cholesterol, we suspect that prostatic epithelium of *lxr*^{-/-} mice could be sensitive to an increase of cholesterol amounts. Mouse prostate is divided in ventral (VP), dorso-lateral (DLP) and anterior (AP) prostatic lobes. In the present work, we focused on DLP known to be the most sensitive to carcinogenesis. Kim et al, previously reported a phenotype closed to benign prostatic hyperplasia in the VP of *lxr*^{-/-} mice, which was associated with a basal increase of epithelium and stromal proliferation (Kim et al., 2009). However, no data was available regarding DLP of *lxr*^{-/-} mice. In order to unbalance cholesterol homeostasis, we fed both wild-type (WT) mice and *lxr*^{-/-} mice with a control (CD) or high cholesterol diet (HCD). Positive Oil-Red-O staining indicated high levels of neutral lipids in DLP of *lxr*^{-/-} mice only when fed a HCD (Fig 1A). Qualitative analyses revealed a discrete but significant accumulation of cholesterol esters in DLP of *lxr*^{-/-} mice fed a CD, which was largely amplified when fed a HCD and associated with an increase of free cholesterol (Fig 1B). While HCD induced an increase in circulating cholesterol (especially LDL cholesterol) in both *lxr*^{-/-} and wild type mice plasma (Fig 1C), prostates from wild type mice did not accumulate cholesterol. This suggested that prostates from *lxr*^{-/-} mice present aberrant LDL-cholesterol uptake and cholesterol storage. *Idol* is a LXRs target gene, which encodes an ubiquitin ligase that triggers LDLR proteasomal degradation. In WT mice, HCD induced *idol* expression, maintaining LDLR accumulation at a basal level. In contrast, *idol* was not upregulated in the DLP of *lxr*^{-/-} mice, irrespective of the diet (Fig 1D). Using mouse epithelial cells derived from mouse prostate explants (MPE), LXRs-IDOL-LDLR axis was found functional in prostatic cells. Indeed, the synthetic LXRs agonist T0901317 induced *idol* expression and consequently decreased LDLR protein accumulation in WT cells. This cholesterol regulation feedback was LXRs dependent as it was completely abolished in *lxr*^{-/-} MPE cells (Fig 1E-F). Defects in cholesterol homeostasis were also supported by a decreased expression of the efflux cassette *abca1* at both mRNA and protein levels in *lxr*^{-/-} prostates, although it was still inducible by HCD (Fig 1D,G). However, ABCA1 accumulation was lower in *lxr*^{-/-} prostate mice fed a HCD than in prostate from wild type fed a CD or a HCD. As expected, the lack of *idol* regulation in *lxr*^{-/-} mice DLP prevents proteasome degradation of LDLR and results in increased LDLR protein accumulation when mice were fed a HCD (Fig 1G). Together, these data clearly indicate that the impairment of *idol* and *abca1* expression control leads to aberrant LDL uptake and high cholesterol storage in *lxr*^{-/-} DLP. These deficient prostates are unable to manage high cholesterol exposure, which results in intracellular cholesterol accumulation.

LXR ablation is associated with a cholesterol-induced reversible neoplastic-like phenotype

In order to investigate the effects of LXR ablation and cholesterol accumulation on tissue structure, histological analyses were performed on DLP. HE staining from DLP of *lxr*^{-/-} mice fed a

HCD revealed a massive disorganization of the epithelial layer characterized by hyperplasia and the presence of mitosis figures in the epithelium (Fig 2A-B). This suggested the presence of cell proliferation. Indeed, these mice exhibited a large number of proliferative PCNA stained nuclei in the prostate epithelium (Fig 2A). This was confirmed by a 3.5 fold increase in *cyclin D2* expression in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. In contrast, HCD had no effect on PCNA staining or *cyclin D2* expression in WT DLP. Surprisingly, there was no increase in prostatic weight (Fig 2D) as usually observed in mice developing prostatic intra-neoplasm (PIN). This suggested that proliferation could be balanced by another mechanism. Therefore we analyzed apoptotic cell death as a potential mechanism preventing DLP enlargement. TUNEL experiments showed the presence of apoptotic cells in prostatic lumen of *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. These cells seemed to delaminate from the epithelium towards the lumen (Fig 2D and supplemental data S1). The restriction of apoptotic cells in this area suggested that cell proliferation led to cell detachment from the epithelium and subsequent anoikis. Consistent with this hypothesis, BrdU positive cells were also present in the prostatic ducts of *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. This suggested that proliferative cells could break off into the lumen (Fig 2E). High proliferation and cell detachment are characteristic of aberrant epithelial self-renewal. Such cell turn over implies the mobilization of epithelial lineages, from basal to luminal cells. To investigate proliferating cell identity, we performed immunohistochemistry against PCNA and p63, a marker of the basal compartment. Experiments showed the presence of a large number of proliferating cells in the vicinity of p63-positive cells (Fig 2F). Interestingly, while basal cells are normally quiescent in mouse prostatic epithelium (Fig 2F), few p63⁺ proliferating cells were observed in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. These observations pointed out active cell division in the epithelial lineage and involved basal cells in this process.

We next hypothesized that, if cholesterol accumulation was key to the initiation of pre-neoplastic lesions in prostate on *lxr*^{-/-} mice fed a HCD, cholesterol withdrawal may induce a reversion of the prostatic phenotype. In order to test this hypothesis, we investigated the effect of a 4 weeks recovery period with a normal cholesterol diet (CD) on the DLP phenotype (Fig 3A). Plasma lipid analysis revealed that 4 weeks of CD feeding were sufficient to significantly decrease circulating LDL levels (5.6 vs 2.3 fold increase in pre vs post-recovery period over the control) (Fig 3B, supplemental data S2). This decrease was correlated with a reduction of neutral lipid accumulation in prostate epithelium of *lxr*^{-/-} mice as demonstrated by ORO staining (Fig 3C). Histology after the recovery period was comparable in *lxr*^{-/-} mice initially fed the HCD and *lxr*^{-/-} mice fed the CD (Fig 3C). These observations showed that cholesterol-induced neoplastic-like lesions were reversible upon cholesterol withdrawal. Consistent with this, expression of *Cyclin d2* and PCNA staining were comparable in prostates of *lxr*^{-/-} mice fed a HCD or a CD after recovery (Fig 3C and D). Therefore, these observations indicate that the presence of neoplastic-like feature in the prostate is directly correlated with LDL levels and cholesterol accumulation in *lxr*^{-/-} mice.

The neoplastic-like phenotype is associated with a cancer-related transcriptomic signature

To identify the deregulated molecular pathways that could account for epithelial cell hyperproliferation in DLP from *lxr*^{-/-} mice a fed HCD, transcriptome analysis was performed. Four direct gene expression comparisons were established. Array 1 compared WT mice fed the CD with

WT mice fed the HCD. Array 2 compared WT and *lxr*^{-/-} mice fed a CD. Array 3 compared *lxr*^{-/-} mice fed a CD with *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. Finally, array 4 compared WT and *lxr*^{-/-} mice fed a HCD (Fig 4A). In this setup, arrays 1 and 3 evaluate the “diet effect” on gene expression in both genotypes. Arrays 2 and 4 evaluate the “genotype effect” in both diet conditions. HCD altered the expression of 373 genes (320 up- and 53 downregulated) in WT mouse prostates (array 1). Expression of 797 genes was altered by the same treatment in *lxr*^{-/-} mouse prostates (463 up- and 334 downregulated) (array 3). Genotype was associated with the deregulated expression of 626 genes in mice fed a CD (480 up- and 146 downregulated) (array 2). At last, expression of 1208 genes was altered by the genotype in mice fed a HCD (715 up- and 483 downregulated) (array 4). These results underlined that a larger set of genes is deregulated in the neoplastic-like condition (797 and 1208 genes respectively in array 3 and 4) than the sets of genes deregulated exclusively by the diet or the genotype (373 and 626 genes respectively in array 1 and 2). We next compared the 40 top up- and downregulated genes of each array against the others. Hierarchical clustering analysis showed a high similarity in the deregulated gene profiles array 3 and 4 in this comparison (Fig 4B). This suggested that the molecular alterations resulting in the neoplastic-like phenotype were closely related, irrespective of the experimental condition that led to the phenotype (i.e LXRs ablation (array 4) or HCD (array 3)). Therefore, we postulated that a Venn analysis of our datasets could identify a list of neoplastic-like phenotype-associated genes. This method allowed us to exclude “genotype effect” (deregulated in array 2), and “diet effect” genes (deregulated in array 1), from the list of genes that were deregulated in both arrays 3 and 4. This generated a set of 254 up- and 209 downregulated genes that we could match with the neoplastic-like phenotype (Fig 4C). We next used the functional enrichment Ingenuity software to identify relevant networks and functions in which these genes could be involved. Cancer-related genes were prominent in both “networks” and “diseases and disorders” lists (Fig 4D) (Supplemental data S3). Moreover, “cellular growth and proliferation” and “cell cycle” appeared as significantly altered. Therefore, although the prostatic neoplastic-like phenotype of *lxr*^{-/-} mice fed a HCD was reversible, the associated-transcriptomic signature was closely related with cancer. These observations suggested that LXR ablation and cholesterol accumulation could play an important role in early steps of carcinogenesis. This unbalanced homeostasis may provide a favorable environment for the onset of oncogenic hits, resulting in genuine neoplastic prostatic transformation.

Repression of nkx3.1 and msmb tumor suppressor genes is associated with over expression of ezh2 in lxr^{-/-} mouse prostate

The homeodomain-containing transcription factor *nkx3.1* (Bieberich et al., 1996) and the immunoglobulin-binding factor *msmb* (Sasaki et al., 1996), two essential prostatic tumor suppressor genes, were found downregulated in the list of cancer signature genes (Fig 4D, Supplemental data S4). This was confirmed by qPCR analysis in prostate from *lxr*^{-/-} mice fed a HCD (Fig 5A). Consistent with their tumor suppressor activity, both genes are also downregulated in PIN lesions and prostatic carcinomas in patients (He et al., 1997, Whitaker et al., 2010). Recent data demonstrated that this down-regulation resulted from histone methylation of *nkx3.1* and *msmb* promoter sequences by the histone methyltransferase EZH2 (Beke et al., 2007, Kunderfranco et al., 2010). EZH2 is the major

enzyme that trimethylates lysine-27 of histone H3 (H3-K27) in the Polycomb repressive complex 2 (PRC2), leading to the inactivation of targeted genes (Cao et al., 2002). Interestingly, both *ezh2* transcript and protein were up-regulated in the DLP of *lxr*^{-/-} mice fed a HCD (Fig 5B,C). These observations suggested that *ezh2* deregulation could be linked with repression of *nkx3.1* and *msmb* and subsequent reactivation of epithelial proliferation. Consistent with this idea, immunofluorescence analysis revealed that *ezh2* was only expressed in PCNA positive proliferative cells (Fig 5D). This indicated that *ezh2* accumulation and epithelium proliferation were closely related. As histone H3 is a substrate of EZH2, we monitored total H3K27me3 modification. We did not observe an increase of global K27-trimethylation on histone H3 in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD, suggesting that EZH2 potentially represses *nkx3.1* and *msmb* promoters in a specific manner (Fig 5C). We postulated that *ezh2*, *nkx3.1* and *msmb* deregulations lead to neoplastic-like phenotype in prostate of *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. Given that, we analyzed whether a 4 weeks of diet recovery could restore basal expression of these genes (Fig 3A). We observed that *lxr*^{-/-} mice fed a HCD or CD during 5 weeks, following 4 weeks of CD, exhibit the same *ezh2*, *nkx3.1* and *msmb* gene expression levels (Fig 5E). This was associated with normalization of cell proliferation as demonstrated by *cyclin D2* expression (Fig 3D). Together, these results highlighted deregulation of key genes involved in epithelium quiescence. An important finding is the alteration of *ezh2* gene expression, newly connected epigenetic to cholesterol homeostasis. This result was unexpected as *ezh2* overexpression is usually associated with advanced prostate cancer, especially metastasis. Given that, we investigated the effect of LDL cholesterol exposure on cholesterol storage and proliferation of the PC3 prostate metastatic cell line. Interestingly, advanced prostate cancer cells exhibit loss of LDLR feedback regulation leading, as in *lxr*^{-/-} cells, to a high LDL uptake (Chen & Hughes-Fulford 2001). Human LDL cholesterol treatment on PC3 cells induced cholesterol ester and free cholesterol accumulation within the cells (Fig 5F). As previously observed *in vivo* in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD, increase of intracellular cholesterol level was correlated with an increase of cell proliferation. LDL cholesterol treatment led to accumulate cells in S-phase of the cell cycle (Fig 5G). We next investigated *ezh2* gene expression and found that LDL treatment enhanced its mRNA level (Fig 5H). These results indicate that *ezh2* expression is sensitive to cholesterol homeostasis even in metastatic model in human. Thus these observations strengthened that deregulation of *ezh2* expression is tightly correlated with cholesterol accumulation in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD.

Discussion

Alterations of cholesterol homeostasis observed in prostate cancer cells raise the question of its potential role in carcinogenesis. Here, using *lxr*^{-/-} mice, we provide evidence that cholesterol accumulation is able to initiate some mechanisms involved in tumor development *in vivo*. In the absence of LXRs, *idol* and *abca1* are not induced by a cholesterol-rich diet. This results in a high level of cholesterol uptake and a decrease in HDL reverse transport, which in turn leads to cholesterol accumulation within prostatic epithelial cells (Fig 6). We show that cholesterol accumulation is closely associated with acquisition of a neoplastic-like phenotype, which can be reversed by cholesterol withdrawal. Although this phenotype is somewhat labile, its transcriptomic signature resembles prostatic cancer gene deregulations. This suggests that unbalanced cholesterol homeostasis may

provide a favorable environment for the onset of oncogenic hits, leading to neoplastic prostatic transformation. Our data showing that deregulation of cholesterol storage is sufficient to deregulate epithelial cell cycle in human prostatic cancer cells PC3 suggest that the tight control of cholesterol homeostasis is also important in the context of aggressive cancer development and progression. Consistent with these observations, high cholesterol diet experiments accelerate prostatic tumor progression in the TRAMP mouse model (Llaverias et al., 2010). Our findings correlate with experimental studies demonstrating that statins, inhibitors of cholesterol synthesis, inhibit growth of prostate cancer cells *in vitro* or in xenografts models (Zhuang et al., 2005). Also, retrospective analysis highlights a reduction of advanced prostate cancer risk in long-term statin users (Flick et al., 2007, Jacobs et al., 2007). These observations point out deregulation of cholesterol homeostasis as a driving force that acts in conjunction with oncogenic alterations to initiate and promote carcinogenesis in the prostate.

The molecular pathways that are altered by chronic exposure to high levels of circulating cholesterol remain unknown. Here, we observed that *Lxr*^{-/-} mice fed a high cholesterol diet develop a neoplastic-like epithelium with marked dysplasia and express a prostate cancer-like transcriptome signature. In these mice, downregulation of tumor suppressor genes *nkx3.1* and *msmb* is correlated with overexpression of *ezh2*. In human, the histone methyltransferase EZH2 was scored as the most significantly up-regulated gene in metastatic prostate cancer (Varambally et al., 2002). Functional studies show that *ezh2* overexpression induces cell proliferation and enhances tumor growth *in vivo* (Croonquist & Van Ness 2005, Varambally et al., 2002). Conversely, inhibition of EZH2 blocks cell cycle progression, reduces tumor growth and decreases metastasis formation (Varambally et al., 2002, Yu et al., 2007). Therefore, EZH2 can be considered as an oncogenic protein, which alters the genomic expression program by chromatin hypersilencing. *Msmb* and *nkx3.1* promoters are known to be direct targets of EZH2 (Beke et al., 2007, Kunderfranco et al., 2010). *Nkx3.1* was extensively studied in relation with prostate cancer after it had been identified at locus 8p21, a chromosomal region that was frequently deleted in prostate carcinoma (Bowen et al., 2000). Genetic ablation of *nkx3.1* in mouse is sufficient to induce prostatic intraneoplasia (Kim et al., 2002) demonstrating its crucial role as a tumor suppressor gene. *Msmb* encodes the prostatic secretory protein of 94 amino acids (PSP94), which is secreted in the prostate lumen and functions as a suppressor of tumor growth and metastasis (Beke et al., 2007). In light of our observations, we propose that *ezh2* overexpression could be responsible for the induction of proliferation in both the prostatic cells of *Lxr*^{-/-} mice and in PC3 cells exposed to LDL, through key genes repression such as *msmb* and *nkx3.1*.

Our data provide a novel connection between LXRs, cholesterol accumulation and *ezh2* gene expression. Recent publications indicate that *ezh2* overexpression in prostate cancer is tightly correlated with genomic deletion of the locus encoding the microRNA miR-101 (Varambally et al., 2008). Overexpression of miR-101 in DU145 prostate carcinoma cells decreases cell invasion and attenuates DU145 tumor growth in a mouse xenograft model through extinction of EZH2 expression (Varambally et al., 2008). Dietary lipids have already been shown to suppress expression of EZH2 in breast cancer cells (Dimri et al., 2010). Treatment with omega-3 polyunsaturated fatty acids, such as

EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid), leads to downregulation of EZH2 and to a subsequent decrease of H3K27 trimethylation. This downregulation may involve some post-transcriptional proteasome-dependent mechanisms. Thus miR-101 and post-translational pathways could be relevant candidates to investigate the molecular mechanisms underlying *ezh2* overexpression in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. Beyond *ezh2* overexpression, we did not observe any global increase of the H3K27me3 mark in whole DLP protein extracts. We proposed that the amount of cells overexpressing *ezh2* is not sufficient to detect any changes by western blot. Another, and not exclusive, explanation is a specific EZH2 regulation on *nkx3.1* and *msmb* promoters. Such model has been already described for *nkx3.1* promoter in primary prostate cancer, in which EZH2 activity is conditioned by ETS transcription factors (Kunderfranco et al., 2010).

In summary, our results demonstrate that LXR ablation associated with HCD results in abnormal cholesterol accumulation and a neoplastic-like phenotype in the prostate. This phenotype is associated with expression of an array of cancer-related genes but can be reversed upon cholesterol withdrawal. Therefore, these findings suggest that achieving a reduction in LDL cholesterol levels in patients could be proven efficient in preventing prostate cancer initiation and progression. Unexpectedly, cholesterol homeostasis is connected with deregulation of *ezh2* expression and of its downstream target tumor suppressor genes *nkx3.1* and *msmb*. EZH2 is well accepted as an indicator of prostatic tumor aggressiveness as its deregulation is observed in advanced disease and metastatic lesions. Our results underline the potential important role of cholesterol metabolism and LXR activity in both initiation and progression of prostate cancer. These observations warrant further examination of the potential anti-tumor activity of LXR ligands in the context of prostate cancer. Looking further, control of cholesterol homeostasis in tumors could be a relevant strategy to target some deregulated epigenetic processes in prostate cancer.

Material and methods

Mice

Lxra and *Lxr β* double knock-out mice (*Lxr*^{-/-}) and their wild-type controls (Peet et al., 1998, Repa et al., 2000) were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and housed in a temperature-controlled room with a 12-h light/dark cycle. Mice were fed *ad libitum* with water and control diet (CD; Global-diet 2016S) until 5 months of age. Then, mice were fed either the CD or a isocaloric high cholesterol diet (HCD; Cocoa butter-diet TD.88051) from Harlan (Gannat, France) for 5 weeks. For recovery protocol, mice were afterwards fed the CD for 4 weeks before sacrifice. Blood plasma samples were obtained just before necropsy by heart puncture on anesthetized mice. Prostates were removed and were either NEG 50 (Thermo Scientific, Kalamagoo, MI, USA) embedded, or fixed in an alcohol, formaldehyde 37% and acetic acid mixture (7.5:2:0.5; v/v) and then embedded in paraffin for histological analysis, or were snap-frozen in liquid nitrogen for lipid, protein and RNA analyses. All animals were maintained in a controlled environment and animal care was conducted in compliance with the national standards and policies (C 63 014.19). All experiments were approved by the Regional Ethic Committee.

Mouse Prostatic Epithelial cells (MPE)

Culture procedure was derived from methods as previously described for mouse vas deferent epithelial cells (Manin et al., 1992). Briefly, MPE cells were harvested from the dorsal prostatic lobes from *Lxra*; β ^{-/-} mice and their wild-type controls. Dorsal prostate lobes were obtained under microscope dissection from 20- to 30-day-old mice. Fragments were kept in a sterile phosphate buffer solution (PBS). Minced tissue by a razor blade was transferred onto cell culture inserts (BD Falcon, Rungis, France) coated with a thin layer of ECM (Extra Cellular Matrix) gel (Sigma-Aldrich, L'isle d'abeau, France), plated onto 35 mm culture dishes, and cultured in "complete" medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F12 (50:50, GIBCO) supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France), cholera toxin (10 ng/ml), epidermal growth factor (5 ng/ml), gentamycin (100 μ g/ml), insulin (5 μ g/ml), transferin (10 μ g/ml), glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), ethanolamine (0.6 μ g/ml), cAMP (25 μ g/ml), selenium (17.3 ng/ml) and hydrocortisone (10 nM)] at 37°C in a humidified air 5% CO₂ incubator. The ECM was set by incubation at 37°C for 30 min. Growth medium was changed every 2 days. Upon confluency, cells were re-plated in the same conditions at a split ratio of 1:2 until they survived senescence, which typically occurred about six passages. After this point, cells were transfer onto 100-mm culture dishes every 3-4 days at a 1:5 to 1:10 split ratio.

Cell culture and treatment

MPE cells were trypsinized and seeded at 0.6×10^5 in 6-well plates or 3×10^5 in 100-mm culture dishes. After 12 hr, cells were starved for 24 hr and treated in minimal medium [(DMEM) /F12 (50:50, GIBCO) supplemented with gentamycin (100 μ g/ml), glutamine (2 mM)], with either 10 μ M of T0901317 (Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux, France) or vehicle (DMSO, Sigma-Aldrich) for 24 hr.

PC3 cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in DMEM medium (Invitrogen, Cergy-pontoise, France) containing 100 µg/ml penicillin and streptomycin supplemented with 10% FBS (Biowest) and 2 mM glutamine. Cells were trypsinized and seeded at 0.8 x 10⁵ in 6-well plates or 4 x 10⁵ in 100-mm culture dishes. After 12 hr, cells were starved for 24 hrs and treated with native human low density lipoprotein RP-032 (Source Bioscience LifeSciences, Nottingham, UK) in FBS depleted medium for 12 to 48 hr.

Cells were harvested and RNA, lipid extraction or flow cytometry analyses were performed.

Prostate immunostaining/immunofluorescence labeling and TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis

Prostate immunostaining was performed as follows: paraffin sections were dewaxed and rehydrated through a graded series of ethanol and double distilled water baths. Tissue sections were incubated in 0.1M citrate buffer (pH 6.0) for 5 min in a microwave at 350 W. Unspecific epitopes were saturated using BSA 1%, FBS 1% diluted in PBS 1X during 30 min at room temperature. PCNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), EZH2 (Cell signaling, Montigny-Le-Bretonneux, France), BrdU (Roche diagnostic, Meylan, France), p63:69241A (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) primary antibodies were diluted in PBS 1X, BSA 0.1% and incubated at 4°C overnight. For PCNA staining, secondary HRP-conjugated antibody (Sigma-Aldrich) was incubated 1 hr at room temperature and revealed using NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA). For co-immunostaining, secondary Alexa 488 conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen) was incubated 1 hr at room temperature. After PBS washes, the second primary antibody diluted in PBS 1X, BSA 0.1% was incubated at 4°C overnight and secondary Alexa 555 conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen) was incubated 1 hr at room temperature. Cell nuclei were stained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml.

Apoptosis nuclei were visualized using TUNEL reaction with 0.3U/µl of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT ; Euromedex, Souffelwegersheim, France), 6.7mM biotin-11-dUTP (Euromedex), 26.7mM dATP (Promega, Charbonnière, France) in TdT buffer for 1 h à 37°C. Positive nuclei were revealed by addition of extravidin coupled alkaline phosphatase and FastRed TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich) substrate for 25 min. Nuclei counter staining was performed using Mayer hematoxylin for 30 sec.

Cross-sectional areas of the prostate were snaped using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope and Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Le Pecq, France).

cDNA Microarray experiments and acquisition of data

Total RNA was isolated using NucleoSpin® RNA II column kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). The quantity of each total RNA sample was determined by spectrophotometry and the size distribution was assessed using an Agilent Bioanalyzer (Agilent, Wilmington, DE). Five hundred ng of total RNA were converted into labeled cDNA using fluorescent nucleotides coupled (either Cy3 or Cy5) and the Low DNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) following the manufacturer's protocol. cDNA quality was check using an Agilent Bioanalyzer. Equal amounts of Cy3 and Cy5-

labeled cDNA (750 ng) from two different samples were hybridized to Agilent Whole Mouse Genome microarrays and dye swap was performed to overcome fluorochrome interferences. The hybridized array was then washed and scanned and data were extracted from the scanned image using Feature Extraction version 9.5 (Agilent Technologies). For each microarray, log ratio, fold-change, log ratio, p-value were determined Using Rosetta Resolver Gene Expression Analysis System. Microarrays were deposited in the EBI MIAME-compliant data base (E-MTAB-546).

Microarray analysis, gene ontology and hierarchical gene clustering

Venn diagram approach and gene ontology were built using Ingenuity Systems, Inc IPA 8.7 – 3203 (Ingenuity Systems Inc., Redwood, CA). Gene expression change was considered consistent when p-value of log ratio was lower than 10^{-6} . Hierarchical clustering analysis was performed using MultiExperiment Viewer v4.5 software (<http://www.tm4.org/mev>) (Saeed et al., 2003).

qPCR

Total RNA was isolated using the same procedure than for microarray. cDNA was synthesized with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. The qPCR was performed on an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Four μ l of 1:50 diluted cDNA template were amplified by MESA GREEN MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) to measure duplex DNA formation. Primer sequences were: mldolfw AGCGGCCTCTACCGAGCCAT; mldolrv CGCCAAGTGGCCCTTCAGGT; mABCA1fw GGAGCTGGGAAGTCAACAAC; mABCA1rv ACATGCTCTCTCCCGTCAG; mCycD2fw TCCCGCAGTGTTCTATTTTC; mCycD2rv CTGGGGCTTCACAGAGTTGT; mEzh2fw CCTCTGAAGCAAATTCTCGG; mEzh2rv ACATCCTCAGTGGGAACAGG; mNkx3.1fw GGAGGACCCACCAAGTATCC; mNkx3.1rv ATGGCTGAACTTCCTCTCCA; mMsmbfw AGTCCTGCTTTGCCACCATG; mMsmbrv CGTGCAAGTTCTTCTCCAGGGAGT; m18Sfw GGGAGCCTGAGAAACGGC; m18Srv GGGTCCGGAGTGGGTAATTT; hEzh2fw ACCAGTTTGTTGGCGGAAGCG; hEzh2rv CCAAGTCACTGGTCACCGAACAAG; h36b4fw GTCAGTGTGCCAGCTCAGAA; h36b4rv TCAATGGTGCCTCTGGAGAT.

Western blot analysis

Proteins were extracted in Hepes 20 mM, NaCl 0.42 M, $MgCl_2$ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM and NP40 1% supplemented with PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich), Complete 1X (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), NaF 0.1 mM and Na_2VO_3 0.1mM (Sigma-Aldrich). Lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 15000 g. Forty μ g of total proteins were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against either beta-Actin (Sigma-Aldrich), ABCA1 (Novus, Littleton, CO), EZH2 (Cell Signaling, Montigny-Le-Bretonneux, France), LDLR (Cayman Chemical), H3K27me (Millipore, Billerica, MA). A second 1h-incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti mouse IgG (P.A.R.I.S, Compiègne, France) was performed.

Peroxidase activity was detected with the Western Lightning System (Perkin-Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France).

Lipid analysis

Lipid staining of each organ collected was performed on 8 µm thick cryosections with 1,2-propanediol (Sigma-Aldrich) for 1 min and in Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) for 4 min as described (Frenoux et al., 2004). Lipids were extracted as previously described (Pommier et al., 2010) and analyzed on high-performance thin layer chromatography plates. Blood concentrations of triglycerides, cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol were determined on an automated clinical chemistry analyzer (Roche Diagnostics) according to manufacturer's instructions.

Flow cytometry

Cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in RNase A (Sigma-Aldrich) (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1 hr at 4°C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter fluorescence-activated cell sorter. Proliferation amount was determined by evaluating S-phase nuclei percentage or cells counting. At least 15,000 events were measured for each sample.

Statistics

For statistical analysis, Student's *t* test was performed to determine whether there were significant differences between the groups. A *p* value of 0.05 was considered significant. Correlation was performed using Stat View software and significance was determined by ANOVA test.

Author contributions

AJP and SB conceived the study design, performed most of the experimental work and co-wrote the manuscript; JMA and SB supervised the project; JD performed part of qPCR analysis and part of IHC; GA and MM establish the several MPE cell lines and wrote part of Methods; PA and DV helped to design experiment for *ezh2* monitoring and recovery diet; EV, DV, FC and JMA helped during prostate sample collection; AT, PV and FC participate to experiments and manuscript correction.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. David Rouquié (Bayer CropScience, Sophia Antipolis, France) for his help with microarray analysis and gene clustering. We thank J.P. Saru and A. De Haze for molecular biology technical assistance, C. Puchol and S. Plantade for animal facilities. Pathology analyses have been done on the Anip@th facility platform. This study was supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas and Association de Recherche contre le Cancer (ARC) research grants. A. Pommier and J. Dufour are funded by MNERT grants and E. Viennois by FEDER - Région Auvergne grant. G. Alves is funded by Région Auvergne program.

The paper explained

PROBLEM:

Metabolic syndrome is one of the most significant emerging diseases in human health in western countries. This disorder is characterized by a group of metabolic risk factors including high insulin levels, obesity, high hypertension, and altered cholesterol metabolism. The later includes blood lipid disorders such as low HDL cholesterol and high LDL cholesterol. Various epidemiological studies have associated hypercholesterolemia with prostate cancer risk, but the relevance of such association and the underlying mechanisms remain to be established. So far, it does not exist engineered-mouse for cholesterol homeostasis disruption in which prostatic-epithelial lesions have been investigated. In the present study, we studied liver X receptors knock-out mice (*lxr*^{-/-}), which exhibit such cholesterol metabolism disorders in order to establish involvement of aberrant cholesterol uptake in prostate cancer risk.

RESULTS:

Investigation of cholesterol homeostasis in *lxr*^{-/-} mice shows higher cholesterol ester storage in prostate tissue when mice are fed a cholesterol-enriched diet. This phenotype results from the absence of regulated-expression of genes controlling cholesterol uptake and efflux. Cholesterol overload results in phenotypic alterations of the epithelial compartment that recapitulate cancer initiation. Transcriptomic signature of prostate tissue is characteristic of prostate cancer when mice are fed a cholesterol-enriched diet. In particular, two important suppressor genes in prostate, *nkx3.1* and *msmb*, have been found to be repressed. This could be explain by a increased expression of the polycomb gene *ezh2*. Finally, cholesterol accumulation *per se* is thus able to disrupt prostatic epithelial

homeostasis promoting emergence of oncogenic events. Collectively, these data demonstrate that LXRs play a role of "gate-keeper" in prostatic epithelial cells *in vivo*.

IMPACT:

Lxr^{-/-} mice provide a useful tool in order to investigate the connection between cholesterol metabolism and prostate cancer initiation, promotion and development. Two important points have been highlighted: i) cholesterol accumulation could enhance prostate cancer initiation and ii) phenotype is reversible indicating that cholesterol overload leads to prostatic lesions occurrences but still temporary without an "oncogenic" hit. Present study indicates that monitoring cholesterol status in men with high prostate cancer risk could be relevant and underline the potential deleterious effects of chronic hypercholesterolemia in human.

References

- Beke L, Nuytten M, Van Eynde A, Beullens M, and Bollen M (2007) The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. *Oncogene* 26: 4590-4595
- Bieberich CJ, Fujita K, He WW, and Jay G (1996) Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem* 271: 31779-31782
- Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, et al. (2000) Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 60: 6111-6115
- Bravi F, Scotti L, Bosetti C, Talamini R, Negri E, Montella M, Franceschi S, and La Vecchia C (2006) Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann Oncol* 17: 1014-1017
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, and Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043
- Chen Y, and Hughes-Fulford M (2001) Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 91: 41-45
- Croonquist PA, and Van Ness B (2005) The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene* 24: 6269-6280
- Dimri M, Bommi PV, Sahasrabudhe AA, Khandekar JD, and Dimri GP (2010) Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31: 489-495
- Flick ED, Habel LA, Chan KA, Van Den Eeden SK, Quinn VP, Haque R, Orav EJ, Seeger JD, Sadler MC, Quesenberry CP, Jr., et al. (2007) Statin use and risk of prostate cancer in the California Men's Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 2218-2225
- Freeman MR, and Solomon KR (2004) Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91: 54-69

- Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, Kocer A, Henry-Berger J, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM, and Drevet JR (2004) Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 33: 361-375
- Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, and Liao S (2004) Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64: 7686-7689
- He WW, Scivolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, Curtis RT, Shell BK, Bostwick DG, Tindall DJ, et al. (1997) A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* 43: 69-77
- Jacobs EJ, Rodriguez C, Bain EB, Wang Y, Thun MJ, and Calle EE (2007) Cholesterol-lowering drugs and advanced prostate cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 2213-2217
- Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, and Gustafsson JA (2009) Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 558-563
- Kim MJ, Bhatia-Gaur R, Banach-Petrosky WA, Desai N, Wang Y, Hayward SW, Cunha GR, Cardiff RD, Shen MM, and Abate-Shen C (2002) Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 62: 2999-3004
- Kunderfranco P, Mello-Grand M, Cangemi R, Pellini S, Mensah A, Albertini V, Malek A, Chiorino G, Catapano CV, and Carbone GM (2010) ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One* 5: e10547
- Llaverias G, Danilo C, Wang Y, Witkiewicz AK, Daumer K, Lisanti MP, and Frank PG (2010) A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am J Pathol* 177: 3180-3191
- Magura L, Blanchard R, Hope B, Beal JR, Schwartz GG, and Sahmoun AE (2008) Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 19: 1259-1266
- Manin M, Veyssiere G, Cheyvalle D, Chevalier M, Lecher P, and Jean C (1992) In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 131: 2378-2386
- Murtola TJ, Visakorpi T, Lahtela J, Syvala H, and Tammela T (2008) Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions. *Nat Clin Pract Urol* 5: 376-387
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, and Mangelsdorf DJ (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693-704
- Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, et al. (2010) Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29: 2712-2723
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, and Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289: 1524-1529

- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374-378
- Sasaki T, Matsumoto N, Jinno Y, Niikawa N, Sakai H, Kanetake H, and Saito Y (1996) Assignment of the human beta-microseminoprotein gene (MSMB) to chromosome 10q11.2. *Cytogenet Cell Genet* 72: 177-178
- Swyer G (1942) The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* 2: 372-375
- Tontonoz P, and Mangelsdorf DJ (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17: 985-993
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, et al. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629
- Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, et al. (2008) Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322: 1695-1699
- Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S, and Lobaccaro JM (2011) Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15: 219-232
- Whitaker HC, Kote-Jarai Z, Ross-Adams H, Warren AY, Burge J, George A, Bancroft E, Jhavar S, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M, et al. (2010) The rs10993994 risk allele for prostate cancer results in clinically relevant changes in microseminoprotein-beta expression in tissue and urine. *PLoS One* 5: e13363
- White C (1909) On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 13: 3-10
- Yu J, Yu J, Rhodes DR, Tomlins SA, Cao X, Chen G, Mehra R, Wang X, Ghosh D, Shah RB, et al. (2007) A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 67: 10657-10663
- Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, and Tontonoz P (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325: 100-104
- Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, and Freeman MR (2005) Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115: 959-968

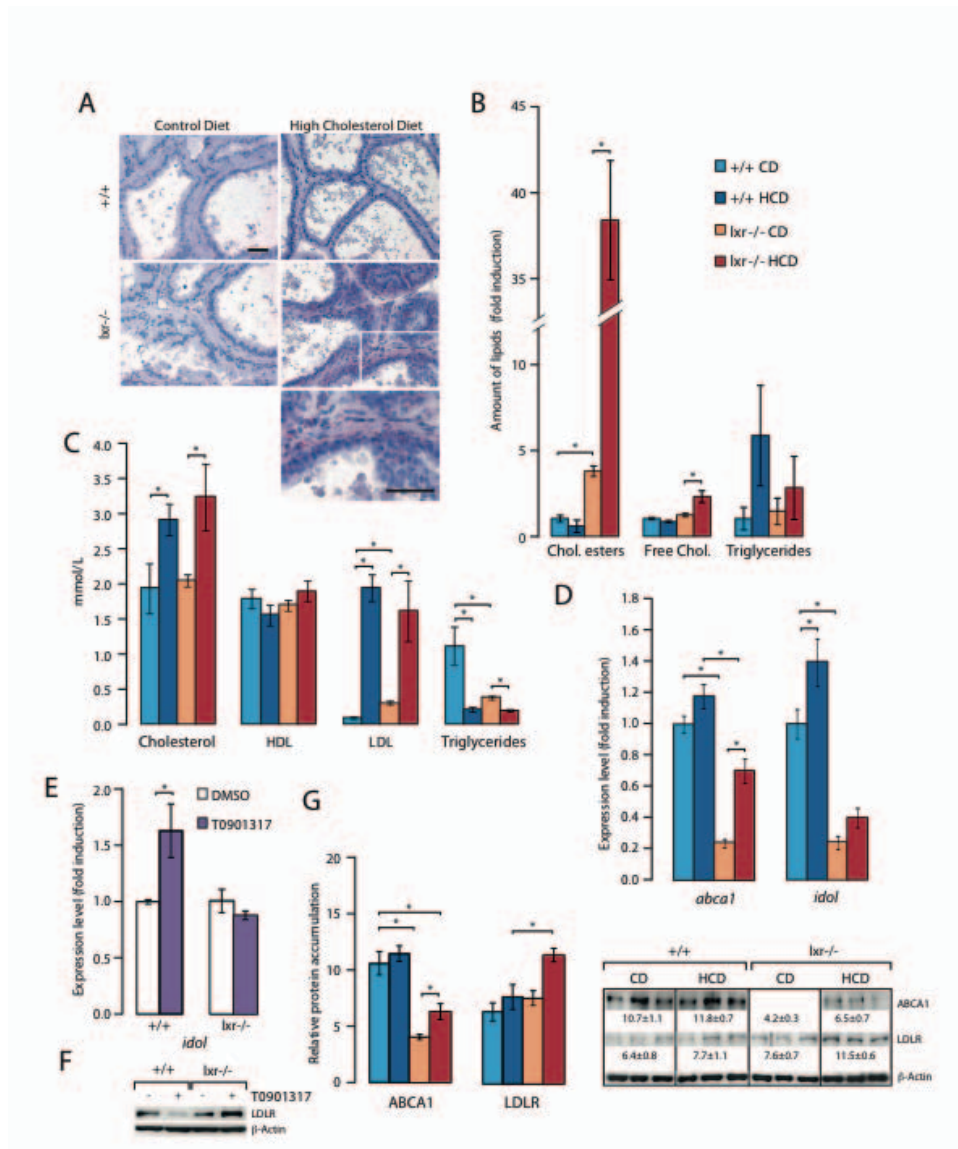


Figure 1: High cholesterol diet induces cholesterol ester accumulation in prostate of *lxl-/-* mice. 5 months wild type and *lxl-/-* mice were fed either Control Diet (CD) or High Cholesterol Diet (HCD) for 5 weeks. Scale bar = 50µm (A) Neutral lipids accumulation in DLP was observed after Oil-Red-O staining (ORO). (B) Cholesterol esters, free cholesterol and triglycerides were quantified by thin layer chromatography (n=3). (C) Plasma concentrations of triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol and HDL-cholesterol were determined (n=9/13). (D) *abca1*, *idol* gene expression levels were determined by RT-qPCR (n=9/13). (E-F) Wild type and *lxl-/-* Murine Prostatic Epithelial (MPE) cells were treated by 10 µM of T0901317 or vehicle (DMSO) for 24 hrs (n=3). *Idol* expression was analyzed by RT-qPCR and LDLR accumulation by western blot. (G) ABCA1 and LDLR protein accumulation was analyzed by western blot in DLP of each group of mice. RT-qPCR experiments were normalized using 18S amplification. β-Actin was used to validate protein loading. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test: *P<0.05.

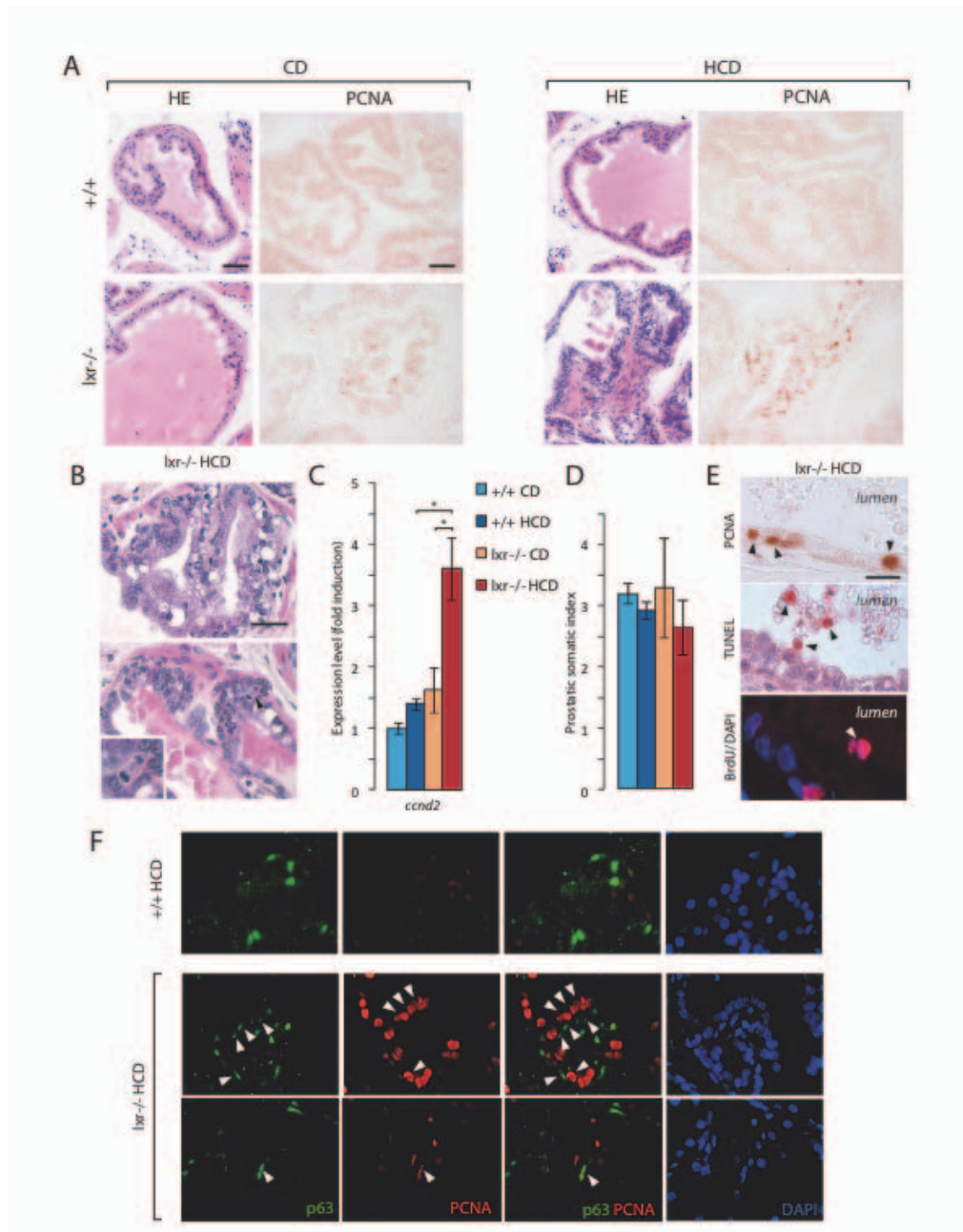


Figure 2: *Lxr*^{-/-} mice prostate exhibited an abnormal increase of epithelial cell proliferation associated with neoplastic-like phenotype. (A) Tissue architecture and proliferative cells nuclei were analyzed by Hematoxyline/Eosine staining (HE) and PCNA immuno-histochemistry (IHC) respectively. Scale bar = 50µm. (B) Magnification of prostate epithelium of *Lxr*^{-/-} mice fed a HCD. Head arrow indicates mitotic cell, scale bar = 25µm. (C) RT-qPCR analysis of *cyclin D2* (*ccnd2*) expression was performed (n=9/13). (D) Prostatic somatic index of latero-dorsal prostates from 5 months wild type and *Lxr*^{-/-} mice fed a Control Diet (CD) or High Cholesterol Diet (HCD) for 5 weeks (n= 9/13). (E) Magnification of proliferative (PCNA IHC), apoptotic nuclei (TUNEL) and cells that have been proliferative (BrdU), indicated by head arrows, in DLP of *Lxr*^{-/-} mice fed HCD. Scale bar = 10µm. (F) p63 basal cell marker, PCNA by immuno-fluorescence and DAPI staining was performed on DLP from *Lxr*^{-/-} mice fed with a HCD. White head arrows indicate alternatively basal cells and proliferating cells. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05

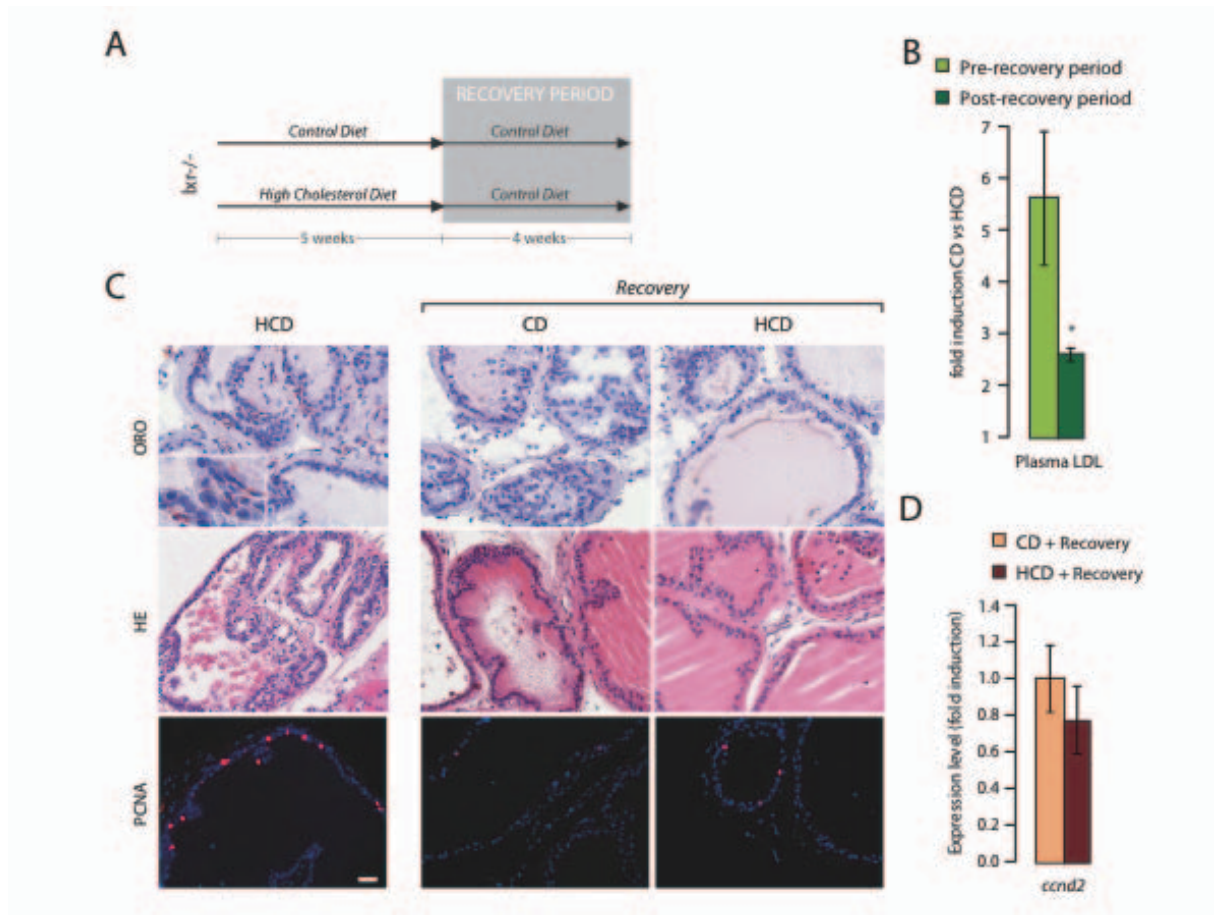


Figure 3: Diet recovery period restores prostate homeostasis and abolishes epithelium neoplastic-like phenotype. (A) Diet protocol experiment diagram, 5 months old *lxr*^{-/-} mice fed a CD vs. HCD during 5 weeks following a recovery period of 4 weeks CD. (B) Circulating LDL cholesterol analysis between each *lxr*^{-/-} mouse group before and after recovery period. (C) ORO, HE and PCNA staining of DLP from *lxr*^{-/-} mice fed for 5 weeks a HCD (first column) compared with *lxr*^{-/-} mice fed a CD for 9 weeks (second column) or *lxr*^{-/-} mice fed a HCD for 5 weeks following a 4 weeks CD (third column), scale bar = 25µm. (D) *cyclin D2* (*ccnd2*) gene expression analysis by RT-qPCR (n= 6/9). Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.01

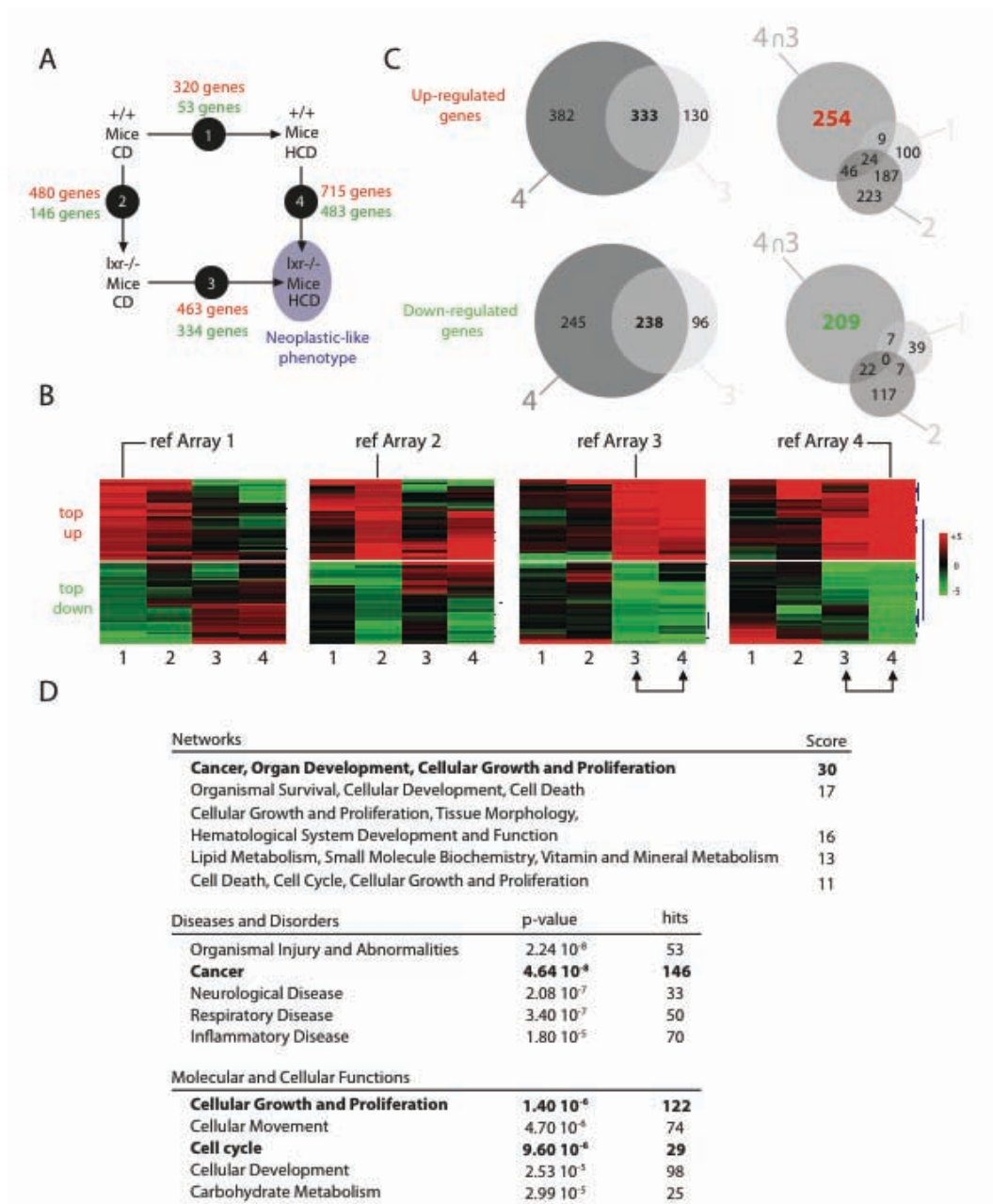


Figure 4: Transcriptome profiling reveals that neoplastic-like phenotype is associated with gene expression signature related to prostate cancer. (A) Experimental design of gene expression profiling in mouse DLP. Wild type and *lxr*^{-/-} mice fed a CD or a HCD was performed using two-colors microarrays approach. Arrays 1 and 3 reveal genes deregulated in wild type or *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. Arrays 2 and 4 exhibit genes deregulated by the absence of LXRs in mice fed CD vs. HCD. (B) Comparison of hierarchical clustering between each array was performed. Changes in gene expression of 40 top up- (red) and down- (green) regulated genes of each array use as references (ref) were compared by hierarchical clustering to each other. (C) Using Venn diagram approach we focused on common deregulated genes only between arrays 3 and 4 that were not deregulated in arrays 1 and 2, by this method we extracted 463 genes (254 up and 209 downregulated) representing genes associated to neoplastic-like phenotype. (D) Gene ontology analysis for top networks, diseases and disorders, molecular and cellular functions. Results were classified using score, p-value and hits using InGenuity® software.

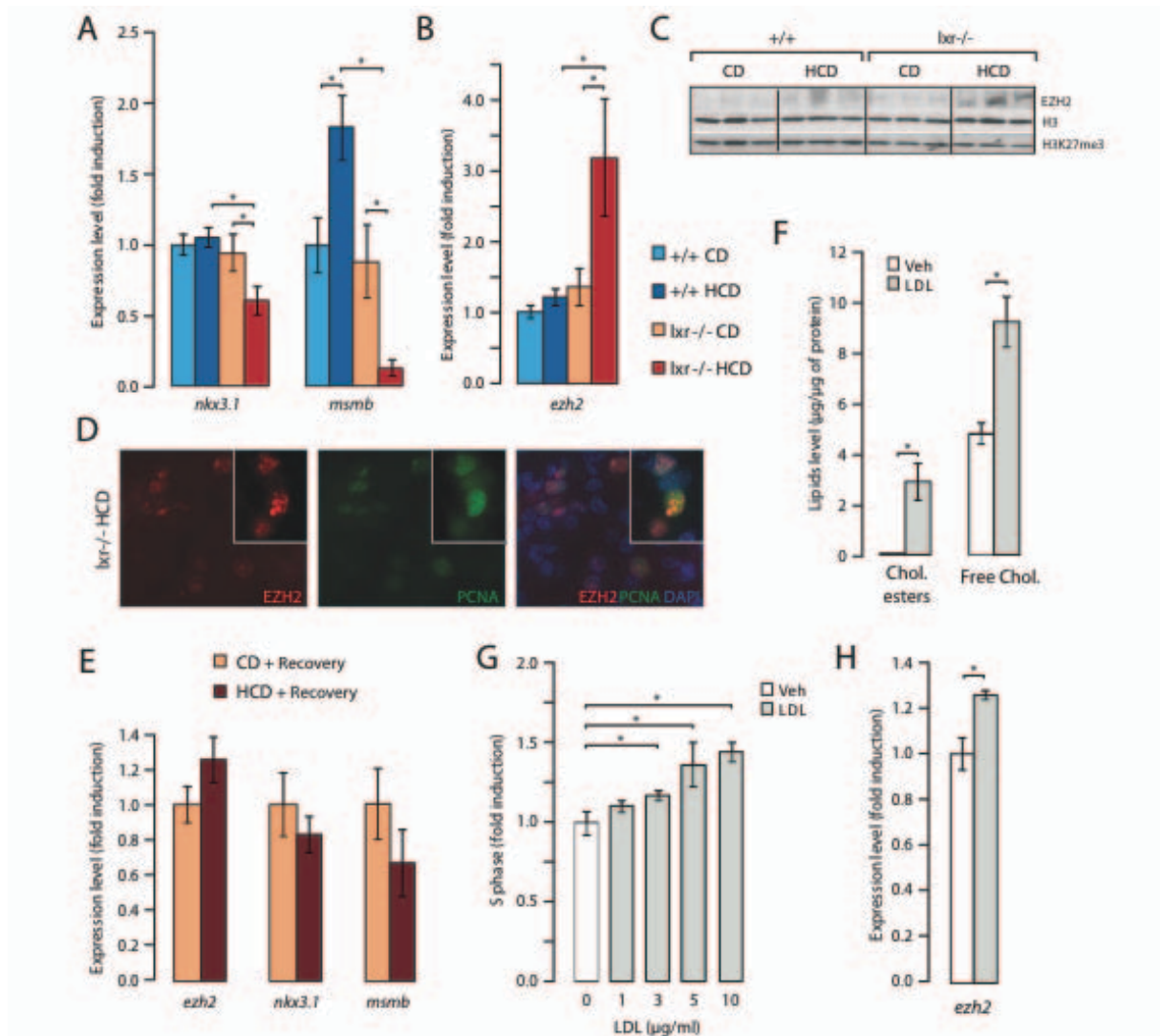
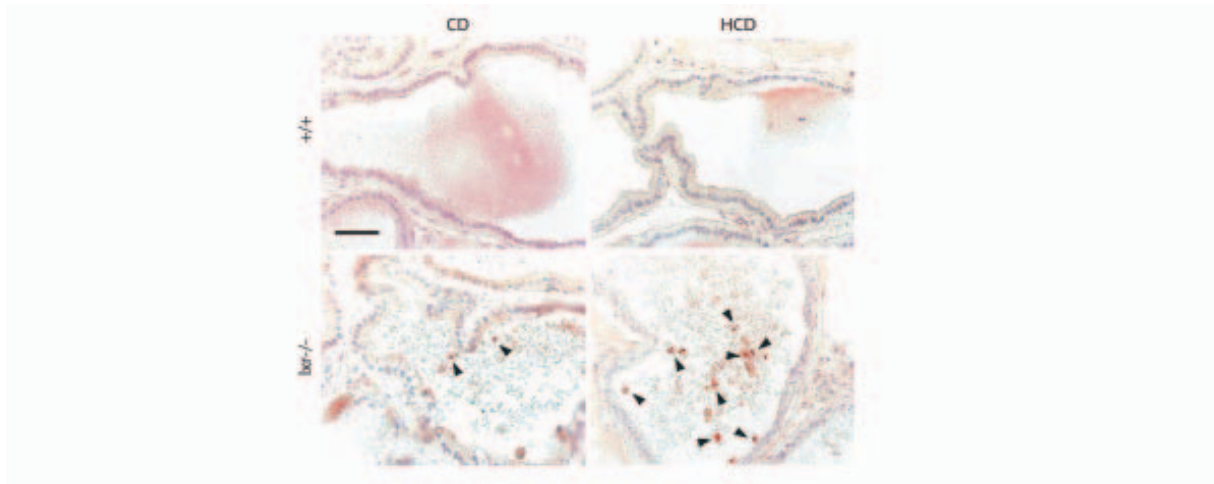


Figure 5: Disruption of cholesterol homestasis induces the repression of *nkx3.1* and *msmb* tumor suppressor genes and upregulation of *ezh2* histone methyltransferase. (A-B) *Nkx3.1*, *msmb* and *ezh2* expression was analyzed by RT-qPCR (n=9/13) on DLP from wild type and *lxr*^{-/-} mice fed a CD vs. HCD. (C) Western blot analysis of EZH2, H3 and H3K27me3 protein accumulations. (D) Immunofluorescence staining of EZH2 and PCNA in *lxr*^{-/-} mice fed a HCD. (E) *ezh2*, *nkx3.1* and *msmb* gene expression analysis by RT-qPCR on DLP of *lxr*^{-/-} mice after recovery period (n= 6/9). (F) Cholesterol esters and free cholesterol accumulations were quantified by thin layer chromatography in PC3 cells treated with 3µg/ml of LDL during 48 hrs. (G) PC3 cells were treated with different doses of native LDL for 48 hrs and proliferation was analyzed by quantification of S-phase cell percentage by flow cytometry. (H) *ezh2* expression was quantified by RT-qPCR (3µg/ml of LDL) after 48 hrs of treatment. Data are means ± s.d. bars and are representative of three independent experiments. Student's t-test : *P<0.05



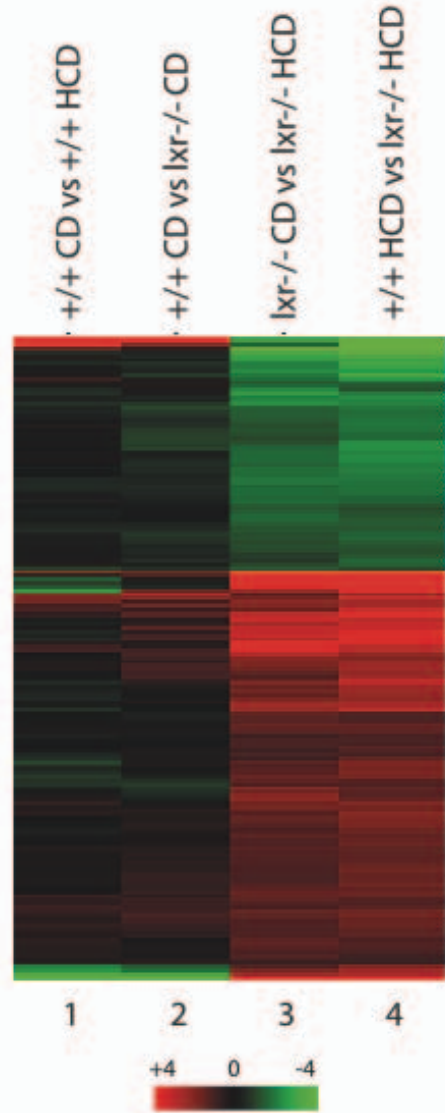
Supplemental data S1: TUNEL experiments on latero-dorsal prostates from 5 month wild type and *lxr*^{-/-} mice fed a Control Diet (CD) or High Cholesterol Diet (HCD) for 5 weeks. Scale bar = 50µM.

	Plasma LDL (mmol/L)	
	Pre-recovery period	Post-recovery period
Control Diet	0.30±0.03	0.55±0.04
High Cholesterol Diet	1.62±0.43	1.07±0.07

Supplemental data S2: Plasma concentrations of LDL-cholesterol were determined before and after recovery period. Data are means ± s.d. (n= 6/9).

Symbol	Accession	Symbol	Accession
ABP1	A_51_P212068	LGI1	A_52_P298394
AGR2	A_51_P209122	LJ06	A_52_P497908
AHR	A_51_P449133	LTF	A_51_P186141
ANLN	A_52_P512955	LYVE1	A_52_P686785
ANPEP	A_51_P231184	MAT2A	A_51_P500344
ANKK3	A_51_P451482	MDM10	A_51_P212662
APOA5	A_52_P292404	MFAP3L	A_52_P138069
BCL11A	A_51_P262998	MGP	A_51_P426270
BMP7	A_52_P278354	MME	A_52_P428723
C1R	A_52_P114260	MMP3	A_51_P255999
CAZ	A_51_P455647	MS4A1	A_51_P277683
CAPG	A_51_P273921	MSMB	A_52_P125636
CASP7	A_51_P414548	MSX1	A_51_P218186
CCL21	A_51_P129480	MT1E	A_51_P246317
CCND2	A_51_P433228	MT1F	A_51_P294879
CD14	A_51_P172853	MYB	A_51_P375543
CD28	A_52_P162957	MYH4	A_52_P082147
CDH11	A_52_P437795	MYH8	A_51_P143256
CDKN2B	A_52_P495241	MYH10	A_52_P686681
CEBPD	A_51_P444447	NG2AM	A_51_P151983
CHRD2	A_51_P305571	NEK6	A_51_P413539
CLIC5	A_51_P193993	NKX3-1	A_51_P409408
COLEC12	A_52_P527625	NOV	A_52_P105537
CRABP1	A_52_P185907	OSMR	A_51_P319460
CRYAB	A_51_P594423	PBK	A_51_P230098
CTGF	A_51_P157042	PDE3A	A_52_P421881
CXADR	A_51_P212308	PDZK1	A_51_P261737
CNCL9	A_51_P461665	PEX1A	A_51_P456957
CXCL13	A_51_P376789	PTX1	A_52_P522255
CXCL16	A_51_P374203	PKHD1	A_52_P377941
CYP2A6	A_52_P246252	PLA2G4A	A_51_P402760
CYP2B9	A_51_P467076	PLAT	A_51_P301566
CYP2B13	A_51_P492339	PLAU	A_52_P302433
CYR61	A_51_P252859	PLAUR	A_52_P681310
DACH1	A_52_P308022	PPP3CC	A_51_P245405
DEFB1	A_52_P321140	PRDX6	A_52_P388359
EDNRA	A_52_P156190	PRLR	A_51_P264673
ESR1	A_52_P237077	PTPRT	A_51_P395373
ESR2	A_52_P195314	QPCT	A_51_P497295
F2	A_51_P489311	RASGRP4	A_52_P122572
FGL1	A_52_P294510	RELN	A_51_P365369
FGS	A_52_P262219	RGS2	A_52_P378958
GABRG1	A_51_P396883	RNR3	A_51_P513311
GAD2	A_51_P452977	S100A9	A_51_P402943
GALNT3	A_51_P380005	S100A11	A_51_P155643
GJA1	A_52_P174915	SDF2L1	A_51_P280446
GPI	A_52_P347412	SELP	A_51_P211854
GREB1	A_51_P127985	SERPINF1	A_51_P517075
GSTO1	A_51_P155313	SLC12A8	A_51_P479618
GSTT1	A_51_P179664	SLC22A1	A_52_P228972
HDAC9	A_51_P204031	SLC26A3	A_52_P185162
HLA-A	A_51_P230289	SLC27A2	A_52_P154871
HQXB2	A_52_P15300	SLC5A3	A_51_P112762
HQXB6	A_51_P232207	SLC5A6	A_51_P107315
HPCD	A_51_P458773	SLC7A5	A_51_P273639
HS3ST3A1	A_51_P515120	SPHK1	A_52_P400436
HSP90B1	A_52_P590546	SPINK1	A_51_P365516
ICOSLG	A_51_P520966	SYNGR1	A_51_P270733
IDO1	A_51_P307150	SYT12	A_51_P384831
IFNG	A_52_P68893	SYT17	A_51_P469688
IGJ	A_51_P150710	TAF15	A_51_P257583
IL24	A_51_P401517	TBL2	A_52_P489206
INHBA	A_51_P239750	TGFBR2	A_51_P450573
INHBB	A_51_P325904	THBS1	A_52_P363951
IQGAP2	A_52_P65494	TMP4	A_51_P355427
ITGB5	A_51_P161054	TLR4	A_51_P300806
ITLN1	A_51_P147967	TLR7	A_51_P371710
KCNK3	A_51_P292221	TMEM97	A_51_P284565
KDELR1	A_52_P596541	TMPSB4	A_51_P446179
KLFB	A_52_P206861	TNN2	A_51_P355122
KLF11	A_52_P474002	USP9NL	A_51_P442719
KLK2	A_51_P388929	WARS	A_52_P35174
LCN2	A_51_P510156	WNT1	A_51_P366435

© 2000-2010 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.



Supplemental data S3: List of 146 deregulated genes associated with “cancer” disease analyzed by hierarchical clustering in figure 4.

Article 6 : *Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male.*

Publié dans *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011 Aug ; 1812(8):974-81. Epub 2011 Feb 18. Review.

El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, Caira F, Drevet JR, Volle DH, Baron S, Saez F, Lobaccaro JM.



Review

Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male[☆]

Fatim-Zorah El-Hajjaji^{a,b,c,1}, Abdelkader Oumeddour^{a,b,c,d,1}, Aurélien J.C. Pommier^{a,b,c}, Aurélia Ouvrier^{a,b}, Emilie Viennois^{a,b,c}, Julie Dufour^{a,b,c}, Françoise Caira^{a,b,c}, Joël R. Drevet^{a,b}, David H. Volle^{a,b,c}, Silvère Baron^{a,b,c}, Fabrice Saez^{a,b}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{a,b,c,*}

^a CNRS Unité Mixte de Recherche 6247 Génétique, Reproduction et Développement, F-63171 Aubière, France

^b Clermont Université, F-63171 Aubière, France

^c Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 rue Montalembert, 63009 Clermont-Ferrand, France

^d Laboratoire d'Endocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2010

Received in revised form 7 February 2011

Accepted 11 February 2011

Available online xxx

Keywords:

Testis

Epididymis

Prostate

LXR

Lipids

ABSTRACT

Liver X receptor (LXR) α and LXR β belong to the nuclear receptor superfamily. For many years, they have been called orphan receptors, as no natural ligand was identified. In the last decade, the LXR natural ligands have been shown to be oxysterols, molecules derived from cholesterol. While these nuclear receptors have been abundantly studied for their roles in the regulation of lipid metabolism, it appears that they also present crucial activities in reproductive organs such as testis and epididymis, as well as prostate. Phenotypic analyses of mice lacking LXRs (*lxr*^{-/-}) pointed out their physiological activities in the various cells and organs regulating reproductive functions. This review summarizes the impact of LXR-deficiency in male reproduction, highlighting the novel information coming from the phenotypic analyses of *lxr α* ^{-/-}, *lxr β* ^{-/-} and *lxr α ; β* ^{-/-} mice. This article is part of a Special Issue entitled: Translating nuclear receptor from health to disease.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. LXRs at a glance

In the early 90's, the discovery of numerous nuclear receptors, called "orphan" since no *bona fide* ligand had been identified, opened the way of the reverse endocrinology [1]. In contrast to classical endocrinology where the effector is discovered following the study of its hormone, the nuclear receptor is used to screen for ligands, either natural or not, which modulate its transcriptional activity. The ligand, in turn, is used as a chemical tool to dissect the role of its nuclear receptor in physiology and pathophysiology [2]. Over the past decade, reverse endocrinology has been used to link several orphan receptors to ligands and biological functions. Such philosophy has led to the identification of liver X receptors (LXRs) α ([3]; NR1H3) and β ([4,5]; NR1H2) as oxysterol receptors [6,7], and to deciphering of their physiological functions. In turn, synthesis of non-metabolizable molecules modulating their transcriptional activity, permitted the investigations of their putative interest as pharmacological targets [8].

LXR α and LXR β form obligatory heterodimers with retinoid receptors (RXR, NR2B1-3), the receptors of 9-*cis* retinoic acid [3,9]. LXR β was found to be expressed in many tissues, whereas LXR α is expressed mainly in a restricted subset of tissues known to play an important role in lipid metabolism (such as liver, small intestine, kidney, spleen, and adipose tissue; for a review, see Ref. [10]). In absence of ligand, LXRs constitutively bind to RXRs and specific binding sequences localized on target gene promoters [3], together with co-repressors, which block transcription by recruitment of histone deacetylase. Hence, the presence of the complex [RXR/LXR-co-repressor-histone deacetylase] on the DNA usually acts as a basal repressor of gene transcription [9]. Oxysterol or 9-*cis* retinoic acid binding to their respective nuclear receptors leads to modifications of the ligand binding pocket within the carboxy-terminus domain. This induces the release of the co-repressors and reinforces the interactions with the co-activators [11]. This cascade of events allows the recruitment of proteins with acetyl-transferase activity and a permissive chromatin environment, which finally enhances LXR-target gene expression and thus the physiological response of the cell.

A large number of natural LXR ligands have been described, such as oxidized derivatives of cholesterol (for a review, see Refs. [12,13]). In mammals, the main source of oxysterols remains endogenous production [13]. An important enzyme of this pathway is the sterol 14 α -demethylase (EC 1.14.13.70, CYP51), a cytochrome P450 required for sterol biosynthesis in different phyla, and the most widely distributed P450 gene family being found in all biological kingdoms [14]. It catalyzes the first

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Translating nuclear receptors from health to disease.

* Corresponding author at: UMR CNRS 6247, INSERM U 931, Clermont-Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 AUBIERE Cedex, France. Tel.: +33 473 40 74 16; fax: +33 473 40 70 42.

E-mail address: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr (J.-M.A. Lobaccaro).

¹ Should be considered as equal first authors.

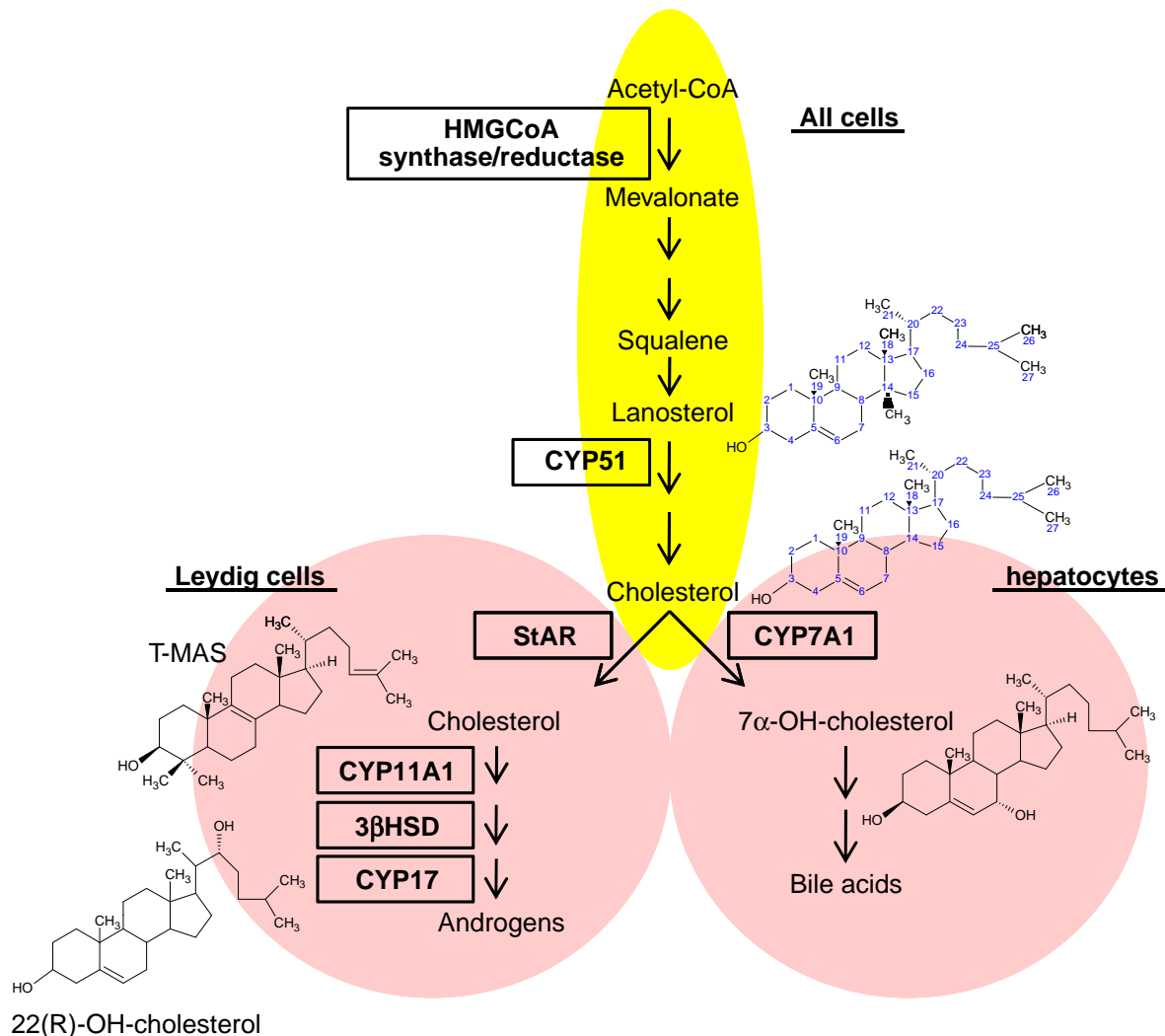


Fig. 1. Schematic representation of cholesterol synthesis and metabolism into androgens or bile acids. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase is the rate-controlling enzyme of the mevalonate pathway that produces cholesterol and other isoprenoids. This synthesis could virtually occur in all cells. Androgens synthesis mainly takes place in Leydig cells, bile acids synthesis in hepatocytes. Structures of the main sterols are indicated: lanosterol, cholesterol, T-MAS, 22(R)-OH-cholesterol and 7α-OH-cholesterol. For more details about the indicated enzymes, see text. StAR, steroidogenic acute regulatory protein; CYP51, 14α-demethylase; CYP7A1, cytochrome P450 cholesterol 7α-hydroxylase; CYP11A1, cytochrome P450 side chain cleavage; CYP17, cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20-lyase; 3βHSD, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

step following cyclization in sterol biosynthesis such as removal of the 14 alpha-methyl group from lanosterol in the cholesterol biosynthetic pathway (Fig. 1). Interestingly, although the human 14α-demethylase gene is expressed in a variety of tissues, the highest levels are observed in testis, ovary, adrenal, prostate, liver, kidney, and lung. In the reproductive tract, many activating oxysterols are present (for a review, see Ref. [13]): including 22(R)-hydroxycholesterol (within the steroidogenic pathway), follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS), and its derivative, testis meiosis-activating sterol (T-MAS).

Due to the lipid nature of the ligands, the physiological roles of LXRs have been extensively detailed in the homeostasis of cholesterol in the gut-liver axis [15]. The role of the LXRs on cholesterol metabolism was determined using engineered knock-out mice lacking one (*lxrα*−/− or *lxrβ*−/−) or both (*lxrα;β*−/−) isoforms. Historically, the first analyses were performed on the *lxrα*−/− mice, which developed a hepatic steatosis, due to cholesteryl-ester accumulation when fed a cholesterol-rich diet [16]. The molecular mechanism leading to this phenotype was the lack of upregulation of *cyp7a1* encoding for the rate-limiting enzyme for the metabolism of cholesterol into bile acid (Fig. 1). *Lxrβ*−/− [17] and *lxrα;β*−/− [17,18] mice were then obtained. The role of the LXRs in cholesterol metabolism was thus extended to *de novo* synthesis of cholesterol [19], excretion [16] and detoxification of bile acids [20] or

lipids [21], as well as in glucose homeostasis [22], immunity [23], skin development and homeostasis [24] and brain functions [25,26]. LXRs, by regulating expression of several genes (including *ABCA1* [18,27], *ABCG1* [28], apolipoprotein E (*APOE*) [29], and *PLTP* [30]) also play a critical role in reverse cholesterol transport. Interestingly, activation of LXRs in intestine and macrophages efficiently prevents atherosclerosis [31,32]. This review will emphasize the physiological roles of LXRs in the male and thus focus on testis, epididymis and prostate (Fig. 2).

The hypothesis that LXRs could also have physiological roles in steroidogenic and reproductive tissues came from difficulties in maintenance of the mouse colony, as well as from previous studies performed on the adrenals [33,34]. *Lxrα*-deficient mice presented an adrenomegaly due to a higher cholesteryl-ester content and a Cushing-like syndrome, as shown by the increased levels of blood corticosterone [33]. This work emphasized the role of *LXRα* as an important regulator of adrenal cholesterol homeostasis through its ability to modulate transcription of genes that govern the three major pathways of adrenal cholesterol, namely efflux, storage, and conversion into steroid hormones [33]. *In vivo* studies also showed that *LXRα*- and *LXRβ*-deficient mice had reduced fertility, characterized by less frequent conception and lower number of pups per litter [35,36]. Careful examination confirmed that both sexes were affected by reproductive

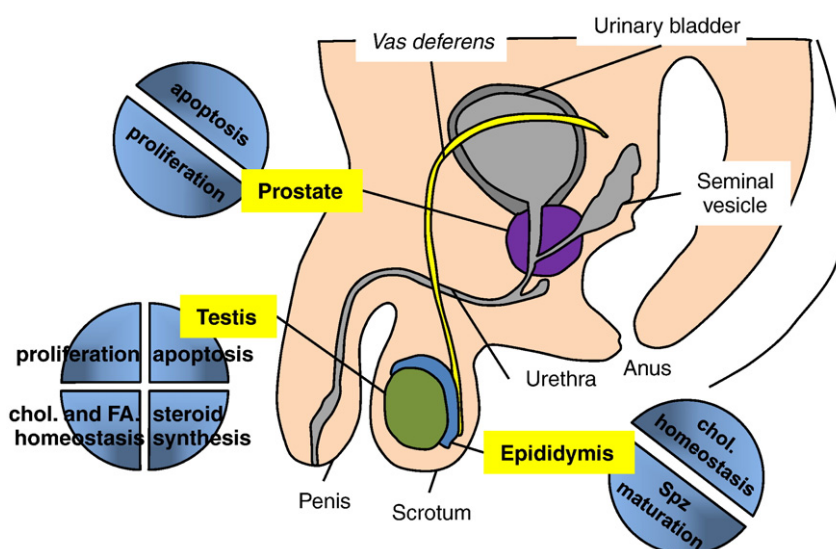


Fig. 2. Physiological roles of LXRs in male genital tract. Three main organs are targeted by LXR-disruption in male mice: testis, epididymis, and prostate. Schematically, LXRs regulate lipid homeostasis in testis and epididymis, as well as apoptosis–proliferation equilibrium of spermatozoa (spz), testicular germ cells and prostate epithelium. For more details, see text.

abnormalities. Female mice showed i) ovarian hyperstimulation-like syndrome [37], a syndrome characterized in women by ovarian enlargement associated with an extra-vascular fluid concentration, haemorrhagic ovarian *corpora lutea* and elevated estradiol serum levels [38,39], as well as ii) parturition defects due to abnormal uterine contraction [40]. LXR-deficient males present abnormal features both within the testis and epididymis (see following chapter). Besides, experiments performed on human cell culture suggested that LXRs could have a protective effect in prostate cancer (see Chapter 4.1).

2. LXR α and LXR β are involved in various physiological processes in the testis

Investigation of LXR-double knock-out mice revealed a decreased fertility at 5 months of age and evolving to complete infertility by 9 months [35,36]. Several testicular functions have been found impaired in LXR α - and LXR β -deficient mice: (1) steroidogenesis, (2) lipid metabolism and (3) proliferation–apoptosis balance in germ cells (Fig. 2).

Quantitative PCR analysis of both LXR isoforms showed that LXR α is expressed in Leydig cells, while LXR β was found in Sertoli cells, suggesting a specific role of each isoform. Both LXRs are present in the germ cells.

2.1. LXR α is involved in germ cell apoptosis while LXR β controls their proliferation

Spermatogenesis is maintained by a delicate balance between proliferation, differentiation, and death of germ cells. Alteration of these processes results in spermatogenic impairment and thus infertility. Both proliferation and apoptosis were found altered in LXR-deficient mice [36].

Analysis of the single LXR-KO mice showed that LXR α is involved in the regulation of apoptosis in the testis [36]. TUNEL analyses revealed that *lxr α* ^{−/−} (as well as *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−}) mice had a significantly higher number of apoptotic cells compared with wild-type mice, whereas a slightly but not significantly decreased number of apoptotic cells was observed in *lxr β* ^{−/−} mice. Consistent with these data, mRNA expression analyses showed a higher accumulation of the proapoptotic transcript *Bad*, as well as *TNF α* in LXR α -lacking mice. Conversely, LXR β -deficient (as well as *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−}) mice had a significantly lower number of proliferating cells [36] and *cyclinA1*

mRNA accumulation, suggesting that LXR β is involved in germ cell proliferation. Infertility and destructured testis were observed only when both isoforms were absent [36]. A schematic view of a testis tubule with the various cells and the proteins, whose accumulation was altered, is given in Fig. 3.

2.2. LXR α controls androgen synthesis in testis

The hypothesis that LXR α could regulate androgen production came from the decreased level of testicular testosterone observed in *lxr α* ^{−/−} and *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−} mice [36]. Type 1 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase (*3 β hsdI*) mRNA accumulation was the most affected of the mRNA encoding the steroidogenic proteins (Fig. 3), whereas levels of steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) and the cytochrome 11a1 (*cyp11a1*) and 17 (*cyp17*) transcripts remained unchanged (refer to Fig. 1 for the proteins). Moreover, significantly lower plasma concentrations of luteinizing hormone (LH) were found in LXR α -deficient mice [36]. These data were confirmed by lower level of expression of the specific β -chain of LH in the pituitary of these animals. Additionally, LXR α -deficient mice were able to respond to human chorionic gonadotropin challenge by an increased production of testosterone similar to their wild-type controls. Interestingly, LXR agonist T0901317 increased testosterone concentration in wild-type mice (almost 14-fold compared to the vehicle-gavaged mice), as well as accumulation of *StAR* at both mRNA and protein levels. Together, these data indicate that LXR α regulates steroid synthesis not only in adrenal cells [33] but also in Leydig cells [36].

2.3. Both LXR α and LXR β play a crucial role in lipid homeostasis in the testis

Part of the phenotype observed in the LXR-deficient mice was correlated with an alteration of lipid homeostasis [35,36,41]. The main enzymes involved in the fatty acid pathway are indicated on Fig. 4. mRNA levels of sterol response element binding protein-1c (*srebp1c*) and fatty acid synthase (*fas*, Fig. 4), encoding the sterol response element binding protein-1c and the fatty acid synthase, respectively, were decreased by 40% in *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−} mice (Fig. 3) compared to the wild-type mice [36]. In contrast, the level of *scd1*, encoding the stearoyl CoA-desaturase 1 (Fig. 4), was increased by 2-fold in LXR-deficient mice (Fig. 3), while *srb1*, encoding the scavenger receptor B1, *abca1* (ATP-binding cassette, sub-family A member 1), and *scd2*

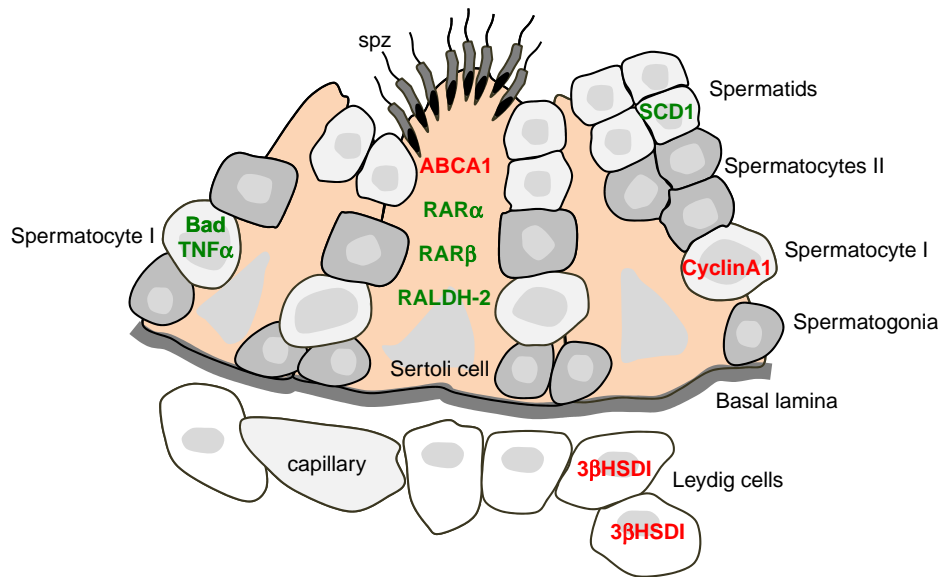


Fig. 3. Proteins which accumulation is altered by LXR-deficiency in the testis tubule. Schematically, LXRs regulate lipid homeostasis in testis, as well as apoptosis–proliferation equilibrium of spermatozoa (spz) and testicular germ cells. For clarity, fibroblasts and myoid cells below the basal lamina have been omitted. Likewise, cytoplasmic bridges between secondary spermatocytes and between early spermatids are not shown. Decreased accumulation is indicated in red; increased accumulation is indicated in green; ABC, ATP-binding cassette protein; Bad, Bcl-2 associated death promoter protein; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; RAR, all-*trans* retinoic acid receptor; RALDH, retinaldehyde dehydrogenase; SCD1, stearoyl coenzyme A desaturase 1; SREBP, sterol regulatory element binding protein; TNF, tumor necrosis factor. Adapted from Ref. [73].

(Fig. 4) were unchanged [36]. Interestingly, oil-red-O staining pointed an accumulation of lipids in the Sertoli cells and in spermatids of LXR-deficient mice. These observations confirmed that fatty acid metabolism is important for reproductive functions, as previously reported [42]. It could also be concluded that lipid homeostasis alteration was the first event in this long process of testis disorganization in *lxrα;β*^{-/-} mice [36], as suggested by Mascres et al. [35].

Our data also showed that the lack of both LXR α and LXR β leads to an increase of RAR α and RAR β (all-*trans* retinoic acid receptors, NR1B1 and NR1B3), and retinaldehyde dehydrogenase-2 (RALDH-2) expressions [36] (Fig. 3), resulting in deregulation of retinoic acid signaling. This is seen in the expression pattern of known RAR-target genes, such as dosage suppressor of *mck1* homolog, meiosis-specific homologous recombination (*dmc1*) and synaptonemal complex protein 3 (*scp3*), and could lead to spermatogenic disorders. Lipid accumulation has previously been observed in rat Sertoli cells in hypervitaminosis A [43], suggesting links between retinoid and lipid pathways. How the lack of LXRs act upon the retinoic acid signaling pathway remains to be clarified; however, it could be hypothesized that SHP (small heterodimeric partner, NROB2), a non-canonical orphan nuclear receptor, could play a major role as shown by Volle et al. [44,45] by studying SHP-deficient mice. Indeed, SHP has been described to be a negative regulator of a number of nuclear receptors such as LXRs and RARs [46].

Phenotypic analysis of *lxr*^{-/-} mice has thus shown that cooperation between LXR α and LXR β maintains both testis structure and function. In human, Chen et al. [47] identified and characterized two alternative spliced transcript variants of LXR α . LXR α 2, which has a shorter N-terminal domain and a reduced transcriptional activity, was found highly expressed in testis. The physiological role of the shorter form remains to be defined in man. Since ablation of LXRs impairs the fertility of aging mice, a putative defect in LXR-signaling cannot be excluded in the premature loss of fertility observed in some men.

3. LXR-deficient mice present abnormal features of the epididymis

As described above, *lxrα;β*^{-/-} male mice become completely infertile when the animals reach the age of 9 months. The infertility

arises from the association of testicular alterations [36] with an epididymal destructuration [48] observed in the two first segments of the organ (for a schematic representation see Fig. 5), which functions in regulation of the cholesterol homeostasis and maturation of spermatozoa. The phenotype observed in the *lxrα;β*^{-/-} mice is characterized by an enlargement of the tubule lumen, with the presence of an amorphous substance in the lumen and shrinkage of the epithelial height. Interestingly, a 15-day supplementation with androgens could not reverse the phenotype. Oil-red-O staining of *caput* epididymidis cryosections reveals lipid accumulation in the peritubular and interstitial tissues and the epithelium of *lxrα;β*^{-/-} male mice. The amorphous substance in the tubule lumen was not stained, thus indicating that it was not composed of neutral lipids. Many isolated spermatozoa heads and flagella were observed when sperm were retrieved from the *cauda* epididymidis, revealing that the gametes were fragile, probably as a result of both testicular and epididymal dysfunctions [48]. The expression levels of genes regulating the fatty acid metabolism also seemed to be affected since quantitative real time RT-PCR showed that *sreb1c*, *scd1* and *scd2* mRNAs were decreased in *lxrα;β*^{-/-} male *caput* epididymidis

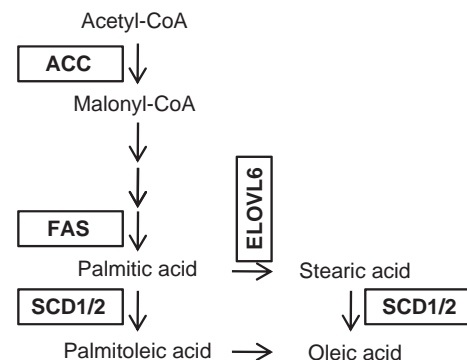


Fig. 4. Schematic representation of fatty acid synthesis in mammals. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is the rate-limiting (committed) step in fatty acid synthesis. There are two major isoforms of ACC in mammalian tissues; FAS, fatty acid synthase; SCD1/2, stearoyl CoA-desaturase 1 or 2; ELOVL6, elongation of very long chain.

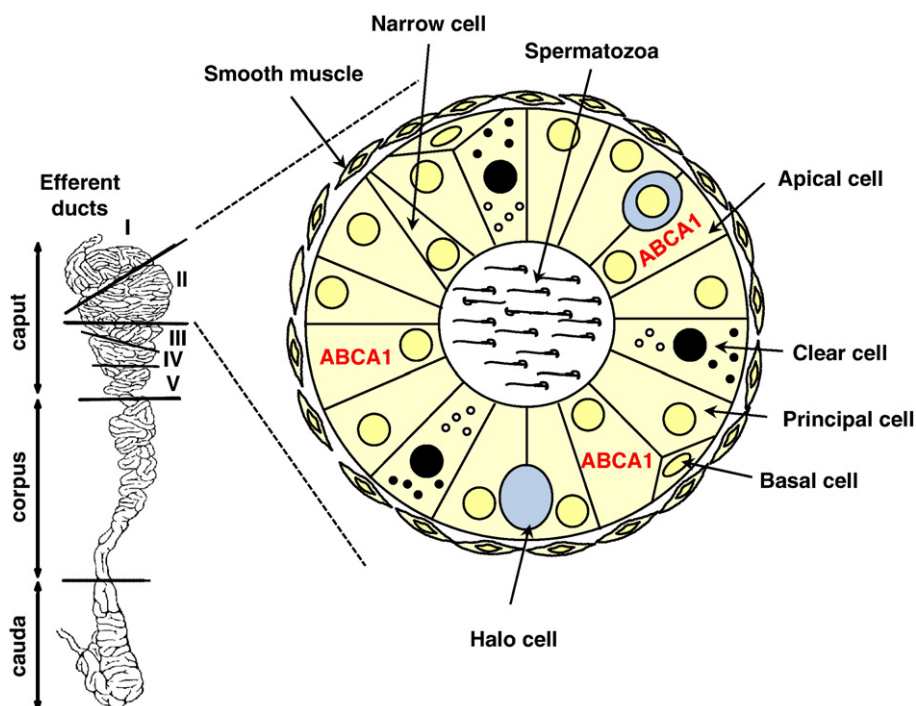


Fig. 5. Schematic representation of the role of LXRs in the *caput* epididymidis. Epididymis is organized in three parts (*caput*, *corpus* and *cauda*). The main cells are indicated. The major phenotype of the LXR-deficient mice is observed in the segments I and II of the *caput* with the lack of ABCA1 (indicated in red) in the apical membrane of the apical cells. Latin numerals indicate the *caput* segments.

compared to wild-type mice. However, the impact of these down regulations was moderate as they do not influence fatty acid compositions of separated phospholipid and neutral lipid fractions in *lxrα;β*^{-/-} animals [49]. Further investigations revealed that cholesterol trafficking was a LXR-regulated mechanism in mouse *caput* epididymidis, in a segment- and cell-specific manner [50]. In LXR α - and LXR β -deficient animals, apical cells present in the two first *caput* segments had their cytoplasm filled with cholesteryl-ester droplets, in association with a loss of ABCA1 in the apical membrane of the apical cells (Fig. 5). The level of apoptotic apical cells was also increased in *lxrα;β*^{-/-} compared to wild-type mice. ABCA1 was thus confirmed to be an important factor in the male reproductive tract, as male mice invalidated for this gene were previously shown to have a 21% fertility decrease over their lifespan. Both expression and location of ABCG1 were different from ABCA1 and were not altered in the epididymis of LXR-deficient mice. ABCG1 was present at the apical pole of all epithelial cells in the proximal *caput* epididymal segments [50], suggesting complementary functions for these two cholesterol transporters in the epididymal epithelium. These locations raise the question how cholesterol efflux could be involved in sperm maturation.

Even though germ cells already presented abnormal lipid accumulation in the testis [36], alterations of cholesterol homeostasis may also be linked to sperm maturation defects along the epididymal duct and lead to impaired fertility. In man, dyslipidemia, obesity and/or hypercholesterolemia are generally associated with testicular defects and endocrine perturbations whereas defaults in epididymal sperm maturation are rarely investigated in these situations. Recent data showed that fertile three month-old *lxrα;β*^{-/-} male mice became infertile when fed a 1.25% cholesterol containing diet during four weeks. An atherosclerosis-like process was observed in the proximal epididymis, provoking sperm morphological abnormalities, decreased motility and viability and premature acrosome reaction (Ouvrier et al. submitted). This study brings forward the epididymis as an early target of cholesterol toxicity in a dyslipidemic mouse model, and shows that post-

testicular sperm alterations may be associated with male infertility under dyslipidemic conditions.

4. Physiological role of LXR α and LXR β in prostate cancer

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of death from cancer in men over 50 years old. Among the various genetic and environmental risk factors, epidemiological analyses have revealed a positive association between hypercholesterolemia and the development of prostate cancer [51,52]. Indeed, epidemiological studies have shown that Chinese populations, with a low risk to develop prostate cancer, had an increased risk after migration to the United States. This environmental effect was attributed to the deleterious impact of lipid consumption on this cancer [53]. Actually, cholesterol accumulation in tumors was first reported in the early 20th century [54] without any clear mechanistic explanation [55]. One of the various hypotheses was that rapidly proliferating cancer cells require new components to build *de novo* plasma membrane. Consistent with this hypothesis, HMG-CoA reductase inhibitors that impede *de novo* synthesis of cholesterol block prostate cancer cell growth *in vitro* [56]. Statins and their derivatives have thus been suspected to have benefits in prostate cancer progression in patients undergoing long-term treatment [57–59]. Even though LXRs are key-sensors of cholesterol homeostasis, their role in prostate physiology remains poorly understood.

4.1. Both LXR α and LXR β modify the apoptosis–proliferation balance in prostate cancer cells

Fukuchi et al. [60] first reported the control of proliferation by LXRs on LNCaP human prostate carcinoma cell line, *in vitro* as well as *in vivo*. In their experiments, LXR agonist T0901317 decreased the percentage of cells in S-phase through an upregulation of *p27^{kip1}*. The induction of expression of the cholesterol membrane transporter ABCA1 by T0901317 led to the assumption that ABCA1 was the key-regulator of the cell cycle in response to LXR activation [61]. Freeman and

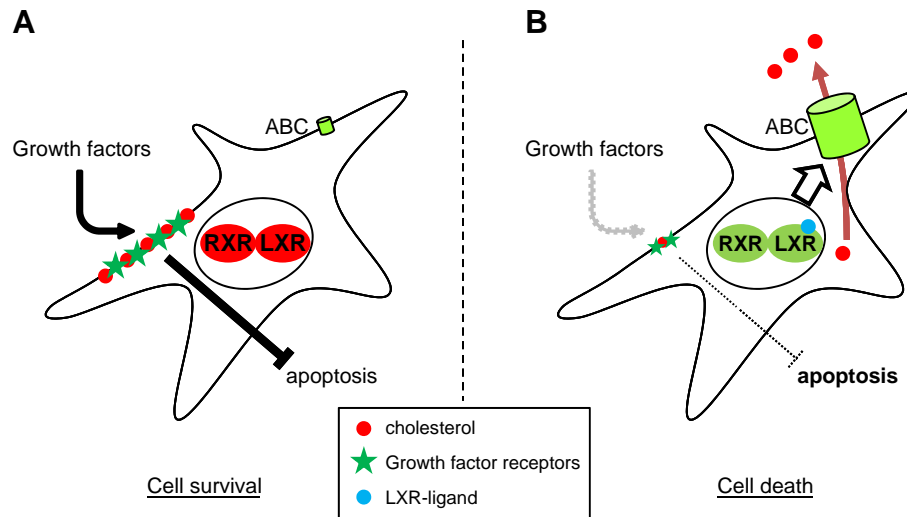


Fig. 6. Role of LXRs in apoptosis of prostate human cancer cells. A) When the level of cholesterol is high, it accumulates in membranes within the lipid rafts, which allows the growth factors to access to their receptors. Binding of these peptides increases cell proliferation and inhibits cell death by apoptosis. B) Activation of LXRs by its ligand induces a higher production of ATP-binding cassettes (ABC) involved in cholesterol efflux, which destructures the lipid rafts. Growth factors are less efficient to maintain cell proliferation, which in turn increases apoptosis. Broken arrow indicates an inhibition.

Solomon proposed that a critical cholesterol concentration in the membrane was required to allow raft coalescence [62]. Sequestration of “oncogenic” signaling proteins in a restricted area through raft coalescence could enhance their activity by exclusion of negative regulators outside the rafts [63,64]. Based on that hypothesis, we explored whether LXRs could modulate cholesterol concentration in rafts [65]. *In vitro* and *in vivo* analyses revealed that modulation of LXR activity triggered apoptosis of prostate cancer cells. This effect involves both the increase of cholesterol efflux by ABC proteins and the disruption of lipid-rafts signaling activity. Schematically (Fig. 6), LXRs first mediate upregulation of ABCG1 that stimulates reverse cholesterol transport. This results in a reduction in plasma membrane cholesterol steady state levels. Then, both disruption of lipid-rafts and down-regulation of raft-associated signaling in prostate cancer cells are induced, together with a decrease in the phosphorylated fraction of raft-associated AKT. Cholesterol replenishment prevents entry of the cells into apoptosis in the presence of T0901317 demonstrating that cholesterol homeostasis regulation by LXRs is a key-process to control cell death. Consistent with this mechanism, chronic T0901317 treatment down regulates AKT and stimulates apoptosis of LNCaP derived tumors in xenografted mice [65]. These results pointed out that LXR α and LXR β are important modulators of prostate cancer cell survival. Altogether, these findings reinforce the idea to consider LXR agonists as potential pharmacological agents in cancer prevention and anti-cancer therapy (for a review, see Ref. [66]). Various studies indeed enlighten the anti-proliferative and proapoptotic effects of LXR-ligand on ovarian [67] and breast [68,69] cancer models.

4.2. LXR α and benign prostatic hyperplasia

Benign prostatic hyperplasia concerns 50% of men over the age of 50 years [70]. Symptoms include urinary frequency, urgency incontinence (compelling need to void that cannot be deferred), and voiding at night (nocturia) [71]. Kim et al. [72] showed that LXR α –/– mice presented benign prostatic hyperplasia-like features on ventral prostate such as proliferative epithelial cells, multiple layers of dense stroma around the prostatic ducts and dilated prostatic ducts. These data suggest that LXR α agonists could also be useful in the treatment of this potentially harmful pathology since some patients may eventually progress to renal failure.

5. Are LXRs promising pharmacological targets in human diseases?

The discovery of new regulated transcription factors has always opened several fields of investigation. From an academic point of view, it is elegant to identify novel *bona fide* genes and associate the discovered factor to new physiological functions. The use of transgenic animals (fly, mouse, worm...) usually helps in linking abnormal features of the transcription factor (mutation or abnormal signaling pathway) to human diseases. At last, once this milestone is reached, chemists can synthesize thousands of new ligands in order to modulate the protein activity. However, the main concern for pharmacology researchers is to solve the pathological problem without opening Pandora's box to optimize the ligands of therapeutical interest without inducing major side effects (for a review, see Ref. [66]).

Studies on mice pointed out that LXR-deficiency could be associated with several phenotypes resembling putative diseases found in human such as metabolic disorders, reproductive failures, central nervous system alterations, or various types of cancer [66]. Clinical use of LXR agonists should thus theoretically be useful in reducing cholesterol levels, neural degeneration, parturition defects, and cancer progression. Up to now, the major side effect of LXRs is a hypertriglyceridemia due to their activity in the liver on the fatty acid synthase. In analogy with what was done for the estrogen receptors, it is likely that SLIMs (Selective Liver X Receptor Modulators) need to be developed [66]. They should have tremendous therapeutical possibilities, after having successfully undergone the extensive approval process. In a near future...

Acknowledgments

We thank Drs. Charles White and Laurent Morel (UMR GReD, Clermont-Ferrand) for critically reading the manuscript. The various works cited are financed in part by Fondation pour la Recherche Médicale INE2000-407031/1, Fondation BNP-Paribas, Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Association de Recherche contre le Cancer, Ligues de l'Allier et du Puy-de-Dôme contre le Cancer, and Société d'Andrologie de Langue Française. E. Viennois is funded by Région Auvergne and Fond Européen de Développement Régional (FEDER); A. Pommier, A. Ouvrier and J. Dufour are funded by

MNERT; A. Oumeddour is a recipient of a grant from the Algerian Government (Programme National Exceptionnel).

References

- [1] R. Lafont, Reverse endocrinology, or "hormones" seeking functions, *Insect biochem.* 21 (1991) 697–721.
- [2] S.A. Kliewer, J.M. Lehmann, T.M. Willson, Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse, *Science* 284 (1999) 757–760.
- [3] P.J. Willy, K. Umesono, E.S. Ong, R.M. Evans, R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway, *Genes Dev.* 9 (1995) 1033–1045.
- [4] D.M. Shinar, N. Endo, S.J. Rutledge, R. Vogel, G.A. Rodan, A. Schmidt, NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor, *Gene* 147 (1994) 273–276.
- [5] C. Song, J.M. Kokontis, R.A. Hiipakka, S. Liao, Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10809–10813.
- [6] B.A. Janowski, M.J. Grogan, S.A. Jones, G.B. Wisely, S.A. Kliewer, E.J. Corey, D.J. Mangelsdorf, Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 (1999) 266–271.
- [7] B.A. Janowski, P.J. Willy, T.R. Devi, J.R. Falck, D.J. Mangelsdorf, An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha, *Nature* 383 (1996) 728–731.
- [8] M. Hansen, T. Connolly, Nuclear receptors as drug targets in obesity, dyslipidemia and atherosclerosis, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 247–255.
- [9] P.J. Willy, D.J. Mangelsdorf, Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR, *Genes Dev.* 11 (1997) 289–298.
- [10] D.H. Volle, J.M. Lobaccaro, Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266 (2007) 183–189.
- [11] M. Albers, B. Blume, T. Schlueter, M.B. Wright, I. Kober, C. Kremoser, U. Deuschle, M. Koegl, A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands. Competitive recruitment of activators and repressors, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4920–4930.
- [12] H. Ratni, M.B. Wright, Recent progress in liver X receptor-selective modulators, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 13 (2010) 403–413.
- [13] G.J. Schroepfer Jr., Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 361–554.
- [14] G.I. Lepesheva, M.R. Waterman, CYP51—the omnipotent P450, *Mol. Cell. Endocrinol.* 215 (2004) 165–170.
- [15] I. D'Errico, A. Moschetta, Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 1523–1543.
- [16] D.J. Peet, S.D. Turley, W. Ma, B.A. Janowski, J.M. Lobaccaro, R.E. Hammer, D.J. Mangelsdorf, Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha, *Cell* 93 (1998) 693–704.
- [17] S. Alberti, G. Schuster, P. Parini, D. Feltkamp, U. Diczfalusy, M. Rudling, B. Angelin, I. Bjorkhem, S. Pettersson, J.A. Gustafsson, Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 565–573.
- [18] J.J. Repa, S.D. Turley, J.A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R.A. Heyman, J.M. Dietschy, D.J. Mangelsdorf, Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers, *Science* 289 (2000) 1524–1529.
- [19] Y. Wang, P.M. Rogers, C. Su, G. Varga, K.R. Stayrook, T.P. Burris, Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26332–26339.
- [20] O. Barbier, J. Trottier, J. Kaeding, P. Caron, M. Verreault, Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation, *Mol. Cell. Biochem.* 326 (2009) 3–8.
- [21] D.H. Volle, J.J. Repa, A. Mazur, C.L. Cummins, P. Val, J. Henry-Berger, F. Caira, G. Veysiere, D.J. Mangelsdorf, J.M. Lobaccaro, Regulation of the aldo-keeto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 888–898.
- [22] T.H. Kim, H. Kim, J.M. Park, S.S. Im, J.S. Bae, M.Y. Kim, H.G. Yoon, J.Y. Cha, K.S. Kim, Y.H. Ahn, Interrelationship between LXR(alpha), SREBP-1c, PPAR(gamma) and SHP in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver, *J. Biol. Chem.* (2009).
- [23] C. Hong, P. Tontonoz, Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18 (2008) 461–467.
- [24] M. Demerjian, E.H. Choi, M.Q. Man, S. Chang, P.M. Elias, K.R. Feingold, Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis, *Exp. Dermatol.* (2009).
- [25] R. Koldamova, I. Lefterov, Role of LXR and ABCA1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease—implications for a new therapeutic approach, *Curr. Alzheimer Res.* 4 (2007) 171–178.
- [26] R.P. Koldamova, I.M. Lefterov, M. Staufenbiel, D. Wolfe, S. Huang, J.C. Glorioso, M. Walter, M.G. Roth, J.S. Lazo, The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4079–4088.
- [27] A. Venkateswaran, J.J. Repa, J.M. Lobaccaro, A. Bronson, D.J. Mangelsdorf, P.A. Edwards, Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14700–14707.
- [28] M.A. Kennedy, A. Venkateswaran, P.T. Tarr, I. Xenarios, J. Kudoh, N. Shimizu, P.A. Edwards, Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39438–39447.
- [29] P.A. Mak, B.A. Laffitte, C. Desrumaux, S.B. Joseph, L.K. Curtiss, D.J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, P.A. Edwards, Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31900–31908.
- [30] G. Cao, T.P. Beyer, X.P. Yang, R.J. Schmidt, Y. Zhang, W.R. Bensch, R.F. Kauffman, H. Gao, T.P. Ryan, Y. Liang, P.I. Eacho, X.C. Jiang, Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39561–39565.
- [31] G. Lo Sasso, S. Murzilli, L. Salvatore, I. D'Errico, M. Petruzzelli, P. Conca, Z.Y. Jiang, L. Calabresi, P. Parini, A. Moschetta, Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis, *Cell Metab.* 12 (2010) 187–193.
- [32] T. Yasuda, D. Grillot, J.T. Billheimer, F. Briand, P. Delerive, S. Huet, D.J. Rader, Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 781–786.
- [33] C.L. Cummins, D.H. Volle, Y. Zhang, J.G. McDonald, B. Sion, A.M. Lefrancois-Martinez, F. Caira, G. Veysiere, D.J. Mangelsdorf, J.M. Lobaccaro, Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1902–1912.
- [34] K.R. Steffensen, S.Y. Neo, T.M. Stulnig, V.B. Vega, S.S. Rahman, G.U. Schuster, J.A. Gustafsson, E.T. Liu, Genome-wide expression profiling; a panel of mouse tissues discloses novel biological functions of liver X receptors in adrenals, *J. Mol. Endocrinol.* 33 (2004) 609–622.
- [35] B. Mascrez, N.B. Ghyselinck, M. Watanabe, J.S. Annicotte, P. Chambon, J. Auwerx, M. Mark, Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells, *EMBO Rep.* 5 (2004) 285–290.
- [36] D.H. Volle, K. Mouzat, R. Duggavathi, B. Siddeek, P. Dechelotte, B. Sion, G. Veysiere, M. Benahmed, J.M. Lobaccaro, Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1014–1027.
- [37] K. Mouzat, F. Volat, S. Baron, G. Alves, A.J. Pommier, D.H. Volle, G. Marceau, A. DeHaze, P. Dechelotte, R. Duggavathi, F. Caira, J.M. Lobaccaro, Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice, *Endocrinology* 150 (2009) 3369–3375.
- [38] H. Kurioka, K. Takahashi, N. Kita, Y. Noda, Hemorrhagic ovarian cyst without peritoneal bleeding in a patient with ovarian hyperstimulation syndrome: case report, *Chin. Med. J. (Engl)* 118 (2005) 1577–1581.
- [39] N.F. Vlahos, O. Gregoriou, Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome, *Ann. NY Acad. Sci.* 1092 (2006) 247–264.
- [40] K. Mouzat, M. Prod'homme, D.H. Volle, B. Sion, P. Dechelotte, K. Gauthier, J.M. Vanacker, J.M. Lobaccaro, Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 4693–4701.
- [41] K.M. Robertson, G.U. Schuster, K.R. Steffensen, O. Hovatta, S. Meaney, K. Hultenby, L.C. Johansson, K. Svechnikov, O. Soder, J.A. Gustafsson, The liver X receptor-(beta) is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis, *Endocrinology* 146 (2005) 2519–2530.
- [42] A. Lenzi, M. Picardo, L. Gandini, F. Dondero, Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy, *Hum. Reprod. Update* 2 (1996) 246–256.
- [43] N.M. Biswas, C. Deb, Testicular degeneration in rats during hypervitaminosis A, *Endokrinologie* 49 (1965) 64–69.
- [44] D.H. Volle, R. Duggavathi, B.C. Magnier, S.M. Houten, C.L. Cummins, J.M. Lobaccaro, G. Verhoeven, K. Schoonjans, J. Auwerx, The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice, *Genes Dev.* 21 (2007) 303–315.
- [45] D.H. Volle, M. Decourteix, E. Garo, J. McNeilly, P. Fenichel, J. Auwerx, A.S. McNeilly, K. Schoonjans, M. Benahmed, The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3752–3764.
- [46] Y. Zhang, C.H. Hagedorn, L. Wang, Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* (2010).
- [47] M. Chen, S. Beaven, P. Tontonoz, Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2570–2579.
- [48] J.M. Frenoux, P. Vernet, D.H. Volle, A. Britan, F. Saez, A. Kocer, J. Henry-Berger, D.J. Mangelsdorf, J.M. Lobaccaro, J.R. Drevet, Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions, *J. Mol. Endocrinol.* 33 (2004) 361–375.
- [49] F. Saez, E. Chabory, R. Cadet, P. Vernet, S. Baron, J.M. Lobaccaro, J.R. Drevet, Liver X receptors and epididymal epithelium physiology, *Asian J. Androl.* 9 (2007) 574–582.
- [50] A. Otvrier, R. Cadet, P. Vernet, B. Laillet, J.M. Chardigny, J.M. Lobaccaro, J.R. Drevet, F. Saez, LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1766–1775.
- [51] F. Bravi, L. Scotti, C. Bosetti, R. Talamini, E. Negri, M. Montella, S. Franceschi, C. La Vecchia, Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer, *Ann. Oncol.* 17 (2006) 1014–1017.
- [52] L. Magura, R. Blanchard, B. Hope, J.R. Beal, G.G. Schwartz, A.E. Sahnoun, Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study, *Cancer Causes Control* 19 (2008) 1259–1266.
- [53] M. Watanabe, T. Nakayama, T. Shiraishi, G.N. Stemmermann, R. Yatani, Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review, *Urol. Oncol.* 5 (2000) 274–283.

- [54] C. White, On the occurrence of crystals in tumours, *J. Pathol. Bacteriol.* 13 (1909) 3–10.
- [55] G. Swyer, The cholesterol content of normal and enlarged prostates, *Cancer Res.* 2 (1942) 372–375.
- [56] L. Zhuang, J. Kim, R.M. Adam, K.R. Solomon, M.R. Freeman, Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 959–968.
- [57] E.A. Platz, M.F. Leitzmann, K. Visvanathan, E.B. Rimm, M.J. Stampfer, W.C. Willett, E. Giovannucci, Statin drugs and risk of advanced prostate cancer, *J. Natl Cancer Inst.* 98 (2006) 1819–1825.
- [58] J. Shannon, S. Tewoderos, M. Garzotto, T.M. Beer, R. Derenick, A. Palma, P.E. Farris, Statins and prostate cancer risk: a case-control study, *Am. J. Epidemiol.* 162 (2005) 318–325.
- [59] T.J. Murtola, T. Visakorpi, J. Lahtela, H. Syvala, T. Tammela, Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions, *Nat. Clin. Pract. Urol.* 5 (2008) 376–387.
- [60] J. Fukuchi, J.M. Kokontis, R.A. Hiipakka, C.P. Chuu, S. Liao, Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 7686–7689.
- [61] J. Fukuchi, R.A. Hiipakka, J.M. Kokontis, S. Hsu, A.L. Ko, M.L. Fitzgerald, S. Liao, Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 7682–7685.
- [62] M.R. Freeman, K.R. Solomon, Cholesterol and prostate cancer, *J. Cell. Biochem.* 91 (2004) 54–69.
- [63] G. Yang, L.D. Truong, T.L. Timme, C. Ren, T.M. Wheeler, S.H. Park, Y. Nasu, C.H. Bangma, M.W. Kattan, P.T. Scardino, T.C. Thompson, Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 1873–1880.
- [64] J. Kim, R.M. Adam, K.R. Solomon, M.R. Freeman, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells, *Endocrinology* 145 (2004) 613–619.
- [65] A.J. Pommier, G. Alves, E. Viennois, S. Bernard, Y. Communal, B. Sion, G. Marceau, C. Damon, K. Mouzat, F. Caira, S. Baron, J.M. Lobaccaro, Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells, *Oncogene* 29 (2010) 2712–2723.
- [66] E. Viennois, A.J.C. Pommier, K. Mouzat, A. Oumeddour, F.-Z. El Hajjaji, J. Dufour, F. Caira, D.H. Volle, S. Baron, J.-M.A. Lobaccaro, Targeting Liver X Receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15 (2) (2011) 219–232.
- [67] J.J. Rough, M.A. Monroy, S. Yerrum, J.M. Daly, Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells, *J Ovarian Res* 3 (2010) 13.
- [68] L.L. Vedin, S.A. Lewandowski, P. Parini, J.A. Gustafsson, K.R. Steffensen, The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells, *Carcinogenesis* 30 (2009) 575–579.
- [69] H. Gong, P. Guo, Y. Zhai, J. Zhou, H. Uppal, M.J. Jarzynka, W.C. Song, S.Y. Cheng, W. Xie, Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1781–1790.
- [70] D.R. Paolone, Benign prostatic hyperplasia, *Clin. Geriatr. Med.* 26 (2010) 223–239.
- [71] C.G. Roehrborn, Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH), *Med. Clin. North Am.* 95 (2011) 87–100.
- [72] H.J. Kim, L.C. Andersson, D. Bouton, M. Warner, J.A. Gustafsson, Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106 (2009) 558–563.
- [73] L.C. Junquiera, J. Carniero, R.O. Kelley, *Basic Histology*, 6th ed., Appleton and Lange, Norwalk, CT, 1989.

Article 7 : Rôles des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction

Publié dans *Médecine Science*. 2009 Feb;25(2):141-4.

Mouzat K, Alves G, Pommier A, Viennois E, Pihen T, Caira F, Baron S, A Lobaccaro JM.

Rôles des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction

Kevin Mouzat, Georges Alves, Aurélien Pommier, Émilie Viennois, Thomas Pihen, Françoise Caira, Silvère Baron, Jean-Marc A. Lobaccaro

Clermont Université, UMR « Génétique, Reproduction et Développement » ; CNRS UMR 6247 ; Inserm U931 ; LXR, oxystérols et tissus stéroïdogènes et Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne ; 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
K. Mouzat (adresse actuelle) : Service de Biochimie, CHU de Nîmes et Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes, France.
j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr



> Au début des années 1990, la découverte de très nombreux récepteurs nucléaires dits « orphelins », car aucun ligand n'avait encore été identifié, a ouvert la voie à la notion d'endocrinologie inverse où la mise en évidence de la fonction physiologique de la protéine est postérieure à la découverte de la protéine et celle de son ligand. Par la suite, la synthèse de molécules non métabolisables modulant l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs nucléaires « orphelins-adoptés » a ouvert des perspectives intéressantes quant à leur utilisation en pathologie. Les LXR (*liver X receptors*) font partie de ces récep-

teurs nucléaires orphelins-adoptés dont l'intérêt pharmacologique n'a cessé de croître ces dernières années devant leur potentiel thérapeutique. Cependant, leur implication récente dans la régulation des fonctions de reproduction chez le mâle et la femelle oblige à beaucoup de prudence quant à une utilisation prochaine dans le traitement de certaines dyslipidémies.

Les LXR, des récepteurs nucléaires activés par des dérivés du cholestérol

Les récepteurs LXR sont des facteurs de transcription activables par des molécules dérivées directement du cholestérol, les oxystérols, et font partie des récepteurs nucléaires qui forment des hétérodimères avec RXR, le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* [1]. Il existe deux isoformes LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) provenant chacune de deux gènes distincts localisés respectivement sur les chromosomes 11p11.2 et 19q13.3 chez l'homme. Si l'expression de LXR β est ubiquiste, LXR α est plutôt exprimé dans les organes présentant un fort métabolisme lipidique comme les tissus adipeux et les organes stéroïdogènes.

térol, les oxystérols, et font partie des récepteurs nucléaires qui forment des hétérodimères avec RXR, le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* [1]. Il existe deux isoformes LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) provenant chacune de deux gènes distincts localisés respectivement sur les chromosomes 11p11.2 et 19q13.3 chez l'homme. Si l'expression de LXR β est ubiquiste, LXR α est plutôt exprimé dans les organes présentant un fort métabolisme lipidique comme les tissus adipeux et les organes stéroïdogènes.

En l'absence de ligand

Canoniquement, les LXR sont des protéines acétylées, fixées sur l'ADN avec leur partenaire RXR (*Figure 1*, étape 1) et leur capacité de transcription est inhibée par la présence de co-répresseurs, comme N-CoR (*Nuclear receptor co-repressor*)

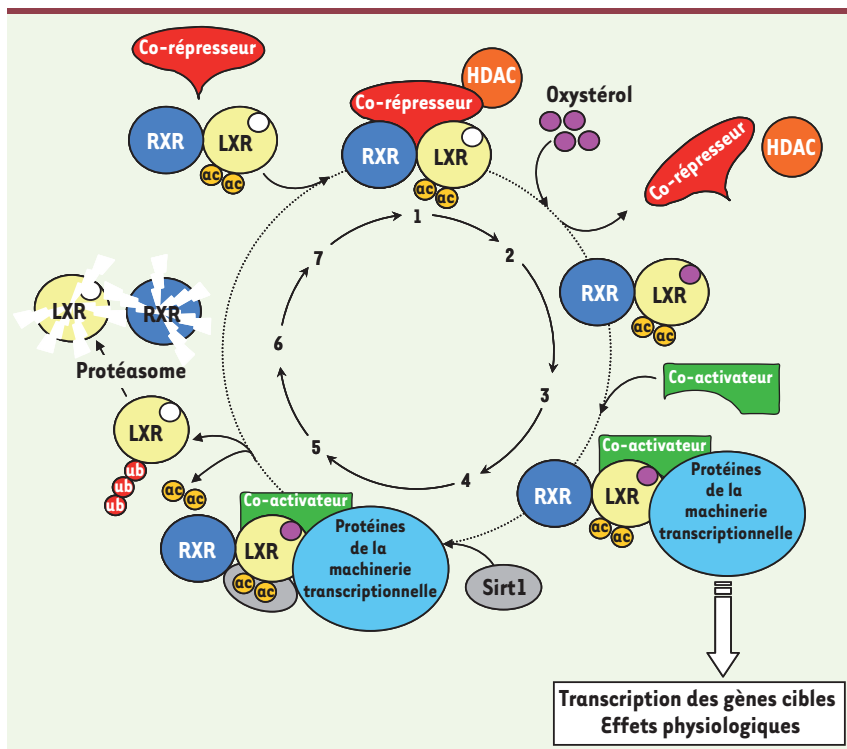


Figure 1. Représentation schématique du cycle d'activation/inhibition de l'hétérodimère RXR-LXR. En l'absence de ligand, l'hétérodimère RXR-LXR recrute des co-répresseurs transcriptionnels. La fixation du ligand (ne sont représentés que la poche de liaison du ligand de LXR et les oxystérols) entraîne le départ des co-répresseur et l'arrivée de protéines co-activatrices et des éléments basaux de la machinerie transcriptionnelle. *In fine*, la réponse physiologique est activée. Le rôle de la sirtuine Sirt1 est de déacétyler LXR, d'entraîner son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome. Par la suite un nouvel hétérodimère se place sur l'élément de réponse à LXR. Pour plus de détails voir le texte. Ac, acétylation ; Ub, ubiquitine.

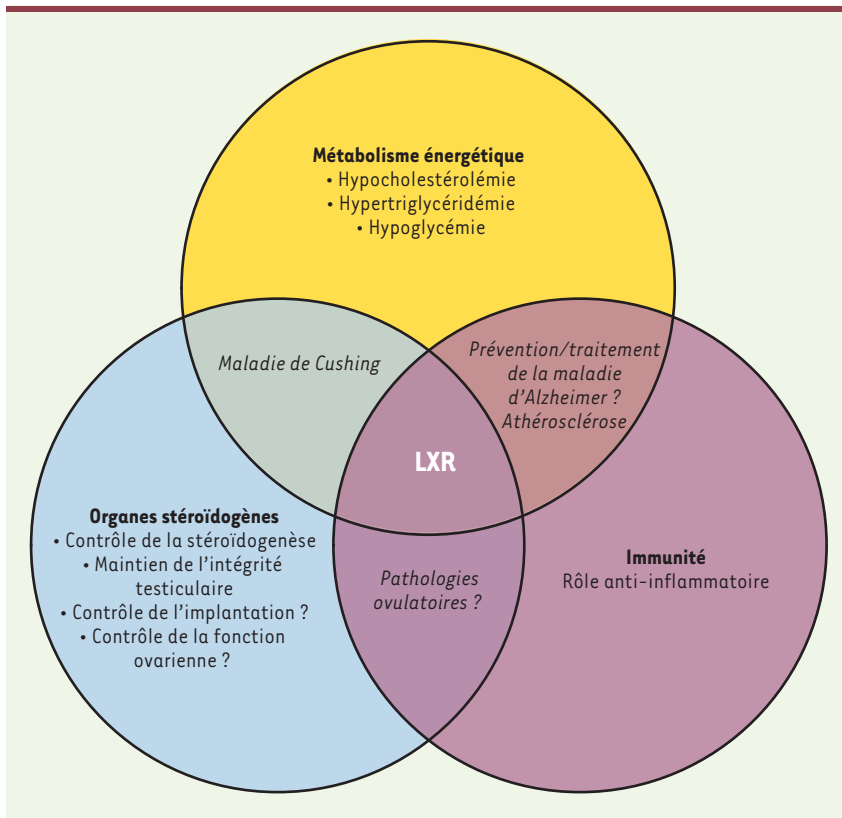


Figure 2. Synthèse du rôle des LXR dans la physiologie. Le rôle des LXR dans le contrôle des métabolismes lipidique et glucidique a été le plus étudié depuis leurs découvertes. Cependant, de plus en plus d'études récentes tendent à associer ces récepteurs nucléaires à d'autres fonctions physiologiques. La compréhension des mécanismes d'action et du rôle précis des LXR dans la physiologie générale de l'organisme aidera à terme à développer des molécules modulatrices utilisables dans la prévention et le traitement de nombreuses pathologies.

s'hétérodimérisent en solution par leur domaine de liaison du ligand (étape 7) et le complexe reconnaît les éléments de réponse sur l'ADN.

Au-delà de cette description schématique, l'activité transcriptionnelle des récepteurs LXR peut aussi être modulée par une SUMOylation, des phosphorylations, la compétition sur les sites de fixation avec d'autres récepteurs nucléaires ou pour la dimérisation avec RXR comme PPAR α .

Les fonctions physiologiques régulées par les LXR

Ces dernières années, la recherche des gènes cibles des LXR a permis de les associer à de nombreuses fonctions physiologiques. C'est incontestablement la disponibilité des souris dont les gènes codant chacune des deux isoformes ont été invalidés et le développement d'agonistes synthétiques non métabolisables qui ont fait augmenter de façon quasi-exponentielle le nombre de gènes cibles. Schématiquement trois fonctions physiologiques ont été associées aux LXR (Figure 2).

Le métabolisme énergétique

Les LXR sont hypocholestérolémiants par l'augmentation du catabolisme hépatique : régulation transcriptionnelle de certaines protéines ABC (*ATP-binding cassettes*) impliquées dans le retour hépatique du cholestérol, d'apolipoprotéines et augmentation des enzymes contrôlant la synthèse

et SMRT (*silencing mediator for RAR and TR*) qui contactent à la fois directement et indirectement des histones déacétylases *via* des protéines de type Sin3. La chromatine est ainsi maintenue dans un état de condensation non permissif pour la transcription. La présence constitutive sur l'ADN des complexes RXR/LXR-co-répresseur-HDAC agit donc comme un répresseur basal de l'expression génique comme le montre la levée de la répression basale de certains gènes cibles dans les souris *lxr α ; β -/-* (pour une revue [1]).

En présence de ligand

Malgré une grande variabilité dans la séquence primaire des récepteurs nucléaires, les analyses cristallographiques montrent que tous les domaines de liaison du ligand ont une structure tridimensionnelle identique, composée de 11 à 13 hélices alpha arrangées en trois couches organisant une poche hydrophobe dans laquelle le ligand de nature lipophile peut venir se fixer. La liaison de l'hormone (étape 2) entraîne

une modification tridimensionnelle de la poche hydrophobe et le départ des co-répresseurs. Ce réarrangement permet la libération de l'hélice 12, agissant ainsi comme un « couvercle » qui scelle la poche en renforçant les interactions entre le ligand et la poche hydrophobe et la fixation de co-activateurs (étape 3). Cette cascade d'événements provoque un environnement chromatinien permissif pour la transcription par le recrutement de protéines à activités histone acétyl-transférases comme SRC-1, la mobilisation de facteurs affectant la méthylation des histones comme Rap250 et/ou la fixation des protéines de la machinerie transcriptionnelle de base, la transcription des gènes cibles et la réponse physiologique cellulaire. De façon intéressante, la fixation concomitante de la sirtuine 1 (étape 4) provoque la déacétylation de LXR, son ubiquitinylation (étape 5), le routage vers le protéasome et sa dégradation (étape 6). Par la suite, deux nouvelles protéines RXR et LXR néosynthétisées



Organes (modèle)	Phénotypes observés	LXR impliqué	Fonctions attribuées	Réf.
Surréale (souris)	Adrenomégalie Accumulation esters de cholestérol Hypercorticotéronémie Syndrome « cushingoïde »	LXR α	Efflux du cholestérol Synthèse des corticostéroïdes	[5]
Testicule (souris)	Stérilité précoce par disparition des cellules germinales Accumulation esters de cholestérol	LXR α et/ou LXR β	Efflux du cholestérol Synthèse des acides gras Rôle anti-apoptotique Rôle prolifératif Synthèse de testostérone	[6, 12]
Ovaire (souris)	Diminution de la fertilité	LXR α LXR β	Contrôle de la reprise de la méiose.	[8]
Ovaire (humain : cellules lutéales)	-	LXR α LXR β	Efflux du cholestérol Inhibition de la synthèse de progestérone	[7]
Placenta (humain : chorio-carcinome JAR et cellules extravilleuses du trophoblaste)	-	LXR α LXR β	Régulation de l'Endogline Inhibition de la synthèse de la hCG Invasion trophoblastique	[11, 13, 14]
Utérus (souris)	Altération des contractions Accumulation esters de cholestérol	LXR β	Efflux du cholestérol Intégrité du muscle lisse	[9]
Épididyme (souris)	Accumulation esters de cholestérol Altération de la composition en acide gras Fragilité de la pièce intermédiaire du spermatozoïde	LXR β	Efflux du cholestérol Synthèse des acides gras Maturation épидидymaire du spermatozoïde	[15]

Tableau 1. Fonctions physiologiques des différentes isoformes des LXR dans les organes stéroïdogènes ou cibles des stéroïdes.

des acides biliaires comme *cyp7a1* [2]. Ce rôle est le plus étudié, et tous les efforts des compagnies pharmaceutiques visent à activer cette fonction, et ce d'autant plus que l'activation des LXR est associée à une diminution du glucose circulant *via* l'induction de Glut4. À ce jour, ce qui bloque l'utilisation d'agonistes synthétiques des LXR *in vivo*, c'est le caractère hypertriglycéridémiant des LXR ; en effet les gènes *acc*, *fas* et *scd-1*, codant des enzymes du métabolisme des triglycérides, sont des cibles transcriptionnelles de RXR-LXR, de même que la protéine SREBP1c, véritable chef d'orchestre de la synthèse des acides gras [3]. Le véritable défi des compagnies pharmaceutiques sera d'identifier des molécules dissociant les effets hypocholestérolémiant et hypertriglycéridémiant.

L'immunité

Les LXR jouent un rôle important dans la physiologie du macrophage. L'activation des LXR par un agoniste synthétique diminue la production de nitrites induite par une infection bactérienne ou des lipopolysaccharides [4], l'expression des gènes codant les facteurs pro-inflammatoires COX-2 (*cyclooxygenase-2*), iNOS (*nitric oxide synthase*), IL (interleukine)-1 β et IL-6. De plus, les agonistes des LXR réduisent la réponse inflammatoire associée à une dermatite de contact induite chez la souris, confirmant le rôle anti-inflammatoire des LXR *in vivo*. De nombreuses études réalisées sur des modèles murins de la maladie d'Alzheimer ont montré que l'activation pharmacologique des LXR s'accompagnait d'une disparition des signes cellulaires de cette pathologie, comme la

diminution des plaques amyloïdes ou de la neuroinflammation.

L'homéostasie des tissus stéroïdogènes et des organes cibles des stéroïdes

L'analyse phénotypique des tissus stéroïdogènes des souris *lxr^{-/-}* a identifié différentes anomalies révélant le rôle physiologique des LXR dans ces organes et permettant l'identification de nombreuses cibles transcriptionnelles. Chez l'homme, ce sont les analyses conjointes de recherche de gènes par bioinformatique et l'utilisation d'agonistes synthétiques qui ont identifié les fonctions physiologiques potentielles des LXR. Un résumé de ces fonctions est présenté sur le *Tableau 1*.

Schématiquement, les LXR régulent l'homéostasie lipidique et la synthèse hormonale des stéroïdes dans la plupart

des organes analysés, que ce soit en augmentant la synthèse des corticostéroïdes dans la surrénale ou des androgènes dans le testicule, et ce en activant directement les gènes clés de ces synthèses comme StAR [5, 6] ou en diminuant celle de la progestérone en favorisant l'efflux de cholestérol [7]. Par delà ce « simple » contrôle de la biosynthèse et du catabolisme des lipides, les LXR ont aussi une activité anti-apoptotique et prolifératrice permettant la gestion efficace du pool de cellules germinales du testicule.

Une des observations importantes de ces travaux est que les souris *lxr*^{-/-} deviennent ainsi de bons modèles pour appréhender des situations complexes comme le syndrome de Cushing [5], la stérilité chez l'homme [6] et la femme [8], l'effet de l'obésité et du surpoids dans la parturition [9] et la pré-éclampsie [10, 11].

Les LXR, des cibles thérapeutiques prometteuses ?

Il est incontestable que les LXR sont des cibles pharmacologiques de choix dans le traitement des hypercholestérolémies dès que cet effet sera dissocié de leur effet hépatique sur la synthèse des triglycérides, en utilisant des molécules qui ne ciblent pas le foie et/ou qui

n'activent pas les gènes de cette synthèse. Cependant, on ne pourra passer sous silence les effets stéroïdogènes majeurs des LXR, en particulier sur la testostérone. En effet à l'âge où seront traités les patients, on ne peut exclure le rôle délétère d'une augmentation des stéroïdes sur le déclenchement éventuel d'un cancer hormono-dépendant (sein ou prostate). ♦

Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction

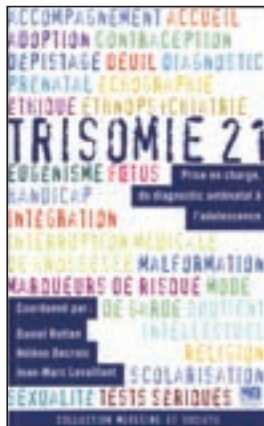
REMERCIEMENTS

Une partie des projets de recherche est financée par le Centre National de la Recherche Scientifique, l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, l'Université Blaise Pascal, l'Université d'Auvergne, la Fondation pour la Recherche Médicale INE2000-407031/1 et la Fondation BNP-Paribas. K.M. a été allocataire du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

RÉFÉRENCES

1. Volle DH, Lobaccaro JM. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the « foie gras », the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 2007 ; 265-266 : 183-9.
2. Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998 ; 93 : 693-704.
3. Repa JJ, Liang G, Ou J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2004 ; 14 : 2819-30.

4. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003 ; 9 : 213-9.
5. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, et al. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1902-12.
6. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007 ; 21 : 1014-27.
7. Drouineaud V, Sagot P, Garrido C, et al. Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol Hum Reprod* 2007 ; 13 : 373-9.
8. Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, Andersen CY. Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the *Lxr* genes. *Mol Cell Endocrinol* 2006 ; 256 : 9-16.
9. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, et al. Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 4693-701.
10. Marceau G, Volle DH, Gallot D, et al. Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005 ; 283 : 175-81.
11. Henry-Berger J, Mouzat K, Baron S, et al. Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor alpha (NR1H3) in human trophoblast cell line JAR. *Biol Reprod* 2008 ; 78 : 968-75.
12. Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, et al. The liver X receptor-(beta) is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* 2005 ; 146 : 2519-30.
13. Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, et al. Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology* 2004 145:4583-91.
14. Weedon-Fekjaer MS, Duttaray AK, Nebb HI. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta* 2005 ; 26 : 721-8.
15. Saez F, Chabory E, Cadet R, et al. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J Androl* 2007 ; 9 : 574-82.



ISBN : 2-84254-105-7 248 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Trisomie 21** : 15 € + 3 € de port = **18 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDK

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

Références bibliographiques

- Abate-Shen, C. and Shen, M.M. (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410-34.
- Abu, E.O., Horner, A., Kusec, V., Triffitt, J.T. and Compston, J.E. (1997) The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3493-7.
- Adighibe, O., Arepalli, S., Duckworth, J., Hardy, J. and Wavrant-De Vrieze, F. (2006) Genetic variability at the LXR gene (NR1H2) may contribute to the risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27, 1431-4.
- Albanes, D., Heinonen, O.P., Huttunen, J.K., Taylor, P.R., Virtamo, J., Edwards, B.K., Haapakoski, J., Rautalahti, M., Hartman, A.M., Palmgren, J. and et al. (1995) Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Clin Nutr* 62, 1427S-1430S.
- Albert, J., Geller, J., Geller, S. and Lopez, D. (1976) Prostate concentrations of endogenous androgens by radioimmunoassay. *J Steroid Biochem* 7, 301-7.
- Algarte-Genin, M., Cussenot, O. and Costa, P. (2004) Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur Urol* 46, 285-94; discussion 294-5.
- Alonso, M.A. and Millan, J. (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J Cell Sci* 114, 3957-65.
- Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P. and Russell, D.W. (1991) Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354, 159-61.
- Andriole, G.L., Crawford, E.D., Grubb, R.L., 3rd, Buys, S.S., Chia, D., Church, T.R., Fouad, M.N., Gelmann, E.P., Kvale, P.A., Reding, D.J., Weissfeld, J.L., Yokochi, L.A., O'Brien, B., Clapp, J.D., Rathmell, J.M., Riley, T.L., Hayes, R.B., Kramer, B.S., Izmirlian, G., Miller, A.B., Pinsky, P.F., Prorok, P.C., Gohagan, J.K. and Berg, C.D. (2009) Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med* 360, 1310-9.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-304.
- Ariyaratne, H.B., Mills, N., Mason, J.I. and Mendis-Handagama, S.M. (2000) Effects of thyroid hormone on Leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biol Reprod* 63, 1115-23.
- ASA (2006) Testosterone replacement therapy for male aging: ASA position statement. *J Androl* 27, 133-4.
- Association, A.U. (2010) Guideline on the management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH).
- Barbier, O., Trottier, J., Kaeding, J., Caron, P. and Verreault, M. (2009) Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol Cell Biochem* 326, 3-8.
- Baron, S., Manin, M., Beaudoin, C., Leotoing, L., Communal, Y., Veyssiere, G. and Morel, L. (2004) Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 14579-86.
- Bayne, C.W., Donnelly, F., Ross, M. and Habib, F.K. (1999) *Serenoa repens* (Permixon): a 5alpha-reductase types I and II inhibitor-new evidence in a coculture model of BPH. *Prostate* 40, 232-41.
- Bayne, C.W., Ross, M., Donnelly, F. and Habib, F.K. (2000) The selectivity and specificity of the actions of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on the prostate. *J Urol* 164, 876-81.
- Benito, M., Gomberg, B., Wehrli, F.W., Weening, R.H., Zemel, B., Wright, A.C., Song, H.K., Cucchiara, A. and Snyder, P.J. (2003) Deterioration of trabecular architecture in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1497-502.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Giese, G., Wrehlke, C., Stamm, O., Sekeris, C.E., Mossmann, H. and Wunderlich, F. (1999) Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *Faseb J* 13, 123-33.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Stamm, O., Wrehlke, C., Guo, Z. and Wunderlich, F. (1999) Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell* 10, 3113-23.

- Berman, D.M., Desai, N., Wang, X., Karhadkar, S.S., Reynon, M., Abate-Shen, C., Beachy, P.A. and Shen, M.M. (2004) Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol* 267, 387-98.
- Berquin, I.M., Min, Y., Wu, R., Wu, H. and Chen, Y.Q. (2005) Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280, 36442-51.
- Berrodin, T.J., Shen, Q., Quinet, E.M., Yudt, M.R., Freedman, L.P. and Nagpal, S. (2010) Identification of 5 α , 6 α -epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol Pharmacol* 78, 1046-58.
- Bevan, C.L., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D.M. and Parker, M.G. (1999) The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* 19, 8383-92.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Callegari, C., Clevenger, B., Phillips, J., Bunnell, T.J., Tricker, R., Shirazi, A. and Casaburi, R. (1996) The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med* 335, 1-7.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Yarasheski, K.E., Clevenger, B., Phillips, J., Lee, W.P., Bunnell, T.J. and Casaburi, R. (1997) Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 407-13.
- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A.A., Scivolino, P.J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C.R., Gridley, T., Cardiff, R.D., Cunha, G.R., Abate-Shen, C. and Shen, M.M. (1999) Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev* 13, 966-77.
- Bieberich, C.J., Fujita, K., He, W.W. and Jay, G. (1996) Prostate-specific and androgen-dependent expression of a novel homeobox gene. *J Biol Chem* 271, 31779-82.
- Blok, L.J., de Ruiter, P.E. and Brinkmann, A.O. (1998) Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry* 37, 3850-7.
- Bornstein, S.R., Rutkowski, H. and Vrezas, I. (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215, 135-41.
- Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J. and Timms, B. (2004) Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101, 2371-490.
- Bostwick, D.G., Liu, L., Brawer, M.K. and Qian, J. (2004) High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 6, 171-9.
- Boudon, C., Rodier, G., Lechevallier, E., Mottet, N., Barenton, B. and Sultan, C. (1996) Secretion of insulin-like growth factors and their binding proteins by human normal and hyperplastic prostatic cells in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 612-7.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 375, 377-82.
- Bourguet, W., Germain, P. and Gronemeyer, H. (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 21, 381-8.
- Boyle, P., Robertson, C., Lowe, F. and Roehrborn, C. (2000) Meta-analysis of clinical trials of permixon in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Urology* 55, 533-9.
- Bravi, F., Scotti, L., Bosetti, C., Talamini, R., Negri, E., Montella, M., Franceschi, S. and La Vecchia, C. (2006) Self-reported history of hypercholesterolaemia and gallstones and the risk of prostate cancer. *Ann Oncol* 17, 1014-7.
- Brinkmann, A.O. (2001) Lessons to be learned from the androgen receptor. *Eur J Dermatol* 11, 301-3.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouellette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J., Genest, J., Jr. and Hayden, M.R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22, 336-45.
- Bruchovsky, N. and Wilson, J.D. (1968) The intranuclear binding of testosterone and 5 α -androstane-17 β -ol-3-one by rat prostate. *J Biol Chem* 243, 5953-60.

- Buckley, D.B. and Klaassen, C.D. (2007) Tissue- and gender-specific mRNA expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in mice. *Drug Metab Dispos* 35, 121-7.
- Burchardt, M., Burchardt, T., Chen, M.W., Hayek, O.R., Knight, C., Shabsigh, A., de La Taille, A. and Buttyan, R. (2000) Vascular endothelial growth factor-A expression in the rat ventral prostate gland and the early effects of castration. *Prostate* 43, 184-94.
- Buttyan, R., Ghafar, M.A. and Shabsigh, A. (2000) The effects of androgen deprivation on the prostate gland: cell death mediated by vascular regression. *Curr Opin Urol* 10, 415-20.
- Camps, J.L., Chang, S.M., Hsu, T.C., Freeman, M.R., Hong, S.J., Zhau, H.E., von Eschenbach, A.C. and Chung, L.W. (1990) Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 75-9.
- Cancilla, B., Jarred, R.A., Wang, H., Mellor, S.L., Cunha, G.R. and Risbridger, G.P. (2001) Regulation of prostate branching morphogenesis by activin A and follistatin. *Dev Biol* 237, 145-58.
- Cao, G., Liang, Y., Broderick, C.L., Oldham, B.A., Beyer, T.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Stayrook, K.R., Suen, C., Otto, K.A., Miller, A.R., Dai, J., Foxworthy, P., Gao, H., Ryan, T.P., Jiang, X.C., Burris, T.P., Eacho, P.I. and Etgen, G.J. (2003) Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 278, 1131-6.
- Carraro, J.C., Raynaud, J.P., Koch, G., Chisholm, G.D., Di Silverio, F., Teillac, P., Da Silva, F.C., Cauquil, J., Chopin, D.K., Hamdy, F.C., Hanus, M., Hauri, D., Kalinteris, A., Marencak, J., Perier, A. and Perrin, P. (1996) Comparison of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: a randomized international study of 1,098 patients. *Prostate* 29, 231-40; discussion 241-2.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Marathe, C., Mangelsdorf, D.J. and Tontonoz, P. (2003) Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 278, 10443-9.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S.A., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G. and Tontonoz, P. (2003) Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 12, 805-16.
- Castro, P., Xia, C., Gomez, L., Lamb, D.J. and Ittmann, M. (2004) Interleukin-8 expression is increased in senescent prostatic epithelial cells and promotes the development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 60, 153-9.
- Cha, J.Y. and Repa, J.J. (2007) The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282, 743-51.
- Chamberlain, L.H., Burgoyne, R.D. and Gould, G.W. (2001) SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5619-24.
- Chang, C.S., Kokontis, J. and Liao, S.T. (1988) Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7211-5.
- Chang, W.Y., Birch, L., Woodham, C., Gold, L.I. and Prins, G.S. (1999) Neonatal estrogen exposure alters the transforming growth factor-beta signaling system in the developing rat prostate and blocks the transient p21(cip1/waf1) expression associated with epithelial differentiation. *Endocrinology* 140, 2801-13.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M. and Mangelsdorf, D.J. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-70.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-7.
- Chiang, J.Y., Kimmel, R. and Stroup, D. (2001) Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene* 262, 257-65.
- Chouinard, S., Pelletier, G., Belanger, A. and Barbier, O. (2004) Cellular specific expression of the androgen-conjugating enzymes UGT2B15 and UGT2B17 in the human prostate epithelium. *Endocr Res* 30, 717-25.
- Chung, L.W., Matsuura, J. and Runner, M.N. (1984) Tissue interactions and prostatic growth. I. Induction of adult mouse prostatic hyperplasia by fetal urogenital sinus implants. *Biol Reprod* 31, 155-63.

- Chung, L.W., Chang, S.M., Bell, C., Zhau, H.E., Ro, J.Y. and von Eschenbach, A.C. (1989) Co-inoculation of tumorigenic rat prostate mesenchymal cells with non-tumorigenic epithelial cells results in the development of carcinosarcoma in syngeneic and athymic animals. *Int J Cancer* 43, 1179-87.
- Chung, L.W. (1995) The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer Surv* 23, 33-42.
- Chuu, C.P. (2011) Modulation of liver X receptor signaling as a prevention and therapy for colon cancer. *Med Hypotheses* 76, 697-9.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, A., Peeters, B., Verhoeven, G. and Rombauts, W. (2001) Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76, 23-30.
- Clark, B.J. and Stocco, D.M. (1995) Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocr Res* 21, 243-57.
- Clark, L.C., Dalkin, B., Krongrad, A., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Witherington, R., Herlong, J.H., Janosko, E., Carpenter, D., Borosso, C., Falk, S. and Rounder, J. (1998) Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 81, 730-4.
- Colvard, D.S., Eriksen, E.F., Keeting, P.E., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., French, F.S., Riggs, B.L. and Spelsberg, T.C. (1989) Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 854-7.
- Costarella, C.E., Stallone, J.N., Rutecki, G.W. and Whittier, F.C. (1996) Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 34-9.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N. and Tall, A.R. (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240-5.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M.V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G. and Klocker, H. (1994) Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54, 5474-8.
- Cummins, C.L., Volle, D.H., Zhang, Y., McDonald, J.G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D.J. and Lobaccaro, J.M. (2006) Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116, 1902-12.
- Cunha, G.R. (1973) The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* 175, 87-96.
- Cunha, G.R., Lung, B. and Reese, B. (1980) Glandular epithelial induction by embryonic mesenchyme in adult bladder epithelium of BALB/c mice. *Invest Urol* 17, 302-4.
- Cunha, G.R., Reese, B.A. and Sekkingstad, M. (1980) Induction of nuclear androgen-binding sites in epithelium of the embryonic urinary bladder by mesenchyme of the urogenital sinus of embryonic mice. *Endocrinology* 107, 1767-70.
- Cunha, G.R. and Chung, L.W. (1981) Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem* 14, 1317-24.
- Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Cooke, P.S., Mee, S., Bigsby, R.M., Higgins, S.J. and Sugimura, Y. (1987) The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* 8, 338-62.
- Cunha, G.R., Battle, E., Young, P., Brody, J., Donjacour, A., Hayashi, N. and Kinbara, H. (1992) Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol* 1, 76-83.
- Cunha, G.R., Hayward, S.W., Wang, Y.Z. and Ricke, W.A. (2003) Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 107, 1-10.
- Cunha, G.R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P.C., Risbridger, G., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., Donjacour, A.A. and Kurita, T. (2004) Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92, 221-36.
- Dave, V.P., Kaul, D., Sharma, Y. and Bhattacharya, R. (2009) Functional genomics of blood cellular LXR-alpha gene in human coronary heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 46, 536-44.

- Demarest, S.J., Martinez-Yamout, M., Chung, J., Chen, H., Xu, W., Dyson, H.J., Evans, R.M. and Wright, P.E. (2002) Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* 415, 549-553.
- Demerjian, M., Choi, E.H., Man, M.Q., Chang, S., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2009) Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis. *Exp Dermatol* 18, 643-9.
- Denechaud, P.D., Bossard, P., Lobaccaro, J.M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J. and Postic, C. (2008) ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118, 956-64.
- DiBlasio-Smith, E.A., Arai, M., Quinet, E.M., Evans, M.J., Kornaga, T., Basso, M.D., Chen, L., Feingold, I., Halpern, A.R., Liu, Q.Y., Nambi, P., Savio, D., Wang, S., Mounts, W.M., Isler, J.A., Slager, A.M., Burczynski, M.E., Dorner, A.J. and LaVallie, E.R. (2008) Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J Transl Med* 6, 59.
- Doles, J., Cook, C., Shi, X., Valosky, J., Lipinski, R. and Bushman, W. (2006) Functional compensation in Hedgehog signaling during mouse prostate development. *Dev Biol* 295, 13-25.
- Donjacour, A.A. and Cunha, G.R. (1993) Assessment of prostatic protein secretion in tissue recombinants made of urogenital sinus mesenchyme and urothelium from normal or androgen-insensitive mice. *Endocrinology* 132, 2342-50.
- Donjacour, A.A., Thomson, A.A. and Cunha, G.R. (2003) FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol* 261, 39-54.
- Donkin, J.J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., Chan, J., Fan, J., Collins, J. and Wellington, C.L. (2010) ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *J Biol Chem* 285, 34144-54.
- Dufau, M.L. (1998) The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol* 60, 461-96.
- Duval, D., Durant, S. and Homo-Delarche, F. (1983) Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 737, 409-42.
- Economides, K.D. and Capecchi, M.R. (2003) Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development* 130, 2061-9.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B. and Korach, K.S. (1996) Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796-805.
- Efanov, A.M., Sewing, S., Bokvist, K. and Gromada, J. (2004) Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 53 Suppl 3, S75-8.
- El-Hajjaji, F.Z., Oumeddour, A., Pommier, A.J., Ouvrier, A., Viennois, E., Dufour, J., Caira, F., Drevet, J.R., Volle, D.H., Baron, S., Saez, F. and Lobaccaro, J.M. (2011) Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta* 1812, 974-81.
- Engel, T., Lorkowski, S., Lueken, A., Rust, S., Schluter, B., Berger, G., Cullen, P. and Assmann, G. (2001) The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 483-8.
- English, H.F., Santen, R.J. and Isaacs, J.T. (1987) Response of glandular versus basal rat ventral prostatic epithelial cells to androgen withdrawal and replacement. *Prostate* 11, 229-42.
- English, H.F., Kyprianou, N. and Isaacs, J.T. (1989) Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* 15, 233-50.
- Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R. and Laudet, V. (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6803-8.
- Fabiani, R., Johansson, L., Lundkvist, O. and Ronquist, G. (1994) Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostasome inclusion in swim-up medium. *Hum Reprod* 9, 1485-9.

- Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52, 513-56.
- Fang, Y., Fliss, A.E., Robins, D.M. and Caplan, A.J. (1996) Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo. *J Biol Chem* 271, 28697-702.
- Fenwick, E.H. (1895) The Effects of Unilateral Castration upon the Prostate. *Br Med J* 1, 529.
- Finkelstein, J.S., Klibanski, A., Neer, R.M., Doppelt, S.H., Rosenthal, D.I., Segre, G.V. and Crowley, W.F., Jr. (1989) Increases in bone density during treatment of men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 69, 776-83.
- Finney, H.C. and Erpino, M.J. (1976) Synergistic effect of estradiol benzoate and dihydrotestosterone on aggression in mice. *Horm Behav* 7, 391-400.
- Fitz, N.F., Cronican, A., Pham, T., Fogg, A., Fauq, A.H., Chapman, R., Lefterov, I. and Koldamova, R. (2010) Liver X receptor agonist treatment ameliorates amyloid pathology and memory deficits caused by high-fat diet in APP23 mice. *J Neurosci* 30, 6862-72.
- Fix, C., Jordan, C., Cano, P. and Walker, W.H. (2004) Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10919-24.
- Fontaine, C., Rigamonti, E., Pourcet, B., Duez, H., Duhem, C., Fruchart, J.C., Chinetti-Gbaguidi, G. and Staels, B. (2008) The nuclear receptor Rev-erb α is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol Endocrinol* 22, 1797-811.
- Fortunati, N. (1999) Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest* 22, 223-34.
- Franck-Lissbrant, I., Haggstrom, S., Damber, J.E. and Bergh, A. (1998) Testosterone stimulates angiogenesis and vascular regrowth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology* 139, 451-6.
- Freeman, D.A. and Ascoli, M. (1982) Studies on the source of cholesterol used for steroid biosynthesis in cultured Leydig tumor cells. *J Biol Chem* 257, 14231-8.
- Freeman, M.R. and Solomon, K.R. (2004) Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91, 54-69.
- Freestone, S.H., Marker, P., Grace, O.C., Tomlinson, D.C., Cunha, G.R., Harnden, P. and Thomson, A.A. (2003) Sonic hedgehog regulates prostatic growth and epithelial differentiation. *Dev Biol* 264, 352-62.
- Fryburg, D.A., Jahn, L.A., Hill, S.A., Oliveras, D.M. and Barrett, E.J. (1995) Insulin and insulin-like growth factor-I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. *J Clin Invest* 96, 1722-9.
- Frye, S.V., Bramson, H.N., Hermann, D.J., Lee, F.W., Sinhababu, A.K. and Tian, G. (1998) Discovery and development of GG745, a potent inhibitor of both isozymes of 5 α -reductase. *Pharm Biotechnol* 11, 393-422.
- Fujimoto, N., Akimoto, Y., Suzuki, T., Kitamura, S. and Ohta, S. (2006) Identification of prostatic-secreted proteins in mice by mass spectrometric analysis and evaluation of lobe-specific and androgen-dependent mRNA expression. *J Endocrinol* 190, 793-803.
- Fukuchi, J., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Hsu, S., Ko, A.L., Fitzgerald, M.L. and Liao, S. (2004) Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 7682-5.
- Fukuchi, J., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Chuu, C.P. and Liao, S. (2004) Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 7686-9.
- Gao, N., Zhang, J., Rao, M.A., Case, T.C., Mirosevich, J., Wang, Y., Jin, R., Gupta, A., Rennie, P.S. and Matusik, R.J. (2003) The role of hepatocyte nuclear factor-3 α (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. *Mol Endocrinol* 17, 1484-507.
- Gao, N., Ishii, K., Mirosevich, J., Kuwajima, S., Oppenheimer, S.R., Roberts, R.L., Jiang, M., Yu, X., Shappell, S.B., Caprioli, R.M., Stoffel, M., Hayward, S.W. and Matusik, R.J. (2005) Forkhead box A1 regulates prostate ductal morphogenesis and promotes epithelial cell maturation. *Development* 132, 3431-43.

- Gao, T. and McPhaul, M.J. (1998) Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* 12, 654-63.
- Gao, W. (2010) Androgen receptor as a therapeutic target. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 1277-84.
- Geller, J., Albert, J., Lopez, D., Geller, S. and Niwayama, G. (1976) Comparison of androgen metabolites in benign prostatic hypertrophy (BPH) and normal prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 43, 686-8.
- Gelmann, E.P. (2002) Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20, 3001-15.
- Georget, V., Terouanne, B., Nicolas, J.C. and Sultan, C. (2002) Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry* 41, 11824-31.
- Gerdes, M.J., Dang, T.D., Larsen, M. and Rowley, D.R. (1998) Transforming growth factor-beta1 induces nuclear to cytoplasmic distribution of androgen receptor and inhibits androgen response in prostate smooth muscle cells. *Endocrinology* 139, 3569-77.
- Gerin, I., Dolinsky, V.W., Shackman, J.G., Kennedy, R.T., Chiang, S.H., Burant, C.F., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.A. and MacDougald, O.A. (2005) LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 280, 23024-31.
- Geyeregger, R., Zeyda, M., Bauer, W., Kriehuber, E., Saemann, M.D., Zlabinger, G.J., Maurer, D. and Stulnig, T.M. (2007) Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* 109, 4288-95.
- Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20, 689-725.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Ascherio, A., Chute, C.C. and Willett, W.C. (1993) A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 1571-9.
- Gong, H., Guo, P., Zhai, Y., Zhou, J., Uppal, H., Jarzynka, M.J., Song, W.C., Cheng, S.Y. and Xie, W. (2007) Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol Endocrinol* 21, 1781-90.
- Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Diaz, M., Gallardo, G., de Galarreta, C.R., Salazar, J., Lopez, F., Edwards, P., Parks, J., Andujar, M., Tontonoz, P. and Castrillo, A. (2009) Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31, 245-58.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., Maloney, P.R., Willson, T.M. and Kliewer, S.A. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6, 517-26.
- Gormley, G.J., Stoner, E., Bruskewitz, R.C., Imperato-McGinley, J., Walsh, P.C., McConnell, J.D., Andriole, G.L., Geller, J., Bracken, B.R., Tenover, J.S. and et al. (1992) The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 327, 1185-91.
- Grefhorst, A., van Dijk, T.H., Hammer, A., van der Sluijs, F.H., Havinga, R., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Groot, P.H., Reijngoud, D.J. and Kuipers, F. (2005) Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E829-38.
- Griffiths, J. (1895) An Enlarged Prostate Gland Eighteen Days after Bilateral or Complete Castration. *Br Med J* 1, 579-81.
- Griggs, R.C., Kingston, W., Jozefowicz, R.F., Herr, B.E., Forbes, G. and Halliday, D. (1989) Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J Appl Physiol* 66, 498-503.
- Grino, P.B., Griffin, J.E. and Wilson, J.D. (1990) Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126, 1165-72.
- Grishina, I.B., Kim, S.Y., Ferrara, C., Makarenkova, H.P. and Walden, P.D. (2005) BMP7 inhibits branching morphogenesis in the prostate gland and interferes with Notch signaling. *Dev Biol* 288, 334-47.

- Guerin, S., Doyon, F. and Hill, C. (2009) [The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]. *Bull Cancer* 96, 51-7.
- Guerin, S. and Hill, C. (2010) [Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA]. *Bull Cancer* 97, 47-54.
- Gupta, A., Gupta, S., Pavuk, M. and Roehrborn, C.G. (2006) Anthropometric and metabolic factors and risk of benign prostatic hyperplasia: a prospective cohort study of Air Force veterans. *Urology* 68, 1198-205.
- Haggstrom, S., Wikstrom, P., Bergh, A. and Damber, J.E. (1998) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the rat ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration. *Prostate* 36, 71-9.
- Hales, D.B., Sha, L. and Payne, A.H. (1990) Glucocorticoid and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-mediated induction of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450_{scc}) in MA-10 tumor Leydig cells. Increases in mRNA are cycloheximide sensitive. *Endocrinology* 126, 2800-8.
- Handisurya, A., Steiner, G.E., Stix, U., Ecker, R.C., Pfaffeneder-Mantai, S., Langer, D., Kramer, G., Memaran-Dadgar, N. and Marberger, M. (2001) Differential expression of interleukin-15, a pro-inflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate. *Prostate* 49, 251-62.
- Hannema, S.E. and Hughes, I.A. (2007) Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 67, 142-51.
- Hayward, S.W., Baskin, L.S., Haughney, P.C., Cunha, A.R., Foster, B.A., Dahiya, R., Prins, G.S. and Cunha, G.R. (1996) Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anat (Basel)* 155, 81-93.
- Hayward, S.W., Baskin, L.S., Haughney, P.C., Foster, B.A., Cunha, A.R., Dahiya, R., Prins, G.S. and Cunha, G.R. (1996) Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)* 155, 94-103.
- Hayward, S.W., Cunha, G.R. and Dahiya, R. (1996) Normal development and carcinogenesis of the prostate. A unifying hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 784, 50-62.
- Heinlein, C.A. and Chang, C. (2002) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23, 175-200.
- Hiramatsu, M., Kashimata, M., Minami, N., Sato, A. and Murayama, M. (1988) Androgenic regulation of epidermal growth factor in the mouse ventral prostate. *Biochem Int* 17, 311-7.
- Hogan, B.L. (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-8.
- Hogan, B.L. (1999) Morphogenesis. *Cell* 96, 225-33.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-41.
- Honda, S., Harada, N., Ito, S., Takagi, Y. and Maeda, S. (1998) Disruption of sexual behavior in male aromatase-deficient mice lacking exons 1 and 2 of the *cyp19* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 445-9.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. and et al. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
- Houck, K.A., Borchert, K.M., Hepler, C.D., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Michael, L.F. and Burris, T.P. (2004) T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab* 83, 184-7.
- Hsing, A.W. (2001) Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev* 23, 42-58.
- Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C. and Lala, D.S. (2003) Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol* 17, 1019-26.
- Huang, L., Pu, Y., Hepps, D., Danielpour, D. and Prins, G.S. (2007) Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 148, 1235-45.

- Huang, T.H., Razmovski-Naumovski, V., Salam, N.K., Duke, R.K., Tran, V.H., Duke, C.C. and Roufogalis, B.D. (2005) A novel LXR-alpha activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. *Biochem Pharmacol* 70, 1298-308.
- Huggins, C., Masina, M.H., Eichelberger, L. and Wharton, J.D. (1939) Quantitative Studies of Prostatic Secretion : I. Characteristics of the Normal Secretion; the Influence of Thyroid, Suprarenal, and Testis Extirpation and Androgen Substitution on the Prostatic Output. *J Exp Med* 70, 543-56.
- Huggins, C. and Clark, P.J. (1940) Quantitative Studies of Prostatic Secretion : II. The Effect of Castration and of Estrogen Injection on the Normal and on the Hyperplastic Prostate Glands of Dogs. *J Exp Med* 72, 747-62.
- Husmann, D.A., McPhaul, M.J. and Wilson, J.D. (1991) Androgen receptor expression in the developing rat prostate is not altered by castration, flutamide, or suppression of the adrenal axis. *Endocrinology* 128, 1902-6.
- Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T. and Peterson, R.E. (1974) Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186, 1213-5.
- Imperato-McGinley, J., Peterson, R.E., Gautier, T. and Sturla, E. (1979) Androgens and the evolution of male-gender identity among male pseudohermaphrodites with 5alpha-reductase deficiency. *N Engl J Med* 300, 1233-7.
- Infante, J., Rodriguez-Rodriguez, E., Mateo, I., Llorca, J., Vazquez-Higuera, J.L., Berciano, J. and Combarros, O. (2010) Gene-gene interaction between heme oxygenase-1 and liver X receptor-beta and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging* 31, 710-4.
- Isaacs, J.T. (1984) Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. *Prostate* 5, 545-57.
- Iyer, A.K. and McCabe, E.R. (2004) Molecular mechanisms of DAX1 action. *Mol Genet Metab* 83, 60-73.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R. and Mangelsdorf, D.J. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-31.
- Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J. and Mangelsdorf, D.J. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 266-71.
- Jayasuriya, H., Herath, K.B., Ondeyka, J.G., Guan, Z., Borris, R.P., Tiwari, S., de Jong, W., Chavez, F., Moss, J., Stevenson, D.W., Beck, H.T., Slattey, M., Zamora, N., Schulman, M., Ali, A., Sharma, N., MacNaul, K., Hayes, N., Menke, J.G. and Singh, S.B. (2005) Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J Nat Prod* 68, 1247-52.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S. and Drachman, D.A. (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356, 1627-31.
- Joniau, S., Goeman, L., Pennings, J. and Van Poppel, H. (2005) Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur Urol* 48, 379-85.
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F. and Tontonoz, P. (2002) Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277, 11019-25.
- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., Tran, J., Tippin, T.K., Wang, X., Lusic, A.J., Hsueh, W.A., Law, R.E., Collins, J.L., Willson, T.M. and Tontonoz, P. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7604-9.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J. and Tontonoz, P. (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213-9.
- Juntti, S.A., Coats, J.K. and Shah, N.M. (2008) A genetic approach to dissect sexually dimorphic behaviors. *Horm Behav* 53, 627-37.
- Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I. and Makishima, M. (2003) Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 278, 36091-8.

- Kang, Z., Janne, O.A. and Palvimo, J.J. (2004) Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18, 2633-48.
- Kase, E.T., Wensaas, A.J., Aas, V., Hojlund, K., Levin, K., Thoresen, G.H., Beck-Nielsen, H., Rustan, A.C. and Gaster, M. (2005) Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes* 54, 1108-15.
- Katz, A., Udata, C., Ott, E., Hickey, L., Burczynski, M.E., Burghart, P., Vesterqvist, O. and Meng, X. (2009) Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 49, 643-9.
- Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H. and Kato, S. (2003) Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9416-21.
- Keeney, D.S. and Mason, J.I. (1992) Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5----4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. *Endocrinology* 130, 2007-15.
- Kelly, R.W. (1999) Immunomodulators in human seminal plasma: a vital protection for spermatozoa in the presence of infection? *Int J Androl* 22, 2-12.
- Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N. and Edwards, P.A. (2001) Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 276, 39438-47.
- Kim, H.J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M. and Gustafsson, J.A. (2009) Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 558-63.
- Knaus, P., Marqueze-Pouey, B., Scherer, H. and Betz, H. (1990) Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron* 5, 453-62.
- Koldamova, R. and Lefterov, I. (2007) Role of LXR and ABCA1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease - implications for a new therapeutic approach. *Curr Alzheimer Res* 4, 171-8.
- Koldamova, R.P., Lefterov, I.M., Staufenbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J.C., Walter, M., Roth, M.G. and Lazo, J.S. (2005) The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 280, 4079-88.
- Kopachik, W., Hayward, S.W. and Cunha, G.R. (1998) Expression of hepatocyte nuclear factor-3alpha in rat prostate, seminal vesicle, and bladder. *Dev Dyn* 211, 131-40.
- Kotani, H., Tanabe, H., Mizukami, H., Makishima, M. and Inoue, M. (2010) Identification of a naturally occurring retinoid, honokiol, that activates the retinoid X receptor. *J Nat Prod* 73, 1332-6.
- Kousteni, S., Chen, J.R., Bellido, T., Han, L., Ali, A.A., O'Brien, C.A., Plotkin, L., Fu, Q., Mancino, A.T., Wen, Y., Vertino, A.M., Powers, C.C., Stewart, S.A., Ebert, R., Parfitt, A.M., Weinstein, R.S., Jilka, R.L. and Manolagas, S.C. (2002) Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science* 298, 843-6.
- Krajewska, M., Krajewski, S., Epstein, J.I., Shabaik, A., Sauvageot, J., Song, K., Kitada, S. and Reed, J.C. (1996) Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 148, 1567-76.
- Kramer, G., Mitteregger, D. and Marberger, M. (2007) Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol* 51, 1202-16.
- Krieg, M., Bartsch, W., Janssen, W. and Voigt, K.D. (1979) A comparative study of binding, metabolism and endogenous levels of androgens in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J Steroid Biochem* 11, 615-24.
- Kristal, A.R., Arnold, K.B., Schenk, J.M., Neuhaus, M.L., Goodman, P., Penson, D.F. and Thompson, I.M. (2008) Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 167, 925-34.
- Kristal, A.R., Schenk, J.M., Song, Y., Arnold, K.B., Neuhaus, M.L., Goodman, P.J., Lin, D.W., Stanczyk, F.Z. and Thompson, I.M. (2008) Serum steroid and sex hormone-binding globulin

- concentrations and the risk of incident benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 168, 1416-24.
- Krumlauf, R. (1994) Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
- Krycer, J.R. and Brown, A.J. (2011) Cross-talk between the Androgen Receptor and the Liver X Receptor: IMPLICATIONS FOR CHOLESTEROL HOMEOSTASIS. *J Biol Chem* 286, 20637-47.
- Kuil, C.W. and Mulder, E. (1996) Deoxyribonucleic acid-binding ability of androgen receptors in whole cells: implications for the actions of androgens and antiandrogens. *Endocrinology* 137, 1870-7.
- Kuslak, S.L. and Marker, P.C. (2007) Fibroblast growth factor receptor signaling through MEK-ERK is required for prostate bud induction. *Differentiation* 75, 638-51.
- Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J. and Tontonoz, P. (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 507-12.
- Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S.B., Castrillo, A., Wilpitz, D.C., Mangelsdorf, D.J., Collins, J.L., Saez, E. and Tontonoz, P. (2003) Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5419-24.
- Lamm, M.L., Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Lee, J., Clemens, J.Q., Hebner, C.M. and Bushman, W. (2001) Mesenchymal factor bone morphogenetic protein 4 restricts ductal budding and branching morphogenesis in the developing prostate. *Dev Biol* 232, 301-14.
- Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C. and Jahn, R. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* 20, 2202-13.
- Lasnitzki, I. and Mizuno, T. (1980) Prostatic induction: interaction of epithelium and mesenchyme from normal wild-type mice and androgen-insensitive mice with testicular feminization. *J Endocrinol* 85, 423-8.
- Lasserre, R., Guo, X.J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A.M., Soudja, S.M., Lenne, P.F., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunes, J.A., Payrastre, B., Marguet, D. and He, H.T. (2008) Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat Chem Biol* 4, 538-47.
- Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-26.
- Lazar, M.A. (2003) Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 1, e001.
- Lee, J.H., Gong, H., Khadem, S., Lu, Y., Gao, X., Li, S., Zhang, J. and Xie, W. (2008) Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149, 3778-88.
- Lee, J.H., Park, S.M., Kim, O.S., Lee, C.S., Woo, J.H., Park, S.J., Joe, E.H. and Jou, I. (2009) Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol Cell* 35, 806-17.
- Lee, S., Lee, J., Lee, S.K. and Lee, J.W. (2008) Activating signal cointegrator-2 is an essential adaptor to recruit histone H3 lysine 4 methyltransferases MLL3 and MLL4 to the liver X receptors. *Mol Endocrinol* 22, 1312-9.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A. and Willson, T.M. (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272, 3137-40.
- Leoni, V. and Caccia, C. (2011) Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids*.
- Lepor, H. (1991) The emerging role of alpha antagonists in the therapy of benign prostatic hyperplasia. *J Androl* 12, 389-94.
- Leube, R.E., Leimer, U., Grund, C., Franke, W.W., Harth, N. and Wiedenmann, B. (1994) Sorting of synaptophysin into special vesicles in nonneuroendocrine epithelial cells. *J Cell Biol* 127, 1589-601.

- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M. and Guarente, L. (2007) SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 28, 91-106.
- Li, X., Yeh, V. and Molteni, V. (2010) Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007 - 2009). *Expert Opin Ther Pat* 20, 535-62.
- Liao, C.H., Li, H.Y., Chung, S.D., Chiang, H.S. and Yu, H.J. (2011) Significant association between serum dihydrotestosterone level and prostate volume among Taiwanese men aged 40-79 years. *Aging Male*.
- Lin, R.C. and Scheller, R.H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 19-49.
- Lin, Y., Liu, G., Zhang, Y., Hu, Y.P., Yu, K., Lin, C., McKeegan, K., Xuan, J.W., Ornitz, D.M., Shen, M.M., Greenberg, N., McKeegan, W.L. and Wang, F. (2007) Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase is required for prostatic morphogenesis and the acquisition of strict androgen dependency for adult tissue homeostasis. *Development* 134, 723-34.
- Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., Parsons, J.K., Bearden, J.D., 3rd, Crawford, E.D., Goodman, G.E., Claudio, J., Winquist, E., Cook, E.D., Karp, D.D., Walther, P., Lieber, M.M., Kristal, A.R., Darke, A.K., Arnold, K.B., Ganz, P.A., Santella, R.M., Albanes, D., Taylor, P.R., Probstfield, J.L., Jagpal, T.J., Crowley, J.J., Meyskens, F.L., Jr., Baker, L.H. and Coltman, C.A., Jr. (2009) Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 301, 39-51.
- Lipschutz, J.H., Foster, B.A. and Cunha, G.R. (1997) Differentiation of rat neonatal ventral prostates grown in a serum-free organ culture system. *Prostate* 32, 35-42.
- Lo Sasso, G., Murzilli, S., Salvatore, L., D'Errico, I., Petruzzelli, M., Conca, P., Jiang, Z.Y., Calabresi, L., Parini, P. and Moschetta, A. (2010) Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* 12, 187-93.
- Loffler, M., Bilban, M., Reimers, M., Waldhausl, W. and Stulnig, T.M. (2006) Blood glucose-lowering nuclear receptor agonists only partially normalize hepatic gene expression in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 797-804.
- Losel, R. and Wehling, M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.
- Lu, W., Luo, Y., Kan, M. and McKeegan, W.L. (1999) Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem* 274, 12827-34.
- Lubahn, D.B., Joseph, D.R., Sar, M., Tan, J., Higgs, H.N., Larson, R.E., French, F.S. and Wilson, E.M. (1988) The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 2, 1265-75.
- Madersbacher, S., Haidinger, G., Temml, C. and Schmidbauer, C.P. (1998) Prevalence of lower urinary tract symptoms in Austria as assessed by an open survey of 2,096 men. *Eur Urol* 34, 136-41.
- Magura, L., Blanchard, R., Hope, B., Beal, J.R., Schwartz, G.G. and Sahmoun, A.E. (2008) Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* 19, 1259-66.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J. and Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362-5.
- Makoukji, J., Shackelford, G., Meffre, D., Grenier, J., Liere, P., Lobaccaro, J.M., Schumacher, M. and Massaad, C. (2011) Interplay between LXR and Wnt/beta-catenin signaling in the negative regulation of peripheral myelin genes by oxysterols. *J Neurosci* 31, 9620-9.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S. and Jilka, R.L. (2002) Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57, 385-409.
- Maradonna, F., Batti, S., Marino, M., Mita, D.G. and Carnevali, O. (2009) Tamoxifen as an emerging endocrine disruptor. effects on fish reproduction and detoxification target genes. *Ann N Y Acad Sci* 1163, 457-9.

- Maramag, C., Menon, M., Balaji, K.C., Reddy, P.G. and Laxmanan, S. (1997) Effect of vitamin C on prostate cancer cells in vitro: effect on cell number, viability, and DNA synthesis. *Prostate* 32, 188-95.
- Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., Eastham, J., Weigel, N.L. and Lamb, D.J. (2000) Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60, 944-9.
- Marivoet, S., Van Dijck, P., Verhoeven, G. and Heyns, W. (1992) Interaction of the 90-kDa heat shock protein with native and in vitro translated androgen receptor and receptor fragments. *Mol Cell Endocrinol* 88, 165-74.
- Marshall, W.A. and Tanner, J.M. (1970) Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45, 13-23.
- Martin, M., Dotti, C.G. and Ledesma, M.D. (2010) Brain cholesterol in normal and pathological aging. *Biochim Biophys Acta* 1801, 934-44.
- Mauras, N., Haymond, M.W., Darmaun, D., Vieira, N.E., Abrams, S.A. and Yergey, A.L. (1994) Calcium and protein kinetics in prepubertal boys. Positive effects of testosterone. *J Clin Invest* 93, 1014-9.
- Mauras, N., Hayes, V., Welch, S., Rini, A., Helgeson, K., Dokler, M., Veldhuis, J.D. and Urban, R.J. (1998) Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1886-92.
- McElreavey, K. and Fellous, M. (1999) Sex determination and the Y chromosome. *Am J Med Genet* 89, 176-85.
- McFarland, K.C., Sprengel, R., Phillips, H.S., Kohler, M., Roseblit, N., Nikolics, K., Segaloff, D.L. and Seeburg, P.H. (1989) Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245, 494-9.
- McGarvey, T.W. and Stearns, M.E. (1995) Keratinocyte growth factor and receptor mRNA expression in benign and malignant human prostate. *Exp Mol Pathol* 63, 52-62.
- McNeal, J.E. (1978) Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol* 15, 340-5.
- Mills, J.S., Needham, M. and Parker, M.G. (1987) A secretory protease inhibitor requires androgens for its expression in male sex accessory tissues but is expressed constitutively in pancreas. *Embo J* 6, 3711-7.
- Mills, J.S., Needham, M. and Parker, M.G. (1987) Androgen regulated expression of a spermine binding protein gene in mouse ventral prostate. *Nucleic Acids Res* 15, 7709-24.
- Mirosevich, J., Gao, N. and Matusik, R.J. (2005) Expression of Foxa transcription factors in the developing and adult murine prostate. *Prostate* 62, 339-52.
- Misra, A. and Khurana, L. (2008) Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. *J Clin Endocrinol Metab* 93, S9-30.
- Mitra, A., Richardson, R.T. and O'Rand, M.G. (2010) Analysis of recombinant human semenogelin as an inhibitor of human sperm motility. *Biol Reprod* 82, 489-96.
- Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A. and Saez, E. (2007) T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 581, 1721-6.
- Monder, C., Hardy, M.P., Blanchard, R.J. and Blanchard, D.C. (1994) Comparative aspects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: development of a model for the mediation of Leydig cell function by corticosteroids. *Steroids* 59, 69-73.
- Mongiat-Artus, P., Peyromaure, M., Richaud, P., Droz, J.P., Rainfray, M., Jeandel, C., Rebillard, X., Moreau, J.L., Davin, J.L., Salomon, L. and Soulie, M. (2009) [Recommendations for the treatment of prostate cancer in the elderly man: A study by the oncology committee of the French association of urology]. *Prog Urol* 19, 810-7.
- Morishima, A., Grumbach, M.M., Simpson, E.R., Fisher, C. and Qin, K. (1995) Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3689-98.
- Morris, M.D., Chaikoff, I.L., Felts, J.M., Abraham, S. and Fansah, N.O. (1957) The origin of serum cholesterol in the rat; diet versus synthesis. *J Biol Chem* 224, 1039-45.

- Mouzat, K., Prod'homme, M., Volle, D.H., Sion, B., Dechelotte, P., Gauthier, K., Vanacker, J.M. and Lobaccaro, J.M. (2007) Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 282, 4693-701.
- Mouzat, K., Volat, F., Baron, S., Alves, G., Pommier, A.J., Volle, D.H., Marceau, G., DeHaze, A., Dechelotte, P., Duggavathi, R., Caira, F. and Lobaccaro, J.M. (2009) Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* 150, 3369-75.
- Murphy, W.M., Soloway, M.S. and Barrows, G.H. (1991) Pathologic changes associated with androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Cancer* 68, 821-8.
- Murtola, T.J., Visakorpi, T., Lahtela, J., Syvala, H. and Tammela, T. (2008) Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions. *Nat Clin Pract Urol* 5, 376-87.
- Nagy, L. and Freeman, D.A. (1990) Effect of cholesterol transport inhibitors on steroidogenesis and plasma membrane cholesterol transport in cultured MA-10 Leydig tumor cells. *Endocrinology* 126, 2267-76.
- Nickel, J.C., Downey, J., Young, I. and Boag, S. (1999) Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 84, 976-81.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. and Milburn, M.V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-43.
- Ogawa, D., Stone, J.F., Takata, Y., Blaschke, F., Chu, V.H., Towler, D.A., Law, R.E., Hsueh, W.A. and Bruemmer, D. (2005) Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ Res* 96, e59-67.
- Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S. and Pfaff, D.W. (2000) Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14737-41.
- Ogihara, T., Chuang, J.C., Vestermark, G.L., Garmey, J.C., Ketchum, R.J., Huang, X., Brayman, K.L., Thorner, M.O., Repa, J.J., Mirmira, R.G. and Evans-Molina, C. (2010) Liver X receptor agonists augment human islet function through activation of anaplerotic pathways and glycerolipid/free fatty acid cycling. *J Biol Chem* 285, 5392-404.
- Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6027-32.
- Oz, O.K., Hirasawa, G., Lawson, J., Nanu, L., Constantinescu, A., Antich, P.P., Mason, R.P., Tsyganov, E., Parkey, R.W., Zerwekh, J.E. and Simpson, E.R. (2001) Bone phenotype of the aromatase deficient mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79, 49-59.
- Parsons, J.K., Carter, H.B., Partin, A.W., Windham, B.G., Metter, E.J., Ferrucci, L., Landis, P. and Platz, E.A. (2006) Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2562-8.
- Parsons, J.K., Bergstrom, J. and Barrett-Connor, E. (2008) Lipids, lipoproteins and the risk of benign prostatic hyperplasia in community-dwelling men. *BJU Int* 101, 313-8.
- Parsons, J.K. and Kashefi, C. (2008) Physical activity, benign prostatic hyperplasia, and lower urinary tract symptoms. *Eur Urol* 53, 1228-35.
- Parsons, J.K., Sarma, A.V., McVary, K. and Wei, J.T. (2009) Obesity and benign prostatic hyperplasia: clinical connections, emerging etiological paradigms and future directions. *J Urol* 182, S27-31.
- Parsons, J.K., Palazzi-Churas, K., Bergstrom, J. and Barrett-Connor, E. (2010) Prospective study of serum dihydrotestosterone and subsequent risk of benign prostatic hyperplasia in community dwelling men: the Rancho Bernardo Study. *J Urol* 184, 1040-4.
- Partin, A.W., Page, W.F., Lee, B.R., Sanda, M.G., Miller, R.N. and Walsh, P.C. (1994) Concordance rates for benign prostatic disease among twins suggest hereditary influence. *Urology* 44, 646-50.

- Pearson, J.D., Lei, H.H., Beaty, T.H., Wiley, K.E., Isaacs, S.D., Isaacs, W.B., Stoner, E. and Walsh, P.C. (2003) Familial aggregation of bothersome benign prostatic hyperplasia symptoms. *Urology* 61, 781-5.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E. and Mangelsdorf, D.J. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693-704.
- Penna, G., Fibbi, B., Amuchastegui, S., Cossetti, C., Aquilano, F., Laverny, G., Gacci, M., Crescioli, C., Maggi, M. and Adorini, L. (2009) Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol* 182, 4056-64.
- Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H. and Cato, A.C. (1999) Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 18, 6322-9.
- Platz, E.A., Leitzmann, M.F., Visvanathan, K., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C. and Giovannucci, E. (2006) Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 98, 1819-25.
- Pluciennik, F., Verrecchia, F., Bastide, B., Herve, J.C., Joffre, M. and Deleze, J. (1996) Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *J Membr Biol* 149, 169-77.
- Podlasek, C.A., Duboule, D. and Bushman, W. (1997) Male accessory sex organ morphogenesis is altered by loss of function of Hoxd-13. *Dev Dyn* 208, 454-65.
- Podlasek, C.A., Barnett, D.H., Clemens, J.Q., Bak, P.M. and Bushman, W. (1999) Prostate development requires Sonic hedgehog expressed by the urogenital sinus epithelium. *Dev Biol* 209, 28-39.
- Podlasek, C.A., Clemens, J.Q. and Bushman, W. (1999) Hoxa-13 gene mutation results in abnormal seminal vesicle and prostate development. *J Urol* 161, 1655-61.
- Pommier, A.J., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., Baron, S. and Lobaccaro, J.M. (2010) Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 2712-23.
- Pratt, W.B., Scherrer, L.C., Hutchison, K.A. and Dalman, F.C. (1992) A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41, 223-9.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18, 306-60.
- Price, D. (1963) Comparative Aspects of Development and Structure in the Prostate. *Natl Cancer Inst Monogr* 12, 1-27.
- Prins, G.S., Birch, L. and Greene, G.L. (1991) Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate. *Endocrinology* 129, 3187-99.
- Prins, G.S. and Birch, L. (1993) Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement. *Endocrinology* 132, 169-78.
- Prins, G.S. and Birch, L. (1995) The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology* 136, 1303-14.
- Prins, G.S. and Birch, L. (1997) Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 138, 1801-9.
- Prins, G.S., Marmer, M., Woodham, C., Chang, W., Kuiper, G., Gustafsson, J.A. and Birch, L. (1998) Estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. *Endocrinology* 139, 874-83.
- Prins, G.S., Chang, W.Y., Wang, Y. and van Breemen, R.B. (2002) Retinoic acid receptors and retinoids are up-regulated in the developing and adult rat prostate by neonatal estrogen exposure. *Endocrinology* 143, 3628-40.
- Prins, G.S., Birch, L., Tang, W.Y. and Ho, S.M. (2007) Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol* 23, 374-82.

- Prins, G.S. and Putz, O. (2008) Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* 76, 641-59.
- Pu, Y., Huang, L., Birch, L. and Prins, G.S. (2007) Androgen regulation of prostate morphoregulatory gene expression: Fgf10-dependent and -independent pathways. *Endocrinology* 148, 1697-706.
- Quinet, E.M., Basso, M.D., Halpern, A.R., Yates, D.W., Steffan, R.J., Clerin, V., Resmini, C., Keith, J.C., Berrodin, T.J., Feingold, I., Zhong, W., Hartman, H.B., Evans, M.J., Gardell, S.J., DiBlasio-Smith, E., Mounts, W.M., LaVallie, E.R., Wrobel, J., Nambi, P. and Vlasuk, G.P. (2009) LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. *J Lipid Res* 50, 2358-70.
- Rahman, F. and Christian, H.C. (2007) Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab* 18, 371-8.
- Reed, M.J., Purohit, A., Woo, L.W., Newman, S.P. and Potter, B.V. (2005) Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev* 26, 171-202.
- Reichardt, J.K., Makridakis, N., Henderson, B.E., Yu, M.C., Pike, M.C. and Ross, R.K. (1995) Genetic variability of the human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res* 55, 3973-5.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Mangelsdorf, D.J. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14, 2819-30.
- Repa, J.J. and Mangelsdorf, D.J. (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 459-81.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M. and Mangelsdorf, D.J. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524-9.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H. and Mangelsdorf, D.J. (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277, 18793-800.
- Reverter, M., Rentero, C., de Muga, S.V., Alvarez-Guaita, A., Mulay, V., Cairns, R., Wood, P., Monastyrskaya, K., Pol, A., Tebar, F., Blasi, J., Grewal, T. and Enrich, C. (2011) Cholesterol transport from late endosomes to the Golgi regulates t-SNARE trafficking, assembly and function. *Mol Biol Cell*.
- Roche, P.J., Hoare, S.A. and Parker, M.G. (1992) A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 6, 2229-35.
- Rochette-Egly, C. (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15, 355-66.
- Rosner, W. (1990) The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev* 11, 80-91.
- Rosner, W. (1991) Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 20, 697-720.
- Rough, J.J., Monroy, M.A., Yerrum, S. and Daly, J.M. (2010) Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res* 3, 13.
- Ruan, B., Wilson, W.K. and Schroepfer, G.J., Jr. (1998) An alternative synthesis of 4,4-dimethyl-5 alpha-cholesta-8,14,24-trien-3 beta-ol, an intermediate in sterol biosynthesis and a reported activator of meiosis and of nuclear orphan receptor LXR alpha. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 233-6.
- Russell, D.W. and Wilson, J.D. (1994) Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63, 25-61.
- Russell, P.J., Bennett, S. and Stricker, P. (1998) Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 44, 705-23.
- Russell, P.J. and Khatri, A. (2006) Novel gene-directed enzyme prodrug therapies against prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 15, 947-61.
- Russo, V. (2011) Metabolism, LXR/LXR ligands, and tumor immune escape. *J Leukoc Biol* 90, 673-9.

- Saez, F., Motta, C., Boucher, D. and Grizard, G. (2000) Prostatosomes inhibit the NADPH oxidase activity of human neutrophils. *Mol Hum Reprod* 6, 883-91.
- Saez, J.M. (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15, 574-626.
- Sakr, W.A., Haas, G.P., Cassin, B.F., Pontes, J.E. and Crissman, J.D. (1993) The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 150, 379-85.
- Sakr, W.A. and Grignon, D.J. (1998) Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. Relationship to pathologic parameters, volume and spatial distribution of carcinoma of the prostate. *Anal Quant Cytol Histol* 20, 417-23.
- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., D'Andrea, G., Occhiogrosso, G., Pichierri, A. and Caroli, E. (2005) Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *J Exp Clin Cancer Res* 24, 203-7.
- Salzer, U. and Prohaska, R. (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. *Blood* 97, 1141-3.
- Sanda, M.G., Doehring, C.B., Binkowitz, B., Beaty, T.H., Partin, A.W., Hale, E., Stoner, E. and Walsh, P.C. (1997) Clinical and biological characteristics of familial benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 157, 876-9.
- Sarma, A.V., Parsons, J.K., McVary, K. and Wei, J.T. (2009) Diabetes and benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms--what do we know? *J Urol* 182, S32-7.
- Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H. and Kato, S. (2003) Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 167-71.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P. and Kato, S. (2004) Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1673-8.
- Schaid, D.J. (2004) The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1, R103-21.
- Schauer, I.G. and Rowley, D.R. (2011) The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*.
- Schmitt, J.F., Hearn, M.T. and Risbridger, G.P. (1996) Expression of fibroblast growth factor-8 in adult rat tissues and human prostate carcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57, 173-8.
- Schoenmakers, E., Verrijdt, G., Peeters, B., Verhoeven, G., Rombauts, W. and Claessens, F. (2000) Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem* 275, 12290-7.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D. and Shan, B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831-8.
- Schuermans, A.L., Bolt, J. and Mulder, E. (1988) Androgens and transforming growth factor beta modulate the growth response to epidermal growth factor in human prostatic tumor cells (LNCaP). *Mol Cell Endocrinol* 60, 101-4.
- Shannon, J., Tewoderos, S., Garzotto, M., Beer, T.M., Derenick, R., Palma, A. and Farris, P.E. (2005) Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 162, 318-25.
- Shannon, J.M. and Cunha, G.R. (1983) Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* 4, 367-73.
- Shen, M.M. and Abate-Shen, C. (2003) Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn* 228, 767-78.
- Shenoy, S.D., Spencer, T.A., Mercer-Haines, N.A., Alipour, M., Gargano, M.D., Runge-Morris, M. and Kocarek, T.A. (2004) CYP3A induction by liver x receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 32, 66-71.
- Sherwood, E.R., Fong, C.J., Lee, C. and Kozlowski, J.M. (1992) Basic fibroblast growth factor: a potential mediator of stromal growth in the human prostate. *Endocrinology* 130, 2955-63.

- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A. and Greene, G.L. (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-37.
- Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A. and Schmidt, A. (1994) NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* 147, 273-6.
- Shou, J., Ross, S., Koeppen, H., de Sauvage, F.J. and Gao, W.Q. (2001) Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis. *Cancer Res* 61, 7291-7.
- Siiteri, P.K. and Wilson, J.D. (1970) Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J Clin Invest* 49, 1737-45.
- Siler, U., Herzog, A., Spitzer, V., Seifert, N., Denelavas, A., Hunziker, P.B., Barella, L., Hunziker, W., Lein, M., Goralczyk, R. and Wertz, K. (2005) Lycopene effects on rat normal prostate and prostate tumor tissue. *J Nutr* 135, 2050S-2S.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Davis, S. and Jones, M. (1999) Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 6, 131-7.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-4.
- Singh, R., Artaza, J.N., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F. and Bhasin, S. (2003) Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 144, 5081-8.
- Singh, R., Artaza, J.N., Taylor, W.E., Braga, M., Yuan, X., Gonzalez-Cadavid, N.F. and Bhasin, S. (2006) Testosterone inhibits adipogenic differentiation in 3T3-L1 cells: nuclear translocation of androgen receptor complex with beta-catenin and T-cell factor 4 may bypass canonical Wnt signaling to down-regulate adipogenic transcription factors. *Endocrinology* 147, 141-54.
- Singh, S.B., Ondeyka, J.G., Liu, W., Chen, S., Chen, T.S., Li, X., Bouffard, A., Dropinski, J., Jones, A.B., McCormick, S., Hayes, N., Wang, J., Sharma, N., Macnaul, K., Hernandez, M., Chao, Y.S., Baffic, J., Lam, M.H., Burton, C., Sparrow, C.P. and Menke, J.G. (2005) Discovery and development of dimeric podocarpic acid leads as potent agonists of liver X receptor with HDL cholesterol raising activity in mice and hamsters. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 2824-8.
- Sitaram, N. and Nagaraj, R. (1995) Seminal plasmin. *Bioessays* 17, 415-22.
- Sklar, C.A., Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M. (1980) Evidence for dissociation between adrenarche and gonadarche: studies in patients with idiopathic precocious puberty, gonadal dysgenesis, isolated gonadotropin deficiency, and constitutionally delayed growth and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 51, 548-56.
- Smith, E.P., Boyd, J., Frank, G.R., Takahashi, H., Cohen, R.M., Specker, B., Williams, T.C., Lubahn, D.B. and Korach, K.S. (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* 331, 1056-61.
- Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D., Gronberg, H., Xu, J., Isaacs, S.D., Brownstein, M.J., Bova, G.S., Guo, H., Bujnovszky, P., Nusskern, D.R., Damber, J.E., Bergh, A., Emanuelsson, M., Kallioniemi, O.P., Walker-Daniels, J., Bailey-Wilson, J.E., Beaty, T.H., Meyers, D.A., Walsh, P.C., Collins, F.S., Trent, J.M. and Isaacs, W.B. (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 274, 1371-4.
- Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A. and Liao, S. (1994) Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10809-13.
- Song, C., Hiipakka, R.A. and Liao, S. (2000) Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* 65, 423-7.
- Song, C. and Liao, S. (2000) Cholestenic acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology* 141, 4180-4.

- Song, C., Hiipakka, R.A. and Liao, S. (2001) Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* 66, 473-9.
- Song, C.S., Jung, M.H., Kim, S.C., Hassan, T., Roy, A.K. and Chatterjee, B. (1998) Tissue-specific and androgen-repressible regulation of the rat dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene promoter. *J Biol Chem* 273, 21856-66.
- Souidi, M., Dubrac, S., Parquet, M., Volle, D.H., Lobaccaro, J.M., Mathe, D., Combes, O., Scanff, P., Lutton, C. and Aigueperse, J. (2004) [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* 28, 279-93.
- Spector, D., Anthony, M., Alexander, D. and Arab, L. (2003) Soy consumption and colorectal cancer. *Nutr Cancer* 47, 1-12.
- Spyridon, M., Moraes, L.A., Jones, C.I., Sage, T., Sasikumar, P., Bucci, G. and Gibbins, J.M. (2011) LXR as a novel antithrombotic target. *Blood* 117, 5751-61.
- Stegmayr, B. and Ronquist, G. (1982) Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 10, 253-7.
- Steiner, G., Gessl, A., Kramer, G., Schollhammer, A., Forster, O. and Marberger, M. (1994) Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 151, 480-4.
- Steiner, G.E., Newman, M.E., Paikl, D., Stix, U., Memaran-Dagda, N., Lee, C. and Marberger, M.J. (2003) Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate* 56, 171-82.
- Steiner, G.E., Stix, U., Handisurya, A., Willheim, M., Haitel, A., Reithmayr, F., Paikl, D., Ecker, R.C., Hrachowitz, K., Kramer, G., Lee, C. and Marberger, M. (2003) Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Lab Invest* 83, 1131-46.
- Stephan, C., Jung, K., Lein, M. and Diamandis, E.P. (2007) PSA and other tissue kallikreins for prostate cancer detection. *Eur J Cancer* 43, 1918-26.
- Stephens, F.O. (1997) Phytoestrogens and prostate cancer: possible preventive role. *Med J Aust* 167, 138-40.
- Stocco, D.M. (1997) A StAR search: implications in controlling steroidogenesis. *Biol Reprod* 56, 328-36.
- Strott, C.A. (2002) Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* 23, 703-32.
- Sugimura, Y., Cunha, G.R. and Donjacour, A.A. (1986) Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 34, 961-71.
- Sugimura, Y., Foster, B.A., Hom, Y.K., Lipschutz, J.H., Rubin, J.S., Finch, P.W., Aaronson, S.A., Hayashi, N., Kawamura, J. and Cunha, G.R. (1996) Keratinocyte growth factor (KGF) can replace testosterone in the ductal branching morphogenesis of the rat ventral prostate. *Int J Dev Biol* 40, 941-51.
- Sun, M., Yang, L., Feldman, R.I., Sun, X.M., Bhalla, K.N., Jove, R., Nicosia, S.V. and Cheng, J.Q. (2003) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *J Biol Chem* 278, 42992-3000.
- Sun, Q., Yu, X., Degraff, D.J. and Matusik, R.J. (2009) Upstream stimulatory factor 2, a novel FoxA1-interacting protein, is involved in prostate-specific gene expression. *Mol Endocrinol* 23, 2038-47.
- Suzuki, S., Platz, E.A., Kawachi, I., Willett, W.C. and Giovannucci, E. (2002) Intakes of energy and macronutrients and the risk of benign prostatic hyperplasia. *Am J Clin Nutr* 75, 689-97.
- Svensson, S., Ostberg, T., Jacobsson, M., Norstrom, C., Stefansson, K., Hallen, D., Johansson, I.C., Zachrisson, K., Ogg, D. and Jendeborg, L. (2003) Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *Embo J* 22, 4625-33.
- Talvas, J., Caris-Veyrat, C., Guy, L., Rambeau, M., Lyan, B., Minet-Quinard, R., Lobaccaro, J.M., Vasson, M.P., George, S., Mazur, A. and Rock, E. (2010) Differential effects of lycopene consumed in tomato paste and lycopene in the form of a purified extract on target genes of cancer prostatic cells. *Am J Clin Nutr* 91, 1716-24.

- Tamehiro, N., Sato, Y., Suzuki, T., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Yokoyama, S., Kawanishi, T., Ohno, Y., Inoue, K., Nagao, T. and Nishimaki-Mogami, T. (2005) Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR)alpha agonist and an LXRbeta antagonist. *FEBS Lett* 579, 5299-304.
- Tantivejkul, K., Kalikin, L.M. and Pienta, K.J. (2004) Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem* 91, 706-17.
- Taplin, M.E., Bubley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N. and Balk, S.P. (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332, 1393-8.
- Tasca, A., Barulli, M., Cavazzana, A., Zattoni, F., Artibani, W. and Pagano, F. (1985) [Treatment of obstructive symptomatology caused by prostatic adenoma with an extract of *Serenoa repens*. Double-blind clinical study vs. placebo]. *Minerva Urol Nefrol* 37, 87-91.
- Teiten, M.H., Gaascht, F., Eifes, S., Dicato, M. and Diederich, M. (2010) Chemopreventive potential of curcumin in prostate cancer. *Genes Nutr* 5, 61-74.
- Theyer, G., Kramer, G., Assmann, I., Sherwood, E., Preinfalk, W., Marberger, M., Zechner, O. and Steiner, G.E. (1992) Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in benign prostatic hyperplasia. *Lab Invest* 66, 96-107.
- Toda, K., Saibara, T., Okada, T., Onishi, S. and Shizuta, Y. (2001) A loss of aggressive behaviour and its reinstatement by oestrogen in mice lacking the aromatase gene (*Cyp19*). *J Endocrinol* 168, 217-20.
- Toft, D., Shyamala, G. and Gorski, J. (1967) A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57, 1740-3.
- Tomlinson, D.C., Freestone, S.H., Grace, O.C. and Thomson, A.A. (2004) Differential effects of transforming growth factor-beta1 on cellular proliferation in the developing prostate. *Endocrinology* 145, 4292-300.
- Tostain, J., Rossi, D. and Martin, P.M. (2004) [Physiology of androgens in adult men]. *Prog Urol* 14, 639-60.
- Uebanso, T., Taketani, Y., Yamamoto, H., Amo, K., Tanaka, S., Arai, H., Takei, Y., Masuda, M., Yamanaka-Okumura, H. and Takeda, E. (2011) Liver X receptor negatively regulates fibroblast growth factor 21 in the fatty liver induced by cholesterol-enriched diet. *J Nutr Biochem*.
- Uno, S., Endo, K., Jeong, Y., Kawana, K., Miyachi, H., Hashimoto, Y. and Makishima, M. (2009) Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol* 77, 186-95.
- Urban, R.J., Bodenbun, Y.H., Gilkison, C., Foxworth, J., Coggan, A.R., Wolfe, R.R. and Ferrando, A. (1995) Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am J Physiol* 269, E820-6.
- Val, P., Lefrancois-Martinez, A.M., Veyssiere, G. and Martinez, A. (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1, 8.
- Van Der Eerden, B.C., Van De Ven, J., Lowik, C.W., Wit, J.M. and Karperien, M. (2002) Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat. *Endocrinology* 143, 4048-55.
- van Laar, J.H., Bolt-de Vries, J., Voorhorst-Ogink, M.M. and Brinkmann, A.O. (1989) The human androgen receptor is a 110 kDa protein. *Mol Cell Endocrinol* 63, 39-44.
- Vedin, L.L., Lewandowski, S.A., Parini, P., Gustafsson, J.A. and Steffensen, K.R. (2009) The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 575-9.
- Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J.M. and Baron, S. (2011) Selective liver X receptor modulators (SLiMs): What use in human health? *Mol Cell Endocrinol*.
- Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F.Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S. and Lobaccaro, J.M. (2011) Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15, 219-32.
- Villablanca, E.J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentinis, B., Bregni, M., Prinetti, A., Steffensen, K.R., Sonnino, S., Gustafsson, J.A., Doglioni, C., Bordignon, C., Traversari, C. and Russo, V. (2010) Tumor-mediated liver X receptor-alpha

- activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* 16, 98-105.
- Volle, D.H., Repa, J.J., Mazur, A., Cummins, C.L., Val, P., Henry-Berger, J., Cairra, F., Veysiere, G., Mangelsdorf, D.J. and Lobaccaro, J.M. (2004) Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 18, 888-98.
- Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.M., Verhoeven, G., Schoonjans, K. and Auwerx, J. (2007) The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21, 303-15.
- Volle, D.H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Dechelotte, P., Sion, B., Veysiere, G., Benahmed, M. and Lobaccaro, J.M. (2007) Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21, 1014-27.
- Volle, D.H., Decourteix, M., Garo, E., McNeilly, J., Fenichel, P., Auwerx, J., McNeilly, A.S., Schoonjans, K. and Benahmed, M. (2009) The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 119, 3752-64.
- Waller, A.S., Sharrard, R.M., Berthon, P. and Maitland, N.J. (2000) Androgen receptor localisation and turnover in human prostate epithelium treated with the antiandrogen, casodex. *J Mol Endocrinol* 24, 339-51.
- Wallis, C.J. and Luttge, W.G. (1975) Maintenance of male sexual behavior by combined treatment with oestrogen and dihydrotestosterone in CD-1 mice. *J Endocrinol* 66, 257-62.
- Walsh, P.C., Hutchins, G.M. and Ewing, L.L. (1983) Tissue content of dihydrotestosterone in human prostatic hyperplasia is not supranormal. *J Clin Invest* 72, 1772-7.
- Wang, L.G., Liu, X.M., Kreis, W. and Budman, D.R. (1999) Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 21-8.
- Wang, Q., Lu, J. and Yong, E.L. (2001) Ligand- and coactivator-mediated transactivation function (AF2) of the androgen receptor ligand-binding domain is inhibited by the cognate hinge region. *J Biol Chem* 276, 7493-9.
- Wang, X.D., Leow, C.C., Zha, J., Tang, Z., Modrusan, Z., Radtke, F., Aguet, M., de Sauvage, F.J. and Gao, W.Q. (2006) Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation. *Dev Biol* 290, 66-80.
- Wang, Y., Sudilovsky, D., Zhang, B., Haughney, P.C., Rosen, M.A., Wu, D.S., Cunha, T.J., Dahiya, R., Cunha, G.R. and Hayward, S.W. (2001) A human prostatic epithelial model of hormonal carcinogenesis. *Cancer Res* 61, 6064-72.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R. and Burris, T.P. (2008) Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J Biol Chem* 283, 26332-9.
- Watanabe, M., Nakayama, T., Shiraishi, T., Stemmermann, G.N. and Yatani, R. (2000) Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol Oncol* 5, 274-283.
- Westin, P., Stattin, P., Damber, J.E. and Bergh, A. (1995) Castration therapy rapidly induces apoptosis in a minority and decreases cell proliferation in a majority of human prostatic tumors. *Am J Pathol* 146, 1368-75.
- White, J.W. (1894) Castration for Hypertrophy of the Prostate. *Br Med J* 1, 1353-4.
- White, J.W. (1895) Effects of Unilateral Castration on the Prostate. *Ann Surg* 21, 492.
- Whittemore, A.S., Wu, A.H., Kolonel, L.N., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., West, D.W., Teh, C.Z. and Stamey, T. (1995) Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 141, 732-40.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A. and Mangelsdorf, D.J. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9, 1033-45.
- Wilson, E.M. and French, F.S. (1976) Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. *J Biol Chem* 251, 5620-9.
- Wilson, J.D. and Griffin, J.E. (1980) The use and misuse of androgens. *Metabolism* 29, 1278-95.
- Wilson, J.D., George, F.W. and Griffin, J.E. (1981) The hormonal control of sexual development. *Science* 211, 1278-84.

- Windahl, S.H., Andersson, G. and Gustafsson, J.A. (2002) Elucidation of estrogen receptor function in bone with the use of mouse models. *Trends Endocrinol Metab* 13, 195-200.
- Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L. and Sobin, L.H. (2002) TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* 94, 2511-6.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G. and Siegel, G. (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57, 1439-43.
- Wu, C.P. and Gu, F.L. (1991) The prostate in eunuchs. *Prog Clin Biol Res* 370, 249-55.
- Yalow, R.S. and Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39, 1157-75.
- Yamada, Y. (1979) Effects of testosterone on unit activity in rat hypothalamus and septum. *Brain Res* 172, 165-8.
- Yan, G., Fukabori, Y., Nikolaropoulos, S., Wang, F. and McKeenan, W.L. (1992) Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Mol Endocrinol* 6, 2123-8.
- Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H. (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 281, 27816-26.
- Yasuda, T., Grillot, D., Billheimer, J.T., Briand, F., Delerive, P., Huet, S. and Rader, D.J. (2010) Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 781-6.
- Yeh, S., Lin, H.K., Kang, H.Y., Thin, T.H., Lin, M.F. and Chang, C. (1999) From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5458-63.
- Yeh, S., Tsai, M.Y., Xu, Q., Mu, X.M., Lardy, H., Huang, K.E., Lin, H., Yeh, S.D., Altuwaijri, S., Zhou, X., Xing, L., Boyce, B.F., Hung, M.C., Zhang, S., Gan, L. and Chang, C. (2002) Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13498-503.
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Takahashi, A., Sone, H., Osuga, J., Gotoda, T., Ishibashi, S. and Yamada, N. (2002) Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 277, 1705-11.
- Zelcer, N. and Tontonoz, P. (2006) Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* 116, 607-14.
- Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E.G., Landreth, G.E., Vinters, H.V. and Tontonoz, P. (2007) Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10601-6.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R. and Tontonoz, P. (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325, 100-4.
- Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L.G., Sutherland, R.L. and Williams, E.D. (2005) Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* 65, 222-30.
- Zhou, Z.X., Sar, M., Simental, J.A., Lane, M.V. and Wilson, E.M. (1994) A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem* 269, 13115-23.
- Zhou, Z.X., Kempainen, J.A. and Wilson, E.M. (1995) Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Mol Endocrinol* 9, 605-15.
- Zhou, Z.X., He, B., Hall, S.H., Wilson, E.M. and French, F.S. (2002) Domain interactions between coregulator ARA(70) and the androgen receptor (AR). *Mol Endocrinol* 16, 287-300.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R. and Freeman, M.R. (2005) Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115, 959-68.

- Zilliacus, J., Wright, A.P., Carlstedt-Duke, J., Nilsson, L. and Gustafsson, J.A. (1995) Modulation of DNA-binding specificity within the nuclear receptor family by substitutions at a single amino acid position. *Proteins* 21, 57-67.
- Zitzer, H., Wente, W., Brenner, M.B., Sewing, S., Buschard, K., Gromada, J. and Efanov, A.M. (2006) Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 147, 3898-905.

Résumé

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) est une pathologie qui affecte 50% des hommes dès l'âge de 60 ans et qui conduit à des troubles de la miction. L'HBP se caractérise par une hypertrophie exclusive ou composite de plusieurs compartiments tissulaires de la prostate que sont l'épithélium, le stroma et les fibres musculaires qui définissent respectivement les composantes glandulaire, fibreuse et musculaire de cette pathologie. Il a récemment été montré que les souris dépourvues en récepteurs nucléaires LXR (*Liver-X-receptor*) α (souris *lxra*^{-/-}) développent une hypertrophie de la prostate dont les signes histologiques évoquent une HBP de type fibreuse. Par ailleurs, un des traitements de l'HBP, vise à éteindre la signalisation androgénique en inhibant la conversion de la testostérone en son métabolite actif, la dihydrotestostérone (DHT). Le phénotype d'hypertrophie de la prostate pourrait donc également s'expliquer par une altération de la signalisation androgénique dans les souris *lxra*^{-/-}.

Dans ce contexte, notre projet de recherche a été centré sur l'étude du rôle des LXR dans l'apparition de l'HBP dans sa composante glandulaire et l'analyse des relations moléculaires associant les signalisations dépendantes de LXR α et du récepteur des androgènes (AR) au sein de la prostate.

Le phénotype d'HBP observé dans les souris *lxra*^{-/-} résulte d'altérations importantes de l'homéostasie de l'épithélium qui miment la composante glandulaire : 1) une activité sécrétoire accrue ; 2) une altération des processus de sécrétion associée à une altération de l'expression des gènes codant des protéines du transport vésiculaire ; 3) une réponse altérée de certains gènes androgéno-dépendants associée à une hypersensibilité aux androgènes ; 4) des modifications du réseau paracrine reliant le stroma et l'épithélium.

Au final, ces travaux définissent LXR α comme un acteur clé de l'homéostasie prostatique et ouvrent des pistes intéressantes pour la compréhension de l'étiologie de l'HBP chez l'homme. Ces résultats montrent qu'il est possible de moduler la réponse androgénique de la prostate en ciblant LXR α . Ainsi, à plus long terme, l'activation pharmacologique de LXR α constitue une piste potentielle dans le traitement de l'HBP.

Mot clés : Prostate, androgènes, LXR, Hypertrophie bénigne de la prostate, SBP

Abstract

Benign prostate hyperplasia (BPH) is a very common prostatic disorder that affects 50% of men after 60 years. In BPH, prostate enlargement causes urinary disorders. BPH is characterized by a hypertrophy of several tissue compartments such as the epithelium, stroma and/or muscle fibers. Hence, three main forms of BPH have been described: glandular, fibrous and muscular form. It has been recently shown that LXR (Liver-X-receptor) α (*lxra*^{-/-}) mice develop a prostate enlargement with histological signs of fibrous BPH. Inhibition of testosterone conversion into DHT is one the most effective pharmacological treatment of BPH. Thus, the *lxra*^{-/-} prostate phenotype could be in part due to an alteration of androgen signaling.

In this context, the aim of this work was to study the role of LXR in glandular BPH development and to understand the relationships between LXR α and the androgen receptor (AR) dependent signaling pathway in prostate.

The prostate enlargement observed in *lxra*^{-/-} mice results from major alterations in epithelium homeostasis mimicking the glandular alteration of BPH: 1) increase of secretory activity; 2) alteration of the secretory process associated with altered expression of vesicular transport protein encoding genes; 3) a disruption in the response of androgen-dependent genes associated with androgen hypersensitivity; 4) changes in the paracrine network between stroma and epithelium.

Finally, this work defines LXR α as a key player in prostate homeostasis and opens interesting way to the understanding of BPH etiology. These results show that targeting LXR α modulate the prostate androgenic response. Thus, pharmacological activation of LXR α could constitute a new option for the treatment of BPH.

Key words : Prostate, androgens, LXR, Benign prostatic hypertrophy, SBP