

Abréviations

| | |
|---------------------------------|---|
| 17β-HSD | <i>17β-hydroxysteroid dehydrogenase</i> |
| 3βHSD | <i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase</i> |
| ABC | <i>ATP-binding cassettes</i> |
| ABP | <i>androgene binding protein</i> |
| ACC | <i>adénocarcinome à cellules claires</i> |
| AF | <i>activating Function</i> |
| ALCs | <i>adult Leydig Cells</i> |
| AMPc | <i>adénosine monophosphate cyclique</i> |
| AP-1 | <i>activator protein-1</i> |
| APD | <i>acetyl podocarpic dimer</i> |
| Apo | <i>apolipoprotéine</i> |
| AR | <i>androgen receptor</i> |
| ASC-2 | <i>activating signal cointegrator 2</i> |
| BAFs | <i>brahma associated factors</i> |
| bHLH-PAS | <i>basic helix loop helix-per arnt sims</i> |
| BRG-1 | <i>brahma-related gene 1</i> |
| BRM | <i>brahma</i> |
| CAC | <i>acetyl CoA carboxylase</i> |
| CAR | <i>constitutive androstane receptor</i> |
| CARM1 | <i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i> |
| ChREBP | <i>carbohydrate response element binding protein</i> |
| CNRE | <i>overlapping of a cAMP and a negative response element</i> |
| CoA | <i>acetyl coenzyme A</i> |
| CoCoA | <i>coiled coil coactivator</i> |
| COUP-TF | <i>chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor</i> |
| COX-2 | <i>cyclooxygenase 2</i> |
| CRP | <i>C reactive protein</i> |
| CTE | <i>carboxy terminal extension</i> |
| CYP11a1 | <i>cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1</i> |
| CYP11B1 | <i>11β-hydroxylase</i> |
| CYP17 | <i>steroid 17α- hydroxylase</i> |
| CYP21 | <i>21-hydroxylase</i> |
| CYP3A4 | <i>cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4</i> |
| CYP7B1 | <i>cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1</i> |
| Cyp7α | <i>cholesterol 7alpha-hydroxylase</i> |
| DAX-1 | <i>dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1</i> |
| DAZ | <i>deleted in azoospermia gene</i> |
| DAZL | <i>DAZ Like</i> |
| DBD | <i>DNA binding domain</i> |
| DES | <i>diethylstilbestrol</i> |
| DHEA | <i>dehydroepiandrosterone</i> |
| DHT | <i>dihydrotestosterone</i> |
| DR | <i>direct repeat</i> |
| ER | <i>everted repeat</i> |
| ERK1/2 | <i>extracellular signal regulated kinases 1/2</i> |
| ERR | <i>estrogen related receptor</i> |
| F1-6B | <i>fructose 1,6 biphosphatase</i> |
| FAS | <i>fatty acid synthase</i> |
| FD | <i>fetal day</i> |
| FF-MAS | <i>follicular fluid meiosis activating sterol</i> |
| FLC | <i>fetal leydig cell</i> |
| FTZ-F1 (ou NR5A2) | <i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2</i> |

| | |
|----------------|--|
| FXR | <i>farnesoid X receptor</i> |
| G6P | <i>glucose-6-phosphatase</i> |
| GCNF | <i>germ cell nuclear factor</i> |
| G-CSF | <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> |
| GGPP | <i>geranylgeranyl pyrophosphate</i> |
| GLUT-4 | <i>glucose transporter type 4</i> |
| GnRH | <i>gonadolibérine</i> |
| GPER | <i>récepteur des estrogènes couplé aux protéines G</i> |
| GR | <i>glucocorticoid receptor</i> |
| GRIP-1 | <i>glucocorticoid receptor interacting protein 1</i> |
| HAT | <i>histone acetyl transférase</i> |
| HDL | <i>high density lipoprotein</i> |
| HMG-CoA | <i>hydroxy-methyl-glutaryl-CoA</i> |
| HNF-4 | <i>hepatocyte nuclear factor-4</i> |
| Hpg | <i>souris hypogonadiques</i> |
| HPV | <i>human papillomavirus</i> |
| HRE | <i>hormone response element</i> |
| HSV2 | <i>herpes virus</i> |
| IL | <i>interleukin</i> |
| ILC | <i>immature leydig cell</i> |
| iNOS | <i>inductible nitric oxide synthase</i> |
| InsL3 | <i>insulin like factor 3</i> |
| IR | <i>indirect repeat</i> |
| KO | <i>knockout</i> |
| LBD | <i>ligand binding domain</i> |
| LBP | <i>ligand binding pocket</i> |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| LH | <i>luteinizing hormone</i> |
| LPS | <i>lipopolysaccharide</i> |
| LRH-1 | <i>liver receptor homolog-1</i> |
| LXR | <i>liver x receptor</i> |
| MCP | <i>monocyte chemotactic proteins</i> |
| MR | <i>mineralocorticoid receptor</i> |
| NADPH | <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> |
| N-CoR | <i>nuclear receptor co-repressor</i> |
| NF-kB | <i>nuclear factor-kB</i> |
| NGFI-B | <i>nerve growth factor IB</i> |
| NLS | <i>nuclear localization signal</i> |
| NOR | <i>neuron-derived orphan receptor</i> |
| NRID | <i>nuclear receptor interactiong domain</i> |
| NRs | <i>nuclear receptors</i> |
| NURR | <i>nuclear receptor related</i> |
| DDT | <i>dichlorodiphenyltrichloroethane</i> |
| p/CIP | <i>p300/CBP cointegrator associated protein</i> |
| P450c17 | <i>17α-hydroxylase/17,20 lyase/17,20 desmolase</i> |
| P450scc | <i>cholesterol side-chain cleavage enzyme</i> |
| PB | <i>benzodiazépines</i> |
| PBR | <i>benzodiazepine receptor</i> |
| PEPCK | <i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i> |
| PGF2α | <i>prostaglandines F2α</i> |
| PL | <i>préleptotène</i> |
| PLC | <i>progenitor leydig cell</i> |
| PLTP | <i>phospholipid transfer protein</i> |

| | |
|------------------|---|
| PND | <i>postnatal day</i> |
| PPAR | <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> |
| PPARGC1A | <i>PPAR-gamma, coactivator-1</i> |
| PR | <i>progesterone receptor</i> |
| PXR | <i>pregnane X receptor</i> |
| RAP250 | <i>nuclear receptor-activating protein 250</i> |
| RAR | <i>retinoic acid receptor</i> |
| Rev-Erb | <i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i> |
| ROR | <i>RAR-related orphan receptor</i> |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| RXR | <i>retinoid X receptor</i> |
| scd1 | <i>stearoyl CoA desaturase 1</i> |
| SF-1 | <i>steroidogenic factor 1</i> |
| SHP | <i>small heterodimer partner</i> |
| SMRT | <i>silencing mediator for RAR and TR</i> |
| SRB1 | <i>scavenger receptor class B1</i> |
| SRC-1 | <i>steroid receptor coactivator-1</i> |
| SREBP1c | <i>sterol regulatory element binding protein 1c</i> |
| SREBP2 | <i>sterol regulated element binding protein-2</i> |
| StAR | <i>steroidogenic acute regulatory protein</i> |
| SWI/SNF | <i>SWItch/sucrose nonfermentable</i> |
| SXR | <i>steroid and xenobiotic receptor</i> |
| TDS | <i>syndrome de dysgénésie testiculaire</i> |
| TIF-2 | <i>transcriptional intermediary factor 2</i> |
| T-MAS | <i>testis meiosis-activating sterol</i> |
| TR | <i>thyroid hormone receptor</i> |
| TRAP/DRIP | <i>thyroid receptor-associated protein / vitamin D receptor interacting protein</i> |
| TRRAP | <i>transformation/transcription domain-associated protein</i> |
| TSPO | <i>tanslocator protein</i> |
| VDR | <i>vitamin D receptor</i> |
| YFP | <i>yellow fluorescent protein</i> |

Sommaire

| | |
|--|----|
| Sommaire | 1 |
| Introduction bibliographique | 6 |
| I. Les récepteurs nucléaires | 7 |
| 1. Classification | 8 |
| 2. Les récepteurs nucléaires des oxystérols | 9 |
| 2.1. Structure | 9 |
| 2.1.1. Le domaine N-terminal | 10 |
| 2.1.2. Le domaine de liaison à l'ADN | 10 |
| 2.1.3. Le domaine charnière | 11 |
| 2.1.4. Le domaine de liaison du ligand | 11 |
| 3. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires | 14 |
| 3.1. Les éléments de réponse des NRs | 14 |
| 3.2. Les éléments de réponse aux LXR | 15 |
| 3.3. Les corégulateurs | 16 |
| 3.3.1. Les corépresseurs (<i>en absence du ligand</i>) | 16 |
| 3.3.2. Les coactivateurs (<i>en présence du ligand</i>) | 16 |
| 3.3.2.1. La famille de protéines SWI/SNF | 17 |
| 3.3.2.2. Les coactivateurs histone-acétyltransférases (HAT) | 17 |
| 3.4. Les ligands des LXR | 19 |
| 3.4.1. Les ligands LXR naturels : les oxystérols | 19 |
| 3.4.1.1. Définition, origine des oxystérols | 19 |
| 3.4.1.2. Les sources enzymatiques des oxystérols | 19 |
| a) <i>Le 24(S), 25-époxycholestérol</i> | 20 |
| b) <i>Les intermédiaires de la stéroïdogenèse</i> | 20 |
| c) <i>Les dérivés hydroxylés du cholestérol</i> | 20 |
| 3.4.1.3. Source non enzymatique des oxystérols | 21 |
| 3.4.2. Les ligands de LXR non oxystérols | 22 |
| 3.4.2.1. Les intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol | 22 |
| 3.4.2.2. Le glucose | 22 |
| 3.4.2.3. Les ligands synthétiques et naturels exogènes | 22 |
| 3.4.3. Les ligands antagonistes LXR | 23 |
| 4. Les rôles physiologiques des LXR | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1. Les LXR _s dans et système reproducteur mâle | 24 |
| 4.1.1. L'épididyme | 24 |
| 4.1.2. La stéroïdogenèse | 24 |
| 4.1.3. La balance prolifération/apoptose des cellules germinales | 25 |
| 4.1.4. L'homéostasie des lipides dans le testicule | 25 |
| 4.2. Le métabolisme lipidique | 25 |
| 4.2.1. Régulation de l'homéostasie du cholestérol | 25 |
| 4.2.2. La synthèse <i>de novo</i> | 26 |
| 4.2.3. La synthèse des acides biliaires | 26 |
| 4.2.4. Transport inverse du cholestérol | 26 |
| 4.3. Le métabolisme des acides gras | 27 |
| 4.4. L'homéostasie du glucose | 27 |
| 4.5. L'inflammation et la réponse immunitaire | 28 |
| 4.6. La stéroïdogenèse | 28 |
| 4.7. La physiologie du rein | 29 |
| 4.8. Le système nerveux central | 29 |
| 5. Signalisation des LXR _s dans les cas pathologiques | 29 |
| II. Physiologie de la fonction testiculaire | 31 |
| 1. Structure du testicule : un aperçu général | 31 |
| 2. Organisation fonctionnelle du testicule | 32 |
| 2.1. Le compartiment interstitiel | 32 |
| 2.1.1. Les cellules de Leydig | 32 |
| 2.1.1.1. Les cellules de Leydig fœtales | 32 |
| 2.1.1.2. Les cellules de Leydig adultes | 34 |
| a) Structure des progéniteurs des ALCs | 34 |
| b) Structure des cellules de Leydig immatures et les cellules | |
| de Leydig matures | 35 |
| c) Fonction stéroïdogène des ALCs | 35 |
| 2.1.2. Les macrophages, les lymphocytes et les fibres nerveuses | 36 |
| 2.2. Le compartiment tubulaire | 36 |
| 2.2.1. Les cellules péritubulaires | 36 |
| 2.2.2. Les cellules de Sertoli | 36 |
| 2.2.3. Les cellules germinales | 37 |
| 2.2.3.1. Les spermatogonies | 37 |
| 2.2.3.2. Les spermatocytes | 38 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.4. | La spermatogenèse | 39 |
| 2.4.1. | Le cycle de l'épithélium séminifère | 40 |
| 2.4.2. | La vague de l'épithélium séminifère | 41 |
| 3. | La stéroïdogenèse | 42 |
| 3.1. | Sources et mobilisation du cholestérol | 42 |
| 3.2. | Le transport du cholestérol dans la cellule de Leydig | 43 |
| 3.3. | Les voies de la stéroïdogenèse dans la cellule de Leydig | 43 |
| 3.4. | La conversion de prégnénolone en testostérone | 44 |
| 3.5. | Régulation des enzymes de la stéroïdogenèse | 45 |
| 4. | Le contrôle hormonal de la fonction testiculaire | 46 |
| 5. | L'épididyme | 47 |
| 6. | Les glandes accessoires | 47 |
| 6.1. | Les vésicules séminales | 47 |
| 6.2. | La prostate | 48 |
| III. | Les perturbateurs endocriniens | 49 |
| 1. | Définition | 49 |
| 2. | Altération des fonctions de l'appareil reproducteur mâle | 49 |
| 3. | Les sites cibles des perturbateurs endocriniens dans le système reproducteur mâle | 50 |
| 4. | Les perturbateurs endocriniens et la fonction testiculaire | 51 |
| 4.1. | Effet des anti-androgènes sur la fonction hormonale des cellules de Leydig | 51 |
| 4.2. | Effet des composés œstrogéniques sur les fonctions des cellules de Leydig | 51 |
| 4.3. | Les facteurs environnementaux et l'épigénétique | 52 |
| 5. | Le diéthylstilbestrol | 52 |
| 5.1. | Histoire du diéthylstilbestrol | 52 |
| 5.2. | Les effets secondaires chez les mères DES | 53 |
| 5.3. | Les effets secondaires chez les filles DES | 54 |
| 5.3.1. | Risque du cancer du sein | 54 |
| 5.3.2. | Adénocarcinome à cellules claires du col et du vagin | 54 |
| 5.3.3. | Les anomalies utérines | 54 |
| 5.3.4. | Autres anomalies annexielles | 55 |
| 5.4. | Les effets secondaires chez les garçons DES | 55 |
| 5.4.1. | Conséquences de l'exposition au DES sur le développement urogénital | 55 |
| 5.4.2. | Risque de cancer du testicule chez les hommes exposés <i>in utero</i> au DES | 56 |
| 5.4.3. | Risque d'hypospadias chez les hommes exposés <i>in utero</i> au DES | 56 |
| 5.5. | Les effets secondaires sur la troisième génération | 57 |

| | |
|--|----|
| IV. Présentation du projet de recherche | 58 |
| Résultats | 60 |
| Article 1 : | 62 |
| Discussion et perspectives | 66 |
| 1. Quel est l'effet d'une forte dose du DES sur l'histologie du testicule? | 67 |
| 2. Effet d'une faible dose du DES sur la morphologie testiculaire | 68 |
| 3. Le métabolisme lipidique est-il perturber par le traitement DES ? | 69 |
| 4. Quel est l'effet du DES sur la stéroïdogenèse | 70 |
| 5. Un excès d'un xénoestrogène est-il perturbant pour le testicule? | 71 |
| 6. Quelle est la nature des relations associant la signalisation DES et LXR dans le testicule ? | 71 |
| Annexe | 73 |
| Références bibliographiques | 76 |

Introduction bibliographique

| | Récepteurs endocriniens | Récepteurs Orphelins « adoptés » | Récepteurs Orphelins |
|---------------|--|--|---|
| Ligand | Hormones stéroïdiennes Haute affinité | Lipides alimentaires Faible affinité | Inconnus |
| | ER α, β PR AR GR MR | RXR α, β, γ PPAR α, β, γ LXR α, β FXR PXR/SXR CAR | SF-1 LRH-1 DAX-1 SHP TLX PNR NGFI-B α, β, γ ROR α, β, γ ERR α, β, γ RVR α, β, γ GCNF TR 2,4 HNF-4 COUP-TF α, β, γ |

Figure 1: Les récepteurs nucléaires sont classés en trois ou quatre groupes, en fonction de leur capacité à fixer un ligand. Les 48 NRs humains sont présentés, ainsi que le récepteur de l'ecdysone chez les insectes (EcR). Adapté d'après Chawla *et al.*, 2001.

I. Les récepteurs nucléaires

Ce sont des protéines qui agissent dans le noyau comme facteur de transcription. La famille des récepteurs nucléaires (NRs) compte à ce jour 48 membres chez l'homme (dont 24 seulement ont un ligand connu) et 49 membres chez la souris (Auwerx *et al.*, 2003 ; Germain *et al.*, 2006). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription ligand-dépendants qui répondent directement à une grande variété de substances hormonales et métaboliques, les ligands (**Figure 1**). Ces derniers déclenchent des changements dans la conformation et la dynamique du comportement des récepteurs qui à leur tour régulent le recrutement de corégulateurs et des différentes machineries de modification de la chromatine, un élément clé de la signalisation des NRs. En effet, l'action ultime des récepteurs nucléaires sur les gènes cibles, après la liaison à l'ADN à la séquence spécifique, est d'améliorer le recrutement et/ou l'activation de la machinerie générale de transcription sous l'effet du ligand (Roeder, 1996). D'autres récepteurs nucléaires sont appelés récepteurs orphelins, pour lesquels les ligands sont encore inconnus ou n'existent pas ; les NRs pour lesquels les ligands n'ont été identifiés que récemment sont qualifiés d'«*orphelins adoptés*». L'alignement des séquences et la construction de l'arbre phylogénétique aboutit à un classement de la famille des NRs humaines en six groupes évolutifs de taille inégale (Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999; Escriva *et al.*, 2000) :

1. Ce grand groupe comprend les récepteurs TR, RAR, VDR (NR1I1) et PPAR, ainsi que les récepteurs orphelins comme RoRs, Rev-Erbα, CAR (NR1I3), PXR (NR1I2), LXR et d'autres récepteurs nucléaires.
2. Ce groupe comprend RXRs, COUP-TF et HNF-4.
3. Cette sous-famille comprend les récepteurs des stéroïdes avec les ERs, GRs, PRs et ARs ainsi que les ERRs.
4. Ce petit groupe contient un ensemble de facteurs de croissance allant du *nerve growth factor induced clone B* à des récepteurs orphelins (NGFI-B, NURR1, NOR1).
5. Ce petit groupe comprend le *steroidogenic factor 1* (NR5A1) et des récepteurs de la drosophile FTZ-F1.
6. Cette sous-famille ne contient que le récepteur GCNF1 (NR6A1) qui ne s'intègre pas bien dans toutes les autres sous-familles.

La plus importante différence entre les récepteurs nucléaires et les autres facteurs de transcription est la capacité à lier spécifiquement des petites molécules hydrophobes. Ces ligands constituent des signaux de régulation qui changent l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire correspondant après la liaison. Une distinction est faite entre les récepteurs nucléaires classiques dont les ligands sont connus et ce qu'on appelle les récepteurs «orphelins» sans ligand connu. Cependant, l'identification de ligands au cours de ces dernières années pour un bon nombre de ces récepteurs orphelins a rendu cette distinction assez superficielle (Mangelsdorf et Evans, 1995; Kliewer *et al.*,

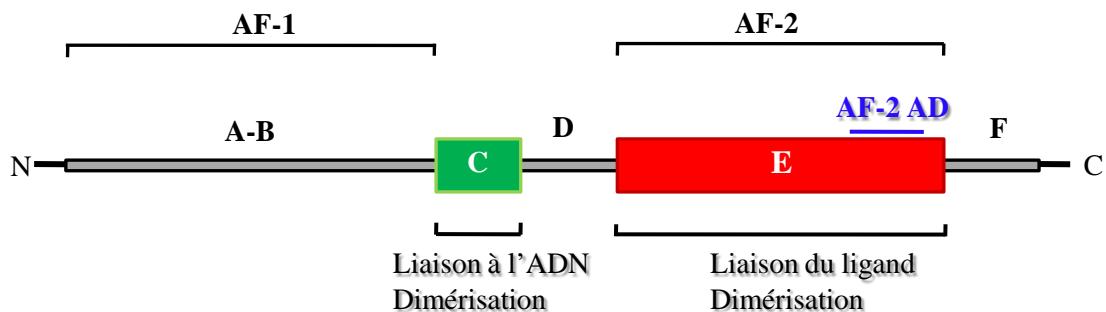


Figure 2: Organisations structurelle et fonctionnelle d'un récepteur nucléaire. Les récepteurs nucléaires se composent de six domaines (A à F) basés sur des régions de fonction et de séquences conservées. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD; région C) est le domaine le plus hautement conservé et code pour deux doigts de zinc. Le domaine de liaison du ligand (LBD; région E) est moins conservé et sert à la liaison du ligand, la dimérisation et une fonction de transactivation ligand-dépendante, appelée AF-2. L'intégrité du domaine d'activation (AD) a été démontré comme nécessaire pour la transactivation ligand-dépendante. La région N-terminale A-B contient une fonction de transactivation spécifique du promoteur appelée AF-1. La région D est considérée comme un domaine charnière. La région F n'est pas présente dans tous les récepteurs et sa fonction est mal comprise. *Adapté d'après Bourguet et al., 2000.*

1999 a). En outre, la classification des récepteurs nucléaires en 6 à 7 sous-familles phylogénétiques avec des groupes qui comprennent à la fois les récepteurs orphelins et non orphelins rejette encore une telle classification (Germain *et al.*, 2006). Les récepteurs peuvent également intégrer les différentes voies de signalisation et réguler les activités des autres grandes cascades de signalisation. Enfin, bien que certains NRs soient localisés dans le noyau cellulaire indépendamment de la présence de ligand, d'autres comme AR, MR, PR, ou GR sont situés dans le cytoplasme en l'absence de ligand. La liaison d'un agoniste à ces récepteurs cytosoliques induit une translocation nucléaire.

1. Classification

La classification des récepteurs nucléaires est faite en vertu de l'homologie du domaine de liaison à l'ADN avec d'autres membres de la famille (Région C, **Figure 2**) et le domaine de liaison du ligand (Région E) ayant la plus forte conservation évolutive. Le tableau n°1 énumère tous les récepteurs nucléaires connus avec leurs noms triviaux et les nouveaux acronymes selon un système de nomenclature unifiée (Germain *et al.*, 2006). Il a été proposé que les récepteurs nucléaires ont évolué à partir d'un récepteur orphelin ancestral par diversification précoce et seulement plus tard par la liaison du ligand acquis (Escriva *et al.*, 1997). Néanmoins, aussi longtemps que l'identification de ligand pour les récepteurs orphelins précédents se poursuit, il ne peut être formellement exclu que tous les récepteurs nucléaires peuvent avoir des ligands apparentés. Pour des raisons historiques, la recherche s'est d'abord portée sur les récepteurs des hormones stéroïdes classiques. Actuellement, les scientifiques et les pharmacologues industriels focalisent leurs recherches beaucoup plus sur le dépistage systématique des agonistes et des antagonistes qui se lient avec une haute affinité au domaine de liaison du ligand de divers récepteurs orphelins. Il est intéressant de savoir que certains ligands récemment identifiés sont des métabolites intermédiaires. Il apparaît donc que, dans certains systèmes, tels que le métabolisme du cholestérol ou les voies de β -oxydation des acides gras, le contrôle de l'accumulation, la répartition et le stockage des métabolites actifs sont régulés au niveau de l'expression des gènes et que, dans de nombreux cas, cette signalisation « intracrine » est provoquée par les récepteurs nucléaires. En outre, les expériences de l'inactivation du gène (*Knockout*) suggèrent que les métaboliques intermédiaires, tels que les ligands du SF-1 (NR5A1) ou du PPAR γ (NR1C3), peuvent avoir une fonction de régulation du développement des organes spécifiés (Luo *et al.*, 1994 ; Barak *et al.*, 1999). Les plus importants ligands métaboliques sont les acides biliaires et les acides gras, les eicosanoïdes et les oxystérols. Le groupe des hormones stéroïdes comprend les œstrogènes, les progestines, les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes, les androgènes et lesecdystérones. Il existe des exemples de ligands des récepteurs nucléaires dérivés de vitamines comme la vitamine D3 (VDR) ou des dérivés de la vitamine A comme l'acide rétinoïque (RAR et RXR). Ainsi les récepteurs nucléaires fonctionnent-ils dans les voies de signalisation endocrines (récepteurs des hormones stéroïdes), autocrines/paracrines (les récepteurs des rétinoïdes) et les voies de signalisation intracrines

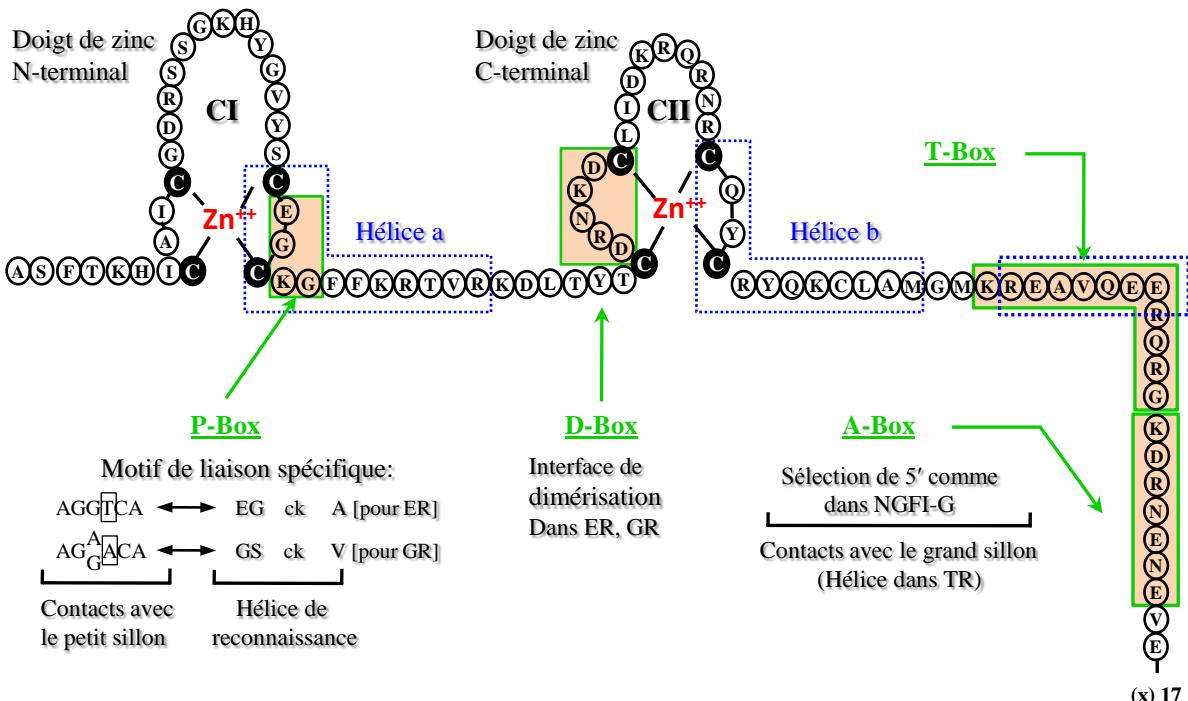
[récepteurs métaboliques, tels que les voies de signalisation LXR α , SF-1, FXR, PXR, PPARs, CAR β] (Laudet et Gronemeyer, 2002).

2. Les récepteurs nucléaires des oxystérols (LXRs)

2.1. Structure

Les récepteurs nucléaires des oxystérols (LXRs), LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) appartiennent à une grande famille de récepteurs nucléaires ligands dépendants qui se lient à la région régulatrice des gènes cibles. LXR α a été initialement isolé à partir d'une banque d'ADNc de foie de rat comme un nouveau récepteur nucléaire orphelin sans ligand physiologique connu. Plusieurs chercheurs ont identifié l'isoforme LXR β par criblage de différentes banques d'ADNc (Song et al., 1994, Teboul et al., 1995). Le gène humain LXR α est situé sur le chromosome 11p11.2, tandis que le gène humain LXR β est situé sur le chromosome 19q13.3. L'expression de LXR α prédomine dans les tissus métaboliquement actifs tels que le foie, l'intestin grêle, les reins, les macrophages et le tissu adipeux, alors que LXR β est exprimé de manière ubiquitaire avec des niveaux particulièrement élevés dans le cerveau en développement (Fan et al., 2008). LXR α existe en trois variantes provenant de l'épissage alternatif du promoteur et de l'ARNm: LXR α 1, LXR α 2 et LXR α 3 (Chen et al., 2005). LXR α 1 est la variante majeure dans la plupart des tissus à l'exception des testicules, où le LXR α 2 prédomine, alors que LXR α 3 est exprimé à des niveaux faibles dans les poumons, la glande thyroïde et la rate. Les trois variantes se lient à l'ADN, mais LXR α 2 est moins actif dans la stimulation de la transcription que LXR α 1, alors que LXR α 3 est incapable de lier les ligands et ne parvient pas à stimuler la transcription ; LXR α 3 peut en effet s'opposer à la fonction des autres isoformes (Wójcicka et al., 2007). LXR α et LXR β humains partagent 80% d'identité au niveau des acides aminés dans leur domaine de liaison à l'ADN et du domaine de liaison du ligand. Les paralogues LXRs sont très hautement conservés entre les rongeurs et les humains. LXR α humain et LXR α du rat présentent près de 100% d'identité de séquences d'acides aminés dans leur domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison du ligand (Lee et al., 2008a).

Tous les récepteurs nucléaires présentent une structure caractéristique qui se compose de cinq à six domaines d'homologie (désignés A à F, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale) sur la base des régions de séquence conservée et la fonction. (Giguère et al., 1986; Krust et al., 1986). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD, la région C, absent chez DAX-1 et SHP) et le domaine de liaison du ligand (LBD ; région E) sont les domaines les plus hautement conservés. Le domaine A/B N-terminal et la région D sont moins conservés. La région F en position C-terminale, qui est contiguë au domaine E, n'est pas présente dans tous les récepteurs et sa fonction est mal comprise (Germain et al., 2006).



(x) 17

Figure 3: Illustration schématique du domaine de liaison à l'ADN (DBD). Les boîtes (*boxes*) illustrent les régions impliquées dans la sélection de l'élément de réponse. La boîte P fait partie de l'hélice α de reconnaissance de l'ADN (hélice a ; encadrée par des lignes discontinues) et le changement des résidus EGA de la boîte-P du ER par les résidus GSV correspondants de GR change l'élément de réponse ERE/GRE comme décrit dans l'illustration ci-dessous. La boîte-D est responsable de la sélection PAL3/PAL par le récepteur de l'oestrogène et le récepteur des hormones thyroïdiennes, et contribue à des interfaces d'homodimérisation des DBDs du ER et GR. La région de la boîte-T forme une hélice (hélice c) et correspond à une surface de dimérisation des homodimères RXR. CI et CII sont les deux motifs en doigt de zinc. Adapté d'après Grönemeyer et Laudet, 1995.

D'un point de vue structural, la protéine LXR est composée de quatre domaines indépendants fonctionnellement liés (**Figure 2**). Ce sont le domaine N-terminal, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière et le domaine de liaison du ligand (LBD).

2.1.1. Le domaine N-terminal (ou domaine modulateur)

Ce domaine, également appelé domaine A/B, est le plus variable dans la superfamille des NRs aussi bien en longueur qu'en séquence. Le domaine modulateur contient généralement une fonction d'activation de la transcription, dénommée AF-1 (*Activating Function 1*) qui lie des co-régulateurs, l'activité de l'AF-1 est contrôlée par la liaison du ligand au LBD. Contrairement à ce qui a été décrit pour certains récepteurs nucléaires, aucune phosphorylation des LXRs au niveau du domaine A/B n'a aujourd'hui été décrite.

2.1.2. Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C)

Les récepteurs nucléaires se lient à l'ADN sous forme de monomères, homodimères et hétérodimères. La plupart des complexes hétérodimériques contiennent l'un des récepteurs de l'acide rétinoïque (RXRs) comme partenaire commun. Dans le domaine de liaison à l'ADN, les LXRs montrent 76% d'homologie de structure en acides aminé avec FXR (NR1H4), 67% avec EcR (NR1H1) et de 44 à 59% avec les membres de la famille des récepteurs nucléaires II (PXR, CAR). Le DBD (*DNA Binding Domain*) des récepteurs nucléaires est le domaine le plus conservé. Grâce à ce domaine, les récepteurs nucléaires se lient aux séquences spécifiques de l'ADN, appelées éléments de réponse aux hormones (HREs ; *Hormone Response Element*). Le DBD est composé de deux motifs en « doigts de zinc » de type C₂C₂, formés de 66 à 70 résidus d'acide aminé et une extension carboxy-terminale (CTE) qui recouvre approximativement 25 résidus (**Figure 3**). Dans chaque doigt, la disposition de quatre cystéines invariables permet la chélation d'un ion de zinc. Il est composé de deux hélices alpha et est riche en acides aminés basiques (Aranda et Pascual, 2001). Le DBD est subdivisé en quatre sous-domaines appelés les boîtes P, D, T et A qui définissent ou contribuent à la spécificité de l'élément de réponse, à l'interface de dimérisation au sein du DBD et aux contacts avec le squelette de l'ADN (Umesono et Evans, 1989) :

- **La boîte P (ou P-box)**

La boîte P formée de 3 à 4 acides aminés est la partie la plus hautement conservée dans le premier doigt de zinc entre les deux dernières cystéines (Luisi *et al.*, 1991 ; Lee *et al.*, 1993 ; Laudet, 1997). C'est le motif impliqué dans la reconnaissance spécifique de l'élément de réponse aux hormones ; HRE (*Hormone Responsive Elements*), dont la séquence canonique est AGGTCA (Giguere, 1999).

- ***La boîte D (D box ; boîte distale ou de dimérisation)***

Ce sous-domaine, situé entre les deux premières cystéines du second doigt de zinc, définit l'écartement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse sur l'ADN. Cette partie conservée du DBD définit aussi le caractère homodimérique ou hétérodimérique du récepteur nucléaire. La boîte D n'est donc impliquée que dans la fixation sur des éléments de réponse de type IR (Glass, 1994).

- ***L'extension carboxy-terminale (CTE)***

Cette région de 25 acides aminés, située en C-terminal du second doigt de zinc, joue un double rôle en fournissant à la fois l'interface protéine/ADN et protéine/protéine, notamment par la reconnaissance des régions riches en A/T en 5' des éléments de réponse des NRs monomériques (Giguere, 1999). Toutefois, tous les récepteurs nucléaires ne possèdent pas cette extension carboxy-terminale.

- ***Le signal de localisation nucléaire (NLS)***

Ce signal de transfert nucléaire est une succession de 5 à 6 acides aminés basiques riches en arginines et lysines. Bien que ce signal soit constitutivement actif, le transport nucléaire du récepteur est dépendant de l'énergie (**Figure 3**). Une étude récente utilisant un récepteur chimérique LXR α ou LXR β couplé à YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) a permis de préciser le rôle du NLS (*Nuclear Localization Signal*) dans la localisation cellulaire (Prufer et Boudreux, 2007). Quatre NLS sont maintenant connus pour les LXRs. Les NLS 1 et 2 sont situés dans le DBD, le NLS3 dans le domaine charnière et le NLS4, identifié et caractérisé dans le domaine A/B.

2.1.3. ***Le domaine charnière : (domaine D, ou hinge)***

Cette région des récepteurs nucléaires est très variable aussi bien en longueur qu'en séquence primaire. Comme son nom l'indique, sa fonction principale est d'assurer le rôle de charnière entre le DBD et le LBD. Le *hinge* doit être très flexible pour permettre au DBD une rotation de 180°, ce qui assure la fixation du dimère de récepteurs sur des éléments de réponse de type DR ou IR. Le rôle principal du domaine charnière est le contact de corépresseurs en l'absence de ligand, maintenant ainsi la transcription inactive (Horlein, *et al.*, 1995 ; Chen et Evans, 1995).

2.1.4. ***Le domaine de liaison du ligand (domaine C-terminal ou LBD)***

L'activation de la transcription est initiée par la liaison du ligand au LBD, un domaine complexe qui contient quatre motifs structurellement distincts fonctionnellement liés :

- (1) la poche de liaison au ligand, qui interagit avec diverses petites molécules lipophiles.

(a) En absence du ligand (b) En présence du ligand (c) En présence d'un antagoniste

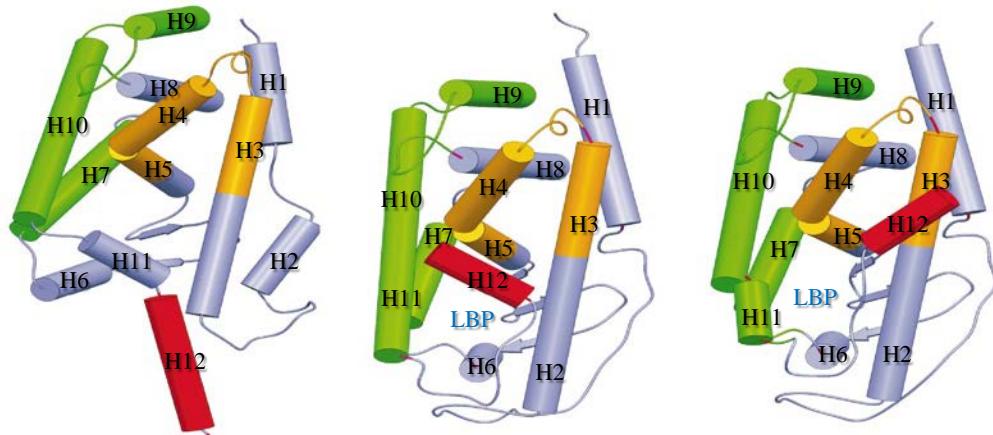


Figure 4: Représentation schématique de trois différents états conformationnels des domaines de liaison du ligand d'un récepteur nucléaire. (a) LBD de RXR en absence du ligand. (b) LBD de RXR en présence de l'agoniste. (c) LBD de RXR en présence d'un antagoniste. Les hélices α (H1-H12) sont représentées comme des tiges alors que les flèches larges représentent le β -turn. Les différentes régions du LBD sont colorées selon leur fonction: la surface de dimérisation est représentée en vert, le site de liaison du coactivateur et corépresseur est représenté en orange et l'hélice 12 qui contient la fonction d'activation 2 (AF-2) est représentée en rouge. D'autres éléments structuraux sont présentés en mauve. Abréviation: LBP, poche de liaison du ligand. Adapté d'après Bourguet et al., 2000.

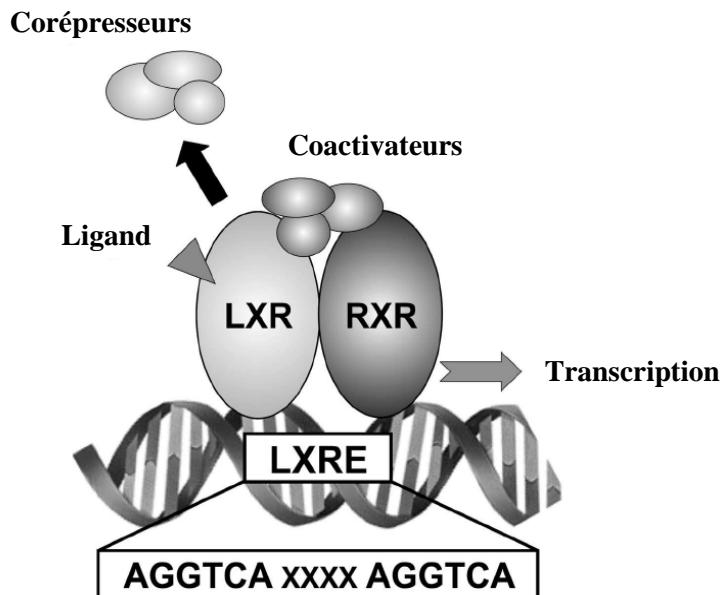


Figure 5: Mécanisme de la régulation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires des oxystérols (LXR). RXR, *retinoid x receptor*; LXRE, LXR response element. Adapté d'après Baranowski, 2008.

(2) une surface de liaison des cofacteurs, qui se lient aux complexes protéiques de régulation et qui modulent positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle.

(3) une fonction d'activation de la transcription, dénommée AF-2, impliquée dans l'activation de la transcription ligand-dépendante.

(4) un motif de dimérisation, impliqué dans l'interaction avec le partenaire du LBD. L'activité du récepteur nucléaire nécessite une interaction allostérique complexe entre les quatre motifs fonctionnels du LBD (Shulman *et al.*, 2004).

- ***Structure du domaine de liaison du ligand***

Les LBDs des récepteurs nucléaires sont des domaines de signalisation allostérique complexe capables d'intégrer de multiples interactions moléculaires entre quatre sites distincts structurellement chevauchés, pour moduler l'activation transcriptionnelle (Bourguet *et al.*, 2000). La structure primaire du LBD du récepteur nucléaire RXR α en absence de son ligand (Bourguet *et al.*, 1995) montre qu'il est formé de 12 hélices (H) et un court β -turn (s1-s2), arrangées en trois couches pour former un antiparallèle « α -helical Sandwich » (**Figure 4**). Les hélices 1, 2 et 3 constituent une face du LBD, H4, H5, s1-s2, H8 et H9 correspondent à la couche centrale et H6, H7 et H10 forment la deuxième face. La superposition de ces structures montre une similitude globale claire, particulièrement au niveau de la moitié supérieure du LBD, qui comprend H1, H4, H5 et H7 jusqu'au H10 qui correspondent à la région structurellement invariable. La partie inférieure du LBD comprend la région variable, qui contient la poche de liaison du ligand (*ligand-binding pocket* ; LBP) (Bourguet *et al.*, 2000).

Le LBD de LXR β adopte le pli canonique des NRs composé de trois couches d'hélices α et possède trois petits feuillets β (s0, s1 et s2) semblables à l'ensemble des autres NRs ; la plupart des NRs sont structurellement étroitement liés (récepteurs de vitamine D, RAR γ , TR β , PPAR α , PPAR γ , RXR α , ROR α , ROR β et PXR) (Tocchini-Valentini *et al.*, 2001). La structure moléculaire du domaine de liaison du ligand de LXR β en présence de son ligand synthétique le T-0901317 représente la conformation agoniste du récepteur, comme jugé par l'orientation relative de l'hélice H12 (région AF2) pour le reste de la molécule (Renaud et Moras 2000 ; Hoerer *et al.*, 2003).

- ***La dimérisation***

Les récepteurs nucléaires forment des monomères, des homodimères ou des hétérodimères avec RXR (**figure 5**). Une comparaison entre LBD de l'hétérodimère formé par RAR α et RXR α avec le LBD de l'homodimère ER α montre que les éléments structuraux qui génèrent l'interface de dimérisation sont identiques. Les interfaces comprennent les résidus H7, H9, H10 et H11, ainsi que les boucles (*Loop* ; L) 8-9 et L9-10. Les hélices H9 et H10 contribuent jusqu'à 75% de la surface totale constituant ainsi le noyau de l'interface de dimérisation (Bourguet *et al.*, 2000). Cependant,

contrairement à l'organisation symétrique presque parfaite des interfaces homodimères, les interfaces hétérodimères sont légèrement asymétriques. Dans ER α , les résidus H8, H9 et H10 et L8–9 sont plus longs et forment des contacts supplémentaires. En conséquence, les surfaces de contact sont plus importantes pour l'homodimère ER α (autour de 1700 A°²) que les surfaces de contact pour l'hétérodimère RXR α -RAR α (915 A°²), ce qui suggère une plus grande affinité de dimérisation pour les ER α que pour les dimères RXR.

- ***La poche de liaison du ligand***

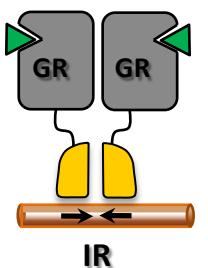
La poche de liaison du ligand (LBP, *ligand Binding Pocket*) est une caractéristique structurelle importante des NRs. Elle est située généralement derrière l'hélice 3 et en face des hélices 7 et 10 et est bordée par la plupart des acides aminés hydrophobes. Quelques résidus polaires à la profondeur de la poche près du β -turn agissent en tant que points d'ancrage pour l'association du ligand et jouent un rôle essentiel dans le positionnement correct du ligand et renforce la sélectivité de la poche. La spécificité de liaison du ligand est également déterminée par la forme du LBP qui peut varier considérablement d'un sous-type de récepteur à un autre (Germain *et al.*, 2004). Malgré le pliage conservé des LBDs, le LBP est également très variable en taille, de Nurr1, qui n'a pas de cavité, à SF-1, qui a une poche de ~ 1600 A°³. La poche est entièrement remplie par les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes dans les récepteurs nucléaires orphelins comme Nurr1, indiquant que certains NRs ne fonctionnent pas comme des récepteurs ligand dépendant (Wang *et al.*, 2003). La structure du LBD d'un autre récepteur orphelin, LRH-1, montre la présence d'une large LBP de ~ 800 A°³ qui est complètement fermée (Sablin *et al.*, 2003).

La poche de liaison du ligand du LXR β est une grande cavité hydrophobe qui est entourée par les hélices H3, H5, H6, H7, H11 et H12. Son volume de 800 A°³ est légèrement plus grand que la taille de la cavité signalée pour ROR α et ROR β , 722 A°³ et 766 A°³ respectivement (Bourgue *et al.*, 1995 ; Stehlin *et al.*, 2001). Dans la conformation agoniste du LBD, une entrée de la cavité du ligand existe entre H5 et la boucle s1-s2, semblable à la situation dans PPAR γ (Kallen *et al.*, 2002). La cavité est formée principalement par des résidus hydrophobes à l'exception du résidu His 435. Les résidus qui tapissent la poche de liaison du ligand du LXR β sont complètement conservés dans LXR α (Hoerer *et al.*, 2003).

- ***La fonction AF-2***

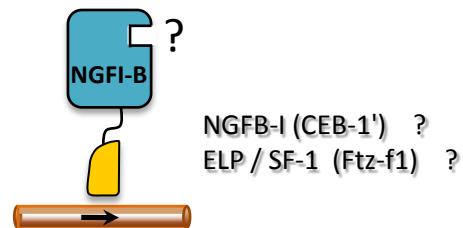
La capacité du LBD des NRs à activer la transcription est contrôlée par l'hélice 12 C-terminale, nommée AF-2 (*Activating function 2*). Les structures cristallographiques des LBDs de la plupart des NRs en présence ou en absence du ligand suggèrent un mécanisme commun par lequel la fonction AF-2 (portée par l'hélice 2) devient transcriptionnellement compétente (Bourguet *et al.*, 2000). En absence du ligand, l'hélice H12 du RXR s'étend vers le bas du LBD. La liaison du ligand

Récepteurs stéroïdes



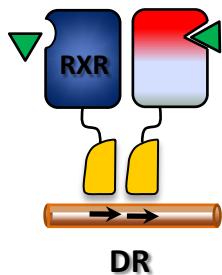
GR glucocorticoïde
MR minéralocorticoïde
PR progestérone
AR androgènes
ER estrogène

Récepteurs orphelins monomériques

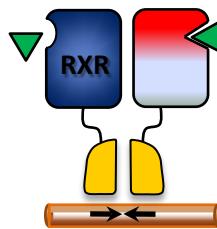


NGFB-I (CEB-1') ?
ELP / SF-1 (Ftz-f1) ?

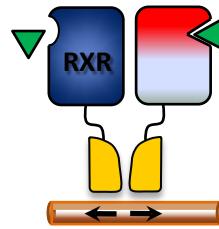
Les Hétérodimères RXR



DR



IR



ER

Figure 6: La liaison des récepteurs nucléaires aux éléments de réponse aux hormones (HREs). Les récepteurs stéroïdes se fixent généralement sur des éléments de réponse de type IR (*Inverted repeat*). Les NRs hétérodimériques contactent le plus souvent des éléments de type DR (*Direct Repeat*) mais peuvent également se fixer sur des IR ou ER. Adapté d'après Mangelsdorf *et al.*, 1995; Aranda *et Pascual*, 2001.

provoque une série d'interactions intramoléculaires, permettant le réarrangement des hélices 10 et 11 en une hélice unique et le balancement concomitant de H12. L'hélice 12 se réaligne ainsi contre la poche hydrophobe de liaison du ligand, agissant ainsi comme un « couvercle » qui scelle la poche en renforçant les interactions entre le ligand et le LBD. Ce modèle est décrit comme le modèle « *mouse trap* » (modèle du piège à souris ; **Figure 4**) dans lequel la liaison du ligand provoque des changements conformationnels dans le LBD permettant la liaison des coactivateurs (Renaud *et al.*, 1995).

3. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires

3.1. Les éléments de réponses des NRs

Les récepteurs nucléaires activent leurs gènes cibles en se liant à des sites spécifiques appelés éléments de réponse aux hormones (HRE) trouvés dans la région régulatrice de leurs gènes cibles. Les éléments de réponse sont des éléments bipartites composés de deux séquences hexamériques appelées demi-sites, séparées par un nombre variable de nucléotides (**Figure 6**). Ces séquences nucléotidiques forment des répétitions directes (DR), indirectes (IR, ou palindromes) ou inversées (ER). L'identité des éléments de réponse peut être déterminée par :

- la séquence des demi-sites
- le nombre de paires de bases qui séparent les demi-sites
- l'orientation relative des motifs.

La superfamille des NRs peut être divisée en sous-groupes sur la base du profil de dimérisation :

- Les séquences consensus des éléments de réponse aux récepteurs des glucocorticoïdes et des œstrogènes sont des répétitions inversées (IR3) de 6 pb séparées par un à trois nucléotides. La séquence consensus du demi-site est 5'-AGAACCA-3', à l'exception de ER (5'-AGGTCA-3'). La cristallisation de GR (*Glucocorticoid Receptor*) et ER a montré une orientation tête-à-tête de l'homodimère (Luisi *et al.*, 1991 ; Schwabe *et al.*, 1993).
- Les récepteurs qui forment des hétérodimères avec RXR (TR, VDR, RAR, PPAR, LXR, FXR, SXR, CAR) contactent généralement des éléments AGAACCA de type DR1 à DR5. Le nombre de nucléotides détermine la spécificité du couple élément de réponse/hétérodimère. Les études cristallographiques ont montré une organisation en tête-à-queue (Germain *et al.*, 2006).
- Enfin, les récepteurs nucléaires qui agissent sous forme de monomères (NGFI-B, SF-1, ROR, ERR, REV-ERB) contactent des éléments de réponse dont la séquence consensus est AGGTCA précédée d'une séquence riche en A/T en 5'.

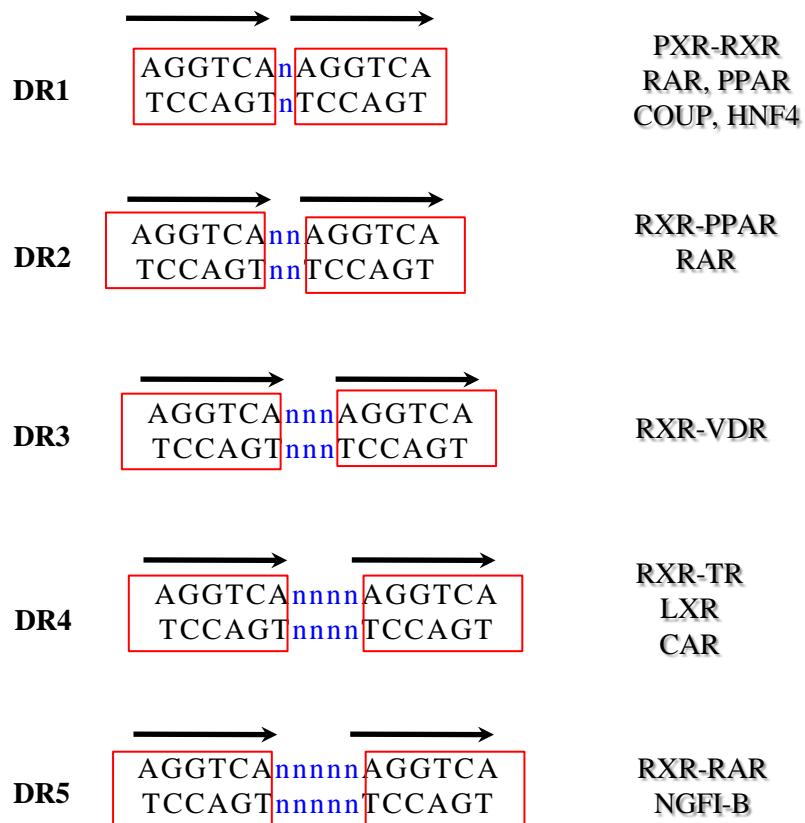


Figure 7: La règle du 1-5 des répétitions directes (DR) de liaison à l'ADN de RXR et ses partenaires. Le nombre de paires de bases entre les séquences AGGTCA peut varier de un à cinq. *Adapté d'après Rastinejad, 2001.*

Il est également à noter que certains récepteurs nucléaires peuvent se fixer sur des éléments de réponse de type ER ou IR, en plus de leur DR canonique, notamment FXR, TR, RAR, VDR (*Vitamin D Receptor*). La capacité des hétérodimères à reconnaître un ER, un IR ou un DR implique que le DBD doit avoir une flexibilité de rotation par rapport au LBD (Mangelsdorf et Evans, 1995)

3.2. Les éléments de réponse aux LXR_s.

Plusieurs éléments ont été décrits :

- **DR4** : Il a été démontré que LXR α se lie à la séquence 5'-GGTTTAaataAGTTCA-3' appelée DR4-LXR *response element* (Willy *et al.*, 1995; Willy et Mangelsdorf, 1997) et induit la transcription de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol et la production des acides biliaires (**Figure 7**). Willy et Mangelsdorf (1997) ont montré que contrairement à d'autres hétérodimères RXR, l'activation par le ligand se produit lorsque le récepteur RXR occupe la position 5' de l'élément de réponse (DR4). En outre, la fixation du ligand par un seul récepteur (RXR) confère l'activation via le domaine AF-2 de l'autre récepteur (LXR).
- **DR1** : Il a été montré que la liaison de LXR β à un élément de réponse de type DR1 (AGGTCAaAGGTCA) est possible quel que soit sa position sur l'élément de réponse, bien qu'avec une affinité légèrement plus élevée lorsque LXR β occupe la position 3' sur le demi site de l'élément de réponse (Feltkamp *et al.*, 1999; Varga et Su, 2007) Contrairement à LXR β , l'hétérodimère RXR-LXR α n'est pas capable de se lier à l'élément de réponse de type DR1 (Gronemeyer et Laudet, 1995).
- **IR1** : Mark et ses collaborateurs (2002) ont identifié et caractérisé deux éléments de réponse fonctionnels LXR (LXREs) dans le promoteur proximal du gène humain PLTP (*phospholipid transfer protein*). Un LXRE correspond à une répétition directe traditionnelle séparée par 4 pb (DR4). Cependant, le second LXRE correspond à une répétition inversée (IR1) et est identique à l'élément de réponse du FXR.
- **CNRE** : *In vitro*, LXR α peut contrôler la transcription d'un groupe de gènes dont la rénine de façon dépendante de l'AMPc (Tamura *et al.*, 2000) en se liant à un nouveau élément de réponse appelé CNRE (*cAMP and a negative response element*). Dans le promoteur du gène de la rénine, cet élément se trouve dans la région proximale (≈ -600 pb) et est conservé dans le génome humain et les rongeurs. Morello *et al.*, (2005) a montré que LXR α et LXR β interagissent physiquement avec le CNRE du promoteur du gène de la rénine dans le rein. En outre, la liaison des LXR_s au CNRE corrèle l'état fonctionnel de l'appareil juxtaglomérulaire.

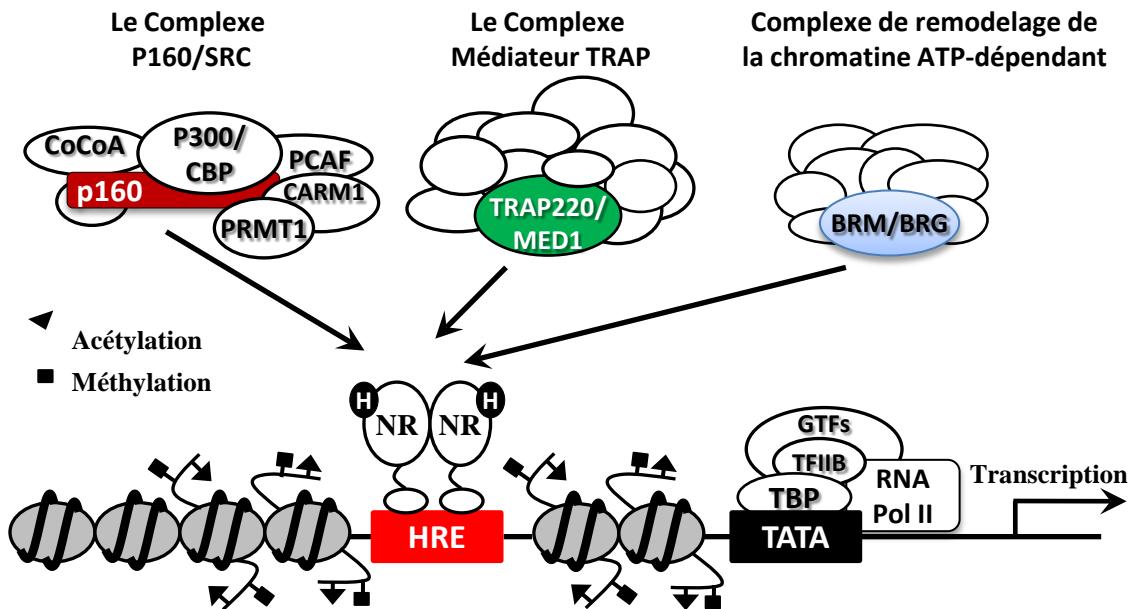


Figure 8: Plusieurs complexes de coactivateurs participent à la transcription médiée par les Récepteurs Nucléaires (NRs). Le complexe coactivateur p160/SRC possède des activités histone acétyltransférase et histone méthyltransférase qui provoquent l'acétylation et la méthylation locale des histones nucléosomiques. Le complexe SWI/SNF possède des activités de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes. Le complexe médiateur facilite le recrutement de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et les facteurs de transcription généraux (GTFs). Ces complexes coactivateurs sont recrutés par les NRs activés par les hormones fixées aux promoteurs des gènes cibles, et agissent ensemble pour remodeler la structure de la chromatine, le recrutement la machinerie générale de la transcription, et améliorer la transcription du gène cible du NR. H, hormone; HRE, *hormone response element*. Adapté d'après Kumar et O'Malley, 2008)

3.3. Les corégulateurs

Les fonctions des récepteurs nucléaires sont dues à des domaines d'activation spécifiques, appelés fonction d'activation (AF-1) localisé dans l'extrémité N-terminale et fonction d'activation (AF-2) localisée dans le domaine de liaison du ligand C-terminal (LBD) (Rosenfeld et Glass, 2001). La régulation de la transcription génique par les récepteurs nucléaires nécessite le recrutement de protéines appelées les corégulateurs. L'échange entre les corépresseurs ligand-dépendants et les coactivateurs sert de mécanisme de base pour le passage de la répression du gène à son activation (McKenna et O'Malley, 2002).

3.3.1. Les corépresseurs (*en absence du ligand*)

Les LXR α s sont des protéines acétylées au niveau des résidus K432 de LXR α et K433 de LXR β , adjacent au domaine AF2 (Li *et al.*, 2007), fixées sur l'ADN avec leur partenaire RXR ; leur capacité de transcription est inhibée par la présence de co-répresseurs comme N-CoR (*Nuclear receptor co-repressor*) (Hu *et al.*, 2003 ; Chen et Evans, 1995) et SMRT (*silencing mediator for RAR and TR*). Ces corépresseurs sont de grosses protéines qui partagent une importante homologie dans le domaine de répression de la région N-terminale et dans le domaine d'interaction au récepteur dans la région C-terminale. N-CoR et SMRT répriment la transcription en recrutant des histones désacétylases sur leurs domaines respectifs de répression. Les domaines d'interaction aux récepteurs de N-CoR et SMRT comportent des motifs constitués de petits peptides (boîtes CoRNR) qui sont à la fois nécessaires et suffisants pour les interactions avec TR et RAR (Shang *et al.*, 2000).

3.3.2. Les coactivateurs (*en présence du ligand*)

Un très grand nombre de protéines ont été identifiées comme coactivateurs potentiels des récepteurs nucléaires (**Figure 8**). Le recrutement ligand-dépendant de coactivateurs dépend de la fonction AF-2, qui se compose d'une courte séquence hélicoïdale conservée au sein de l'extrémité C-terminale du LBD (Bourguet *et al.*, 2000). Il est admis que le contact initial entre le récepteur activé et les coactivateurs est assuré en grande partie par une hélice amphipathique conservée à la surface de la plupart des coactivateurs, le motif LXXLL (où L = Leucine et X = acide aminé quelconque) ou boîte du NR (Heery *et al.*, 1997). Les coactivateurs peuvent être divisés en deux catégories générales : les protéines de la famille des membres de *switch/sucrose* non fermentescibles (SWI/SNF) et les membres de la famille des histones acétyltransférases. Les deux classes de coactivateurs ont la capacité de modifier l'environnement chromatinien en facilitant la transcription indirectement par l'atténuation des effets répressifs du contact histone-ADN. Ils peuvent également influencer directement l'activité de la machinerie basale de la transcription à travers les contacts protéine-protéine (Collingwood *et al.*, 1999; Xu, 2005).

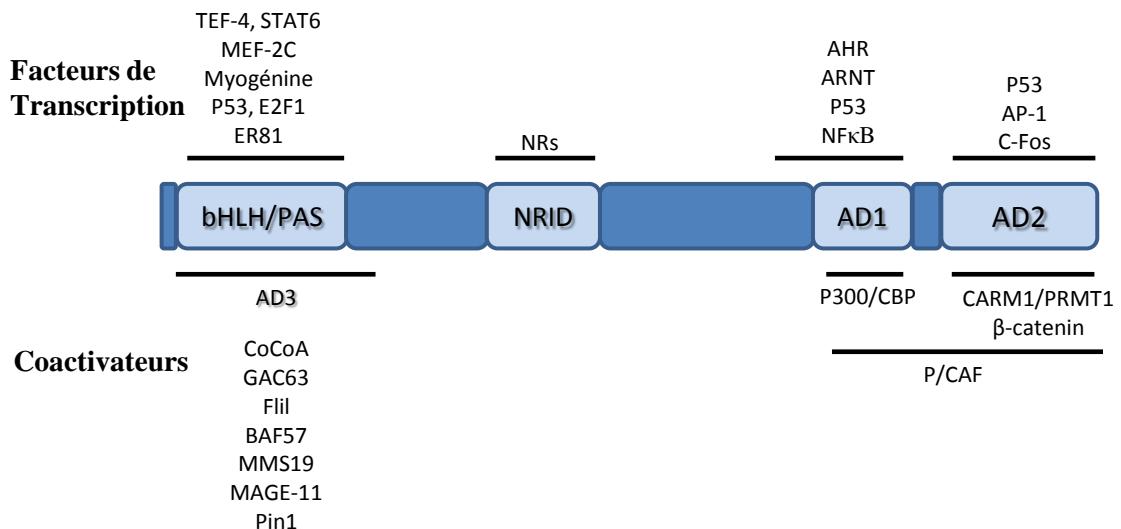


Figure 9: Les protéines d'interaction avec le SRC. SRC coactive les récepteurs nucléaires (NR) et de nombreux facteurs de transcription. Une fois attaché à la chromatine via ces interactions, SRC recrute un certain nombre de coactivateurs secondaires qui interagissent avec ses domaines d'activation (ADs). Ceci est une liste représentative de quelques-unes des protéines interagissant avec SRC, dont ces domaines d'interaction ont été cartographiés. *Adapté d'après Johnson et O'Malley, 2011.*

3.3.2.1. La famille de protéines SWI/SNF

Ces protéines ont d'abord été caractérisées comme régulateurs de l'expression des gènes dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Neigeborn et Carlson 1984). Ces facteurs sont capables d'hydrolyser l'ATP pour déstabiliser les interactions entre l'ADN et les histones, permettant ainsi un relâchement de la chromatine et facilitant l'accès à l'ADN par les facteurs de transcription. Ces facteurs agissent sous forme de complexe dont la sous-unité catalytique est toujours soit BRG-1 (*Brahma-Related Gene 1*) soit BRM (*Brahma*), agissant avec une dizaine de protéines associées (BAFs = *Brahma Associated Factors*). Une étude récente montre que BRG-1 a la capacité de se lier à l'hétérodimère RXR/LXR. Cette liaison est dépendante de la fixation sur un DR4 (Huuskonen *et al.*, 2004; Euskirchen *et al.*, 2011).

3.3.2.2. Les coactivateurs histone-acétyltransférases (HAT)

Ces facteurs ont été identifiés initialement sur la base de leur interaction avec le domaine de liaison du ligand d'une variété de récepteurs nucléaires en présence de ligands apparentés, avec des études ultérieures révélant leur activité histone-acétyltransférase (Spencer *et al.*, 1997). La famille des protéines SRCs (p160) partage de 50 à 55% de similarité de séquence, avec plusieurs domaines structuraux conservés. L'extrémité N-terminale des SRCs contient un motif bHLH-PAS (*basic helix loop helix-Per Arnt Sims*) qui est le domaine le plus conservé au sein de la famille des protéines (Figure 9, York et O'Malley, 2010). Il est impliqué dans plusieurs interactions protéine-protéine qui recrutent les coactivateurs, tels que le CoCoA (*coiled-coil coactivator*), une protéine qui agit en synergie avec CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) et p300 pour maximiser l'activation transcriptionnelle par les NRs (Kim *et al.*, 2003). La région centrale contient le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NRID). Ces SRCs contiennent trois motifs LXXLL en hélices α essentiels pour leur interaction avec NRs. La moitié C-terminale comprend deux domaines d'activation : AD1 et AD2. Ces deux domaines recrutent des coactivateurs sur le promoteur, ce qui provoque le remodelage de la chromatine d'une manière permissive pour l'activation de la transcription (Kim *et al.*, 2008).

- *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1 ou p160/NCoA-1, ERAP-160) a été le premier coactivateur identifié et est le membre fondateur de la famille SRC. *In vitro*, l'hétérodimérisation de RXR α et LXR β permet le recrutement de SRC-1, de manière dépendante de la fonction AF2 de LXR β . Cette interaction stimule la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un DR4. De plus, l'ajout d'un ligand de LXR β permet un recrutement accru de SRC-1. Une étude récente montre par ailleurs que la surexpression de SRC-1 augmente la transcription du gène *abca1* (Huuskonen *et al.*, 2004 ; Son et Lee, 2010).

- SRC-2 également connu sous le GRIP-1 (*glucocorticoid receptor interacting protein 1*) ou TIF-2 (*transcriptional intermediary factor-2*). Une étude cristallographique a par ailleurs montré une interaction directe de GRIP-1 avec à la fois LXR α et RXR β (Svensson *et al.*, 2003).
- SRC-3 a beaucoup d'autres noms comme p/CIP (*p300/CBP cointegrator associated protein*). CBP et p300 sont considérés comme des co-intégrateurs des signaux extracellulaires et intracellulaires. Huuskonen *et al.*, (2004) ont montré que p300 a la capacité de lier LXR α et de stimuler l'expression du gène *abca1*.
- D'autres facteurs comme PGC1 α (ou PPARGC1A : *PPAR-Gamma, Coactivator-1*) et TRRAP (*Transformation/Transcription Domain-Associated Protein*) ont été décrits comme coactivateurs de LXR α (Oberkofler *et al.*, 2003 ; Unno *et al.*, 2005).
- ***Les facteurs affectant la méthylation des histones : Nuclear Receptor-Activating Protein 250 (RAP250)*** ou *Activating signal cointegrator 2 (ASC-2)*, est un coactivateur de plusieurs récepteurs nucléaires et de facteurs de transcription, y compris les LXRs. Il est associé à l'histone H3 lysine 4 (H3K4) méthyltransférase (H3K4MT) MLL3 ou à son parologue MLL4 dans un complexe appelé ASCOM (ASC-2 complexe). ASC-2 se lie à de nombreux récepteurs nucléaires d'une manière ligand-dépendante par ses deux motifs LXXLL. En particulier, le second motif est impliqué spécialement dans la reconnaissance des LXRs. ASC-2 joue un rôle clé dans le déclenchement de la triméthylation H3K4 des gènes cibles de LXR en raison de la capacité de l'ASC-2-NR2 à attacher ASCOM à l'hétérodimère RXR-LXR lié aux gènes cibles LXR d'une manière ligand-dépendante (Lee *et al.*, 2008).
- ***Les facteurs affectant la méthylation des histones : Le complexe TRAP/DRIP (Thyroid Receptor-Associated Protein / Vitamin D Receptor Interacting Protein)*** : Ce complexe est capable d'interagir directement avec l'ARN polymérase de type II et a un rôle important dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription. TRAP220 est un composant du complexe DRIP/TRAP et contient deux boîtes NR (NR box-1 et -2) qui présentent des affinités différentes de liaison aux NRs. Alors que TR, VDR et PPAR interagissent avec la boîte NR-2 de TRAP220, leur partenaire d'hétérodimérisation RXR se lie spécifiquement à la boîte NR-1 (Ito et Roeder, 2001). Ainsi, il a été proposé qu'une seule molécule de TRAP220 puisse interagir simultanément avec les deux sous-unités de l'hétérodimère NR/RXR via ses deux boîtes NR. La liaison de l'un des deux partenaires de LXR sur la boîte NR-2 ou RXR sur la boîte NR-1 est suffisante pour une liaison optimale de LXR/RXR au NR1/2, indiquant que les deux récepteurs contribuent à parts égales dans cette interaction (Son et Lee, 2009).

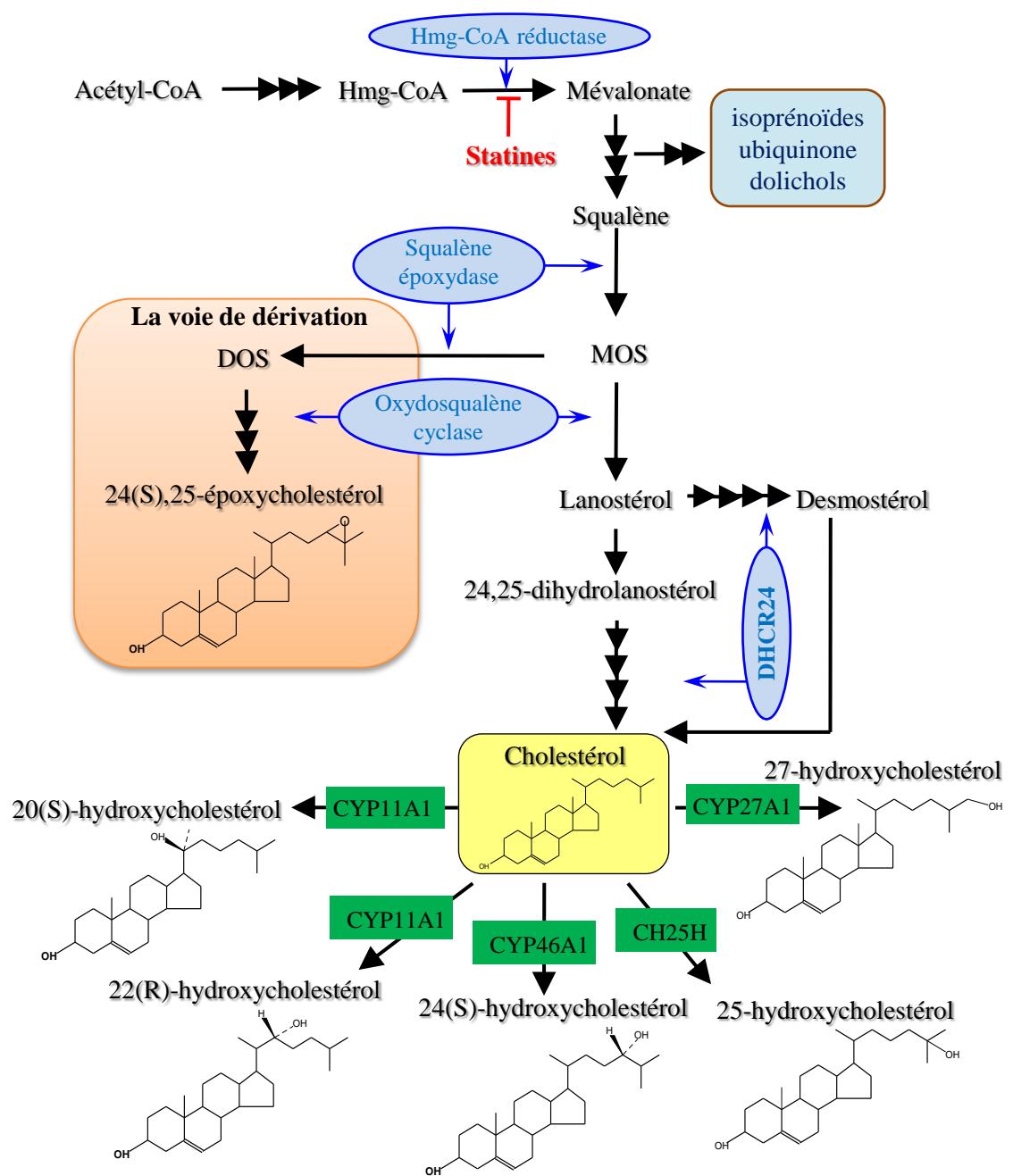


Figure 10: Synthèse et structure des oxystérols ayant une activité agoniste des LXR_s. 20 (S)-hydroxycholesterol, 22(R)-hydroxycholesterol, 24(S)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol et 27-hydroxycholesterol sont synthétisés à partir du cholestérol. Les groupes hydroxyls sont branchés dans les différentes parties de la chaîne latérale du cholestérol. Les réactions qui conduisent à leur synthèse sont catalysées par CYP11A1 à la fois pour 20(S)-hydroxycholesterol et 22(R)-hydroxycholesterol, et CYP46A1, CYP27A1, CH25H pour 24(S)-hydroxycholesterol, 25hydroxycholesterol et 27-hydroxycholesterol respectivement. 24 (S),25-époxycholestérol est synthétisé dans la «voie de dérivation» qui est parallèle et partage les mêmes enzymes avec la voie du mévalonate. Deux enzymes sont impliquées dans le contrôle de cette voie. La squalène époxydase (SE) qui synthétise le monooxydosqualène (MOS) et le dioxydosqualène (DOS). L'oxydosqualène cyclase (OSC) catalyse la première réaction de la voie conduisant à la formation du cholestérol et de 24 (S),25-époxycholestérol à partir de MOS et DOS respectivement. 24 (S),25-époxycholestérol a la même structure que celle du cholestérol avec un groupe époxy branché sur les carbones 24 et 25 de la chaîne latérale. Le desmostérol qui est converti en cholestérol par la 3β-hydroxystérol-24 Δ -réductase (DHCR24) est un ligand pour LXR. Adapté d'après Gill et al., 2008 et Ducheix et al., 2011.

3.4. Les ligands des LXR

3.4.1. Les ligands naturels : les oxystérols

3.4.1.1. Définition et origine des oxystérols

Les oxystérols ont d'abord été identifiés comme des produits d'autoxydation du cholestérol (**Figure 10**). Ils sont principalement oxydés par l'ajout d'un groupe hydroxyle ou une cétone à l'anneau B du stérol, en particulier à la 7^{ème} position. Ces composés ont été décrits au début comme des modulateurs du métabolisme du cholestérol à travers leur influence sur la séquestration des SREBPs dans le réticulum endoplasmique, ce qui limite l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol (Brown et Jessup, 1999). Il est admis que les ligands physiologiques de LXR sont certains dérivés monoxygénés du cholestérol appelés oxystérols (Janowski *et al.*, 1996).

Les oxystérols biologiques se répartissent en deux catégories principales ; ceux qui sont oxygénés sur l'anneau des stérols, principalement à la position 7 (par exemple le 7 α / β -hydropéroxycholestérol, 7-kétocholestérol et 7 α / β -hydroxycholestérol) et ceux oxygénés sur la chaîne latérale (comme le 24S-hydroxycholestérol, 25-hydroxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol). Généralement, les stérols oxygénés sur l'anneau aromatique ont tendance à être formés de façon non enzymatique, alors que les stérols oxygénés sur la chaîne latérale ont généralement une origine enzymatique. Cependant, il y a des exceptions à cette règle, car le 25HC et le 7 α HC peuvent être produits par les deux voies, enzymatique et non enzymatique (Gill *et al.*, 2008). Il existe trois sources d'oxystérols dans le corps de l'animal :

- la production endogène par des réactions enzymatiques.
- la production endogène par les espèces oxygénо-réactives non enzymatiques (ROS).
- la fourniture à partir de sources alimentaires.

3.4.1.2. Les sources enzymatiques des oxystérols

En général, les oxystérols produits par des réactions enzymatiques sont des agonistes puissants des LXR, tandis que ceux générés par des réactions non enzymatiques ont peu ou pas d'activité agonistique (**figure 11**). En effet, les oxystérols énantiomères naturels ont beaucoup plus d'affinité avec les LXR que les stéréoisomères qui ne sont pas générés de manière endogène (Janowski *et al.*, 1996). Les oxystérols générés enzymatiquement peuvent être divisés en trois groupes :

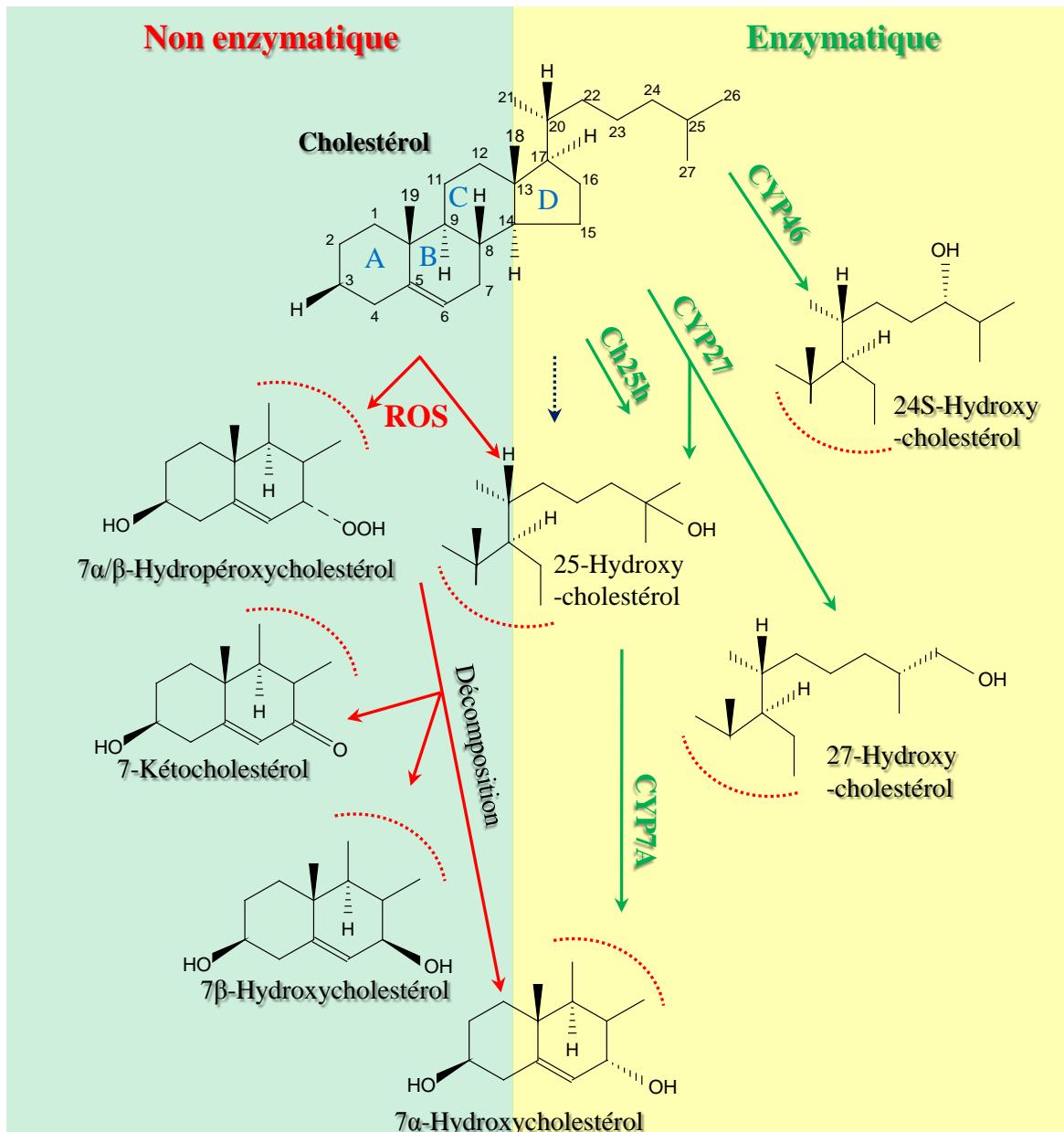


Figure 11: Sources et structures de certains oxystérols. La structure complète du cholestérol est montrée avec des anneaux en lettres (A-D) et des carbones numérotés (1-27). Les structures tronquées des oxystérols sont représentées, en insistant sur l'oxygénation supplémentaire. Ch25h, cholestérol 25-hydroxylase, une enzyme qui n'appartient pas à la famille des cytochromes P450; ROS, espèces réactives de l'oxygène. Adapté d'après Brown et Jessup, 2009.

a) Le 24(S), 25-époxycholestérol

Parmi les intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol, le 24 (S), 25-époxycholestérol jusqu'à ce jour est le seul représentant de ce groupe : c'est un agoniste puissant des LXR_s, détecté en grande quantité dans le foie et, en moindre quantité, dans de nombreux autres tissus.

b) Les intermédiaires de la stéroïdogenèse

Ce sont des composés intermédiaires dans la synthèse des hormones stéroïdes à partir du cholestérol, comme le 22 (R)-hydroxycholestérol et le 20 (S)-hydroxycholestérol. La transformation du cholestérol en prégnénolone est la première étape limitante de la stéroïdogenèse. Cette réaction est catalysée par le cytochrome P450CYP11A1, enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (P450scc), une enzyme contenue dans la membrane mitochondriale interne des tissus stéroïdogènes. Cette enzyme catalyse trois réactions consécutives menant à la transformation du cholestérol en prégnénolone ; le 22 (R)-hydroxycholestérol (22 (R)-HC) et le 20,22-dihydroxycholestérol sont des intermédiaires et des activateurs puissants des LXR_s. Le 20 (S)-hydroxycholestérol monohydroxylé est également un agoniste de LXR, mais ce composé n'est pas produit de façon endogène (Wójcicka *et al.*, 2007).

c) Les dérivés hydroxylés du cholestérol

Plusieurs composés hydroxystérols sont formés à partir du cholestérol sous l'action d'autres cytochromes P450 (CYP). La famille des dérivés du cholestérol hydroxylés connus pour activer les LXR_s comprend le 24 (S)-hydroxycholestérol, le 25-hydroxycholestérol et le 27-hydroxycholestérol.

- **24(S)-hydroxycholestérol :** également connu sous le nom de «cérébrostérol», il est l'hydroxystérol le plus abondant dans le cerveau. Il est synthétisé dans les neurones, mais pas dans les cellules gliales, par CYP46 (cholestérol 24-hydroxylase). Le 24 (S)-hydroxycholestérol joue un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol au niveau du cerveau. Comme le cholestérol ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, il ne peut pas être éliminé de cet organe par les mécanismes de transport inversés classiques impliquant les lipoprotéines à haute densité (HDL) (Lütjohann *et al.*, 1996). En revanche, le 24 (S)-HC traverse la barrière hémato-encéphalique ce qui rend la transformation du cholestérol en 24 (S)-HC la voie principale de l'efflux du cholestérol dans le cerveau. Dans le foie, le 24 (S)-HC est excrété dans la bile sous forme de conjugués sulfatés ou glucuronidés, où il est d'abord convertie en 7 α , 24 (S)-dihydroxycholestérol par la 24 hydroxycholestérol 7 α -hydroxylase microsomale (CYP39A1) ou

par la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et ensuite oxydé en acides biliaires (Li-Hawkins *et al.*, 2000).

- **Le 27-hydroxycholestérol et l'acide cholesténoïque :** Le 27-hydroxycholestérol (27-HC) est généré par la cholestérol 27-hydroxylase mitochondriale (CYP27) exprimée dans le foie et d'autres types cellulaires, dont les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. La CYP27 catalyse trois réactions d'oxydation consécutives d'un groupe méthyle C-27 en alcool (27-hydroxycholestérol), aldéhyde et acide carboxylique (*3 β -hydroxy-5-cholestenoic acid*). Dans certaines cellules, le 27-HC agit non seulement comme un ligand des LXR_s, mais peut également être impliqué dans l'efflux du cholestérol à partir des cellules d'une manière HDL indépendante (Bjorkhem *et al.*, 1994).
- **25-hydroxycholestérol :** C'est un oxystérol mineur formé par une enzyme microsomale spécifique qui n'appartient pas à la famille des CYPs, la cholestérol 25-hydroxylase, qui contient deux atomes de fer non héminique. Ensuite il est repris par le foie, hydroxylé en 7 α , 25-dihydroxycholestérol par CYP7B1, puis métabolisé en acide biliaire (Lund *et al.*, 1998).
- **4 β -hydroxycholestérol :** c'est l'un des plus importants oxystérols circulants, formé dans le foie et, éventuellement, dans l'intestin grêle par CYP3A4. Dans le foie, le 4 β -hydroxycholestérol est converti en acide biliaire à un rythme très lent car toutes les isoformes des CYPs étudiées à ce jour ont une activité très faible sur ce composé (Bodin *et al.*, 2002).
- **7 α -hydroxycholestérol :** le 7 α -hydroxycholestérol est un agoniste faible des LXR_s, alors que ses dérivés, l'acide cholique et chémodéoxycholique, sont complètement inactifs (Janowski *et al.*, 1999).

3.4.1.3. Sources non enzymatiques des oxystérols (Figure 11)

L'attaque directe du cholestérol par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), comme le radical hydroxyle, conduit à l'abstraction d'un atome d'hydrogène allylique en C-7. Le radical du carbone central généré en C-7 a une relativement longue longévité et peut réagir encore avec l'oxygène moléculaire pour former le radical cholestérol peroxyde (COO[·]). L'abstraction d'hydrogène supplémentaire d'un autre lipide génère les hydropéroxydes de cholestérol relativement stables (Brown et Jessup, 2009).

Ces oxystérols sont normalement détectés dans le plasma et les tissus à des concentrations beaucoup plus faibles que celles des produits obtenus par voies enzymatiques. Cependant, leur concentration augmente dans les conditions pathologies associées au stress oxydatif et ils peuvent exercer de nombreux effets défavorables comme l'inhibition de la vasorelaxation de l'endothélium

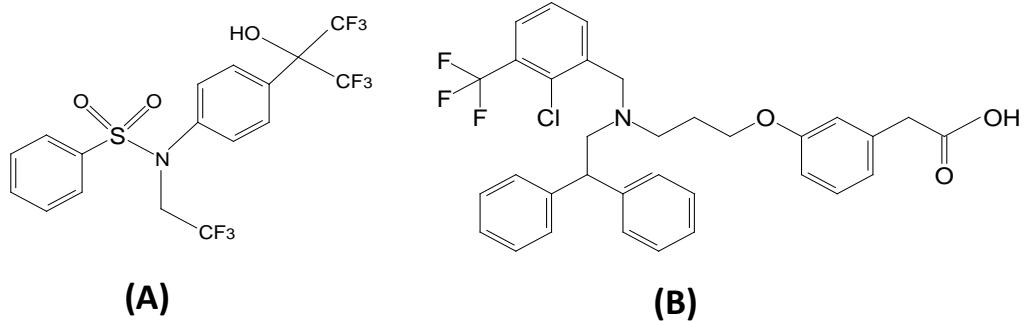


Figure 12: Structure chimique du T 0901317(A) et du GW 3965 (B).

(Kiss *et al.*, 2006), le stress du réticulum endoplasmique (Pedruzzi *et al.*, 2004) et l'apoptose (Larsson *et al.*, 2006). Ces oxystérols peuvent contribuer avec d'autres produits de peroxydation lipidique à la genèse des maladies liées au stress comme l'athérosclérose (Brown et Jessup, 1999). Enfin, ces oxystérols sont présents dans certains aliments, habituellement constituant jusqu'à 1% du cholestérol alimentaire. Les principaux oxystérols dérivés du régime alimentaire comprennent le 7-kétocholestérol, le 7α - et 7β -hydroxycholestérol, le 5α , 6α -époxycholestérol, le 5β , 6β -époxycholestérol et le cholestane 3β , $5,6\beta$ -triol. Ils proviennent probablement de l'oxydation du cholestérol par les ROS pendant la préparation et le stockage des aliments. Les oxystérols alimentaires sont absorbés dans l'intestin grêle et incorporés dans les chylomicrons. Cependant, les oxystérols d'origine alimentaire ne se lient pas aux LXR α avec une haute affinité (Janowski *et al.*, 1999).

3.4.2. Les ligands de LXR non oxystérols

3.4.2.1. Les intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol

Le desmostérol (24-déhydrocholestérol), l'un des intermédiaires dans la biosynthèse du cholestérol, est un puissant activateur des LXR α . L'inhibition de la desmostérol réductase par le *triparamol* conduit à l'augmentation de l'expression des gènes cibles des LXR due à l'accumulation endogène du desmostérol (Yang *et al.*, 2006). LXR α est aussi activé par le FF-MAS (*follicular fluid meiosis activating sterol*). Le FF-MAS d'abord isolé du liquide folliculaire préovulatoire, stimule la méiose des ovocytes chez les mammifères. C'est un intermédiaire dans la biosynthèse du cholestérol, transformé rapidement dans la plupart des cellules en T-MAS (*testis meiosis-activating sterol*). L'affinité de FF-MAS et TMAS aux LXR α est relativement faible et ces composés possèdent probablement des activités LXR indépendantes. Néanmoins, des anomalies de la fonction gonadique chez les souris dépourvues des LXR α suggèrent que la signalisation FF-MAS/T-MAS-LXR peut être importante pour la fonction gonadique (Janowski *et al.*, 1996 ; Wójcicka *et al.*, 2007).

3.4.2.2. Le glucose

Il a été suggéré que le D-glucose et le D-glucose-6-phosphate pouvaient être des ligands physiologiques des LXR α , agissant alors comme des senseurs intracellulaires du glucose (Mitro *et al.*, 2007; Anthonisen *et al.*, 2010). Cette hypothèse a depuis été invalidée (Denechaud *et al.*, 2008).

3.4.2.3. Les ligands synthétiques et naturels exogènes

Deux agonistes synthétiques non stéroïdiens des LXR α , le T0901317 et le GW3965 sont couramment utilisés dans les études expérimentales (**Figure 12**). Le T0901317 active à la fois LXR α et LXR β , alors que le GW3965 a plus d'affinité pour LXR β que pour LXR α , mais la différence est trop faible pour différencier les deux isoformes (Shang *et al.*, 2006). Le T0901317 n'est pas un agoniste totalement sélectif pour LXR, car il permet également d'activer PXR et FXR. L'affinité du T0901317

pour PXR et FXR est cependant beaucoup plus faible que pour LXR (Houck *et al.*, 2004; Shang *et al.*, 2006).

D'autres agonistes synthétiques des LXR α s sont utilisés occasionnellement, tel le APD (*Acetylpodocarpic dimer*), qui est un dérivé d'acide podocarpique isolé de la résine d'une plante, *Podocarpus* (Singh *et al.*, 2005). Un alcaloïde indole, la paxilline, produite par le champignon *Penicillium paxilli*, est le premier agoniste naturel non oxystérol des LXR α s. Son affinité pour les LXR α s est similaire à celle du 22 (R)-HC. Toutefois, la paxilline est impropre aux études *in vivo* en raison de sa toxicité (Bramlett *et al.*, 2003) : c'est une mycotoxine qui provoque de graves troubles neurologiques dus à une inhibition de canaux potassiques (Knaus *et al.*, 1994). De même, la riccardine C est un composé naturel non stéroïdiens qui agit comme un agoniste de LXR α et un antagoniste de LXR β (Tamehiro *et al.*, 2005).

Les cellules végétales ne synthétisent pas de cholestérol, mais des stérols possédant une structure chimique similaire, tels que le sitostérol, le stigmastérol, le campestérol, le brasicasterol et l'ergostérol. Les stérols des végétaux sont mal absorbés par l'intestin et inhibent l'absorption du cholestérol en le déplaçant de micelles biliaires. La supplémentation en stérols végétaux peut réduire le niveau du cholestérol plasmatique et est considéré comme une thérapie anti-athérosclérotique potentielle (Patel et Thompson, 2006). Il a été démontré que le stigmastérol est un ligand puissant des LXR α s en raison de la double liaison entre C22 et C23 dans la chaîne latérale (Yang *et al.*, 2006).

3.4.3. Les ligands antagonistes LXR

Le GGPP (*Geranylgeranyl pyrophosphate*), l'un des produits de la voie du mévalonate, inhibe l'activité transcriptionnelle de LXR α et LXR β en inhibant leur interaction avec les coactivateurs nucléaires (Gan *et al.*, 2001). Les acides gras polyinsaturés de la famille n-3 et n-6, tels que l'acide arachidonique, l'acide eicosapentaénoïque, l'acide docosahexaénoïque et l'acide linoléique, sont des antagonistes compétitifs de l'interaction entre les LXR α s et leurs ligands. En revanche, les acides gras saturés ne possèdent pas cette activité antagoniste et les acides gras monoinsaturés ont seulement une faible activité antagoniste (Ou *et al.*, 2001; Cruz-Garcia *et al.*, 2011). Le sulfonate de cholestérol oxydé, le 5 α , 6 α -époxycholestérol-3-sulfonate, normalement détecté dans le plasma humain, inhibe l'activité transcriptionnelle des LXR α s (Song *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que son énantiomère, 5 β , 6 β -époxycholestérol-3-sulfonate, n'est pas un antagoniste des LXR α s. Le 7-kétocholestérol-3-sulfonate inhibe LXR avec une puissance similaire au 5 α , 6 α -époxycholestérol-3-sulfonate. Le 5 α , 6 α -époxycholestérol-3-sulfonate est probablement un produit de l'auto-oxydation du cholestérol-3-sulfonate, le stérol sulfonné le plus abondant dans le plasma et les tissus, où il est produit par sulfonation de 5 α , 6 α -époxycholestérol par la cholestérol-sulfotransférase. La surexpression de l'enzyme cholestérol sulfotransférase inactive la signalisation LXR et réduit l'expression de gènes cibles des LXR α s tant *in vitro* que *in vivo*. Actuellement, il n'est pas clair si les dérivés sulfonés des

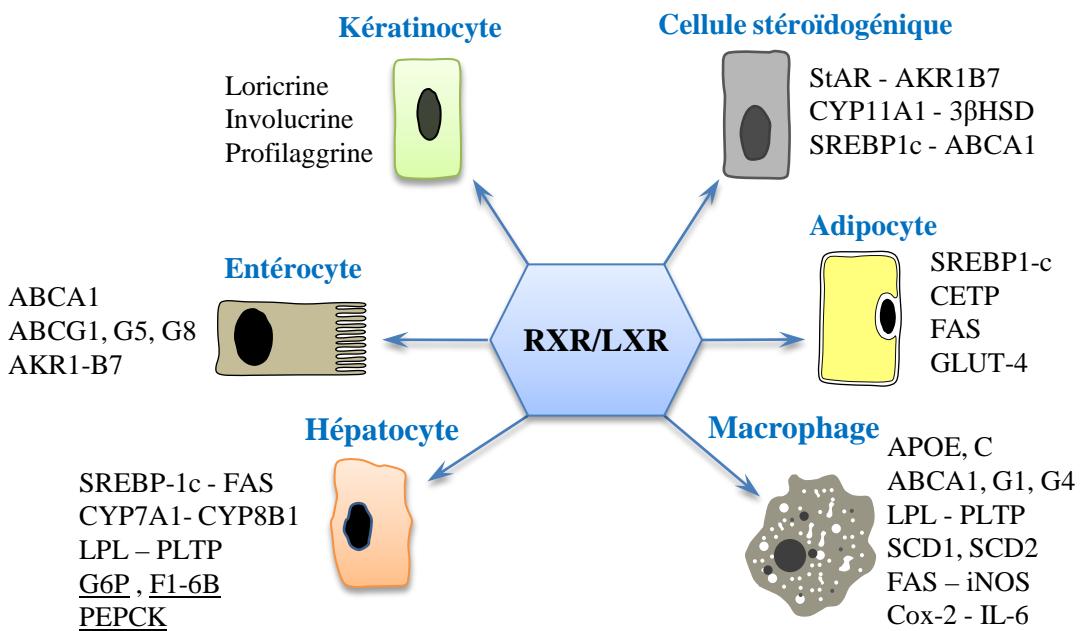


Figure 13: Certaines protéines cibles de l'hétérodimère RXR-LXR. Les différents types cellulaires sont représentés. 3β HSD, 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase; ABCA1, ABCG1, ABCG4, ABCG5 et ABCG8: membres de la famille des ATP-binding cassette; APOE, C: apolipoprotéines E et C; AKR1B7, aldo-kéto réductase famille 1, membre 7; CETP, cholesteryl-ester transfert protein; Cox2, cyclo-oxygénase 2; CYP7A1, CYP8B1: 7 α et 12 α -hydroxylases; CYP11A1, cytochrome 11A1/side chain cleavage; F1-6B, fructose 1-6 biphasphatase; SAF, fatty acid synthase; G6P, glucose-6 phosphatase; GLUT4, transporteur du glucose 4; IL6, interleukine 6, iNOS, NO synthase inducible, LPL, lipoprotéine lipase; PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase; PLTP, protéine de transfert des phospholipides; SCD1 et 2, stéaryl Co-A décarboxylases 1 et 2; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein 1c; StAR, steroidogenic acute regulatory protein. Les protéines régulées négativement sont soulignées. Adapté d'après Volle et Lobaccaro, 2007.

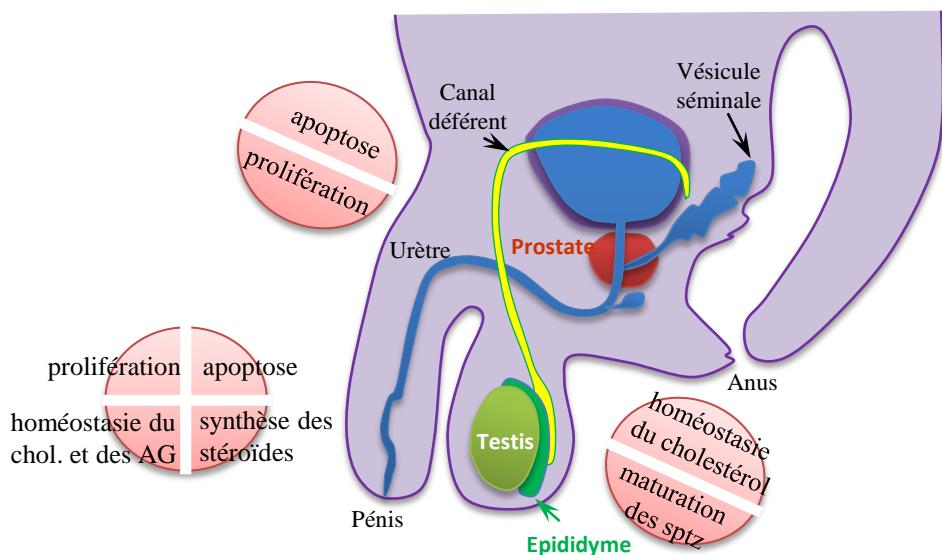


Figure 14: Rôles physiologiques des LXRs dans le tractus génital mâle. Trois organes principaux sont ciblés par les perturbations des LXRs chez la souris mâle: le testicule, l'épididyme et la prostate. Schématiquement, les LXRs régulent l'homéostasie des lipides dans le testicule et l'épididyme, ainsi que la balance apoptose-prolifération des spermatozoïdes (spz), des cellules germinales et de l'épithélium de la prostate. Chol, cholestérol; AG, acides gras. Adapté d'après El-Hajjaji et al., 2011.

oxystérols formés par voie enzymatique sont présents dans les tissus et s'ils sont aussi antagonistes des LXR α s (Chen *et al.*, 2007).

4. Les rôles physiologiques des LXR α s

Au cours des deux dernières décennies, l'identification des fonctions physiologiques des récepteurs nucléaires a été le sujet principal de recherche à travers le monde. Elle a conduit à l'élaboration de nouveaux concepts biologiques tels que «l'endocrinologie inverse» (Kliewer *et al.*, 1999). Le développement d'agonistes synthétiques et l'étude de souris déficientes en LXR α s ont abouti à la découverte des voies de signalisation nucléaires imprévues pour les oxystérols avec des importantes ramifications physiologiques et pharmacologiques. Au total, les différentes fonctions des LXR α s peuvent être schématiquement associées à plusieurs voies physiologiques (**Figure 13**).

4.1. Les LXR α s dans le système reproducteur mâle (Figure 14)

4.1.1. L'épididyme

Frenoux *et al.*, (2004) sont les premiers à avoir montrer que les souris mâles *lxr $\beta^{(-/-)}$* âgées de cinq à six mois sont moins fertiles que les souris sauvages. Cela a été associé à des anomalies de structure de l'épididyme, y compris la perturbation de l'épithélium, l'élargissement des canalicules épididymaires qui sont remplis d'une substance lipidique amorphe et l'accumulation des esters du cholestérol dans les cellules épithéliales et interstitielles. Cette accumulation résulte de la perte d'ABCA1 et d'une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales (Ouvrier *et al.*, 2009). En outre, moins de spermatozoïdes ont été trouvés dans l'épididyme des souris *lxr $\beta^{(-/-)}$* ; ces spermatozoïdes montrent des anomalies structurelles et fonctionnelles. Les souris *lxr $\alpha^{(-/-)}$* présentent des petites gouttelettes lipidiques dans les cellules de Sertoli, mais la spermatogenèse et la fertilité ne sont pas altérées. Cependant, le phénotype est plus sévère dans les souris « double KO » (*lxr $\alpha\beta^{(-/-)}$*) que dans les souris *lxr $\beta^{(-/-)}$* (Robertson *et al.*, 2005).

4.1.2. La stéroïdogénèse

L'hypothèse que LXR α pourrait réguler la production d'androgènes est venue de la baisse du niveau de la testostérone testiculaire observée chez les souris *lxr $\alpha^{(-/-)}$* et *lxr $\beta^{(-/-)}$* . L'accumulation des transcrits de 3 β hsdI (*Type 1 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase*) a été la plus importante parmi toutes celles codant les protéines stéroïdogènes, tandis que les niveaux des transcrits de StAR, CYP11A1 (*P450scC*) et CYP17 (*steroid 17 α hydroxylase*) restent sans changement. D'autre part, des concentrations plasmatiques significativement plus faibles de l'hormone lutéinisante (LH) ont été trouvées chez les souris *lxr $\alpha^{(-/-)}$* . L'administration du T0901317 augmente la teneur en testostérone dans les testicules des souris de type sauvage, corrélée à une augmentation de l'expression de StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) et de 3 β hsd (*3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*). Ces données

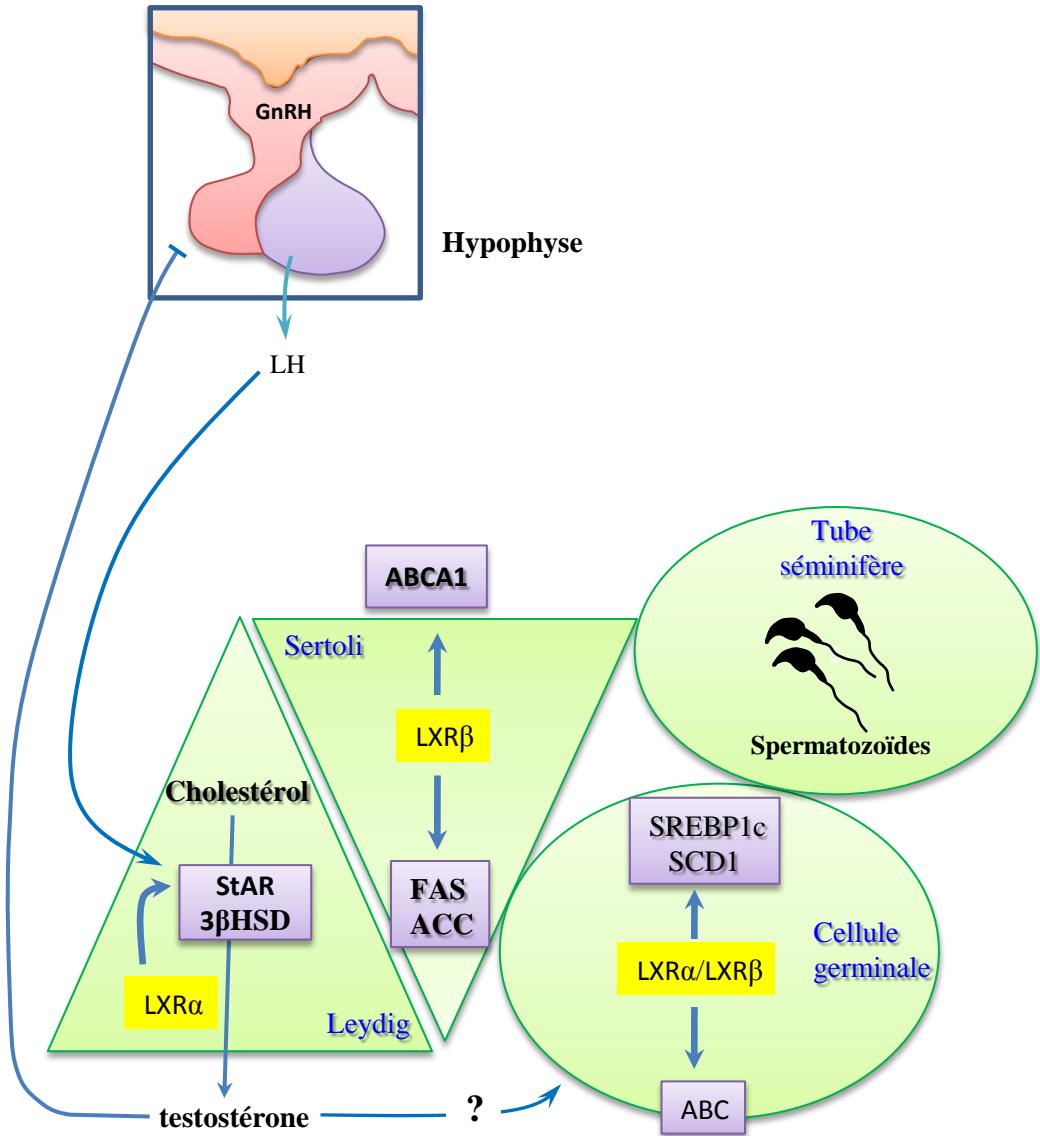


Figure 15: Un modèle représentant les rôles physiologiques des LXR dans le testicule. La production de la testostérone est régulée par LXR α au niveau testiculaire et hypophysaire par le contrôle de la sécrétion de LH. LXR β exprimé au niveau des cellules de Sertoli contrôle l'homéostasie lipidique par induction de ABCA1 et contrôle aussi la stéroïdogenèse en induisant les facteurs paracritiques. Dans les cellules germinales, LXR α et LXR β sont impliqués dans les processus de l'apoptose et la prolifération ainsi que la régulation de l'homéostasie lipidique. *Adapté d'après Volle et al., 2007.*

indiquent que LXR α régule la synthèse des stéroïdes, non seulement dans les cellules surrénales mais aussi dans les cellules de Leydig (Volle *et al.*, 2007).

4.1.3. La balance prolifération/apoptose des cellules germinales

La spermatogenèse est maintenue par un équilibre délicat entre la prolifération, la différenciation et la mort des cellules germinales. L'altération de ces processus provoque l'altération de la spermatogenèse et donc la stérilité. Les deux processus, prolifération et apoptose, ont été trouvés altérés chez les souris *lxr $\alpha\beta^{(-/-)}$* . En particulier, la prolifération des cellules germinales est réduite chez les souris *lxr $\beta^{(-/-)}$* , avec une réduction secondaire de l'apoptose. En revanche, l'apoptose est accélérée chez les souris *lxr $\alpha^{(-/-)}$* , mais cela est équilibré par l'augmentation de la prolifération (**Figure 15**). En raison de ces changements, le ratio entre la prolifération et l'apoptose est relativement perturbé dans les deux génotypes « simple KO ». En revanche, chez les souris « double KO », la prolifération est compromise et l'apoptose est augmentée en raison de l'absence de LXR β et LXR α respectivement et ces changements ne peuvent pas être compensés, ce qui conduit à une altération sévère de la spermatogenèse. Cela peut expliquer pourquoi le phénotype est beaucoup plus sévère dans les mâles « double KO » que dans les « simples KO » (Volle *et al.*, 2007).

4.1.4. L'homéostasie des lipides dans le testicule

Une partie du phénotype observé chez les souris déficientes en LXR a été corrélée avec une altération de l'homéostasie des lipides (Robertson *et al.*, 2005; Volle et Lobaccaro, 2007). Les taux d'ARNm de *Srebp1c* (*Sterol-regulatory-element-binding protein 1c*) et *Fas* (*Fatty Acid Synthase*) ont diminué de 40% chez les souris *lxr $\alpha\beta^{(-/-)}$* par rapport aux souris de type sauvage. En revanche, le niveau de *scd1* (*stearoyl CoA-desaturase 1*) a été augmenté de 2 fois chez la souris déficiente en LXR, tandis que *srb1* (*Scavenger Receptor B1*), ABCA1 et *scd 2* restent sans changement (Volle et Lobaccaro, 2007). La coloration à l'huile rouge montre une accumulation de lipides dans les cellules de Sertoli et dans les spermatides des souris LXR $^{(-/-)}$. Ces observations confirment que le métabolisme des acides gras est important pour les fonctions de reproduction. Il pourrait également être conclu que l'altération de l'homéostasie lipidique a été le premier événement de ce long processus de désorganisation du testicule des souris *lxr $\alpha\beta^{(-/-)}$* (Mascrez *et al.*, 2004 ; Volle et Lobaccaro, 2007).

4.2. Le métabolisme lipidique

4.2.1. Régulation de l'homéostasie du cholestérol

Bien que le cholestérol soit un composant essentiel des membranes cellulaires ainsi qu'un substrat pour la synthèse de l'acide biliaire et des hormones stéroïdiennes, un excès de cholestérol cellulaire peut être toxique et entraîner le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires ultérieures. Un bon contrôle de l'homéostasie du cholestérol est donc crucial. Les

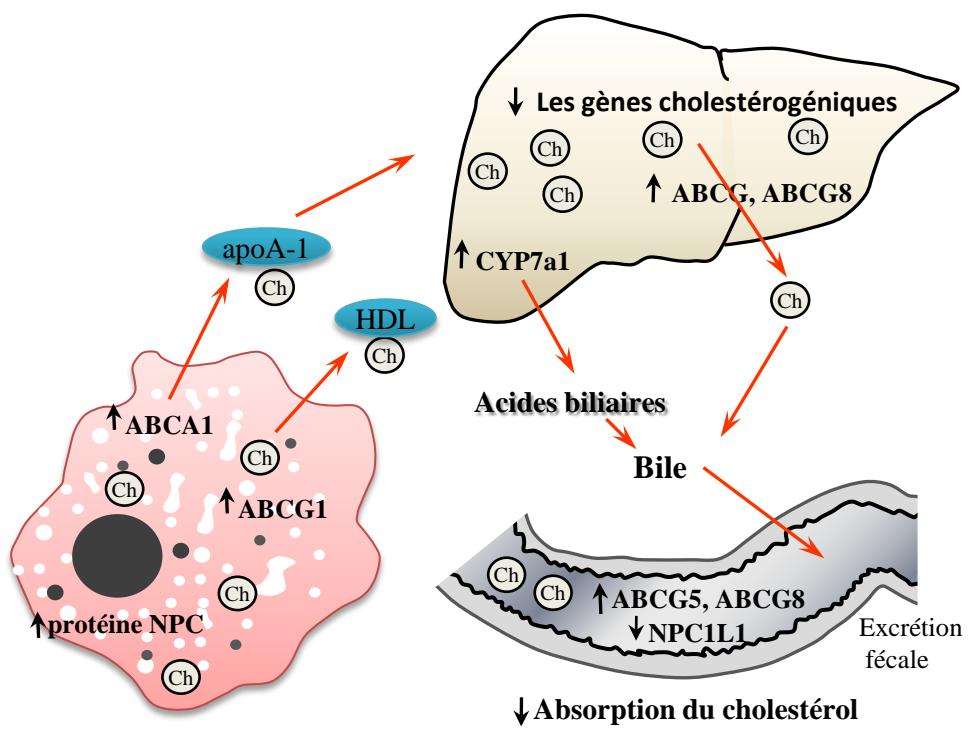


Figure 16: Rôle de LXR dans le transport et le métabolisme du cholestérol. Les gènes régulés par LXR sont indiqués. ABC, transporteurs *ATP-binding cassette*; apoA-I, apolipoprotéine A-I; Ch, cholestérol; CYP7a1, cholestérol 7- α -hydroxylase; HDL, *high density lipoprotein*; NPC protein, protéine Niemann-Pick C; NPC1L1, protéine Niemann-Pick C1 like 1. Adapté d'après Baranowski, 2008.

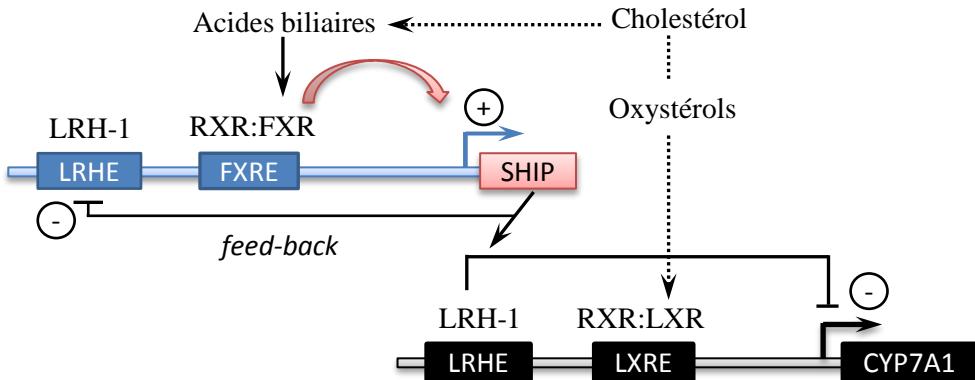


Figure 17: Contrôle de la synthèse des acides biliaires par une cascade de récepteurs nucléaires SHP, FXR, LRH-1 et LXR. Les niveaux élevés de cholestérol provoquent une augmentation de l'expression du gène CYP7A1 par liaison de l'hétérodimère RXR:LXR sur le promoteur du gène CYP7A1. Elle est suivie d'une augmentation du catabolisme du cholestérol et synthèse des acides biliaires comme un produit final. Les acides biliaires cumulés à leur tour induisent la transcription du gène SHP par fixation de l'hétérodimère RXR:FXR à un élément de réponse (FXRE) dans le promoteur du gène SHP. La protéine SHP interagit avec récepteur LRH-1 et conduit à la formation d'un hétérodimère SHP:LRH-1 inactif. Ce processus réprime l'expression du gène CYP7A1 et induit un rétrocontrôle négatif du gène de SHP due à la présence de sites de liaison de LRH-1 sur les promoteurs des deux gènes. Adapté d'après Zhang et Dufau, 2004.

LXRs régulent l'homéostasie du cholestérol en agissant sur trois voies : l'inhibition de la synthèse *de novo*, l'induction de la synthèse des acides biliaires et l'activation du transport inverse du cholestérol (Viennois *et al.*, 2011).

4.2. 2. La synthèse *de novo*

Les souris invalidées pour les récepteurs LXR α perdent leur capacité à réagir au cholestérol alimentaire et sont incapables de tolérer n'importe quel excès de cholestérol. Les souris *lxr $\alpha^{-/-}$* nourries par un régime alimentaire riche en cholestérol ne parviennent pas à induire la transcription du gène *Cyp7a* (*cholestérol 7alpha-hydroxylase*), l'enzyme limitante dans la synthèse des acides biliaires (**Figure 16**). Ce défaut est associé à une accumulation rapide de grandes quantités de cholestérol dans le foie, ce qui provoque éventuellement une insuffisance hépatique. La régulation de plusieurs autres gènes du métabolisme lipidique est également altérée chez les souris *lxr $\alpha^{-/-}$* (Peet *et al.*, 1998). Le traitement par le T0901317 montre que LXR active l'expression de la plupart des gènes de la biosynthèse des acides gras (lipogénèse) et augmente les niveaux des triglycérides plasmatiques et des phospholipides (Schultz *et al.*, 2000).

4.2.3. La synthèse des acides biliaires

La bile contient de l'eau, du cholestérol, des phospholipides (principalement phosphatidylcholine), les sels biliaires, la bilirubine et des ions bicarbonate. Les acides biliaires sont produits par le foie à partir du cholestérol et la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) est l'enzyme limitante de la voie neutre (ou classique) (**Figure 17**). Les acides biliaires sont ensuite conjugués à la glycine ou la taurine avant leur sécrétion dans la bile. La sécrétion biliaire des lipides et des sels biliaires est contrôlée par le taux de cholestérol hépatique, les phospholipides et les transporteurs des sels biliaires situés sur la membrane canaliculaire des hépatocytes (Fiévet et Staels, 2009). Les souris *lxr $\alpha^{-/-}$* développent une stéatose hépatique résultant de l'accumulation des esters de cholestérol lorsqu'elles sont nourries d'un régime riche en cholestérol (Peet *et al.*, 1998).

4.2.4. Transport inverse du cholestérol

L'excès de cholestérol est transporté par les lipoprotéines de haute densité (HDL) des tissus périphériques, tels que les macrophages, vers le foie via le compartiment plasmatique. La première étape consiste en l'absorption du cholestérol dans les cellules par des accepteurs spécifiques. Les transporteurs membranaires ABC (*ATP-binding cassette*), déclenchent la formation de l'HDL en favorisant l'efflux du cholestérol et l'association du cholestérol et des phospholipides avec des apolipoprotéines (apo) comme apo A-I et apo E (Francis *et al.*, 1995). Dans l'étape suivante, le cholestérol est estérifié par la lécithine cholestérol acyltransférase activée par l'apo A1, puis déplacé vers le centre de la particule HDL, transformant ainsi les particules discoïdales de l'HDL en particules

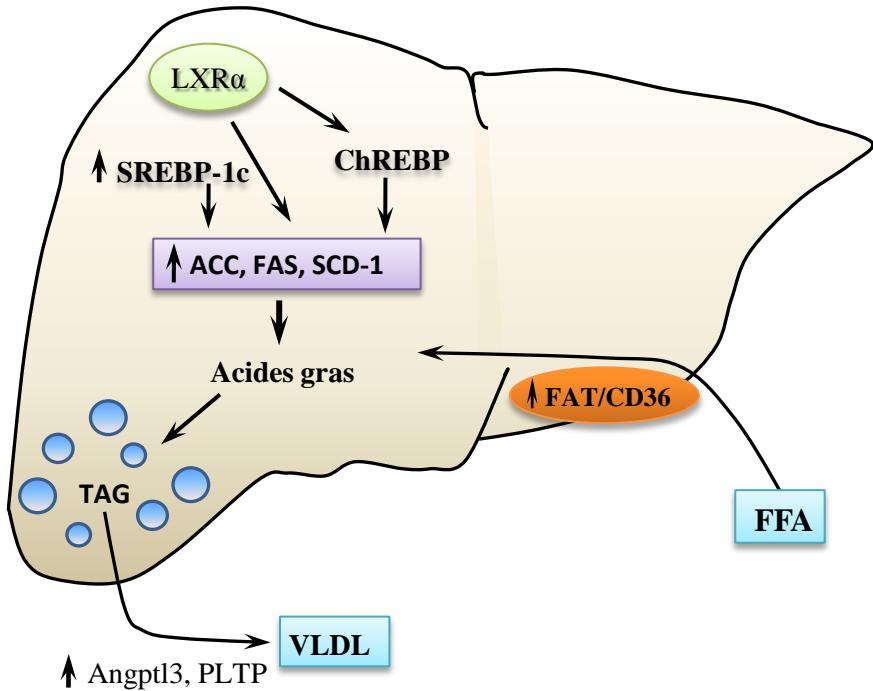


Figure 18: Stimulation de la lipogenèse par LXR dans le foie conduit à une stéatose hépatique et à une hypertriglycéridémie. Les gènes régulés par LXR sont indiqués. ACC - acétyl-CoA carboxylase; Angptl3, *angiopoietin-like protein 3*; ChREBP , *carbohydrate response element binding protein*; FAS, *fatty acid synthase*; FAT/CD36, *fatty acid translocase/CD36*; FFA, Acides gras libres; PLTP, *phospholipid transfer protein*; SCD-1 stéaroyl-CoA désaturase 1; SREBP-1c, *sterol regulatory element binding protein 1c*; TAG, triacylglycérol; VLDL, *very low density lipoprotein*. Adapté d'après Baranowski, 2008.

HDL3 sphériques. Ensuite, les HDL sont remodelées en HDL matures et leur cholestérol est repris par le foie.

En fait, l'activation de LXR augmente l'expression de *abca1*, *abcg1* et *abcg5/abcg8* en se liant au LXRE de leurs promoteurs (Costet *et al.*, 2002 ; Kennedy *et al.*, 2001). Par ailleurs, chez les souris nourries avec un régime gras, l'invalidation de LXR α et LXR β se traduit par une accumulation importante du cholestérol dans les macrophages de la rate, du poumon et de la paroi artérielle, avec une diminution de l'expression du gène *abca1* hépatique (Schuster *et al.*, 2002).

4.3. Le métabolisme des acides gras

Outre le rôle de LXR dans l'homéostasie du cholestérol, l'activation de LXR augmente également l'expression des gènes de la biosynthèse des acides gras (**Figure 18**) et augmente les niveaux de triglycérides plasmatiques (hypertriglycéridémie) (Schultz *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'activation de LXR favorise aussi l'accumulation de triglycérides dans d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires squelettiques humaines ou des cellules β pancréatiques (Choe *et al.*, 2007). Schultz *et al.* (2000) ont montré que le traitement des souris sauvages par le T09013017 augmente la teneur en triglycérides hépatiques et la concentration de triglycérides plasmatiques. Ces effets sont absents chez les souris *lxr α* ^{-/-}, mais pas chez les souris *lxr β* ^{-/-}, suggérant que LXR α est l'isoforme principale responsable de la lipogenèse hépatique et de l'effet délétère de l'activation de LXR, résultant en des niveaux élevés de triglycérides circulants (Joseph *et al.*, 2002; Hozoji-Inada *et al.*, 2011).

4.4. L'homéostasie du glucose

La protéine ChREBP (*Carbohydrate response element binding protein*) est un régulateur central de l'homéostasie des lipides et du glucose dans le foie. Il est nécessaire pour l'expression de l'enzyme pyruvate kinase du foie (L-PK) induite par le glucose et agit en synergie avec SREBP1c pour induire les gènes lipogéniques tels que le *cac* (*acetyl-CoA carboxylase*) et *fas* (*fatty acid synthase*). Même si *chrebp* est un gène cible LXR, la stimulation des LXRs ne favorise pas la phosphorylation de *chrebp* ou la localisation nucléaire, à moins que le flux de glucose intra-hépatique ne soit augmenté (Denechaud *et al.*, 2008).

Les LXRs inhibent aussi la gluconéogenèse par la diminution de l'expression des gènes codant pour des enzymes comme la *phospho-enolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), le fructose 1,6 biphosphatase (F1-6B) et la glucose-6-phosphatase (G6P). De plus, un élément de réponse de type LXRE a été identifié dans le promoteur du gène du transporteur du glucose GLUT-4 (*Glucose transporter type 4*) chez l'homme et la souris. Dans le tissu adipeux blanc, le GW3965 active l'expression du gène codant GLUT-4, cet effet semble être médié par les deux isotypes de LXR (Laffitte *et al.*, 2003; Dalen *et al.*, 2003). Il en résulte une augmentation de l'absorption et de

l'utilisation du glucose. Cependant, aucun effet important sur les concentrations circulantes d'insuline *in vivo* n'a été rapporté. Les souris *lxr $\beta^{-/-}$* et non pas *lxr $\alpha^{-/-}$* nourries avec un régime riche en graisses développent une intolérance au glucose et du diabète. Ceci suggère que l'insulinémie est principalement contrôlée par LXR β *in vivo*. Par conséquent, l'activation des LXRs diminue les concentrations du glucose circulant (Gerin *et al.*, 2005; Zitzer *et al.*, 2006).

4.5. L'inflammation et la réponse immunitaire

En 2003, Joseph *et al.*, ont montré pour la première fois que le traitement des macrophages de souris par le T0901317 et le GW3965 réduit l'expression de plusieurs protéines pro-inflammatoires induites par les lipopolysaccharides LPS, notamment l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), l'interleukine-6 (IL-6), l'interleukine-1b (IL-1b), le facteur stimulant les colonies de granulocytes (G-CSF) et la protéine chimiotactique des monocytes 1 et 3 (MCP-1 et MCP-3). L'injection de LPS induit une importante augmentation de la synthèse hépatique de TNF- α , IL-1b et iNOS et une augmentation du taux de l'IL-6 circulante chez les souris *lxr $\beta^{-/-}$* . Il a été suggéré que l'effet anti-inflammatoire de LXR est important lorsque les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques et les débris cellulaires. Le mécanisme par lequel les agonistes de LXR suppriment la transcription des gènes pro-inflammatoires n'est pas clair, mais il peut inclure l'inhibition des facteurs de transcription pro-inflammatoires comme le facteur NF-kB (*nuclear factor-kB*) ou la protéine AP-1 (*activator protein-1*) (Zelcer et Tontonoz, 2006).

La protéine réactive C ou CRP (*C-reactive protein*) est une protéine de phase aiguë synthétisée par les hépatocytes en réponse aux signaux pro-inflammatoires, en particulier les *Interleukines* IL-1b et IL-6. L'augmentation de la CRP plasmatique favorise l'athérogenèse et est un facteur prédictif des événements aigus cardiovasculaires. Le T0901317 et le GW3965 réduisent la production de CRP induite par les cytokines chez les hépatocytes humains. L'IL-1b et IL-6 activent la transcription du gène CRP en induisant la dissociation nucléaire du corépresseur de son promoteur. Les LXRs empêchent cet effet, maintenant ainsi le gène CRP dans un état réprimé (Blaschke *et al.*, 2006).

4.6. La stéroïdogénèse

Cummins, Volle *et al.*, (2006) ont souligné un rôle majeur de LXR α dans la fonction stéroïdogène des surrénales. En effet, les niveaux de la corticostérone augmentent chez les souris *lxr $\alpha^{-/-}$* comme une conséquence de l'augmentation de l'expression des protéines StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), CYP11A1 (*cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1*) et le 3 β HSD (*3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase*), trois principales protéines stéroïdogènes. Un traitement des souris avec T0901317 augmente également l'expression de ces gènes, ce qui entraîne une production accrue de corticostérone. Le traitement des souris sauvages par le T0901317 produit une forte augmentation du taux de la testostérone intratesticulaire ainsi que des transcrits de StAR et 3 β HSD, les

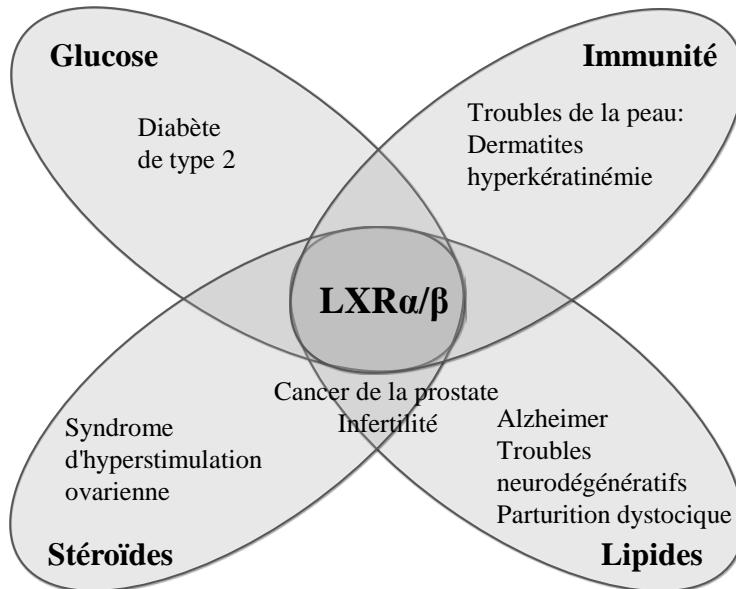


Figure 19: Rôle des LXR dans la physiologie et les maladies putatives associées: Le rôle des LXR dans le contrôle de l'homéostasie lipidique et glucidique, l'immunité et la stéroïdogenèse a été largement étudié. En outre, l'analyse des souris déficientes des LXR conduit à supposer le rôle des voies de signalisation anormales des LXR dans le développement des maladies indiquées. LXR pourrait donc être considérée comme cibles pharmacologiques intéressantes, même si de nombreux défis doivent être résolus avant l'utilisation d'agonistes de LXR chez l'homme. *Adapté d'après Viennois et al., 2011.*

deux protéines clés dans les premières étapes de la stéroïdogenèse. Cet effet est absent chez les souris invalides pour LXR α (Robertson *et al.*, 2005 ; Volle *et al.*, 2007).

4.7. La physiologie du rein

LXR α est largement exprimé le long du néphron, au moins chez le lapin. Le rôle le plus important des LXR s dans les reins semble être son implication dans la sécrétion de la rénine. L'AMPc augmente l'expression du gène de la rénine par stimulation de la liaison de LXR α au CNRE (Tamura *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2004). Il a été démontré que le T0901317 et le GW3965 augmentent les transcrits de la rénine dans le rein ainsi que l'activité de la rénine plasmatique. Bien que ces agonistes des LXR s ne provoquent pas la liaison au CNRE (Tamura *et al.*, 2000), ils peuvent stimuler la synthèse de la rénine par l'augmentation de l'expression de LXR α dans l'appareil juxtaglomérulaire par le biais d'un mécanisme autorégulateur. En outre, l'augmentation AMPc dépendante de la synthèse de rénine induite par la stimulation β -adrénnergique est totalement abolie chez les souris *lxr α* ^(-/-) et les doubles KO *lxr $\alpha\beta$* ^(-/-), mais pas chez les souris *lxr β* ^(-/-), indiquant que LXR α joue un rôle central dans la régulation de l'expression génique de la rénine par le système β -adrénnergique (Morello *et al.*, 2005).

4.8. Le système nerveux central

Les deux isotypes de LXR sont exprimés dans le cerveau, bien que LXR β soit plus abondant que LXR α . Plusieurs études ont démontré que les agonistes des LXR s augmentent l'expression de ses gènes cibles *abca1*, *abcg1* et *apoe* dans les astrocytes du cerveau, ce qui suggère que les LXR s peuvent être essentiels pour maintenir l'équilibre du cholestérol dans le cerveau (Fujiyoshi *et al.*, 2007).

5. Signalisation des LXR s dans les cas pathologiques

Dans la dernière décennie, les analyses phénotypiques des souris LXR $/-$ ont permis l'association du dysfonctionnement des voies de signalisation des LXR s avec plusieurs pathologies humaines (**Figure 19**). Il s'agit de troubles de la reproduction (apoptose des cellules germinales, défauts de parturition, effets secondaires de la fécondation *in vitro* (Mouzat *et al.*, 2007; Beltowski et Semczuk, 2011)), de troubles métaboliques (diabète de type 2 (Kase *et al.*, 2005; Faulds *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011), d'hypercholestérolémie (Wang *et al.*, 2010), d'altérations du système nerveux comme la maladie d'Alzheimer (Vega *et al.*, 2003; Björkhem *et al.*, 2006), de maladies neurodégénératives (Wang *et al.*, 2002; Leoni et Caccia, 2011), d'affections dermatologiques telles que le vieillissement de la peau (Chang *et al.*, 2008 ; Ford *et al.*, 2009), de la dermatite atopique et de cancers hormono-dépendants (ovaire, sein et prostate (Fukuchi *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2007)). Le développement d'agonistes synthétiques des LXR s a permis l'identification de nouveaux gènes cibles. Ces derniers sont impliqués dans le contrôle de divers processus physiologiques telles que la synthèse

du cholestérol et de triglycérides, la glycémie, la stéroïdogénèse et de l'inflammation (Schultz *et al.*, 2000 ; Laffitte *et al.*, 2003 ; Joseph *et al.*, 2003). Bien que les études *in vitro* aient montré que LXR α et LXR β pourraient être considérés comme des isoformes interchangeables, les analyses *in vivo* ont montré qu'ils n'ont pas de fonctions redondantes même lorsqu'ils sont exprimés dans le même type cellulaire à des niveaux similaires (Robertson *et al.*, 2005).

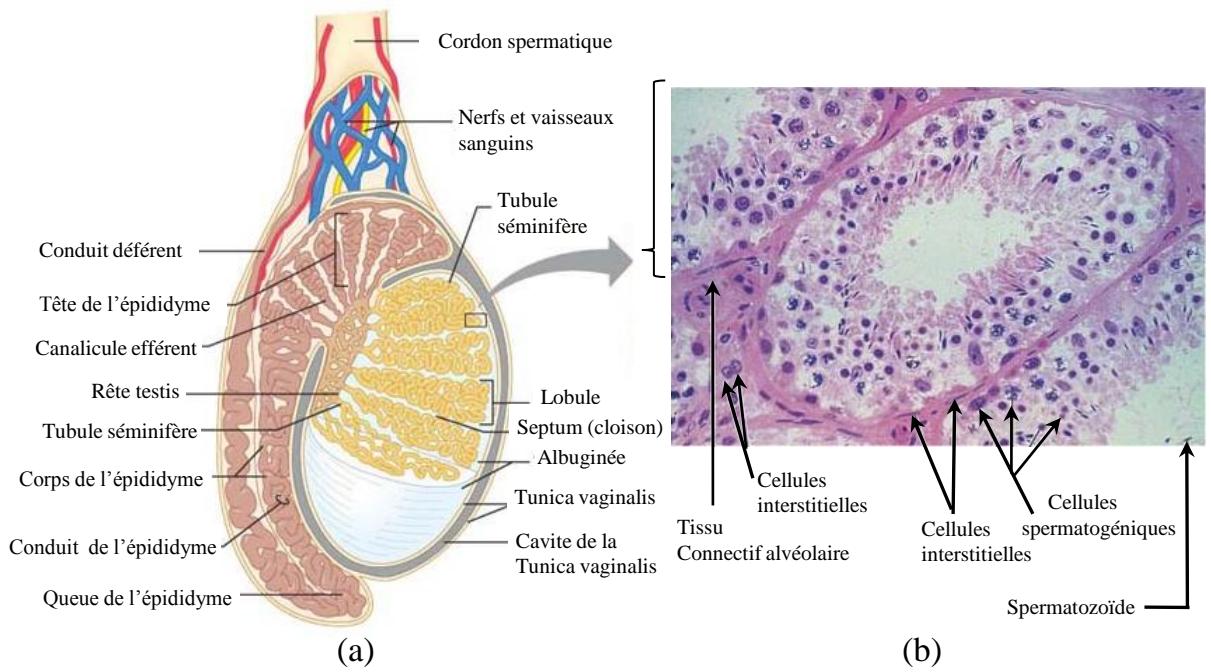


Figure 20: Structure du testicule. (a) coupe sagittale partielle à travers le testicule et l'épididyme. La face antérieure se trouve à droite. (b) coupe transversale dans les tubules séminifères (200×). Les cellules spermatogéniques (spermatogenèse) sont visibles dans l'épithélium des tubules et les cellules interstitielles dans le tissu conjonctif entre les tubules séminifères. Adapté d'après Marieb, 2006.

II. Physiologie de la fonction testiculaire

1. Structure du testicule : un aperçu général

Les testicules sont des organes pairs situés dans le scrotum à l'extérieur de la cavité abdominale. Cette situation leur permet de se maintenir à une température inférieure de 2 à 3°C à la température du corps. La face postérieure du testicule mature est en relation avec l'épididyme. Le testicule et l'épididyme sont tous les deux suspendus dans le sac scrotal par le cordon spermatique qui contient le canal déférent, l'artère spermatique et les plexus veineux et lymphatique (**Figure 20**).

Les testicules de mammifères ont deux fonctions essentielles, la production des spermatozoïdes et la synthèse des stéroïdes. Le testicule est composé de nombreux tubes séminifères et l'espace intermédiaire interstitiel, le tout entouré par une capsule de tissu conjonctif, la tunique albuginée. Les tubes séminifères sont des structures contournées, formant des boucles en épingle à cheveu, qui se jettent à ses deux extrémités dans le *rete testis*, un canal anastomosé situé au pôle vasculaire du testicule et bordé par un épithélium cuboïde. Les cellules épithéliales du *rete testis* sont activement impliquées dans l'endocytose de protéines et de petites molécules qui émanent de la lumière des tubes séminifères, ce qui entraîne une diminution de la composition en protéines observées entre le *rete testis* et le fluide des tubes séminifères. Les tubes séminifères sont bordés par un épithélium composés de cellules germinales ou spermatogonies et de cellules de la lignée somatique, les cellules de Sertoli qui servent de soutien aux cellules germinales (Fawcett, 1975).

Les tubes séminifères sont entourés par une membrane, la *tunica propria* formée de fibres de collagène et de cellules myoïdes contractiles qui participent à la propulsion des spermatozoïdes immature vers le *rete testis* (Hermo et Clermont, 1976). Chez les rongeurs et l'homme, la membrane limitante contient également les cellules du système immunitaire qui ont été identifiées comme les monocytes et les mastocytes par des caractéristiques ultra-structurales. Dans les conditions normales, ces monocytes ne se développent pas en macrophages et sont répartis de manière statistiquement quantifiable par rapport aux différentes étapes du cycle. Ils peuvent enlever les débris cellulaires découlant de l'épithélium séminifère, mais ils ne pénètrent pas dans l'épithélium lui même. A la partie terminale des tubes séminifères où ils se connectent avec le *rete testis*, appelée la zone intermédiaire (Roosen-Runge, 1961), les cellules de Sertoli sont prédominantes, mais de rares cellules germinales sont également présentes. Les grandes cellules de Sertoli allongées s'orientent vers la direction en aval et leur sommet convergent sur une autre direction distale vers le *rete testis*. Là, elles forment une structure de barrière avec une lumière étroite qui fonctionne comme une valve empêchant le reflux de substances en retour du *rete testis* dans la lumière tubulaire (Roosen-Runge, 1961 ; Hermo et Dworkin, 1988).

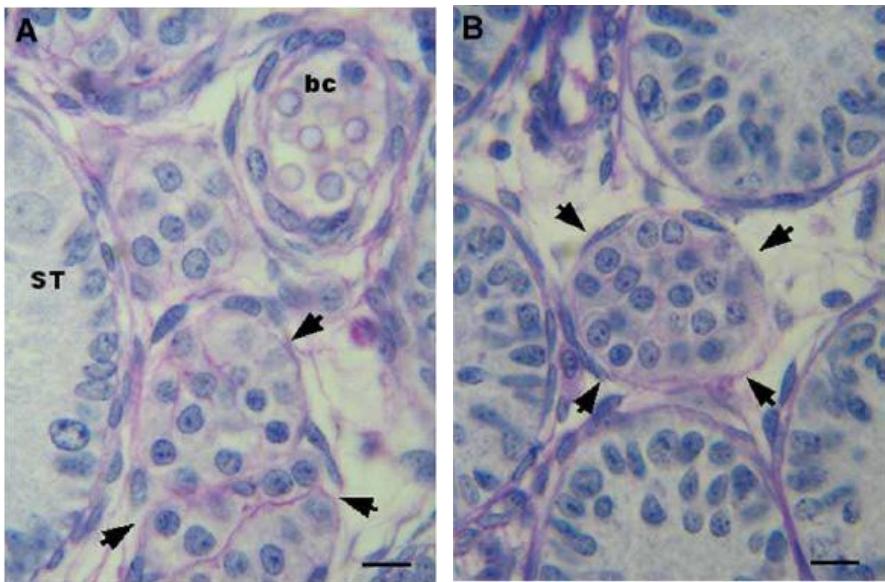


Figure 21: Les Cellules de Leydig Fœtales (FLC) dans le testicule de rat, âgés de 5 j (A, B). bar = 10 µm; coloration à l'hématoxyline. (A) Trois flèches (pointent vers un cluster de FLC dans l'espace interstitiel entre les tubes séminifères (ST). Les noyaux des cellules de Leydig sont grands et ronds avec un nucléole. Les fines lignes rouge-violet à l'intérieur et autour de l'amas des FLC indiquent la membrane basale inégale. Le cluster est entouré par les fibrocytes avec des noyaux fins minces et de capillaires sanguins (bc). (B) Quatre flèches entourent un cluster de FLCs; des fibrocytes avec des noyaux minces sont à la périphérie du cluster. Adapté d'après Payne et Hardy, 2007.

2. Organisation fonctionnelle du testicule

La spermatogenèse et la stéroïdogenèse se déroulent dans deux compartiments morphologiquement et fonctionnellement distincts l'un de l'autre. Ce sont le compartiment tubulaire, comprenant les tubes séminifères, et le compartiment interstitiel (*interstitium*) entre les tubes séminifères. Bien qu'anatomiquement séparés, les deux compartiments sont étroitement liés l'un de l'autre. Pour la production normale de spermatozoïdes, l'intégrité des deux compartiments est nécessaire. La fonction du testicule et donc aussi la fonction de ces compartiments sont contrôlées par l'hypothalamus et l'hypophyse (régulation endocrine). Ces effets endocriniens sont modulés au niveau testiculaire par des mécanismes de contrôle local (facteurs paracrines et autocrines).

2.1. Le compartiment interstitiel

Les cellules les plus importantes de ce compartiment sont les cellules de Leydig. Ces cellules sont la source de la testostérone testiculaire et de l'*insuline-like facteur 3* (INSL3). Le compartiment interstitiel contient aussi des cellules immunitaires, les vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs, les fibroblastes et un tissu conjonctif lâche. Chez les animaux d'expérimentation, ce compartiment correspond à environ 2,6% du volume testiculaire total (Ge et Hardy, 1997).

2.1.1. Les cellules de Leydig

Ces cellules ont d'abord été décrites en 1850 par Franz Leydig (1821-1908). Les cellules de Leydig produisent et sécrètent l'hormone sexuelle mâle la plus importante, la testostérone. D'un point de vue morphologique, fonctionnel et développemental, différents types cellulaires peuvent être distingués : les cellules souches de Leydig et les cellules progénitrices de Leydig. Les cellules de Leydig fœtales sont les cellules différenciées chez le fœtus et les cellules de Leydig adultes sont les cellules de Leydig différenciées (Ge et Hardy, 1997).

Les cellules de Leydig adultes sont riches en réticulum endoplasmique lisse et en mitochondries. Ces caractéristiques physiologiques sont typiques de cellules productrices de stéroïdes et sont très semblables à celles retrouvées dans d'autres cellules stéroïdogènes (la glande surrénale et l'ovaire). D'autres composants cytoplasmiques importants sont retrouvés comme les granules de lipofuscine, le produit final de l'endocytose et la dégradation lysosomiale et les gouttelettes lipidiques, dans lesquelles se déroulent les étapes préliminaires de la synthèse de la testostérone. Le taux de prolifération des cellules de Leydig dans le testicule adulte est plutôt faible et est influencé par la sécrétion de LH.

2.1.1.1. Les cellules de Leydig fœtales

La cellule de Leydig fœtale (**Figure 21**) (FLC ; *fetal Leydig cell*) commence à apparaître dans le mésenchyme du testicule en développement immédiatement après la formation des cordons

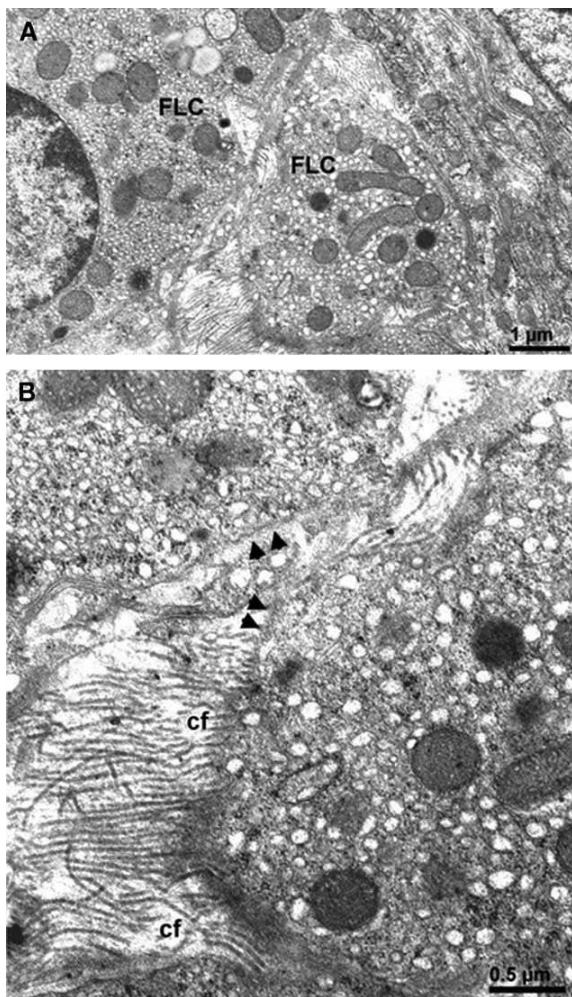


Figure 22: Ultrastructure de deux cellules de Leydig fœtales (FLC) âgées de 10 PND. Les FLCs contiennent des mitochondries tubulo-vésiculaires et le réticulum endoplasmique lisse. Le centre de la partie (A) est agrandi en (B). (B) Les flèches courtes montrent la lame basale autour des FLCs. Les fibres de collagène (FC) sont attachées à la lame basale ainsi que de la membrane plasmique de la FLC. *Adapté d'après Payne et Hardy, 2007.*

testiculaires à partir du 14,5^{ème} jour fœtal (14,5 FD ; *fetal Day*) chez le rat et 12,5 FD chez la souris, jusqu'au jour post-natal 25 (PND ; *postnatal day*), identifié par la présence de 3 β -HSD et du récepteur de l'hormone lutéinisante (*R-LH*). Les FLC sont arrangeées exclusivement en groupes (*clusters*) dans l'espace interstitiel entre les tubes séminifères. Un *cluster* typique des FLC présente les caractéristiques suivantes : des cellules de Leydig de forme ronde et large ou ovale munies d'un noyau rond remarquable avec le plus souvent un nucléole (**Figure 22**). Des rares mitoses sont observées dans les *clusters* qui sont entourés par une mince enveloppe de fibrocytes. Dans la plupart des cas, les *clusters* se trouvent à proximité des capillaires sanguins interstitiels (Chen *et al.*, 2009).

Les *clusters* des FLC changent de taille et de forme pendant la période entre le 15 FD et 25 PND. Au début, les *clusters* sont très grands avec une forme irrégulière occupant presque tout l'espace interstitiel laissé par les cordons testiculaires. La coïncidence temporelle de la formation des cordons testiculaires et la différenciation des FLC dans le testicule fœtal suggèrent que les cellules péritubulaires contribuent au déclenchement des mécanismes qui initient la différenciation des FLC via les facteurs paracitines (Skinner, 2001). Le niveau maximum de croissance des FLC est observé au 19^{ème} FD. Par la suite, par exemple, dans le PND-1, les grands complexes sont dispersés en plusieurs petits groupes qui occupent l'espace interstitiel. Le nombre des *clusters* des FLC diminue progressivement à partir du PND 5, de sorte que 5 à 7 *clusters* seulement sont observés dans une section du testicule au 10^{ème} PND et de 3 à 4 *clusters* au 15^{ème} PND 15. Un ou rarement deux *clusters* seulement sont présents au 25^{ème} PND (Ziegler *et al.*, 1983).

L'origine des précurseurs des FLCs a été au cœur du débat depuis des années. Les FLCs pourraient provenir de quatre sources possibles : le primordium surrénalien gonadique (mésoderme), la crête neurale (neuroectoderme), le mésonéphros (mésoderme) et l'épithélium cœlomique (endoderme) (Byskov, 1986 ; Chen *et al.*, 2010 ; DeFalco *et al.*, 2011). Le déclin des FLCs après la naissance a conduit certains chercheurs à s'interroger sur leur sort chez les adultes. Chez les rats, il a été suggéré que les FLCs pourraient soit subir une dégénérescence (Kuopio *et al.*, 1989), se transformer en FLCs adultes (Mendis-Handagama *et al.*, 1998) ou persister dans le testicule adulte avec la population de cellules de Leydig adultes (Kerr et Knell, 1988; Siril Ariyaratne *et al.*, 2000).

➤ *La fonction stéroïdogène des FLCs*

L'ontogenèse de la 3 β -HSD atteint un niveau maximum à FD 19 et présente une forte diminution immédiatement après la naissance. La cinétique de la synthèse de la testostérone dans les FLCs coïncide avec le comportement ontogénique de 3 β -HSD dans les études histochimiques (Dupont *et al.*, 1993 ; Habert et Brignaschi, 1991). En outre, la présence histochimique et l'expression ontogénique de 3 α -HSD et 17 β -HSD dans le FLC ont été rapportées. Les études histochimiques montrent que les activités oxydatives des 11 β -HSD type 1 et 2 sont absentes dans les FLCs (Schäfers *et al.*, 2001). L'expression des récepteurs de LH dans les FLCs commence au 15,5^{ème} FD et augmente à

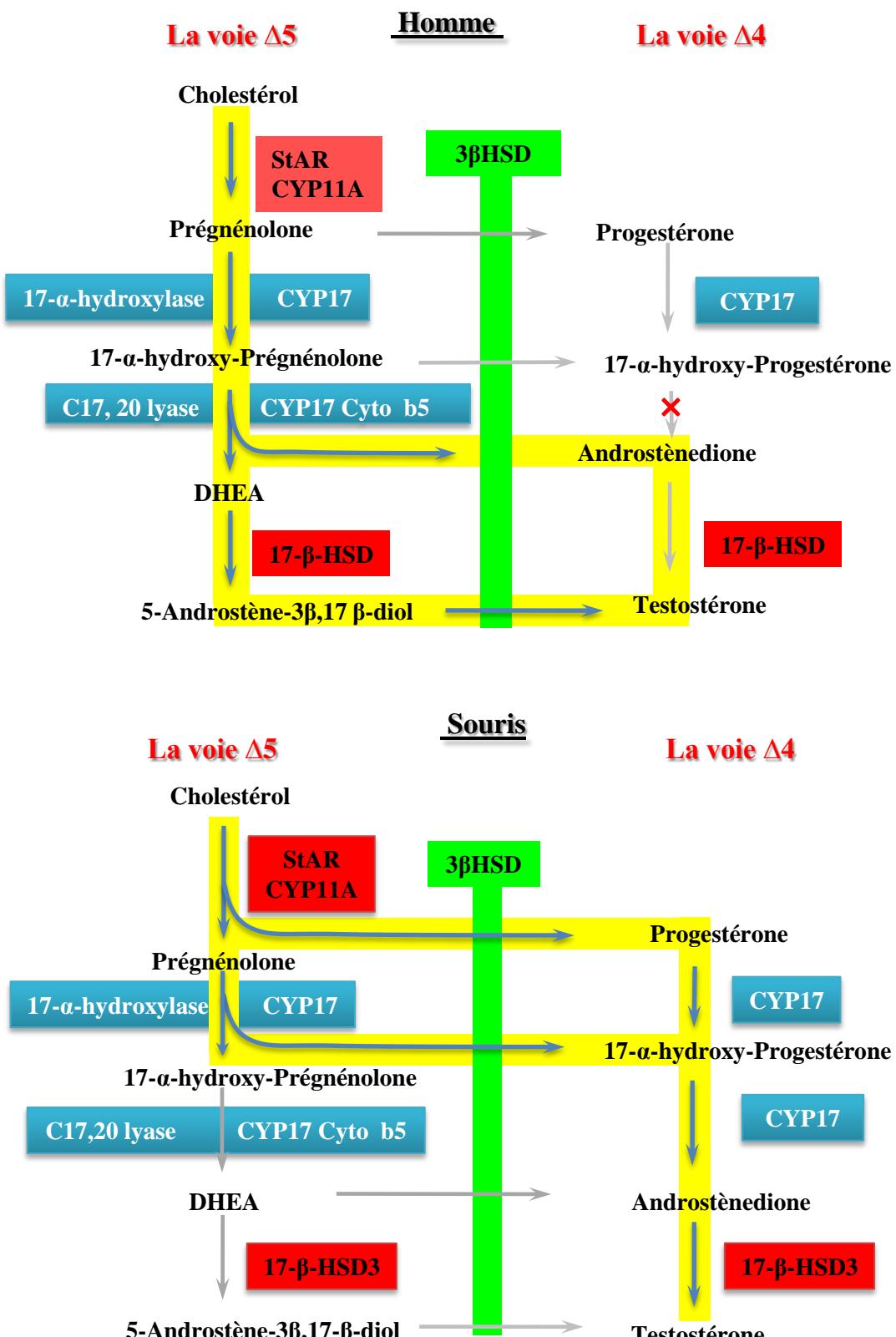


Figure 23: Schéma des principaux composants de la stéroïdogenèse chez l'homme (en haut) et le rat (en bas) dans la cellule de Leydig fœtale. Les flèches jaunes indiquent les voies préférées de la stéroïdogenèse, qui diffèrent entre l'homme et le rat; il reste un degré de flexibilité dans les voies qui peut être utilisé. La croix (✗) rouge dans le schéma en haut indique que cette réaction ne se déroule pas chez l'homme. Adapté d'après Hayley et al., 2009.

partir le 18,5^{ème} FD. Le SF-1(*steroidogenic factor 1*) est présent dans les FLCs différenciés ainsi que dans leurs précurseurs dans le testicule de rat (Majdic et Saunders, 1996). Le récepteur aux androgènes est absent dans les FLCs, mais présent dans les cellules péritubulaires à partir du FD 16,5. Les FLCs produisent une gamme de molécules variant des stéroïdes à des cytokines. Parmi ces molécules, les fonctions des androgènes (**Figure 23**) et d'INSL-3 sont les plus critiques et les mieux définies. Les androgènes produits par les FLCs régulent la différenciation des organes génitaux externes et des canaux de Wolff. Les androgènes et l'INSL-3 sont également impliqués dans la descente des testicules (Majdic *et al.*, 1995)

2.1.1.2. Les cellules de Leydig adultes

Hardy *et al.*, (1989) ont subdivisé la différenciation des ALCs (*Adult Leydig Cells*) du rat en trois stades, qui sont :

- **Le stade progéniteur ; PLC (Progenitor Leydig Cell)** : les cellules de Leydig dérivent des *mesenchymal-like fibroblasts* (PND 13-28) et produisent l'androstérone comme produit final prédominant.
- **Le stade immature ; ILC (Immature Leydig Cell)** : les cellules de Leydig produisent de petites quantités de testostérone à partir de PND 35 et métabolisent la plupart de la testostérone, le produit final prédominant est le 5α-androstane-3α, 17 β-diol.
- **Le stade mature** : les cellules de Leydig produisent activement la testostérone comme produit final d'androgènes et sont entièrement fonctionnelles chez l'animal qui atteint la maturité sexuelle au 90^{ème} PND (Shan et Hardy, 1992).

a) Structure des progéniteurs des ALCs

Les cellules progénitrices des ALCs (PLC, *Progenitor Leydig Cell*) dérivent de fibroblastes péritubulaires et périvasculaires dans le testicule de rat (**Figure 24**). Les fibroblastes péritubulaires semblent être la source principale de PLC pendant l'ontogenèse (Haider, 2004). Pendant les 10 à 13 PND, la *lamina propria* se trouve composée de deux couches de fibroblastes mésenchymateux : externe et interne. La couche externe, orientée vers l'interstitium fournit les progéniteurs des ALCs, identifiés par la présence de 3β-HSD et de R-LH. La formation des PLCs commence dans l'espace péritubulaire, entre le 10 et 13 PND. Après 2 à 4 jours dans l'espace périvasculaire, les fibroblastes mésenchymateux autour des vaisseaux sanguins commencent à exprimer la 3β-HSD (Kerr et Knell, 1988). À partir du 10^{ème} à 13^{ème} PND, les cellules dans la couche externe des cellules péritubulaires montrent des caractéristiques supplémentaires : réticulum endoplasmique lisse, mitochondries tubulo-vésiculaires, gouttelettes lipidiques typiques d'une cellule synthétisant des stéroïdes. Les PLCs expriment les récepteurs de LH et aux androgènes, 3β-HSD, 3α-HSD et 17β-HSD (Chiwakata *et al.*, 1991 ; Mendis-Handagama *et al.*, 1998). La destruction complète des ALCs après le traitement au

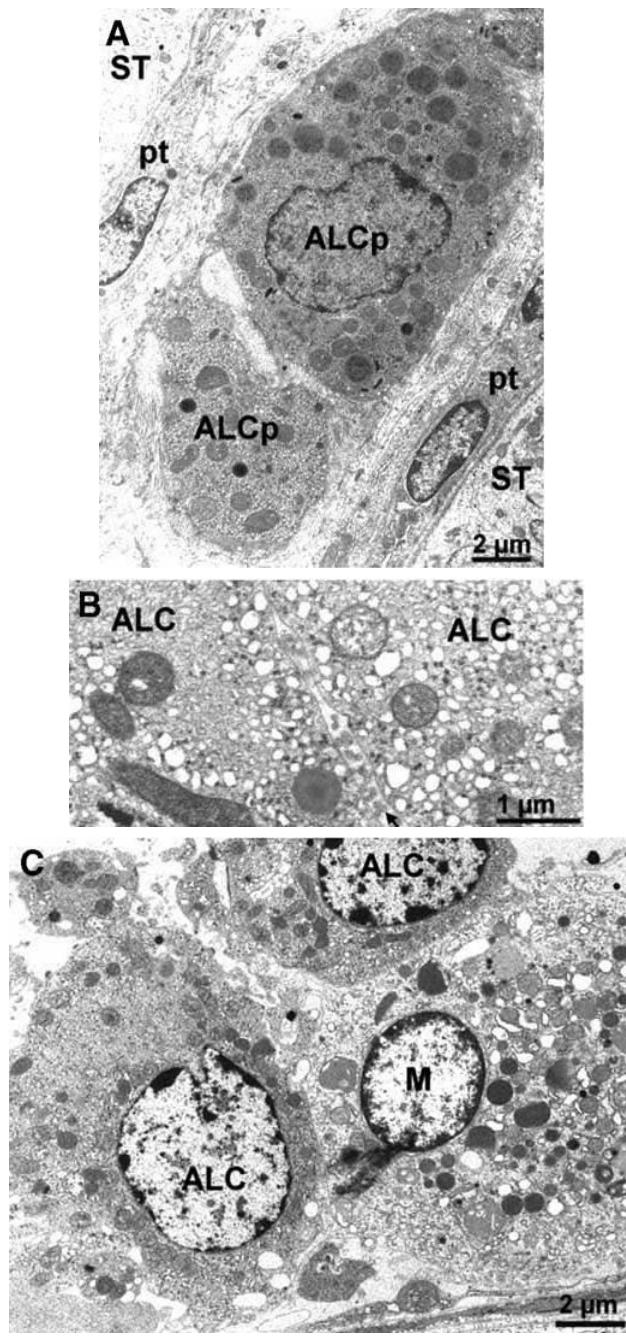


Figure 24: (A) Ultrastructure des progéniteurs des cellules de Leydig adultes (ALCs) âgées de 15 j. (B) Une cellule de Leydig immature avec des mitochondries tubulaires et le réticulum endoplasmique lisse de souris âgées de 50 PND. Des vésicules de sécrétion abondantes (flèche) entre deux ALCs adjacentes. (C) Deux cellules de Leydig mature avec un macrophage (M) de souris âgées de 100 PND. Adapté d'après Payne et Hardy, 2007.

diéthylstilbestrol est suivie par une régénération des ALCs nouvellement formées ; ainsi les péricytes et cellules musculaires lisses vasculaires semblent fournir les progéniteurs des ALCs (Middendorff *et al.*, 1993).

b) Structure des cellules de Leydig immatures et les cellules de Leydig matures.

Les cellules de Leydig immatures (ILCs) sont à la différence des PLCs ovales ou presque rondes avec un noyau rond et un cytoplasme acidophile (éosinophile) et sont présentes du 25^{ème} au 35^{ème} PND chez le rat (**Figure 25**). Contrairement aux FLCs, les ALCs immatures ainsi que les ALCs matures ne sont pas disposés exclusivement en *clusters*. Les PLCs péritubulaires et périvasculaires augmentent de taille et change leur forme de mince à ovale ou ronde. Au cours de la transition en ILCs, les PLCs péritubulaires s'éloignent des tubules séminifères vers l'interstitium, en cherchant préférablement une place en étroite association avec les capillaires sanguins. Le mécanisme cellulaire et moléculaire qui initie et régule le mouvement des PLCs péritubulaires vers l'interstitium est mal connu. Les noyaux des ALCs immatures et des ALCs matures sont grands et ronds avec une euchromatine condensée et un ou deux nucléoles. Le cytoplasme est très riche en réticulum endoplasmique lisse, un grand nombre de mitochondries tubulovésiculaires, un appareil de Golgi bien différencié et quelques petites gouttelettes lipidiques d'un diamètre moyen de 0,5 µm (Davidoff *et al.*, 1999; Haider, 2004)

c) Fonction stéroïdogène des ALCs

Les ALCs immatures ainsi que les ALCs matures expriment R-LH, 3 β -HSD, 3 α -HSD, 17 β -HSD et le 11 β -HSD à partir du 30^{ème} PND (Shinoda *et al.*, 1995 ; Nishino *et al.*, 2001 ; Jeays-Ward *et al.*, 2003). Chez le rat, les activités des enzymes P450scc, 3 β -HSD et P450c17 augmentent rapidement dans les ILCs à partir du 28 à 56 PND (Dupont *et al.*, 1993). Cependant, l'activité de 17 β -HSD reste faible jusqu'au 36 PND et par conséquent, la capacité des ILCs à produire la testostérone est considérablement plus faible que chez les ALCs (Wilson *et al.*, 2002). Un autre aspect du métabolisme des stéroïdes dans les ILCs par rapport aux FLCs et aux ALCs est la présence de taux élevés des enzymes métabolisant la testostérone telles que la 5 α -réductase et la 3 α -HSD. Par conséquent, ces cellules produisent des androgènes essentiellement 5 α -réduits tels que l'androstane-3, 17- β -diol et l'androstènediol au lieu de la testostérone (Murono et Washburn, 1989).

La capacité à sécréter la testostérone augmente de façon significative dans les ALCs matures parce qu'elles acquièrent plus d'organites nécessaires à la production de stéroïdes et une réactivité accrue à la LH circulante. Ceci est probablement dû à l'acquisition d'un plus grand nombre de récepteurs de LH (Shan et Hardy, 1992). Avec l'augmentation progressive du volume des organites dont le réticulum endoplasmique lisse, ces cellules acquièrent plus d'activité enzymatique stéroïdogène, en particulier 17 β -HSD qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de la

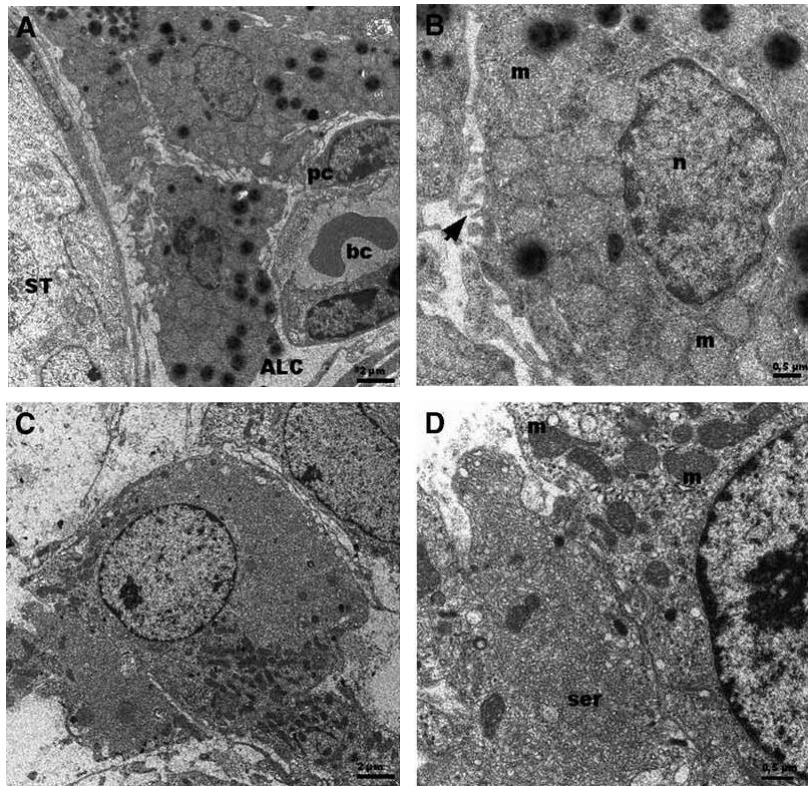


Figure 25: Ultrastructure des cellules de Leydig adultes (ALCs) d'une souris (A, B) et d'un singe marmouset du nouveau monde (C, D). (A) les ALCs, les tubules séminifères (ST), capillaires sanguins (C.B.) et pencyte (pc). La partie centrale supérieure de (A) est agrandie en (B). (B) Les mitochondries de type vésiculaire (m) sont dominantes, le noyau (n). Les vésicules de sécrétion (flèche) sont accolées à la membrane cellulaire. (C) ALC de marmoset. Les mitochondries sont situées principalement dans la partie inférieure et le réticulum endoplasmique lisse dans la partie supérieure de la cellule. La partie gauche de la photo (C) est amplifiée dans (D). (D) Réticulum endoplasmique lisse (SER) et les mitochondries (m). *Adapté d'après Payne et Hardy, 2007.*

testostérone. Une perte considérable d'enzymes métabolisant la testostérone se produit durant cette période, ce qui contribue également à l'augmentation de la capacité de sécrétion de la testostérone testiculaire par les ALCs matures. Avec l'accomplissement de cette transition, la puberté est atteinte (Luu-The , 2008).

2.1.2. Les macrophages, les lymphocytes et les fibres nerveuses

Outre les cellules de Leydig, le compartiment interstitiel contient aussi des cellules appartenant au système immunitaire : les macrophages et les lymphocytes. Les macrophages influencent probablement la fonction des cellules de Leydig, en particulier leur prolifération, différenciation et la production de stéroïdes, à travers la sécrétion de cytokines. Les macrophages sécrètent des stimulateurs et des inhibiteurs de la stéroïdogenèse. Les cytokines pro-inflammatoires, les espèces réactives de l'oxygène, l'oxyde nitrique et les prostaglandines peuvent inhiber la fonction des cellules de Leydig. Les neurotransmetteurs et des facteurs liés à la signalisation sont impliqués lors de la régulation des fonctions cellulaires de Leydig (Mayerhofer *et al.*, 1999).

2.2. Le compartiment tubulaire

La spermatogenèse se déroule dans le compartiment tubulaire. Ce compartiment représente environ 60-80% du volume testiculaire total. Il contient les cellules germinales et deux types différents de cellules somatiques, les cellules péritubulaires et les cellules de Sertoli.

2.2.1. Les cellules péritubulaires

Les tubes séminifères sont couverts par la *lamina propria*, qui se compose d'une membrane basale, une couche de collagène et les cellules péritubulaires (myofibroblastes). Ces cellules sont alignées autour des tubules et forment des couches concentriques qui sont séparées par des couches de collagène. Les cellules péritubulaires produisent plusieurs facteurs qui sont impliqués dans la contractilité cellulaire : panactine, desmine, gelsoline et la myosine et l'actine du muscle lisse. (Holstein *et al.*, 1996). Ces cellules sécrètent également la matrice extracellulaire et les facteurs typiquement exprimé par les cellules des tissus conjonctifs : le collagène, la laminine, la vimentine, la fibronectine, les facteurs de croissance, les protéines des fibroblastes et les molécules d'adhésion (Albrecht *et al.*, 2006; Schell *et al.*, 2008).

2.2.2. Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont des cellules somatiques situées dans l'épithélium germinatif. À l'âge adulte, ces cellules sont mitotiquement inactives. Elles sont nommées d'après Enrico Sertoli (1842-1910), le savant italien qui fut le premier à décrire ces cellules en 1865. Ces cellules sont situées sur la membrane basale et s'étendent vers la lumière des tubes séminifères. Le long du corps cellulaire,

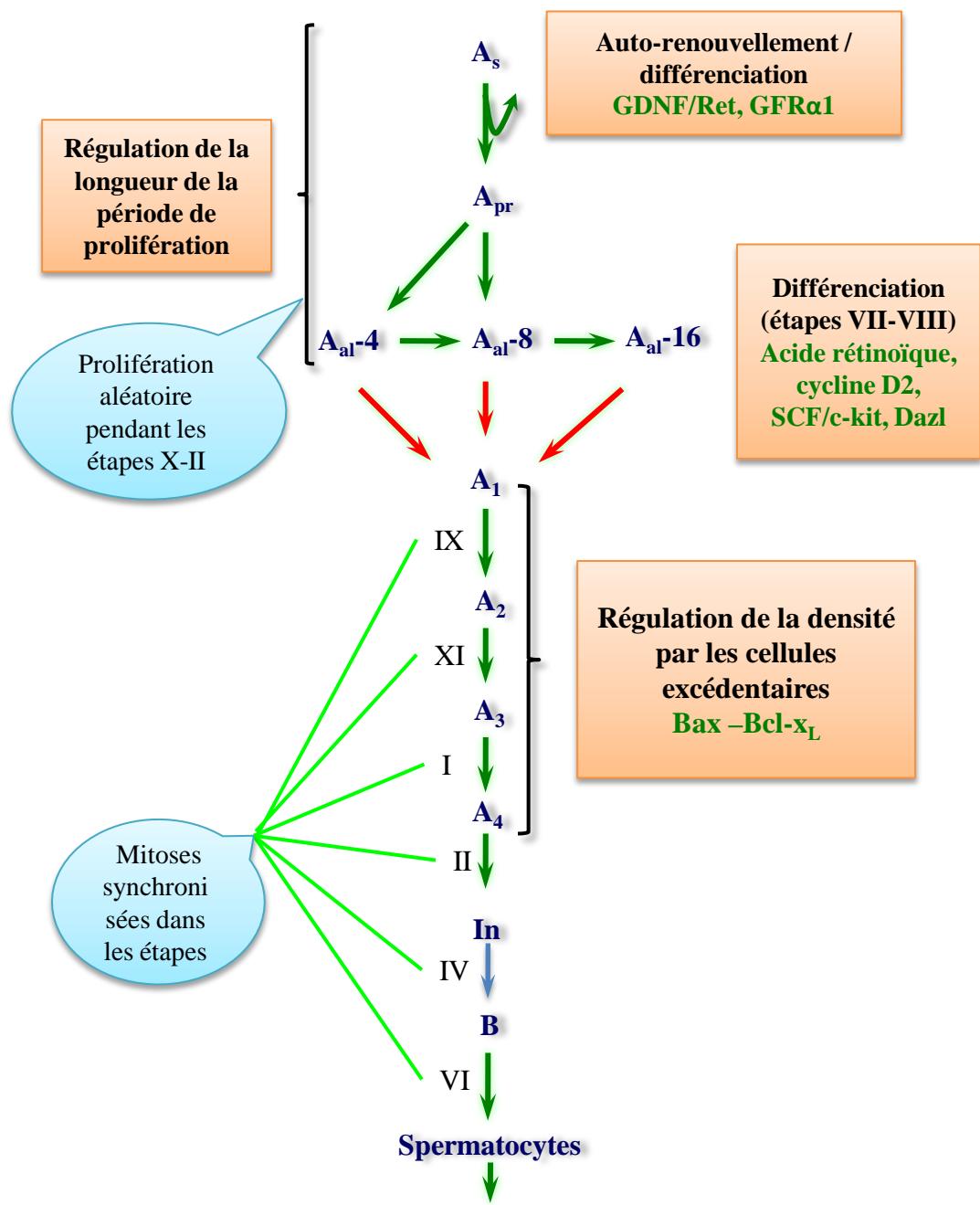


Figure 26: Multiplication des spermatogones et renouvellement des cellules souches chez la souris montrant les différents types successifs de spermatogones. La spermatogenèse commence par les spermatogones souches A_s , qui peuvent soit s'auto-renouveler ou donner lieu à des spermatogones A_{pr} (*paired*), qui sont destinées à passer dans la lignée de la spermatogenèse. Les spermatogones A_{al} (*aligned*). Après une série de 9 à 11 divisions cellulaires (flèche vertes) les spermatocytes sont formés. Les flèches rouges indiquent une étape de différenciation ne comportant pas de division. La multiplication des spermatogones et le renouvellement des cellules souches sont assurés par plusieurs facteurs. *Dazl, deleted in azoospermia-like gene*; *GDNF, facteur neurotrophique dérivé de la lignée cellulaire gliale*; *GFR α 1, récepteur membranaire de GDNF*; *SCF, facteur des cellules souches*. Adapté d'après de Rooij, 2001.

qui s'étend sur toute la hauteur de l'épithélium germinal, se déroulent la différenciation morphologique et physiologique et la maturation de la cellule germinale jusqu'au stade spermatozoïde mature.

Les cellules de Sertoli synthétisent et sécrètent une grande variété de facteurs : les protéines, les cytokines, facteurs de croissance, les opioïdes, les stéroïdes, les prostaglandines, les modulateurs de la division cellulaire. La morphologie des cellules de Sertoli est strictement liée à leurs différentes fonctions physiologiques. Le cytoplasme contient à la fois le réticulum endoplasmique lisse (synthèse des stéroïdes) et rugueux (synthèse des protéines), un appareil de Golgi éminent (élaboration et transport des produits de sécrétion), les granules lysosomales (phagocytose) ainsi que les microtubules et les filaments intermédiaires (adaptation de la forme cellulaire au cours des différentes phases de la maturation des cellules germinales) (Nagano *et al.*, 2001).

La division des cellules de Sertoli se termine lorsque les cellules germinales subissent la division méiotique et que les cellules de Sertoli ont construit des jonctions serrées les unes avec les autres, constituant la barrière hémato-testiculaire. Le manque de la connexine-43 empêche la maturation des cellules de Sertoli avec un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatogonies (Brehm *et al.*, 2007). L'expression des marqueurs de cellules de Sertoli tels que la transferrine, *androgen-binding protein* et les protéines jonctionnelles comme la N-cadhérine, la connexine-43, la gelsoline, la laminine- γ 3 et à vinculine est androgéno-dépendante (Zhang *et al.*, 2006).

2.2.3. Les cellules germinales (Rongeurs)

2.2.3.1. Les spermatogonies

En 1971, Huckins a montré dans un modèle de rat, que toutes les spermatogonies appartiennent à quatre catégories : cellules souches A_s (*single*), les cellules en prolifération A_{pr} (*paired*), les spermatogonies A_{al} (*aligned*) et les cellules différencierées A_1-A_4 , In, B. Les spermatogonies A_s , A_{pr} et A_{al} sont des spermatogonies morphologiquement indifférenciées, tandis que les spermatogonies A_1-A_4 , In et B sont des cellules différencierées (**Figure 26**). Huckins a également montré que les spermatogonies A_s sont situées seules dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère et qu'elles se divisent périodiquement au hasard pour donner deux cellules filles qui se séparent en deux spermatogonies A_s , ou forment des cellules A_{pr} qui restent connectées par un pont cytoplasmique et sont ensuite engagées à se différencier. La plupart des cellules A_s ont un cycle cellulaire court (60h), tandis que quelques spermatogonies A_s ont un très long cycle cellulaire et restent en phase G1 jusqu'à 13 jours à partir de laquelle elles sortent de façon aléatoire pour réintégrer le pool des cellules souches et reprendre la mitose. Ces dernières ont été définies comme des cellules hautement résistantes aux radiations et d'autres agents nocifs et constituent ainsi une population de cellules qui assurent le maintien de la spermatogenèse au cours de la vie (de Rooij et Russell, 2000 ; Ehmcke *et al.*, 2006).

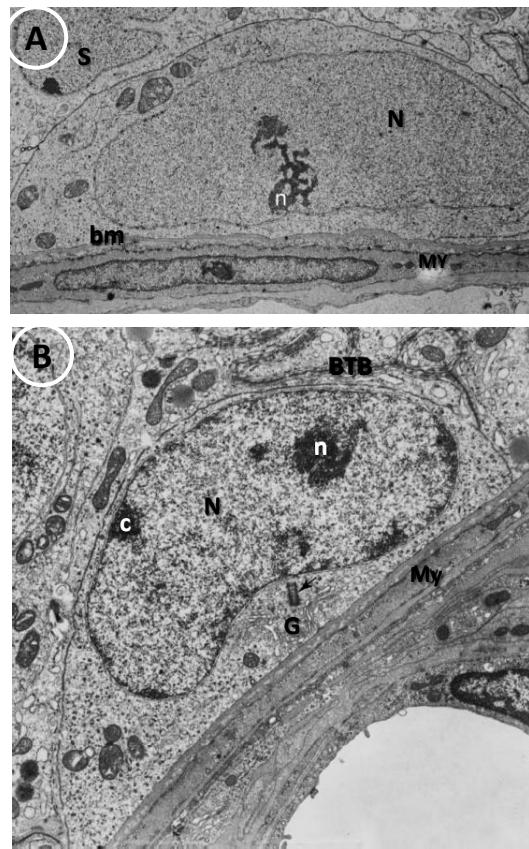


Figure 27 : (A) Une spermatogonie de type A indifférenciée de rat. La cellule a un noyau allongé pâle teinté (N) avec un nucléole éminent (n). Il y a une rareté des organites cytoplasmiques. La cellule contact la membrane basale (mb). My, cellule myoïdes; S, noyau de cellule de Sertoli. Grossissement $\times 40000$. **(B) Une spermatogonie plus différenciée de rat (type A₄).** Le noyau (N) est rectangulaire partiellement découpé présentant des amas d'hétérochromatine (n) à sa périphérie et un nucléole (n). Appareil de Golgi (G) et centriole adjacent (flèche). La barrière hémato testiculaire (BTB) est bien développée dans cette figure. My, cellule myoïdes. Grossissement $\times 49000$. *Adapté d'après Hermo et al., 2010.*

La production de cellules filles A_{pr} à partir des spermatogonies A_s chez le rat est signalée comme un engagement à la différenciation (Huckins (1971). La plupart de ces cellules subissent un certain nombre de divisions synchrones avant de commencer la différenciation et sont désignées comme le compartiment des spermatogonies A_{al} différencierées en prolifération (**Figure 27**). Les spermatogonies dans le compartiment en prolifération se transforment morphologiquement en spermatogonies différencierées, les spermatogonies de type A₁ qui se sont produites aux stades VII-VIII du cycle, ces dernières se transforment à des stades spécifiques du cycle en spermatogonies de type A₂, A₃, A₄, In et B. Les spermatogonies entrent ensuite en prophase de la première division mitotique comme des spermatocytes préleptotènes (PL). La différenciation des spermatogonies chez le rat prend environ 13 jours ou l'équivalent d'un seul cycle de l'épithélium séminifère (Yoshida *et al.*, 2004).

Une autre caractéristique remarquable des spermatogonies dérive des études de Clermont en 1972 concernant la mort des cellules au cours de la différenciation. En effet, à cause de la dégénérescence extensive des spermatogonies en division (A₂, A₃, A₄), le nombre théorique des spermatocytes préleptotènes est beaucoup moins faible que prévu (25%). Les cellules germinales subissent normalement l'apoptose sans interruption tout au long de la vie et les spermatogonies sont les principales cellules subissant l'apoptose chez le rat adulte. Il a été estimé que 75% des spermatogonies ne survivent pas et ne deviennent jamais des spermatozoïdes matures (Huckins, 1978). En effet, les spermatogonies souches sont dirigées vers trois destins : l'auto-renouvellement pour produire de nouvelles cellules souches, la différenciation en spermatogonies plus mûres, ou la mort cellulaire par apoptose (He *et al.*, 2007 ; Hermo *et al.*, 2010).

2.2.3.2. Les spermatocytes

La méiose se produit uniquement dans les cellules germinales et nécessite un cycle de réPLICATION de l'ADN suivi de deux divisions cellulaires consécutives permettant aux cellules diploïdes de former les cellules haploïdes et ainsi générer la diversité génomique par remaniement de l'information entre les chromosomes homologues (Kleene, 2001; van der Laan *et al.*, 2004 ; Liebe *et al.*, 2006). Au cours de la méiose, les chromosomes homologues se distinguent par leur morphologie identique pour former un bivalent, chaque chromosome est composé de deux filaments spiralés appelés chromatides sœurs. Le bivalent contient quatre chromatides et est aussi une tétrade. Dans la tétrade, chaque chromatide possède un seul partenaire d'appariement. Des portions de ces chromatides appariées sont échangées d'un chromosome homologue à l'autre donnant lieu à des figures en forme de croix appelées chiasmas, qui sont une manifestation d'un phénomène cytologique génétique appelée *crossing-over* (de Robertis et de Plazas, 1970).

La prolifération des spermatogonies de type B donne naissance aux spermatocytes primaires qui subissent la première division de la méiose. La prophase de la première division méiotique

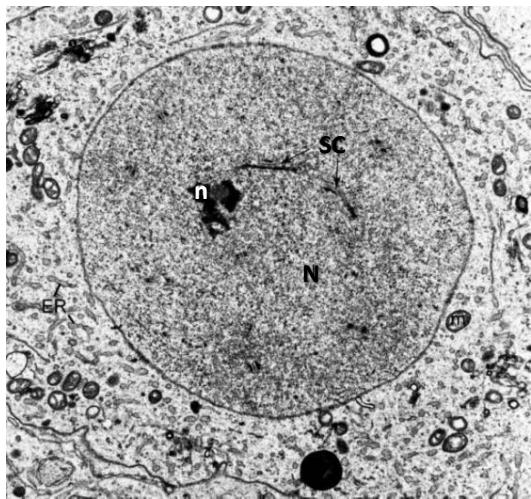


Figure 28: Un spermatocyte pachytène chez le vison révélant un noyau sphérique (N) avec un nucléole (n). Un complexe synaptonémal (SC) est évident montrant son aspect trilaminaire. Le cytoplasme de la cellule montre les mitochondries (m) et de petits éléments du réticulum endoplasmique (RE). Grossissement, \times 53000. Adapté d'après Hermo et al., 2010

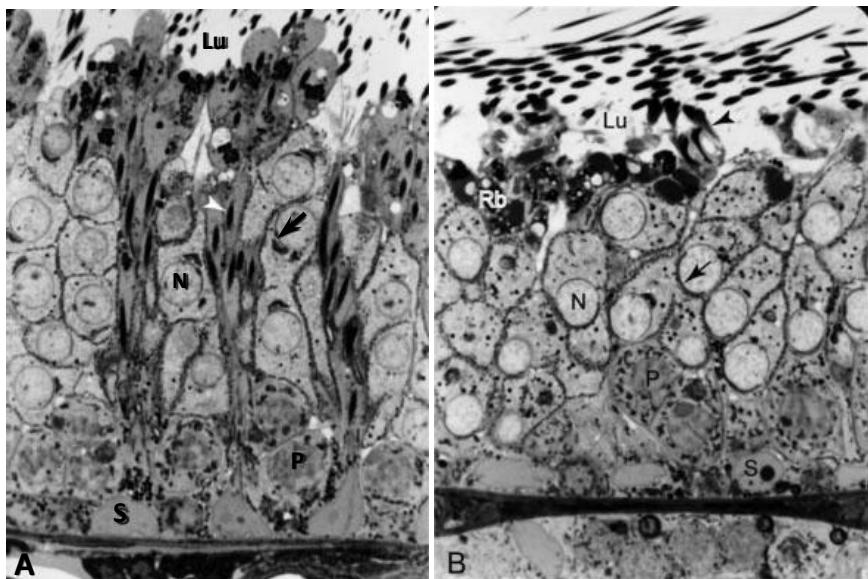


Figure 29 : Structure histologique d'une partie d'un tube séminifère du rat à des stades IV-V (A) et IIIV (B) du cycle. Dans la figure A, les têtes des spermatides tardifs en élongation (pointes de flèches) sont toujours intégrées dans l'épithélium. Les noyaux pâles sphériques (N) de spermatides rondes précoces possèdent un acrosome partiellement formé (flèche) sont situés au centre de la cellule. En (B) la plupart des spermatides en élongation ont quitté l'épithélium, mais quelques uns restent (pointes de flèche) et sont visibles en bordure de la lumière (Lu), où de nombreux corps résiduels sont également présents (Rb). Le noyau pâle des spermatides rondes est excentré avec leur acrosome (flèche) face à la base de l'épithélium. S, noyau de la cellule de Sertoli ; P, noyau du spermatide Pachytène. Grossissement \times 1000. Adapté d'après Hermo et al., 2010

comporte des mouvements importants et l'association des chromosomes pairs, les chiasmas ; où se produisent les échanges génétiques (Handell *et al.*, 1999). Elle est composée d'une prophase, métaphase, anaphase et télophase. La prophase est longue, prenant jusqu'à 90% du temps nécessaire pour l'achèvement de la méiose. Les spermatocytes préleptotènes (PL) sont les premières cellules qui se forment, elles sont activement engagées dans la synthèse de l'ADN (**Figure 28**). Elles sont suivies par les spermatocytes leptotènes où les chromosomes deviennent plus apparents comme de longs filaments et forment des arrangements particuliers appelés *bouquets*. L'appariement des chromosomes et la formation des synapses est initiée dans le stade spermatocyte zygotène et l'appariement des chromosomes est complété dans le stade spermatocyte pachytène. Cela implique un épaissement et un raccourcissement des chromosomes et l'échange du matériel chromosomique par *crossing-over*. La désynapsie se produit dans le stade spermatocyte diplotène avec séparation partielle des chromosomes. La diacinese implique le raccourcissement des chromosomes et chacun est composé de deux chromatides. La prophase est suivie par la métaphase où les chromosomes se sont alignés à l'équateur du fuseau et la télophase donne naissance à des cellules filles nommées spermatocytes secondaires, ces derniers ont une courte demi-vie avec un nombre haploïde de chromosomes bien que leur contenu en ADN soit diploïde. Ils s'engagent dans la deuxième division méiotique pour former des spermatides avec un nombre haploïde de chromosomes. La durée de maturation du spermatocyte est de l'ordre de 20,9 jours chez le rat et 25,3 chez les humains (Cobb et Handel, 1998).

2.4. La spermatogenèse

La spermatogenèse commence avec la division des cellules souches et se termine avec la formation de spermatozoïdes matures. Les cellules germinales sont disposées en différents types d'associations cellulaires au sein des tubules séminifères connus sous le nom des étapes de la spermatogenèse et le processus entier de la spermatogenèse peut être divisé en quatre phases (**Figure 29**):

- La prolifération mitotique et la différenciation des cellules germinales diploïdes (spermatogonies)
- Division méiotique des cellules germinales diploïdes (spermatocytes) donnant les cellules germinales haploïdes (spermatides)
- Transformation des spermatides en spermatozoïdes testiculaires (spermio-génèse)
- Sortie de sperme de l'épithélium germinal dans la lumière tubulaire (spermiation).

Au cours de la phase de prolifération, les spermatogonies vont subir plusieurs divisions mitotiques pour former les spermatocytes, qui subissent deux divisions méiotiques pour former les spermatides haploïdes. Ces derniers se développent en spermatozoïdes suite à une différenciation spectaculaire complexe impliquant des modifications structurales (formation du noyau, condensation

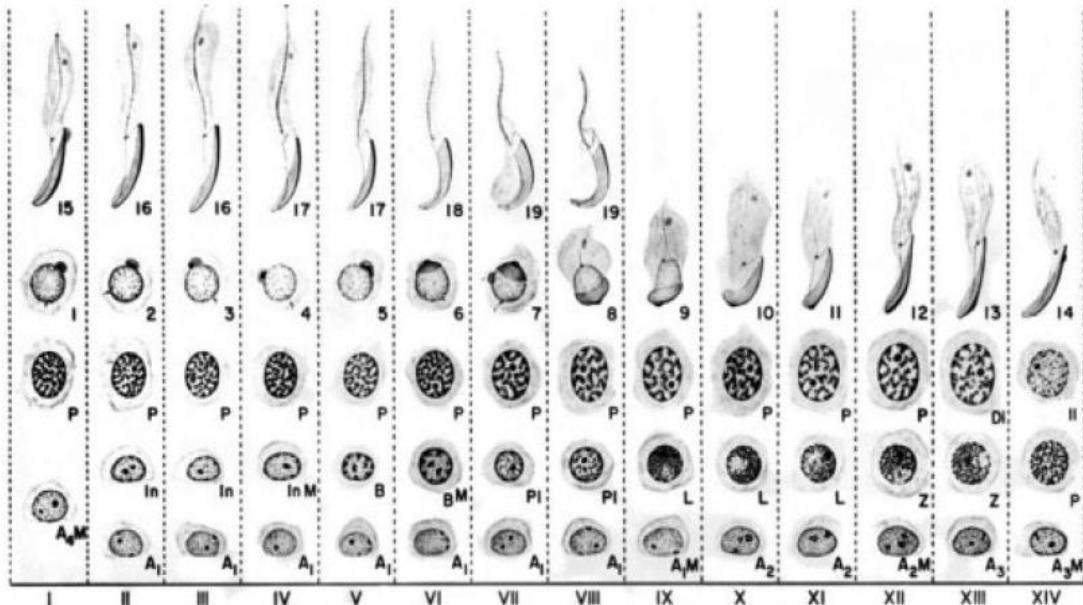


Figure 30 : Un diagramme schématique de différentes étapes du cycle de l'épithélium séminifère chez le rat. Les étapes sont indiquées par des chiffres romains I-XIV. Les colonnes verticales illustrent les différents types cellulaires y sont présentes. Les cellules illustrées sont les spermatogonies de types A₁₋₄, intermédiaires (In) et les spermatogonies de type B; les spermatocytes préleptotènes, leptotènes, zygotènes, pachytènes, et diplotènes; et les spermatides aux étapes 1-19 de spermio-génèse. M à coté de spermatogonies indique que ces cellules sont en cours de mitose, tandis que l'étape II à XIV indiquent que les spermatocytes secondaires subissent des divisions méiotiques.
Adapté d'après Hermo et al., 2010

de la chromatine du noyau, formation d'un acrosome et acquisition d'un flagelle permettant la motilité éventuelle). Les séries de modifications survenues aux spermatides s'appellent la spermio-génèse. La spermatogénèse comporte donc le renouvellement et la prolifération des spermatogonies indifférenciées, la différenciation des spermatogonies, la méiose des spermatocytes et la morphogénèse des spermatides (Hermo *et al.*, 2010).

2.4.1. Le cycle de l'épithélium séminifère

Dans les coupes transversales des tubes séminifères de testicules, les cellules de Sertoli et les cellules germinales sont étroitement liées et forment ensemble un épithélium qui borde une lumière. Les cellules germinales sont organisées de manière bien définie et forment des couches concentriques avec les cellules germinales immatures, les spermatogonies, résidant à la base de l'épithélium adjacent à la membrane limitante et les cellules germinales à des stades plus avancés occupent les couches successives (spermatocytes, spermatides précoce et tardifs) situées plus près de la lumière tubulaire. L'épithélium séminifère est structurellement complexe et montre des profils tubulaires transversaux avec des associations variées de cellules germinales en fonction de leurs différents stades de développement. En utilisant la technique de l'*acid periodic Schiff*, Leblond et Clermont (1952) ont pu suivre le développement de l'acrosome chez les cellules germinales. Le développement de l'acrosome commence par la formation de petits granules proacrosomiques provenant de l'appareil de Golgi à côté du noyau de spermatides précoce. Ces vésicules fusionnent ensuite pour former un acrosome qui recouvre le noyau et qui avec le temps suit les modifications structurales du noyau des spermatides tardifs. De cette façon, ils ont défini 19 étapes du développement de la population des spermatides et ont appelé ce processus la spermio-génèse. La transformation des spermatides rondes en spermatides allongées leur a permis de les classifier comme des spermatides rondes précoce (étapes 1-8) et spermatides en élongation tardive (étapes 9-19). La spermio-génèse est subdivisée en plusieurs étapes. Les trois premières étapes sont classées comme la phase golgienne, tandis que la phase de la coiffe constitue les étapes 4-7. Les étapes de 8-14 correspondent à la phase acrosomique et les étapes 15-19 constituent la phase de maturation.

Leblond et Clermont (1952) ont pu aussi définir 14 associations cellulaires distinctes de cellules germinales appelées cycle de l'épithélium séminifère (**Figure 30**). Les étapes ont été désignées par des chiffres romains I-XIV. Chaque étape contient de nombreuses cellules germinales au même stade du développement, donnant lieu à la notion de générations de développement des cellules germinales. De plus, plusieurs générations distinctes de cellules germinales ont été observées dans un profil d'une section transversale donnée et quatre ou cinq générations de cellules germinales occupent une section tubulaire donnée selon le stade spécifique du cycle de l'épithélium séminifère. Les stades I-VIII montrent cinq générations de cellules germinales et les étapes IX-XIV présentent quatre générations (Clermont, 1972 ; Leblond et Clermont, 1952). Ainsi, une génération de cellules

germinales à une étape spécifique de leur développement est associée à d'autres générations de cellules germinales chacune à sa propre étape de développement. Comme les spermatozoïdes sont relâchés périodiquement dans les tubes séminifères, l'idée du cycle a été proposée. L'apparition séquentielle précise des 14 associations cellulaires qui se produisent avec le temps dans une zone donnée du tube a été définie comme un cycle de l'épithélium séminifère. Basé sur le développement acrosomial, douze étapes différentes possibles ont été décrites chez la souris (Oakberg, 1957) et six chez l'homme (Heller et Clermont, 1963). La durée du cycle est constante, environ 13 jours chez le rat, 8.65 jours chez la souris, 10 à 11 jours chez les primates et 16 jours chez l'homme. Sachant que la spermatogenèse nécessite cinq cycles et un tiers de cycle chez le rat, la durée de la spermatogenèse est facilement calculée à environ 65 jours (Clermont, 1972 ; Clermont et Harvey, 1965).

Au cours du développement post-natal, les différents types de cellules germinales se développent de façon séquentielle jusqu'à l'âge adulte. Dans le testicule de rat, les spermatocytes pachytènes apparaissent d'abord à 15 jours d'âge environ et les spermatides à environ 22 jours d'âge. Ces dernières continuent à se développer pendant 22 jours (Russell *et al.*, 1987 ; O'Donnell, 2001). Chez la souris, il n'y a que des spermatogonies à l'âge de 8 jours, la méiose commence au 10^e jour et les spermatides rondes apparaissent au 18^e jour après deux divisions méiotiques. Quatorze jours en plus sont nécessaires pour que les spermatides achèvent leur processus de différenciation et soient libérées dans la lumière des tubes séminifères (Bellve *et al.*, 1977 ; Clouthier, 1996).

2.4.2. La vague de l'épithélium séminifère

Lors de l'observation d'une section d'un tube séminifère contourné, on remarque que les cellules d'un même stade apparaissent en groupes. Toutefois tous les stades de la spermatogenèse ne sont pas représentés sur une section d'un tube séminifère. Cette apparence est liée au fait qu'à chaque division cellulaire d'une spermatogonie B, les cellules filles restent reliées par des ponts cytoplasmiques alors que leur nombre à la génération suivante sera doublé. Les dérivés d'une spermatogonie B forment ainsi à terme un grand syncytium avec des groupes cellulaires au même stade de développement (Russell *et al.*, 1987).

En outre, plusieurs générations de spermatogonies sont enroulées en spirale les unes sur les autres. C'est la raison pour laquelle on rencontre sur une section de tube séminifère des groupes de différentes générations, les cellules se dirigent en spirale, à la manière d'un tire-bouchon, vers l'intérieur de la lumière. En périphérie du tubule et au début de la spirale, se trouvent les spermatogonies et à la fin de la spirale, les spermatozoïdes libérés dans la lumière tubulaire. Cette illustration permet de comprendre pourquoi on rencontre toujours plusieurs générations sur une section de tube (Hermo *et al.*, 2010).

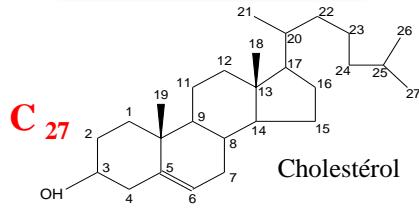
3. La stéroïdogenèse

La testostérone, le principal androgène sécrété par le testicule dans la plupart des espèces de mammifères, est produite presque exclusivement par les cellules de Leydig (Anbalagan *et al.*, 2003). Elle est synthétisée à partir du cholestérol dans une série de réactions biochimiques catalysées par des enzymes spécifiques situés dans les mitochondries des cellules de Leydig et les membranes microsomales (Payne et Hales, 2004). Les cellules de Leydig produisent la testostérone pendant la vie fœtale pour contrôler la différenciation sexuelle mâle et le développement des caractères sexuels primaires. À la puberté, les stéroïdes sexuels mâles sont responsables de l'apparition et du maintien des caractères sexuels secondaires et contribuent au développement et au maintien de la spermatogenèse. Les premières étapes de la synthèse des stéroïdes sont communes à toutes les cellules stéroïdogènes, que ce soit les cellules de Leydig, les cellules ovariennes ou les cellules corticosurrénaliennes (Hermo *et al.*, 2010).

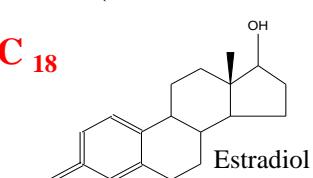
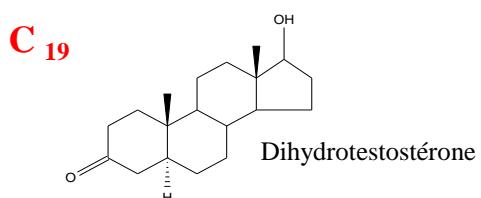
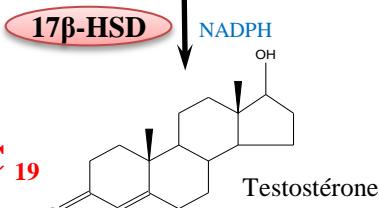
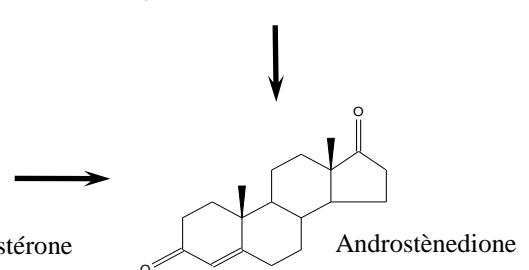
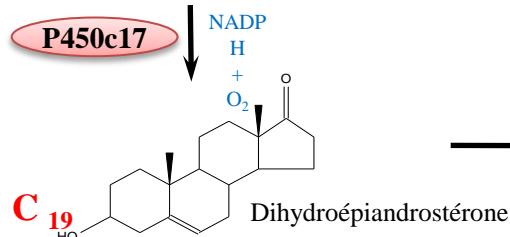
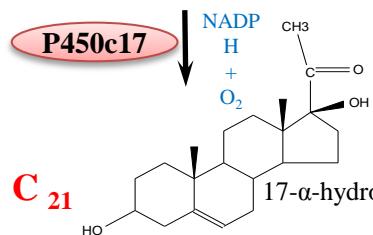
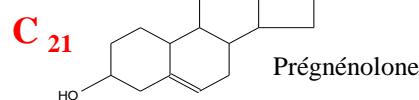
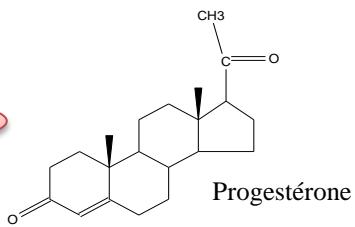
3.1. Sources et mobilisation du cholestérol

Le cholestérol est le précurseur commun à toutes les hormones stéroïdes (Kraemer *et al.*, 2004). La biosynthèse de la testostérone directement à partir du cholestérol ne peut se produire que dans les cellules de Leydig. Toutes les cellules et en particulier les cellules stéroïdogènes sont capables d'effectuer la biosynthèse du cholestérol (*synthèse de novo*) à partir de l'acétylcoenzyme A (CoA) par l'intermédiaire de l'Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-CoA (HMG-CoA). Le cholestérol peut être obtenu aussi à partir de la membrane cellulaire, ou importé de la circulation sous forme de lipoprotéines de haute densité (HDL) ou lipoprotéines de basse densité (LDL). Chez le rat, l'HDL, principale forme circulante du cholestérol, est importée par le récepteur scavenger de classe B type 1 (SRB1), qui est un récepteur membranaire des HDL exprimé dans le testicule fœtal de souris pendant la période clé de production de la testostérone (Carr *et al.*, 1983). Le cholestérol peut également être obtenu à partir de la conversion des unités intracellulaires C2-acétyl via l'activité des enzymes 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl A synthétase et HMG-CoA réductase. Le testicule de fœtus âgé de 10 à 20 semaines est capable d'utiliser le cholestérol synthétisé *de novo* pour la formation de la testostérone (Carr *et al.*, 1983; Scott *et al.*, 2009). L'enzyme HMG-CoA réductase, qui catalyse la transformation de HMG-CoA en mévalonate, est l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol, mais elle est également sous un contrôle régulateur complexe impliquant quatre mécanismes distincts: le *feed-back* d'inhibition (Hampton, 2002), l'expression de gènes à travers la régulation du clivage de SREBP2 (*sterol regulated element binding protein-2*) membranaire (Horton *et al.*, 2002), l'ubiquitination et la dégradation protéolytique et la phosphorylation/déphosphorylation (Ness et Chambers, 2000). Il est bien connu que le facteur de transcription, *Steroidogenic factor-1* (SF-1, NR5A1), un membre de la super-famille des récepteurs nucléaires orphelins, contrôle l'expression de SRB1 (Cao *et al.*, 1999), de HMG-CoA synthétase et de HMG-CoA réductase (Mascarò *et al.*, 2000).

Δ^5 -3 β -Hydroxystéroïdes



Δ^4 -3-Kétostéroïdes



P450scc

3NADPH
+
3O₂

3 β -HSD

NADPH

P450c17

NADP H
+
O₂

P450c17

NADP H
+
O₂

17 β -HSD

NADPH

5 α -RED

NADPH

P450arom

3 NADPH

Figure 31: Les voies de la biosynthèse des stéroïdes dans les cellules de Leydig.
Adapté d'après Payne et Hardy, 2007.

3.2. Le transport du cholestérol dans la cellule de Leydig

La première étape de la stéroïdogenèse nécessite le transport du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane mitochondriale interne (Thompson *et al.*, 2004). C'est en effet dans la mitochondrie que se déroule la première étape de la stéroïdogenèse, la conversion du cholestérol en prégnénolone, cette réaction est catalysée par le cytochrome P450scc (**Figure 31**) localisé dans la membrane mitochondriale interne (Farkash *et al.*, 1986). Bien que la membrane mitochondriale externe elle-même soit relativement riche en cholestérol et ne constitue pas une barrière au cholestérol, l'espace entre les membranes externe et interne des mitochondries est rempli d'un liquide aqueux qui ne permet que le passage libre des molécules solubles dans l'eau, ce qui empêche le passage du cholestérol lipophile. Il a été montré que la conversion du cholestérol mitochondrial en prégnénolone constitue l'étape limitante de la stéroïdogenèse et que le contrôle par les hormones trophiques ne s'exerce pas sur l'activité du P450scc, mais sur la disponibilité en cholestérol pour ce cytochrome P450scc (Stocco, 2001). La translocation du cholestérol à la membrane mitochondriale interne est facilitée par une protéine appelée StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*). StAR est une molécule de courte durée de vie, synthétisée rapidement en réponse aux hormones trophiques, qui transporte le cholestérol mitochondrial et permet au CYP11A l'accès au cholestérol et la régulation du flux des stéroïdes. Il a été montré que SF-1 et LRH-1 peuvent régler l'expression du StAR en se liant à son promoteur (Dubé *et al.*, 2009). L'expression de StAR est principalement régulée par l'activation par la LH des voies dépendantes de l'AMPc, ce qui conduit finalement à l'activation transcriptionnelle (Ascoli *et al.*, 2002). Il a été montré aussi que la protéine StAR est un substrat d'ERK1/2 (*Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2*). L'activation de la protéine ERK1/2 dans le testicule fœtal pourrait bien être un élément déclencheur pour la production de la testostérone fœtale. La protéine TSPO (*Translocator Protein*), auparavant connue sous le nom de récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), est principalement localisée dans la membrane mitochondriale externe et joue un rôle important dans le transport du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne (Rone *et al.*, 2009).

3.3. Les voies de la stéroïdogenèse dans la cellule de Leydig

Les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Leydig adultes utilisent des voies métaboliques similaires pour la production de la testostérone (Flück *et al.*, 2003). Cependant, une différence intéressante entre le testicule fœtal et adulte réside dans l'expression de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type III (17 β -HSDIII) qui catalyse la conversion finale de l'androstenedione en testostérone. Dans le testicule adulte cette enzyme est exprimée exclusivement dans les cellules de Leydig, alors que dans le testicule fœtal, l'expression est principalement tubulaire (O'Shaughnessy *et al.*, 2000). Cela implique que la production de la testostérone dans les testicules de souris fœtales exige la coopération entre les compartiments interstitiel et tubulaire. L'expression de

17β -HSDIII dans les tubules peut être un vestige évolutif à partir du moment où la cellule de Sertoli a été la cellule stéroïdogène prédominante dans le testicule. Une autre différence de stéroïdogenèse entre les cellules de Leydig fœtales et adultes réside dans l'expression des enzymes surrénales par le testicule fœtal. La 11β -hydroxylase (CYP11B1) et la 21-hydroxylase (CYP21) sont exprimées dans le testicule fœtal et non pas le testicule adulte (Hatano *et al.*, 1996 ; Hu *et al.*, 2002).

La synthèse de la testostérone à partir du cholestérol nécessite plusieurs enzymes (**Figure 31**), qui appartiennent à deux catégories: les enzymes du cytochrome P450, CYP11A et CYP17; et les enzymes HSD, 3β -HSD et 17β -HSD. Les enzymes du cytochrome P450 catalysent l'hydroxylation et le clivage du substrat des stéroïdes en utilisant l'oxygène moléculaire et du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) comme source du réducteur potentiel. Les enzymes HSD catalysent l'oxydation des hormones stéroïdes et exigent respectivement le nicotinamide adénine dinucléotide oxydé et / ou le NADPH comme accepteur / donneur des électrons (Payne et Hales, 2004). Bien que chaque enzyme P450 soit le produit d'un seul gène, les enzymes HSD ont plusieurs isoformes, chacune issue d'un gène différent. Une fois le cholestérol transporté vers la membrane interne de la mitochondrie, la première enzyme de la stéroïdogenèse, CYP11A1, clive la chaîne latérale du cholestérol (C27 stérol), donnant un stéroïde à 21 atomes de carbone, la prégnénolone. C'est la première étape et l'étape enzymatique limitante de la biosynthèse de la testostérone. La prégnénolone passe ensuite de la mitochondrie vers le réticulum endoplasmique lisse où se dérouleront les réactions enzymatiques suivantes. Il y a peu de preuves qu'une protéine porteuse spécifique soit nécessaire pour la sortie de la prégnénolone de la mitochondrie (Zirkin et Chen, 2000).

3.4. La conversion de prégnénolone en testostérone

Les actions combinées des 3β -HSD et CYP17 catalysent la conversion globale de la prégnénolone en androstenedione, le précurseur de la testostérone. Cette conversion peut se produire par l'une des deux voies principales : via la voie Δ^5 stéroïde prégnénolone et ses intermédiaires, 17α hydroxyprégnénolone et DHEA, ou via la voie Δ^4 stéroïde progestérone et ses intermédiaires 17α hydroxyprogestérone. Le passage des stéroïdes de la voie Δ^5 vers la voie Δ^4 est catalysé par l'enzyme 3β -HSD, enzyme qui réalise une déshydrogénération en 3β et une isomérisation de la double liaison des stéroïdes en C19 et en C21. Bien que la voie de synthèse des stéroïdes dans les cellules de Leydig soit la même chez l'homme et les rongeurs, il y a une préférence pour chacune des voies Δ^4 ou Δ^5 . Chez l'homme et les primates supérieurs, la voie Δ^5 prédomine chez l'adulte et le testicule fœtal, parce que le CYP17 humain convertit facilement la 17α -hydroxyprégnénolone en DHEA (*Dehydroepiandrosterone*), mais a peu d'activité 17, 20 lyase quand la 17α -hydroxyprogestérone est le substrat. Chez le rat, CYP17 clive facilement les stéroïdes de la voie Δ^4 et Δ^5 , mais au contraire de ce qui se passe chez l'homme, a une préférence pour la voie Δ^4 (Hughes, 2001).

La dernière étape de synthèse de la testostérone est catalysée par 17β hydroxystéroïde oxydo-réductase (17β -HSD). L'androstènedione est converti en testostérone, la DHEA en 5 androstène- 3β , 17β -diol. Il existe plusieurs types de 17β -HSD réductases, mais le type 3 est extrêmement impliqué dans la fonction du testicule adulte (Anderson et Moghrabi, 1997).

3.5. Régulation des enzymes de la stéroïdogenèse

La majorité de ce qui est connu sur la régulation des enzymes de la stéroïdogenèse chez l'homme et le rat vient des études de testicules post-nataux ou adultes. L'expression spécifique des enzymes P450 dépend de l'expression de SF-1 (Lala *et al.*, 1992 ; Morohashi *et al.*, 1992), qui se lie à la région proximale du promoteur de toutes les enzymes du cytochrome P450. Le facteur SF-1 est essentiel pour l'expression du CYP17 dans les cellules gonadiques, mais d'autres facteurs peuvent alors contrôler l'expression maximale et cellulaire spécifique des enzymes P450. Par exemple, la stimulation chronique par la LH, conduit à l'activation de l'adénylate cyclase ce qui initie l'augmentation de la synthèse des enzymes de la stéroïdogenèse. Les différences de régulation de l'activité CYP11A entre espèces sont claires entre les souris et les rats postnataux selon des études faites en culture de cellules de Leydig. Chez les cellules de Leydig de la souris, l'activité CYP11A est à capacité maximale lors d'une stimulation à court terme par la LH, mais peut être inhibée après une stimulation chronique. Comme l'activité CYP11A est l'étape limitante de la synthèse de la testostérone, toute interférence à ce stade pourrait affecter la voie complète (Leinonen et Jaffe, 1985 ; Huhtaniemi, 1994).

En plus des enzymes du cytochrome P450, l'expression de la 3β -HSD semble également dépendre de SF-1. Il y a un élément de réponse à SF-1 dans la région proximale du promoteur du gène 3β -HSD de type 2 humain (gonadique et surrénalien) (Leers-Sucheta *et al.*, 1997) et le promoteur du gène 3β -HSD murin de type 1 (gonadique et surrénalien) dispose de trois sites de liaison de SF-1. Il n'est actuellement pas connu, si le(s) gène(s) 17β -HSD(s) gonadique(s) est/sont régulé(s) par SF-1. Des études utilisant les souris hypogonadiques (*hpg*) ont montré que dans le développement post-natal précoce, l'expression du 17β -HSD gonadique est indépendante de la stimulation par les gonadotrophines, mais après la puberté, elle devient dépendante des gonadotrophines et de l'action des androgènes. Par conséquent, il a été suggéré que les androgènes sont transitoirement nécessaires pour assurer l'expression optimale de 17β -HSD au cours du développement des cellules de Leydig chez l'adulte. Chez le fœtus de souris, le gène 17β -HSD de type 1 est exprimé dans les cellules de Sertoli et non dans les cellules de Leydig fœtales, alors que durant la puberté, l'expression du 17β -HSD se limite aux cellules de Leydig adultes (O'Shaughnessy *et al.*, 2000).

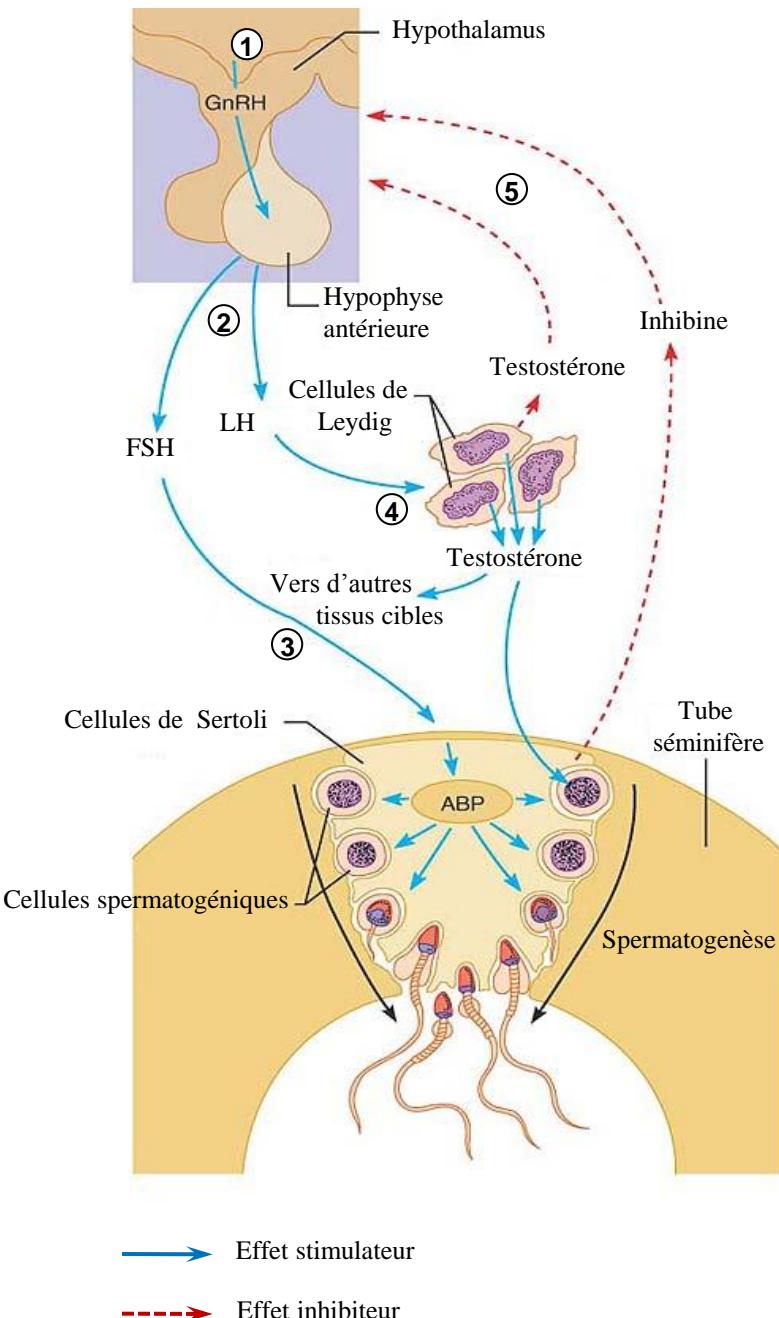


Figure 32: La régulation hormonale de la fonction testiculaire et l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. 1. L'hypothalamus libère la gonadolibérine (GnRH). 2. La GnRH stimule la sécrétion de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse antérieure. 3. La FSH stimule la libération du *androgen-binding protein* (ABP) par les cellules de Sertoli. 4. LH agit sur les cellules interstitielles, en stimulant la libération de la testostérone. Ensuite, la liaison de la testostérone aux ABP améliore la spermatogenèse. 5. Des niveaux élevés de testostérone et d'inhibine (libérés par les cellules de Sertoli) exercent un *feedback* d'inhibition sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Une seule cellule de Sertoli uniquement est représentée de telle sorte que sa relation structurelle avec les cellules spermatogéniques est clairement visible. *Adapté d'après Marieb, 2006.*

4. Le contrôle hormonal de la fonction testiculaire

L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

La régulation hormonale de la spermatogenèse et de la production des androgènes testiculaires implique une interaction entre l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure et les testicules (**Figure 32**). Le déroulement des événements réglementaires, représenté schématiquement dans la figure, est comme suit :

- L'hypothalamus libère de façon rythmique dans le sang porte hypophysaire une neurohormone, la gonadolibérine (GnRH), qui contrôle la libération des deux gonadotrophines hypophysaires antérieures : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH).
- La liaison de la GnRH aux cellules hypophysaires (gonadotropes) les incite à sécréter de la FSH et de la LH dans le sang.
- La FSH stimule la spermatogenèse indirectement en stimulant les cellules de Sertoli pour libérer l'*androgene-binding protein*. (ABP). ABP invite les cellules germinales à lier et à concentrer la testostérone, qui stimule à son tour la spermatogenèse. Ainsi, la FSH rend les cellules réceptives aux effets stimulateurs de la testostérone.
- La LH se lie aux cellules interstitielles, en les poussant à sécréter la testostérone (et une petite quantité d'œstrogènes). Localement, la testostérone sert au déclenchement final de la spermatogenèse.
- La testostérone inhibe la libération hypothalamique de GnRH et agit directement sur l'hypophyse antérieure pour inhiber la libération de gonadotrophines. L'inhibine, une hormone protéique produite par les cellules de Sertoli, sert de détecteur de normalité de la spermatogenèse. Lorsque le nombre de spermatozoïdes est élevé, la libération de l'inhibine augmente et inhibe à la fois la production de la FSH par l'hypophyse antérieure et de libération hypothalamique de GnRH. Lorsque le nombre de spermatozoïdes est inférieur à 20 millions / ml, la sécrétion d'inhibine décroît fortement.

La testostérone, comme toutes les hormones stéroïdes, est synthétisée à partir du cholestérol et exerce ses effets en activant les gènes spécifiques, qui aboutissent à la synthèse accrue de certaines protéines dans les cellules cibles. Dans certaines cellules cibles, la testostérone doit être transformée en un autre stéroïde pour exercer ses effets. Dans la prostate, la testostérone est convertie en dihydrotestostérone (DHT) avant qu'il puisse se lier dans le noyau et dans certains neurones du cerveau, la testostérone est convertie en estradiol (Marieb, 2006).

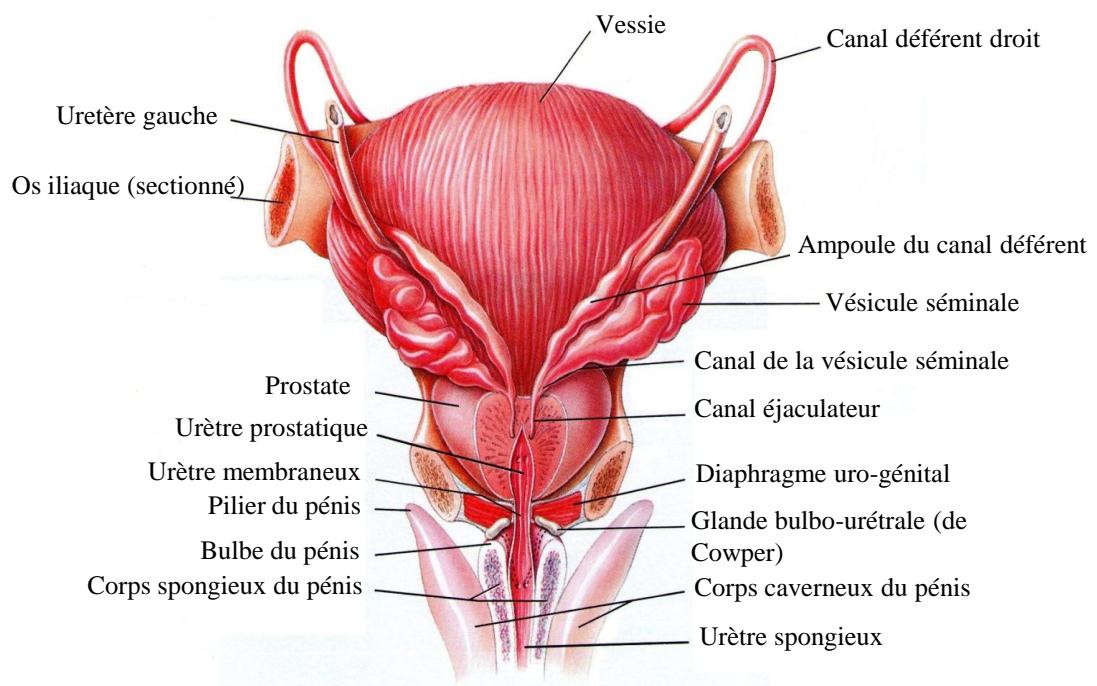


Figure 33: Organes reproducteurs de l'homme en relation avec les structures environnantes (Vue postérieure). Adapté d'après Marieb, 2006.

5. L'épididyme

Les spermatozoïdes sont transportés en dehors du testicule par une série de canaux efférents enroulés situés dans l'épididyme et qui se déversent dans le canal épididymaire. Les spermatozoïdes subissent des changements au cours de leur passage dans l'épididyme.

L'épididyme est un organe en forme de virgule mesurant environ 3.8 cm de longueur chez l'homme. Situé le long du bord postérieur du testicule, il est formé principalement d'un tube étroitement enroulé, le canal épididymaire. La portion postérieure de l'épididyme, plus volumineuse, est appelée tête. Dans la tête, les canaux efférents se déversent dans le canal épididymaire. Le corps de l'épididyme constitue la portion médiane étroite de l'épididyme. La queue est la portion inférieure, plus petite. Au bout de la queue, le canal épididymaire se prolonge en tant que canal déférent. Étroitement enroulé dans l'épididyme, le canal épididymaire mesure environ 6 m de longueur et 1 mm de diamètre. Le canal épididymaire est tapissé d'un épithélium cylindrique pseudo-stratifié et sa paroi contient des couches de muscle lisse. Les faces libres des cellules cylindriques contiennent de longues microvillosités ramifiées, les stéréocils. Les stéréocils augmentent la surface des cellules cylindriques et contribuent ainsi à la réabsorption des spermatozoïdes dégénérés.

Sur le plan fonctionnel, le canal épididymaire est l'endroit où se produit la maturation des spermatozoïdes. Pendant la période de maturation allant de 10 à 14 jours, la motilité des spermatozoïdes augmente et ils deviennent fertiles. Le canal épididymaire entrepose également les spermatozoïdes et les propulse en direction de l'urètre par des contractions péristaltiques de son muscle lisse. Les spermatozoïdes peuvent rester entreposés dans le canal épididymaire pendant une période allant jusqu'à au moins un mois. Après quoi, ils sont expulsés de l'épididyme ou dégénèrent et sont réabsorbés (Marieb, 2006).

6. Les glandes accessoires

Tandis que les canaux du système reproducteur de l'homme entreposent et transportent les spermatozoïdes, les glandes sexuelles annexes sécrètent la presque totalité de la partie liquide du sperme.

6.1. Les vésicules séminales

Les deux vésicules séminales sont des sacs à contour irrégulier, d'une longueur d'environ 5 cm, qui sont situés à l'arrière et à la base de la vessie, en avant du rectum (**Figure 33**). Elles sécrètent un liquide visqueux et alcalin, riche en fructose, en fibrinogène et en prostaglandines. La nature alcaline du liquide contribue à neutraliser le milieu acide du vagin de la femme, car si l'acidité n'était pas neutralisée, elle pourrait inactiver et tuer les spermatozoïdes. Le fructose est nécessaire à la production d'ATP par les spermatozoïdes. Les prostaglandines contribuent à la motilité et au maintien de la vie des spermatozoïdes. Ces substances hormonales peuvent également stimuler la contraction du muscle

utérin de la femme. Le fibrinogène aide à la coagulation du sperme après l'éjaculation. Le liquide sécrété par les vésicules séminales constitue environ 60 % du volume du sperme (Marieb, 2006).

6.2. La prostate

La prostate est une large glande de l'appareil génital masculin (**figure 33**). Elle se trouve au-dessous de la vessie et entoure la portion supérieure de l'urètre. Elle sécrète un liquide blanchâtre, légèrement acide, qui contient de l'acide citrique et un bon nombre d'enzymes telles que la phosphatase acide, des enzymes de coagulation et de la fibrinolysine. Les enzymes de coagulation exercent un effet sur le fibrinogène sécrété par les vésicules séminales, qui provoque alors la coagulation du sperme peu après l'éjaculation. La fibrinolysine a pour rôle de faire liquéfier ensuite le caillot. La sécrétion prostatique entre dans l'urètre prostatique par l'intermédiaire de nombreux canaux prostatiques. Elle constitue environ 25 % du volume du sperme et contribue à la motilité et au maintien de la vie des spermatozoïdes. La prostate grossit lentement entre la naissance et la puberté ; puis elle subit une poussée de croissance rapide. Le volume qu'elle a atteint vers l'âge de 30 ans demeure stable jusqu'à environ 45 ans, période où elle peut recommencé à s'hypertrophier (Marieb, 2006).

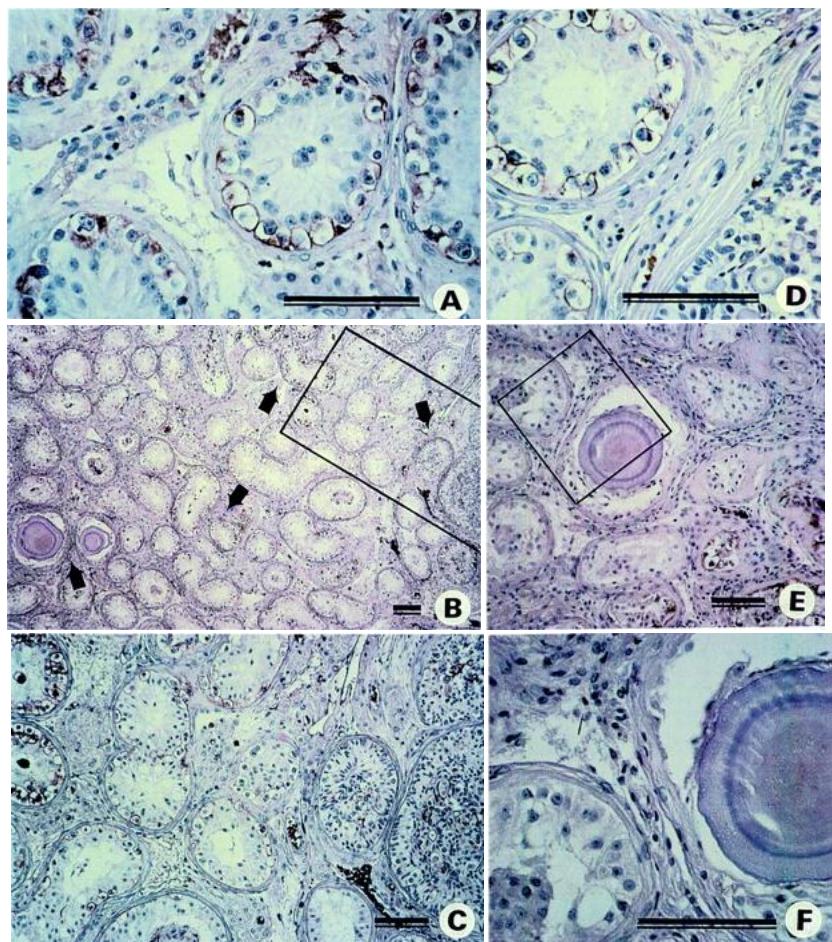


Figure 34: Exemples de dysgénésie testiculaire dans deux biopsies controlatérales des patients atteints de tumeurs testiculaires unilatérales. Les deux biopsies contiennent des cellule de carcinome *in situ* (CIS) qui sont visualisées par coloration immunohistochimique par la *placental-like alkaline phosphatase* (couleur brun foncé). La morphologie des cellules CIS est présentée en détail dans (A) et (D), ce dernier montrant deux tubules CIS avec un tubule comportant des cellules de Sertoli indifférenciées et des microcalcifications. (B) Présentation générale d'une biopsie avec trois caractéristiques dysgénésiques (indiquées par des flèches): les tubules CIS, les microlithes (corps hyalins) et les cellules de Sertoli indifférenciées. La partie encadrée contient des tubules CIS et les tubules dysgénésiques ressemblant à des nids de gonadoblastome et est représenté dans un plus fort grossissement dans (C). (E) Une autre biopsie avec CIS, un grand corps hyalin et des tubules ne contenant que des cellules de Sertoli. La partie encadrée est montrée en détail dans (F). Peu de cellules de Sertoli différenciées sont visibles dans le tubule adjacent à la microlithe. Barre d'échelle = 100 µm. Adapté d'après Skakkebæk N et al. 2001.

III. Les perturbateurs endocriniens

1. Définition

Le système endocrinien est un système complexe constitué de glandes réparties dans l'organisme. Ces glandes sécrètent des hormones qui agissent en tant que messagers chimiques, régulant de nombreuses fonctions comme la croissance, le développement, la reproduction, l'utilisation des aliments dans l'organisme, la pression artérielle, les taux de glycémie et l'équilibre des fluides. Certaines substances, aussi bien naturelles que fabriquées par l'homme, peuvent perturber les glandes endocrines, les hormones, ou les tissus-cibles sur lesquels elles agissent. Elles sont appelées « perturbateurs endocriniens » ou substances à action endocrine. Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques œstrogène-*like* et/ou anti-androgènes qui peuvent interagir avec le système endocrinien par différentes manières (Nassouri et *al.*, 2012):

- Effet similaire à des hormones (agoniste) : la substance se lie dans le corps à un récepteur hormonal et l'active de la même façon qu'une hormone endogène.
- Blocage de l'effet hormonal (antagoniste) : la substance se lie à un récepteur hormonal puis le bloque. Les hormones du corps ne peuvent alors plus s'y fixer.
- Influence (agoniste ou antagoniste) sur la disponibilité des hormones : la substance perturbe la synthèse ou la dégradation des hormones du corps, rendant variable la quantité disponible. La substance peut aussi influer sur la circulation sanguine des hormones.
- Effet indirect : dans les cellules ou l'organisme, le perturbateur endocrinien modifie des mécanismes qui sont d'une manière ou d'une autre en interaction avec le système hormonal et parvient donc à agir sur les hormones.

2. Altération des fonctions de l'appareil reproducteur mâle

On assiste depuis les dernières décennies à une baisse qualitative et quantitative de la production spermatique humaine (Sharpe et Irvine, 2004). En outre, l'incidence des anomalies de la différenciation de l'appareil génital mâle (hypospadias, cryptorchidisme et cancer testiculaire) s'est accrue de façon régulière au cours des vingt dernières années dans tous les pays où des études ont été réalisées (Toppari et *al.*, 1996). Des données cliniques et expérimentales laissent penser que ces xéno-œstrogènes agiraient pendant la vie fœtale et néonatale en induisant des anomalies. Il a été suggéré que ces anomalies seraient les symptômes d'une même pathologie, le syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) (**Figure 34**, Skakkebaek et *al.*, 2001), qui aurait pour origine une perturbation du développement du testicule pendant la vie fœtale. La réduction expérimentale du nombre de gonocytes pendant la vie fœtale ou du nombre de cellules de Sertoli pendant la vie périnatale provoque une

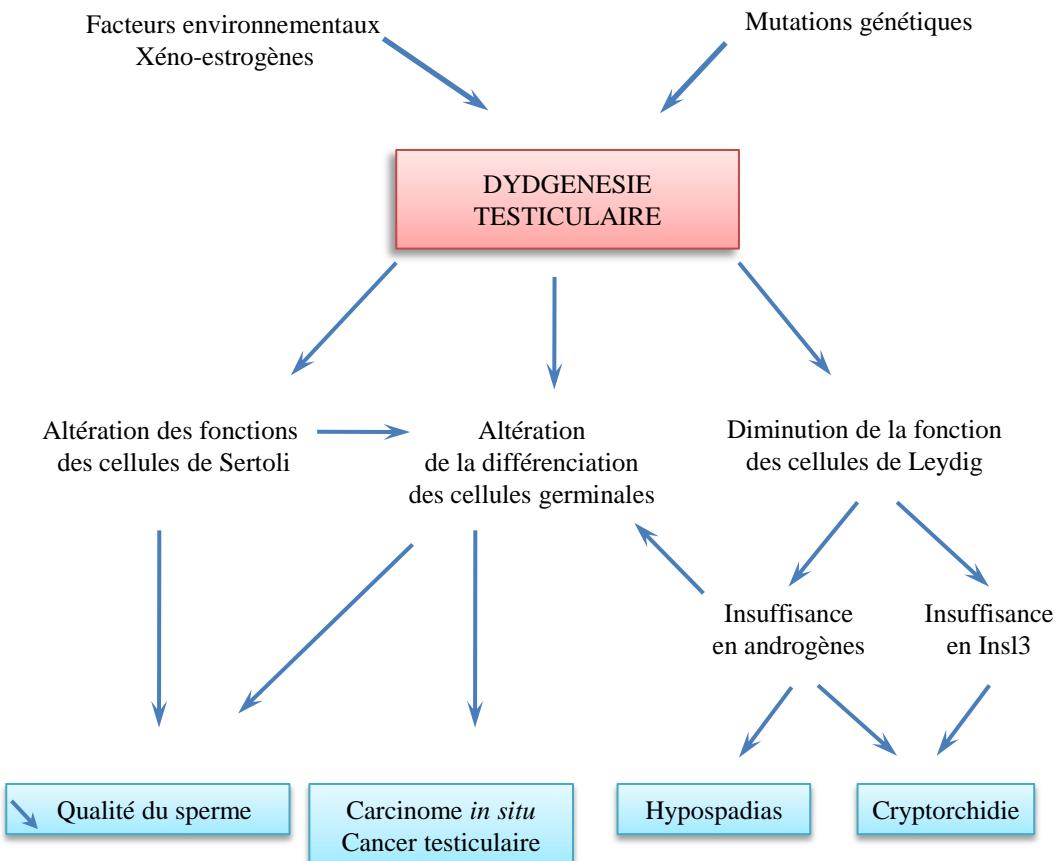


Figure 35: Représentation schématique des origines fœtales de l'altération des fonctions de reproduction masculine. Adapté d'après Skakkebaek et al., 2001.

diminution de la production spermatique adulte. La production spermatique adulte dépend donc en partie du développement testiculaire fœtal et de la capacité des gonocytes à se transformer en spermatogonies souches. Les cellules cancéreuses du testicule pourraient provenir des cellules germinales du testicule fœtal qui ne se seraient pas différenciées normalement en spermatogonies (Dieckmann et Skakkebaek, 1999). En outre, le risque de cancer testiculaire est augmenté chez les individus ayant eu un antécédent de cryptorchidie pendant l'enfance, ce qui va également dans le sens d'une origine prépubertaire des cellules cancéreuses. En fin, il est bien établi que l'hypospadias résulte d'un déficit de production d'androgènes au cours de la vie fœtale. Cette production est maximale durant le processus de masculinisation des organes génitaux externes. Deux hormones produites par les cellules de Leydig fœtales, la testostérone et *Insulin like factor 3*(*Isl3*), contrôlent le processus de descente testiculaire depuis leur position embryonnaire intra-abdominale vers le scrotum (Habert *et al.*, 2007).

3. Les sites cibles des perturbateurs endocriniens dans le système reproducteur mâle

Un perturbateur endocrinien peut affecter plusieurs cibles potentielles dans le tractus reproducteur masculin (**Figure 35**). Les plus importantes étant les testicules, sites de la spermatogenèse et de la production d'androgènes.

- La différenciation des cellules de Sertoli et la formation de la barrière hémato-testiculaire sont essentielles à l'établissement d'une spermatogenèse normale pendant la puberté. Ainsi, de nombreuses malformations de la spermatogenèse dues à l'interférence avec les perturbateurs endocriniens peuvent refléter des changements dans la fonction des cellules de Sertoli et pas nécessairement par la pathologie dans les cellules germinales elles-mêmes (Sikka et Wang, 2008 ; Li *et al.*, 2010).
- La cellule de Leydig peut être la cible directe des perturbateurs endocriniens. Le dysfonctionnement des cellules de Leydig fœtales induites par les perturbateurs endocriniens peut provoquer une masculinisation incomplète et le développement de diverses malformations dans le tractus génital mâle. L'atténuation du développement et de la fonction des cellules de Leydig adultes peut se manifester par la disparition de la spermatogenèse et de la libido. La déficience de la fonction de cellules de Leydig peut se traduire par une diminution de la production de la testostérone, conséquence de la réduction de l'expression de plusieurs facteurs stéroïdogènes importants (Svechnikov *et al.*, 2010).
- Les spermatogonies subissent plusieurs divisions mitotiques pour générer une importante population de spermatocytes primaires, qui donnent des spermatides haploïdes par deux divisions méiotiques. Pendant l'arrêt de la mitose, le gonocyte devient extrêmement sensible à des agents toxiques. Une faible dose d'irradiation, par exemple, peut éradiquer complètement les

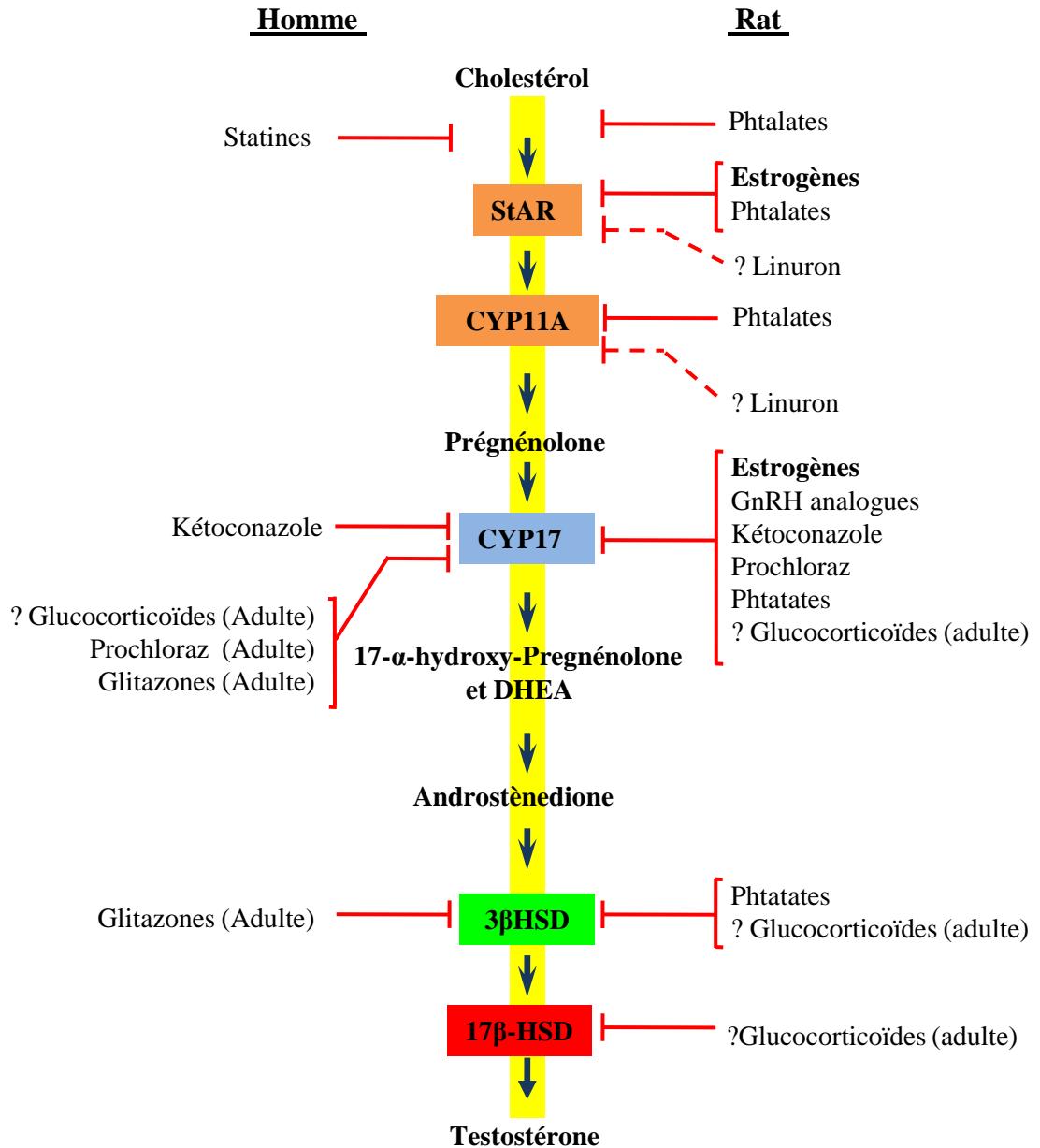


Figure 36: Schéma récapitulatif comparant les points connus dans la voie de la stéroïdogenèse sur lesquels les composés thérapeutiques et environnementaux peuvent avoir un impact négatif sur la production de testostérone dans le testicule du fœtus chez l'homme et le rat. Les informations qui proviennent de l'étude du testicule adulte sont indiquées entre parenthèses. Un site d'action pour les dioxines chez le rat n'est pas visible car son inhibition de StAR et CYP17 peut être secondaire à la suppression de LH. Notez que les voies $\Delta 4$ et $\Delta 5$ ne sont pas représentées dans ce schéma pour des raisons de clarté, mais sont illustrées dans la Fig. 23 pour les humains et les rats / souris. Ce schéma de synthèse ne s'applique pas dans tous les cas à des souris parce que les agonistes de la GnRH, les phtalates (et les dioxines) sont en grande partie sans effet sur cette espèce. *Adapté d'après Hayley et al., 2009.*

cellules germinales tout en provoquant peu de dégâts au développement de cellules de Sertoli, créant ainsi un testicule formé de cellules de Sertoli uniquement.

4. Les perturbateurs endocriniens et la fonction testiculaire (Figure 36)

4.1. Effets des anti-androgènes sur la fonction hormonale des cellules de Leydig

Les composés anti-androgéniques environnementaux peuvent exercer un effet anti-androgène. Les pesticides procymidone, linuron, vinclozoline, p,p-DDT et ses dérivés, sont tous des antagonistes du récepteur des androgènes (AR) et inhibent la croissance des tissus androgéno-dépendants *in vivo* (Kelce *et al.*, 1995). La procymidone est largement utilisée comme fongicide pour lutter contre des maladies des plantes. Ce composé possède une faible activité anti-androgène et peut induire un hypergonadisme (Hosokawa *et al.*, 1999). L'administration de la procymidone à long terme est soupçonnée d'avoir un effet inhibiteur sur la rétroaction négative exercée par les androgènes sur l'hypothalamus et/ou de l'hypophyse, provoquant ainsi un hypergonadisme chez le rat. La moindre capacité de la testostérone à se lier au récepteur AR dans cette situation supprime les réactions d'inhibition de la testostérone sur la production de LH, en empêchant l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure de reconnaître la présence de la testostérone. L'hypergonadisme à long terme et l'hyperstimulation des cellules de Leydig induite par la procymidone donnent lieu à des tumeurs de cellules de Leydig chez les rats mâles (Murakami *et al.*, 1995). La vinclozoline est un fongicide qui possède deux métabolites actifs M1 et M2, qui ont tous les deux des propriétés anti-androgéniques. Ces métabolites empêchent la fixation des androgènes sur AR et inhibent la transcription induite par la DHT (*Dihydrotestostérone*) en bloquant la liaison de AR à l'élément de réponse aux androgènes sur l'ADN (Wong *et al.*, 1995). L'administration orale de la vinclozoline retarde la maturation pubertaire et provoque une diminution de la croissance des glandes sexuelles accessoires et une augmentation des taux sériques de LH, testostérone, 5 α -androstane et 3 α , 17 β -diol (Monosson *et al.*, 1999).

4.2. Effets des composés œstrogéniques sur les fonctions des cellules de Leydig

Les œstrogènes jouent un rôle important dans la modulation de la fonction testiculaire (Sharpe, 2003). L'effet inhibiteur des œstrogènes sur la fonction de reproduction masculine apparaît, au moins en partie, être médiée par la suppression de la libération de LH par l'hypophyse. Un effet direct des œstrogènes sur la stéroïdogenèse des cellules de Leydig a également été démontré. Des expériences *in vivo* ont montré que l'administration d'œstradiol peut inhiber la stéroïdogenèse via la suppression de l'activité du cytochrome P450c17 dans les cellules de Leydig (Kalla *et al.*, 1980). Ces constatations ont été confirmées par des expériences *in vitro*, montrant que l'œstradiol peut interagir directement avec la P450c17 comme un inhibiteur non compétitif en se liant à l'enzyme (Onoda et Hall, 1981).

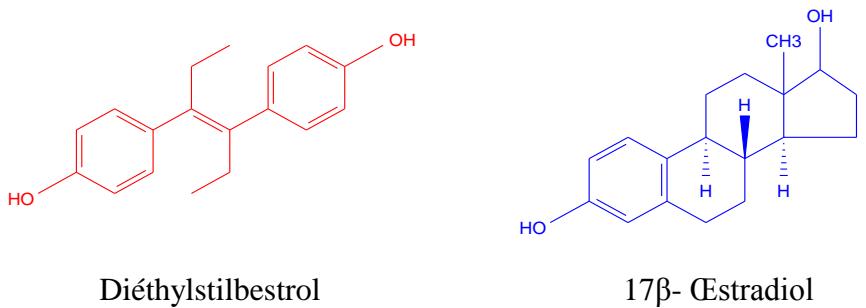


Figure 37: Structure du Diéthylstilbestrol (DES) et du 17 β - œstradiol

Le récepteur des œstrogènes α (ER α) est exprimé dans les cellules de Leydig et les souris invalidées pour ER α ont un taux de spermatozoïdes plus faible et des taux élevés de testostérone sérique (Eddy *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'expression de la plupart des enzymes de la stéroïdogenèse tels que la P450c17, la 17 β -HSD et StAR est plus élevée dans les souris invalidées pour ER α que dans les souris sauvages (Akingbemi *et al.*, 2003), suggérant ainsi que la signalisation ER α peut supprimer la production d'androgènes dans les cellules de Leydig. Étant donné que les composés exogènes d'origine anthropique ou naturelle ayant des fonctions œstrogéniques sont largement distribués dans les aliments, l'air et l'eau, il est suggéré que ces facteurs environnementaux peuvent influencer négativement la fonction de reproduction chez les humains (Svechnikov *et al.*, 2010).

4.3. Les facteurs environnementaux et l'épigénétique

Les marqueurs épigénétiques sont très étroitement surveillés tout au long de la spermatogenèse. La perturbation de toute régulation épigénétique peut conduire à une diminution de la fertilité ou à l'infertilité. En effet, certains facteurs environnementaux ont été trouvés comme étant la cause d'une régulation épigénétique aberrante qui affecte négativement les paramètres du sperme. Une étude menée par Tunc et Tremellen (2009) a démontré que la production des espèces réactives de l'oxygène dans le sperme est positivement corrélée avec la fragmentation de l'ADN et négativement corrélé avec la méthylation de l'ADN. Les hommes infertiles ont été trouvés à avoir une plus grande fragmentation de l'ADN et des niveaux plus élevés d'espèces réactive de l'oxygène que les hommes fertiles. Des études ont montré que la 5-aza-20-désoxycytidine, un agent anticancéreux, entraîne une diminution de la méthylation de l'ADN globale qui conduit à une altération de la morphologie des spermatozoïdes, à une diminution de la motilité des spermatozoïdes, à une diminution de la capacité de la fécondation et une diminution de survie des embryons (Oakes *et al.*, 2007).

5. Le diéthylstilbestrol

5.1. Histoire du diéthylstilbestrol

Le diéthylstilbestrol (DES) est un œstrogène de synthèse non stéroïdien qui a été synthétisé pour la première fois en 1938 à Londres par le médecin chimiste Charles Dodds (**Figure 37**). Cet œstrogène de synthèse est alors commercialisé en 1946 sous le nom de Distilbène et de Stilbestrol-Borne. Il est tout d'abord utilisé dans les grossesses menacées : antécédent d'avortement spontané, hémorragies gravidiques tout particulièrement au cours du 1^{er} trimestre. Ultérieurement il sera proposé et utilisé chez les patientes diabétiques insulino-dépendantes, les toxémies gravidiques et même dans le traitement des stérilités.

Son utilisation comme agent anti-avortement a été basée sur l'hypothèse que l'équilibre hormonal de la grossesse problématique est perturbé. Les études ont souligné que la toxémie de

gestation avancée, l'accouchement prématuré et les fausses couches ont été précédées par de faibles taux d'œstrogènes et de progestérone urinaires. Parce que les propriétés biologiques du DES sont assez semblables aux œstrogènes, il a été suggéré que l'administration de diéthylstilbestrol rétablirait l'équilibre hormonal par compensation des faibles niveaux d'hormones stéroïdes naturelles (Veurink *et al.*, 2005). Ainsi, les fausses couches seraient évitées, ou au moins la gravité des complications serait réduite. Le DES a été donné aux femmes qui avaient des antécédents de grossesses problématiques ou qui ont souffert de diabète, car on croyait que les niveaux hormonaux endogènes de ces femmes avaient été perturbés. Plus tard, le médicament a également été administré à des femmes enceintes en bonne santé (Kruse *et al.*, 2003).

En 1953, un grand essai clinique a été réalisé pour tester l'efficacité du DES. Dans cette étude, les effets de l'administration du DES à 840 femmes enceintes ont été comparés avec les effets d'un placebo administré à 806 femmes enceintes. Les résultats de cette étude ont montré que le DES était inefficace pour la prévention des fausses couches et naissances prématurées (Dieckmann *et al.*, 1999). Ce résultat a été soutenu par le résultat d'une autre étude, dans laquelle 190 femmes ont reçu des doses croissantes du DES. La comparaison de ces femmes avec un groupe témoin de 203 femmes enceintes a montré un avantage thérapeutique du DES sur la pré-éclampsie, la prématurité, le poids du fœtus et la survie, ou encore la taille du placenta (Ferguson, 1953 ; Giusti *et al.*, 1995 ; Hoover *et al.*, 2011).

En 1971, les premiers effets négatifs du DES ont été révélés. Entre 1966 et 1969, huit cas de cancer du vagin ont été découverts chez les jeunes femmes nées de mères qui avaient été traitées au DES. Cette forme rare de cancer, appelée adénocarcinome à cellules claires (ACC) n'avait pas été vu auparavant chez les femmes de moins de 50 ans. Une étude cas-témoins a été faite pour découvrir les facteurs qui pourraient être responsables de l'apparition de ces tumeurs. Une forte relation entre le ACC et l'administration du DES chez les mères de ces femmes a été découverte, après qu'il est devenu clair que sept des huit femmes avaient été exposées au DES pendant la période embryonnaire, comparativement au 32 témoins. Malgré les résultats de cette étude, le DES a été prescrit en Europe jusqu'à la fin des années 1970 (Giusti *et al.*, 1995).

5.2. Les effets secondaires chez les mères DES : Risque du cancer du sein

A partir du moment où le DES a été associé au cancer chez les « filles DES », la recherche a également porté sur les effets du DES sur les mères elles-mêmes. Parce que les éventuels effets à long terme de l'exposition au DES pendant la grossesse ne pouvaient pas être exclus, des études de suivi ont été effectuées. Les femmes ayant pris du DES pendant la grossesse ont une incidence légèrement plus élevée de cancer du sein par rapport à la population générale. Il existe quatre études nord-américaines disponibles sur le sujet (Colton *et al.*, 1993; Calle *et al.*, 1996; Titus-Ernstoff *et al.*, 2001). Il s'agit de quatre études de cohorte comparant le risque de cancer du sein chez les patientes ayant pris du DES

pendant leur grossesse à des patientes non exposées. Ces études suggèrent que les femmes exposées au DES développent des cancers du sein après l'âge de 50 ans à un rythme plus rapide que les femmes non exposées du même âge. Aucune augmentation du risque d'autres cancers hormono-dépendants a été constaté chez les femmes exposées au DES pendant la grossesse (Schrager et Potter, 2004)

5.3. Les effets secondaires chez les filles DES

5.3.1. Risque du cancer du sein

Le rôle de l'exposition *in utero* aux œstrogènes dans la survenue du cancer du sein est évoqué depuis plusieurs années. Ce risque intéresserait plutôt les patientes de moins de 40 ans, chez qui un risque de cancer du sein serait plus élevé en cas d'exposition *in utero* aux estrogènes (Sanderson *et al.*, 1996 ; Weiss *et al.*, 1997). Aucune de ces études ne retrouve une association significative entre le risque de cancer du sein et la prise du DES. Une étude plus récente, concernant des patientes plus âgées et donc à risque plus élevé de cancer du sein, a mis en évidence une association entre le risque de cancer du sein et l'exposition *in utero* au DES (Palmer *et al.*, 2002).

5.3.2. Adénocarcinome à cellules claires du col de l'utérus et du vagin

Le DES est assimilé à un cocarcinogène dont l'évolution vers l'apparition d'un cancer est liée à l'existence d'autres facteurs de risque : facteurs hormonaux péripubertaires, déficience du système immunitaire, hypersensibilisation à l'action des virus du papillome humain (*Human papillomavirus* ; HPV), mais aussi du virus de l'herpès HSV2 (Adam *et al.*, 1985). Les rapports entre l'adénocarcinome à cellules claires du vagin et l'exposition *in utero* au DES ont été démontrés par Herbst et Scully en 1970. Cet auteur rapporta les résultats d'une enquête cas témoin portant sur 8 cas d'ACC appariés à une série de 32 cas témoins. Sept patientes sur huit présentant un ACC avaient été exposées *in utero* au DES.

Le risque de développement d'un ACC est d'environ 1/1 000 adénoses cervico-vaginales, ce qui ne plaide pas en faveur du rôle oncogène de l'adénose. Celle-ci se retrouve en effet chez 30 % des patientes exposées *in utero* au DES. On estime qu'environ 4000000 de patientes ont pris du DES aux États-Unis, ce qui représente la naissance de quelque 3500000 enfants du DES, soit près de 1700000 filles (Herbst *et al.*, 1974 ; Laronda *et al.*, 2012).

5.3.3. Les anomalies utérines

Kaufmann (1977) a attiré l'attention, dès 1977, sur les lésions utérines secondaires suite à l'exposition *in utero* au DES. En 1980, à partir de 267 hystérographies réalisées sur des volontaires exposées *in utero*, il précise ces anomalies. La fréquence de l'hypoplasie utérine est estimée à 70 %

des cas après observation de 267 hystérographies. Elle est très souvent associée à des anomalies de structure des bords utérins qui donnent une image assez stéréotypée de l'utérus (utérus en forme de T).

Belaisch (1983) a émis une hypothèse physiopathologique pour tenter d'expliquer ces anomalies. Le DES aurait une action antagoniste sur les canaux de Müller et de Wolff : effet œstrogénique sur les canaux de Müller et effet anti-œstrogénique sur les canaux de Wolff. La régression des canaux de Wolff sous l'action du DES entraînerait une incurvation et une divergence horizontale des canaux de Müller à l'origine de l'aspect en T. Cette incurvation des canaux de Müller pourrait en outre expliquer l'aspect tourmenté des bords utérins et l'alternance des zones de rétrécissement sous-cornual et de dilatation sus-isthmique. Cet effet anti-œstrogénique expliquerait aussi la plus grande fréquence des anomalies en cas d'exposition précoce *in utero* au DES. Cette anomalie utérine se retrouve expérimentalement chez la souris comme l'ont bien montré les travaux de Mac Lachlan (1982).

5.3.4. Autres anomalies annexielles

Les anomalies de l'ampoule tubaires ont été décrites chez certaines patientes: paroi amincie, pavillon hypoplasique, phymosis, associés à divers kystes péritubaires (Decherney et al., 1981 ; Troiano et McCarthy, 2004), tumeurs annexielles (Herbst et al., 1980), effet antiandrogénique du DES (insensibilité aux androgènes) et la réponse exagérée des œstrogènes cellulaires empêchent l'action du facteur antimüllérien, ce qui explique la présence de vestiges des canaux müllériens (Chryssicopoulos et al., 1990).

5.4. Les effets secondaires chez les garçons DES

Les chercheurs connaissent les conséquences du DES chez les descendants mâles d'une rate ou d'une souris lorsqu'ils ont été exposés *in utero* : hypospadias, cryptorchidie, kystes épидidymaires, hypotrophie testiculaire, diminution de la qualité du sperme... Plusieurs études menées chez l'homme entre 1976 et 1995 indiquent une hausse statistiquement significative de ces anomalies génitales : 5,5 % chez les garçons exposés versus 0,3 % dans la population générale (Lastérade, 2006).

Les « garçons DES » sont trois fois plus susceptibles d'avoir des anomalies structurelles des organes génitaux que les hommes non exposés (Cosgrove et al., 1977). Les anomalies les plus fréquentes sont l'hypoplasie testiculaire, la cryptorchidie, l'hypospadias, les tumeurs du *rete testis* et des cellules interstitielles (Docimo et al., 2000 ; Fielden et al., 2002).

5.4.1. Conséquences de l'exposition au DES sur le développement urogénital

Une incidence accrue de sténoses du méat, d'hypospadias, de kystes épидidymaires, de testicules hypoplasiques, de cryptorchidies, de micropénis et de varicocèles a été rapportée chez les hommes

exposés au DES *in utero*. Oligospermie et anomalie du volume de l'éjaculât, asthénozoospermie, tératospermie ont également été reportées. Ces anomalies du sperme peuvent être responsables d'une réduction de la fertilité chez « les hommes DES » (Drapier, 1984 ; Blanc *et al.*, 2007)

5.4.2. Risque de cancer du testicule chez les hommes exposés *in utero* au DES

Une association entre exposition prénatale au DES et cancer du testicule chez l'homme a été suspectée, mais les résultats tirés d'études cas-témoins ne sont pas concluants. Une étude menée par Strohsnitter en 2001, a comparé 3613 hommes exposés à un groupe témoin et à la population générale. En conclusion, les hommes exposés au DES *in utero* ne présentent pas de risque accru de cancer par rapport au groupe témoin ni par rapport à la population générale. On observe cependant une augmentation non significative du taux de cancer testiculaire par rapport au groupe témoin avec un risque relatif par rapport à la population générale.

La séminome, le cancer du testicule le plus fréquent, exprime bien l'aromatase, l'enzyme permettant la transformation de la testostérone en œstradiol et ces cellules expriment également le récepteur des estrogènes ER β mais non ER α (37). Malheureusement, contrairement au cancer de la prostate et du sein, il n'est pas possible d'induire chez les rongeurs de cancer germinal testiculaire par exposition *in utero* ou périnatale à des xénoestrogènes. Il n'existe d'ailleurs aucun modèle expérimental connu chez ces animaux permettant d'induire un cancer testiculaire germinal ressemblant à la séminome. Force est donc d'utiliser des lignées de cellules cancéreuses humaines (Roger *et al.*, 2005 ; Bouskine *et al.*, 2008). L'œstradiol, l'estrogène naturel, exerce sur les cellules séminomateuses un effet suppresseur sur la prolifération qui est médié par le récepteur nucléaire classique ER β . L'œstradiol couplé à l'sérum albumine bovine ne traversant pas la membrane, en revanche, stimule la prolifération des cellules cancéreuses germinales via un récepteur membranaire couplé aux protéines G (GPER : récepteur des estrogènes couplé aux protéines G). Il existe donc au moins deux mécanismes différents par lesquels des xénœstrogènes peuvent réguler les cellules séminomateuses (Fénichel, 2011).

5.4.3. Risque d'hypospadias chez les hommes exposés *in utero* au DES

L'hypospadias est l'anomalie de l'appareil urogénital la plus étudiée quant aux conséquences du DES chez l'homme. Des études ont reporté un risque multiplié par 20 chez les « garçons DES ». L'étude de Klip *et al.*, en 2002, met en évidence un risque accru d'hypospadias chez les « fils DES ». Bien que le risque de cette anomalie soit faible, cet effet transgénérationnel du DES méritait des investigations supplémentaires. Palmer *et al.*, en 2005, dans une autre étude, ne retrouve cependant pas les mêmes résultats. En effet, il ne retrouve pas d'augmentation du risque d'hypospadias chez les « garçons DES » (Klip *et al.*, 2002 ; Palmer *et al.*, 2005).

Des anomalies de l'appareil urogénital sont fortement suspectées comme une conséquence de l'exposition au DES chez les hommes exposés *in utero* et de nombreuses interrogations subsistent sur une éventuelle transmission de ces anomalies aux garçons de troisième génération. Plusieurs études épidémiologiques sont publiées dans la littérature et certaines font état d'un risque accru d'hypospadias chez les « garçons DES », mais d'autres études sont contradictoires. Concernant les autres conséquences urogénitales, les risques d'infertilité et de cancer du testicule notamment sont très discutés et nécessitent d'autres études (Blanc *et al.*, 2007).

5.5. Les effets secondaires sur la troisième génération

La première démonstration d'un risque de cancer accru dans la troisième génération fut réalisée chez la souris par Walker (1984). Une susceptibilité accrue aux tumeurs du tractus génital a été démontré chez les souris issues de parents exposés au DES en période prénatale (Walker et Haven, 1997), mais cette relation n'a pas encore été observée chez l'homme. À ce jour, aucune étude n'a démontré un risque accru de cancer chez la progéniture des hommes et des femmes qui ont été exposées au DES *in utero*. Deux études (Kaufman et Adam, 2002 ; Wilcox *et al.*, 1995) concernant les « petites filles DES » n'ont trouvé aucun effet de santé lié à l'exposition au DES. Cependant, une étude (Klip *et al.*, 2002) de "petits-fils DES" a montré un risque accru d'hypospadias (Kalfa *et al.*, 2011). Actuellement le DES est à l'étude comme un traitement hormonal expérimental (un type de thérapie aux œstrogènes) chez les hommes atteints du cancer de la prostate réfractaire (Whitesel, 2003). La perturbation de l'équilibre de ce système endocrinien par des facteurs endogènes ou exogènes peut conduire à l'hypospadias (Kalfa *et al.*, 2011).

IV. Présentation du projet de recherche

Au cours de ces dernières années le rôle des LXR α s dans le tractus génital mâle a été bien élucidé. Des importantes anomalies structurelles de l'épididyme ont été observées chez les souris *lxrαβ^{-/-}*, y compris la perturbation de l'épithélium, l'élargissement des canaux épididymaires qui deviennent remplis avec une substance amorphes riches en lipidique et le chargement des lipides dans les cellules épithéliales et interstitielles. En outre, moins de spermatozoïdes ont été trouvés dans l'épididyme de souris *lxrβ^{-/-}* et ces spermatozoïdes présentent des anomalies structurelles et fonctionnelles. Chez les souris *lxrα^{-/-}* le métabolisme des lipides a été sévèrement affectée dans les cellules de Sertoli, sans aucun signe d'infertilité. Cependant, les souris déficientes des deux LXR α s sont complètement stériles à cinq mois d'âge (Frenoux *et al.*, 2004). De plus, un nombre grandissant d'études montre que différents signaux extracellulaires, notamment le statut inflammatoire et intracellulaires, comme les phosphorylations, peuvent moduler l'expression des gènes codant les LXR α s et leur activité transcriptionnelle.

La fonction du testicule des mammifères est contrôlée par de multiples facteurs endocriniens et paracrines, y compris les œstrogènes qui exercent leurs effets via les récepteurs nucléaires des œstrogènes. Il est également bien connu qu'un excès d'œstrogènes est très délétère pour la fonction testiculaire. Chez la souris, l'exposition *in utero* à des fortes doses au DES pendant le développement foetal pourrait provoquer de multiples anomalies du système reproducteur, y compris l'hypoplasie testiculaire, la cryptorchidie, l'hypospadias, les tumeurs du *rete testis* et des cellules interstitielles, des granulomes spermatiques et une diminution du nombre total de spermatozoïdes et de la fertilité (Fielden *et al.*, 2002).

Dans ce cadre, le projet de cette étude a porté sur l'analyse *in vivo* d'interaction possible entre les voies de signalisation du DES et celle des LXR α s dans le testicule par la caractérisation du phénotype des souris mâles *lxrα;β^{-/-}* traités ou non par le DES en période néonatale. Ce projet reposait sur plusieurs observations :

- (1) Les cellules de Leydig déficientes en gène *est* (estrogénosulfotransférase) montrent une accumulation des esters de cholestérol avec altération de la spermatogenèse. Ces cellules produisent 50 à 70% moins de testostérone que celles des souris sauvages (Tong *et al.*, 2004). Le même phénotype a été observé chez les souris LXR par Volle *et al.* (2007) a montré que les souris LXR $\alpha\beta^{-/-}$ présentaient une augmentation de l'accumulation de lipides dans les cellules de Sertoli et une baisse du taux de prolifération des cellules germinales.

- (2) Dans les cellules du tissu adipeux, le 17β estradiol diminue l'expression du *lxr α* après 10h de traitement. L'expression de la plupart des gènes cible LXR α , comme *sebp1c*, *apoe*, *abca1* et *abcg1* est aussi diminuée (Lundholm *et al.*, 2004). L'activation des macrophages et l'homéostasie du cholestérol sont affectées par les changements de concentrations d'œstrogènes. En plus, des expériences de traitement par la cycloheximide, qui bloque la synthèse protéique, indiquent que le retrait des œstrogènes affecte les niveaux de transcription des LXR α (Kramer et Wray, 2002).
- (3) Les LXR s contrôlent l'homéostasie des œstrogènes en régulant l'expression hépatique basale et inducible de l'enzyme (Est), une importante enzyme de la désactivation métabolique des œstrogènes. L'activation génétique ou pharmacologique des LXR s provoque l'induction de *est*, ce qui inhibe la prolifération et l'expression des gènes œstrogèno-dépendants des cellules épithéliales utérines ainsi que le développement du cancer du sein dans le modèle de souris. L'enzyme œstrogènesulfotransférase est une cible transcriptionnelle des LXR s et la délétion du gène *est* abolie l'effet des LXR s sur le métabolisme des œstrogènes (Gong *et al.*, 2007).

Résultats

Présentation du contexte scientifique

Ces dernières années, on a rapporté une augmentation des anomalies de l'appareil reproducteur masculin, comme la cryptorchidie et l'hypospadias, et l'augmentation de l'incidence des cancers du testicule ainsi que la diminution de la qualité du sperme. Des études épidémiologiques ont mis en relation ces altérations avec l'exposition croissante, pendant la vie fœtale et néonatal, à des molécules agonistes des œstrogènes ou antagonistes des androgènes présentes dans l'environnement (Sharpe et Skakkebaek, 1993). Récemment il a été démontré que le testicule fœtal et néonatal sont très sensibles aux estrogènes, étant donné que l'inactivation du récepteur des estrogènes α augmente la stéroïdogenèse et l'inactivation du récepteur des estrogènes β renforce le développement des cellules germinales chez le mâle (Delbès *et al.*, 2006). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation des xénoœstrogènes dans le tractus génital male sont encore mal connus.

Quelques études bibliographiques établissent un lien entre la signalisation des estrogènes et les autres récepteurs nucléaires, notamment les récepteurs LXR α . Lundholm *et al.*, (2004) ont montré que le 17 β estradiol diminue les transcrits de LXR α ainsi que certains gènes cibles comme SREBP1c, ABCG1 et ABCA1 après 10 heures de traitement. En plus, les LXR α contrôlent l'homéostasie des œstrogènes en régulant l'expression hépatique basale de l'enzyme œstrogène sulfotransférase, une enzyme essentielle pour la désactivation d'œstrogène métaboliques (Gong *et al.*, 2007). Nous avons choisi le modèle des souris (LXR $^{-/-}$) pour identifier si les effets délétères du DES sur la physiologie du testicule passent par les LXR α et de disséquer plus précisément les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Article 1

Liver X receptors interfere with the deleterious effect of diethylstilbestrol on testicular physiology

Biochemical and Biophysical Research Communications 446 (2014) 656–662

Abdelkader Oumeddour, Emilie Viennois, Françoise Caira, Clélia Decourbey, Salwan Maqdasy, Abdelkrim Tahraoui, Silvère Baron, David H. Volle, Jean-Marc A. Lobaccaro



Liver X receptors interfere with the deleterious effect of diethylstilbestrol on testicular physiology



Abdelkader Oumeddour ^{a,b,c,d,e}, Emilie Viennois ^{a,b,c,d}, Françoise Caira ^{a,b,c,d}, Clélia Decourbey ^{a,b,c,d}, Salwan Maqdasy ^{a,b,c,d,f}, Abdelkrim Tahraoui ^e, Silvère Baron ^{a,b,c,d}, David H. Volle ^{a,b,c,d,*}, Jean-Marc A. Lobaccaro ^{a,b,c,d,*}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^b CNRS, UMR 6293, GReD, F-63171 Aubière, France

^c INSERM, UMR 1103, GReD, F-63171 Aubière, France

^d Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^e Laboratoire de Neuroendocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria

^f Service d'endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques, CHU Clermont-Ferrand, F-63003 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2013

Available online 11 December 2013

Keywords:

Diethylstilbestrol

LXR

Nuclear receptors

Testis

Germ cells

ABSTRACT

Liver X receptors LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) are transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily, activated by specific oxysterols, oxidized derivatives of cholesterol. These receptors are involved in the regulation of testis physiology. Lxr-deficient mice pointed to the physiological roles of these nuclear receptors in steroid synthesis, lipid homeostasis and germ cell apoptosis and proliferation. Diethylstilbestrol (DES) is a synthetic estrogen considered as an endocrine disruptor that affects the functions of the testis. Various lines of evidences have made a clear link between estrogens, their nuclear receptors ER α (NR3A1) and ER β (NR3A2), and LXR α/β . As LXR activity could also be regulated by the nuclear receptor small heterodimer partner (SHP, NR0A2) and DES could act through SHP, we wondered whether LXR could be targeted by estrogen-like endocrine disruptors such as DES. For that purpose, wild-type and Lxr-deficient mice were daily treated with 0.75 μ g DES from days 1 to 5 after birth. The effects of DES were investigated at 10 or 45 days of age. We demonstrated that DES induced a decrease of the body mass at 10 days only in the Lxr-deficient mice suggesting a protective effect of Lxr. We defined three categories of DES-target genes in testis: those whose accumulation is independent of Lxr; those whose accumulation is enhanced by the lack of both LXR α/β ; those whose accumulation is repressed by the absence of LXR α/β . Lipid accumulation is also modified by neonatal DES injection. Lxr-deficient mice present different lipid profiles, demonstrating that DES could have its effects in part due to LXR α/β . Altogether, our study shows that both nuclear receptors LXR α and LXR β are not only basally important for testicular physiology but could also have a preventive effect against estrogen-like endocrine disruptors.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The nuclear receptors LXR α (NR1H3) [1] and LXR β (NR1H2) [2,3] were first described in the mid 90' in the liver as orphan receptors. David Mangelsdorf's group "deorphanized" them [4] and oxidized or hydroxylated metabolites of cholesterol known as oxysterols have been described to be the *bona fide* ligands [5,6]. Their putative association with human diseases makes them promising pharmacological targets [7,8]. First *in vivo* analyses of Lxr-deficient mice [9,10] pointed out their pivotal roles in

* Corresponding authors at: Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

E-mail addresses: david.volle@insERM.fr (D.H. Volle), j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr (J.-M.A. Lobaccaro).

cholesterol homeostasis; LXR α/β are hence considered as intracellular cholesterol sensors whose activation leads to decreased plasma cholesterol. Beyond cholesterol homeostasis, they modulate numerous physiological functions such as fatty acid synthesis, lipid metabolism, glucose homeostasis, steroidogenesis, immunity, and neurological homeostasis. LXR α/β are also involved in the control of reproductive functions in both females [11,12] and males (for a review see [13]). Indeed, deficient mice for both isoforms become infertile during aging [14,15]. Several functions have been associated with both Lxr isoforms in mouse testis. LXR α regulates steroid synthesis by Leydig cells through transcriptionally enhancing *Star* and *Cyp11a1*, respectively encoding the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein whose function is to translocate cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane in steroidogenic cells [16] and the cholesterol side-chain cleavage enzyme

that catalyzes conversion of cholesterol to pregnenolone [15]. Lxr α -deficient mice also present an increased apoptosis of the germ cells. Next to this, Lxr β has been identified in Sertoli cells as a major sensor of lipid homeostasis. Moreover Lxr β -deficient mice show lower germ cell proliferation [15]. These data define the Lxr α/β as key factors to control testicular integrity and functions [13].

The incidence of male fertility disorders is constantly increasing [17,18] since the 60's as proven by studies on semen quality performed on men from the Nordic countries, Germany, France, UK and the Baltic countries, as well as from Japan and the USA. This has been linked to multiple factors [19]. Among these, endocrine disruptors have been suspected to be involved [20]. These compounds have either estrogenic or anti-androgenic activities. Diethylstilbestrol (DES) is a synthetic estrogen that has been prescribed for 30 years until the 70's to pregnant women to prevent abortions and pregnancy complications. DES was banned from reproductive medication after it was proved to increase the incidence of cancer clear-cell adenocarcinoma of the vagina in pubertal girls who were exposed *in utero* [21] and cryptorchidism and abnormalities in the urogenital tract of boys [22]. This synthetic estrogen is hence considered as an endocrine disruptor that affects the functions of the testis. Interestingly, several types of evidences have linked the estrogens, their nuclear receptors ER α (NR3A1) and ER β (NR3A2), and Lxr α/β [23–26].

Based on that, we hypothesized that Lxr α/β could be in part involved in the deleterious impact of estrogenic endocrine disruptors on testicular physiology. To analyze whether such a link exists, we neonatally treated wild-type or Lxr-deficient mice with a low dose of DES and measured the body and testis masses, as well as accumulation of lipids and DES-affected genes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The Lxr-deficient mice (*Lxr* $-\text{}/-$) were previously described [15], maintained on a mixed background (C57BL/129sv) and housed in a temperature-controlled room with 12-h light, 12-h dark cycles. Mice were fed *ad libitum* with water and Global-diet 2016S from Harlan (Gannat, France). Mice were daily injected subcutaneously from days 1 to 5 after birth with 0.75 μg diethylstilbestrol (DES, Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) diluted in 25 μl of corn oil as previously described [27]. At day 10 or day 45, mice were euthanized by decapitation less than 1.5 h after the beginning of the light cycle and bled before tissue collection. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethics Committee (authorization CE2-04).

2.2. Histology

Hematoxylin/eosin staining was performed as described previously [27]. Testes from 10- or 45-days-old mice were collected, fixed with 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin, and 5 μm -thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin (Supplementary data 1).

2.3. Real-time PCR

Following testis RNA extraction (TRIzol $^{\circledR}$; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and cDNA synthesis (SuperScript II First-Strand Synthesis System; Fisher Scientific, Illkirch, France), real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye to measure duplex DNA formation. Primer sequences are shown in Table 1. Results were analyzed using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

Table 1
qPCR primer sequences used for qPCR analyses.

| Gene | | Sequence |
|---------------------|-----|---------------------------|
| 18S | fw | GGGAGCTGAGAAACGGC |
| | rev | GGGTGGGAGTGGGTAATTTC |
| Lxr α /nr1h3 | fw | TGCATCACCATTTCTCTG |
| | rev | GGCTCACAGCTTCAATTAGC |
| Lxr β /nr1h2 | fw | CGCTACAACCACGAGACAGA |
| | rev | TGTGATGGCGATAAGCAAG |
| Era/nr3a1 | fw | CATATGATCAACTGGCAAAGA |
| | rev | ACTCCGAATTAAGCAAAATGA |
| Er β /nr3a2 | fw | TCTTGTCTCACGACTCGTT |
| | rev | CCAGGAACITGAGACATACAAACTC |
| Lrh1/nr5a2 | fw | CTCTTGATTCGATCACATTAC |
| | rev | CCAGGAACITGAGACATACAAACTC |
| Shp/nr0b2 | fw | CGATCCTTCAACCCAGATG |
| | rev | AGGGTCCAAGACTTCACACA |
| CyclinA1 | fw | GATGTGTATGAAGTCGCACACC |
| | rev | GTGGGGTCAACCAGCATTGG |
| CyclinA2 | fw | CAAGGAGTGTGATCATCAGGACT |
| | rev | CTGGCCAGAAGTGTCTGTC |
| CyclinB2 | fw | CTGGCCAGAAGTGTCTGTC |
| | rev | TTCTCGGATTGGAACTG |
| CyclinD1 | fw | TCTCTGTACCGACAAC |
| | rev | TTCCCTCACTCCCCCTC |
| CyclinD2 | fw | TCCCGCAGTGTCTATTTC |
| | rev | TCCCGCAGTGTCTATTTC |
| Stra8 | fw | GTTCCTCGGTGTCCACAAG |
| | rev | CACCCGAGGCTAACGCTTC |
| Oct3 | fw | AAGTTGGAGAAGGTGGAACC |
| | rev | CTTCTGCCACTTTGGAAC |
| abca1 | fw | CGTTCCGGAAAGTGTCTTA |
| | rev | GCTAGAGATGACAAGGAGGAGGA |
| Star | fw | TGTCAGGAGATCAAGTCTGT |
| | rev | CGATAGGACCTGGTGTGATGAT |
| cyp11a | fw | CTGCTCCAGACTCTTCG |
| | rev | TTCTGAAGGGCAGCTGTT |
| 3 β hsd3 | fw | ATGGTCTGCTGGAAATGAC |
| | rev | ACTCAGGAGGTCAAGAGCT |
| cyp17 | fw | CCAGGACCCAAGTGTCTCT |
| | rev | CCTGATACGAAGCACTTCG |
| Cyp19 | fw | CGGAAGAATGCACAGGCTCGAG |
| | rev | CGATGTAACCTCCAGCACAGC |
| Insl3 | fw | ACTGATGCTCTGGCTCTGG |
| | rev | GGAGATGTCCTGCTCTAGC |
| Lhr | fw | AGCTAATGCCTTGCACACC |
| | rev | GATGGACTCATTTATCATCC |
| Fshr | fw | GTGCTACCAAGCTCGAGTCAT |
| | rev | AAGGCCTCAGGGTGATGACAG |

Fw, forward primer; rev, reverse primer. Sequences are given 5' → 3'.

Quantitative PCR experiments were performed as previously described [15]. 18S was used as housekeeping gene.

2.4. TUNEL analysis

TUNEL experiment was performed as described previously [27] on 5 μm of testis fixed in 4% PFA. Briefly 5- μm -thick paraffin-embedded sections were deparaffined with toluol followed by rehydratation. The slides of each group were incubated for 5 min in unmasking buffer (citrate acetate 1.8 mM, sodium citrate 8.2 mM, pH 6.0) at 86 °C. Then the slides were incubated with 0.3 U/ μl terminal deoxynucleotidyl transferase (Euromedex, Mundolsheim, France), 6.7 mM biotin-11-dUTP (Euromedex), and 26.7 mM dATP (Promega, Charbonnières, France) in terminal deoxynucleotidyl transferase buffer 1 h at 37 °C. Counterstain was performed with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for 30 s. In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted.

2.5. Ki67 staining

Five-micrometer cryosections of testis were fixed 10 min in 4% paraformaldehyde. Slides were incubated with anti Ki67 1/500

(Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) overnight at 4 °C and then washed three times in 1 × PBS. Slides were incubated for 1 h at room temperature with a goat antirabbit secondary antibody labeled with Alexa 488 (1/250; from Invitrogen). In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted.

2.6. Lipid analysis

Lipids were extracted as described previously [15]. High-performance thin-layer chromatography plates (Silica gel 60; Merck) were used after being prewashed with a mixture of methanol/chloroform (1:1, vol/vol) followed by heating at 125 °C for 5 min. Plates were then developed with hexane, diethylether, and glacial acetic acid (80:20:2, vol/vol) and analyzed by densitometry (Sigma Scan Pro; Sigma-Aldrich) using standards.

2.7. Testosterone measurement

Testosterone levels were measured in testis from 45 days old mice using the direct ELISA Kit EiAsyTM WayTESTOSTERONE (Diagnostics Biochem Canada Inc, London, Canada) according the manufacturer's instruction. Briefly, fresh testes were dounced-homogenized in PBS-BSA 0.1 mg/ml and aliquots were used for the testosterone as well protein assays.

2.8. Statistics

For statistical analysis, 2-way ANOVA was performed using the statistical software package SigmaStat 3.0. When significant effects of treatment or genotype or their interactions were obtained, multiple comparisons were made with Holm-Sidak method. All numerical data are mean ± SEM. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

3. Results

As the activity of DES on testis function has been extensively studied and the effects reported in numerous articles ([27]; for a review see [28]), and in order to clarify the role of the nuclear receptors Lxr α/β in the development of these phenotypes, we chose to compare the effect of DES vs. oil treatments in each studied genotype.

3.1. Neonatal treatment with DES decreases body mass and testis somatic index of LXR deficient-mice at 10 days

Neonatal DES treatment has been known to alter adult body mass [29], as shown by the significant decreased body weights at 45 days for wild-type and Lxr $-/-$ mice (Fig. 1A, left panel) demonstrating the efficient effect of DES. Interestingly, at 10 days, a significant 25% lower body weight was observed in the Lxr $-/-$ mice treated with DES, while this effect was not found in wild-type animals. This suggests that Lxr-deficient mice are more prone to DES effect compared to wild-type animals. A similar DES-effect was also found for testis somatic index, defined by the calculation of the testis mass as a proportion of the total body mass (testis weight/body weight × 100), (Fig. 1A, right panel): neonatal DES treatment induced a higher decrease of the somatic index only in Lxr $-/-$ mice (20% at 10 and 45 days), compared to the Lxr $-/-$ mice treated with vehicle (oil). Conversely, DES did not alter the testis weight of wild-type animals at these ages.

As many physiological functions of the testis are regulated by nuclear receptors, we investigated whether neonatal DES treatment could affect their mRNA levels (Fig. 1B). Both Lxr levels were not modified by the treatment in wild-type animals. Estrogen receptor Er α accumulation was induced as previously shown [27], demonstrating that DES was efficient. Likewise, Er β level was increased by DES in wild-type mice. Two downstream Er α

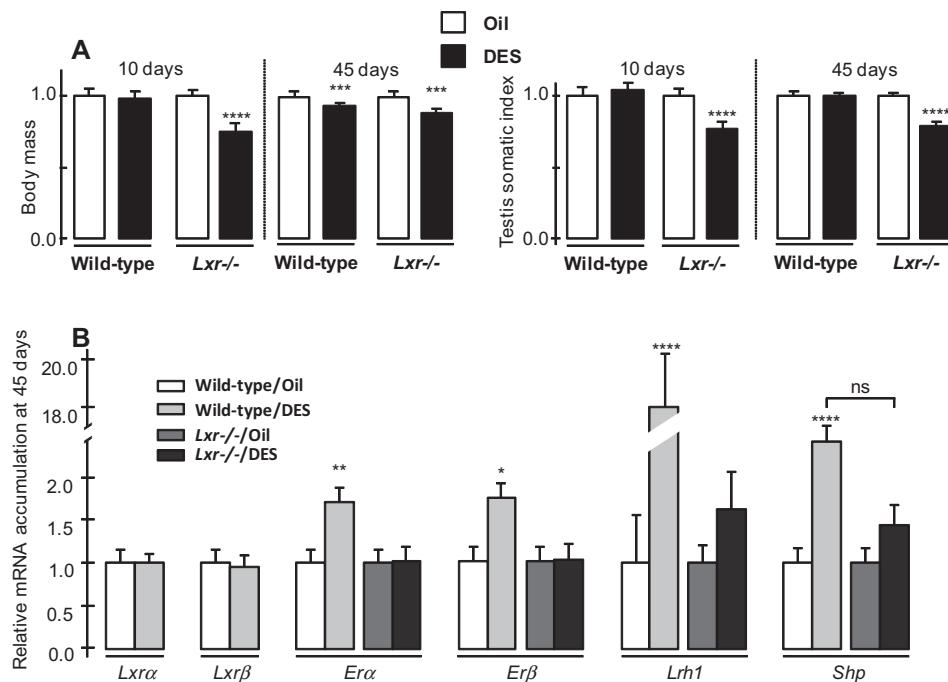


Fig. 1. Effects of neonatal DES treatment on body mass, testis somatic index and nuclear receptors mRNA accumulation. (A) Body mass and somatic index have been arbitrarily fixed at 1 for vehicle-treated wild-type and Lxr $-/-$ mice. Measurements were done at 10 and 45 days of age. Histograms represent mean ± SEM; *N* = 8–15 animals per group. Statistical analysis: ****p* < 0.001 vs. vehicle treated mice; *****p* < 0.0001 vs. vehicle-treated mice. (B) Nuclear receptor encoding mRNAs were measured by qPCR. Vehicle-treated wild-type and Lxr $-/-$ mice were arbitrarily fixed at 1. Measurements were done on testis collected at 45 days of age. Histograms represent mean ± SEM; *N* = 8–15 animals per group. Statistical analysis: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001 vs. vehicle-treated mice.

genes were also accumulated, namely the encoding nuclear receptors *Lrh1* (NR5A2) and *Shp* (NROB2) involved in lipid and steroid homeostasis in testis [27], respectively 18- and 2.5-fold. Interestingly, none of these genes was significantly accumulated following the neonatal DES treatment in *Lxr*-deficient mice, suggesting that part of the DES effect needs *Lxr* receptors.

3.2. Effect of DES on cell apoptosis is increased in LXR deficient mice at 10 days

As already reported [27], 0.75 µg DES did not induce a significant cell apoptosis in testis at 10 days of life (Fig. 2A, left panel), conversely to what was observed at 45 days. The same higher apoptosis rate (2-fold, $p < 0.0001$) was present in *Lxr*-deficient mice at 45 days. Interestingly, a significant 3-fold increase ($p < 0.0001$) is present at 10 days in the DES-treated *Lxr*–/– mice, suggesting they are more sensitive to neonatal DES. While DES had no effect on cell proliferation in wild-type mice, a slight (15%) but significant lower proliferation was observable in DES-treated *Lxr*–/– mice at 45 days (Fig. 2A, right panel).

At 45 days, lower *Cyclin A1* (marker of meiosis of germ cells), *Cyclin B2* (mitosis marker), and *Ocrt3* (germ cell marker) mRNA accumulation was shown in *Lxr*–/– mice neonatally treated with 0.75 µg DES. In wild-type mice, DES induced a higher accumulation level of *Cyclin A2* (mitosis marker) and a decreased level of *Stra8* (meiosis marker) [27]. Altogether, the decreased meiosis marker together with the increased cell apoptosis and the lower cell proliferation rates could participate to the decreased somatic index of the testis.

3.3. DES affects accumulation of lipids in testis at 45 days of age

Lipids have an important role in male fertility [30] and *Lxr*α/β regulate testis lipid homeostasis [14,15,31]. Besides, endocrine dis-

ruptors are known to alter lipid composition in testis [32]. We thus wondered whether DES could interfere with the lipid defects observed in *Lxr*–/– mice, such as the higher cholesterol ester accumulation [14,15] (Supplementary data 2). As shown in Fig. 3A, cholesterol ester levels were not differentially affected by DES (means of 0.14 µg/mg tissue for vehicle vs. 0.12 for DES in wild-type animals; 0.35 µg/mg tissue vs. 0.24 for *Lxr*–/– mice, non-significant). As already described, testis total cholesterol was decreased by DES-treatment in wild-type animals. This effect was not observed in *Lxr*-deficient mice. Conversely a slight increase of *Abca1* (encoding the membrane cholesterol transporter ATP-binding cassette 1) was observed in DES-treated *Lxr*–/– mice (Fig. 3B, $p = 0.1$). Neonatal treatment with DES significantly decreased the amount of phosphatidyl-ethanolamine (55% decrease, $p < 0.05$), phosphatidyl-choline (35% decrease, $p < 0.05$) and sphingosine (25% decrease, $p < 0.05$). Note that these alterations were not seen in *Lxr*–/– mice (Fig. 3A).

3.4. *Lxr*α/β modify neonatal effects of DES on Leydig and Sertoli cells markers

*Lxr*α and *Lxr*β have been shown to regulate Leydig and Sertoli cell physiology [15], by the transcriptional regulation of genes such as *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17* (encoding P450c17 enzyme) and *3βHSD* (encoding 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase), or the decrease of the basal anti-Müllerian hormone (AMH) mRNA, respectively. Neonatal treatment with DES induced a decreased accumulated level *Star*, *Cyp11a1* and *Cyp17* in wild-type mice at 45 days. Conversely *3βHSD*, *Cyp19* (encoding aromatase), *Lhr* (encoding LH-receptor) and *Insl3* (encoding insulin-like 3) were not significantly affected. Interestingly, lack of both *Lxr* abolished DES effect on *Star* level while *3βHSD* was highly accumulated (Fig. 4A). The levels of testosterone were significantly ($p = 0.03$) decreased by 30% at 45 days in *Lxr*–/– testis neonatally treated with DES

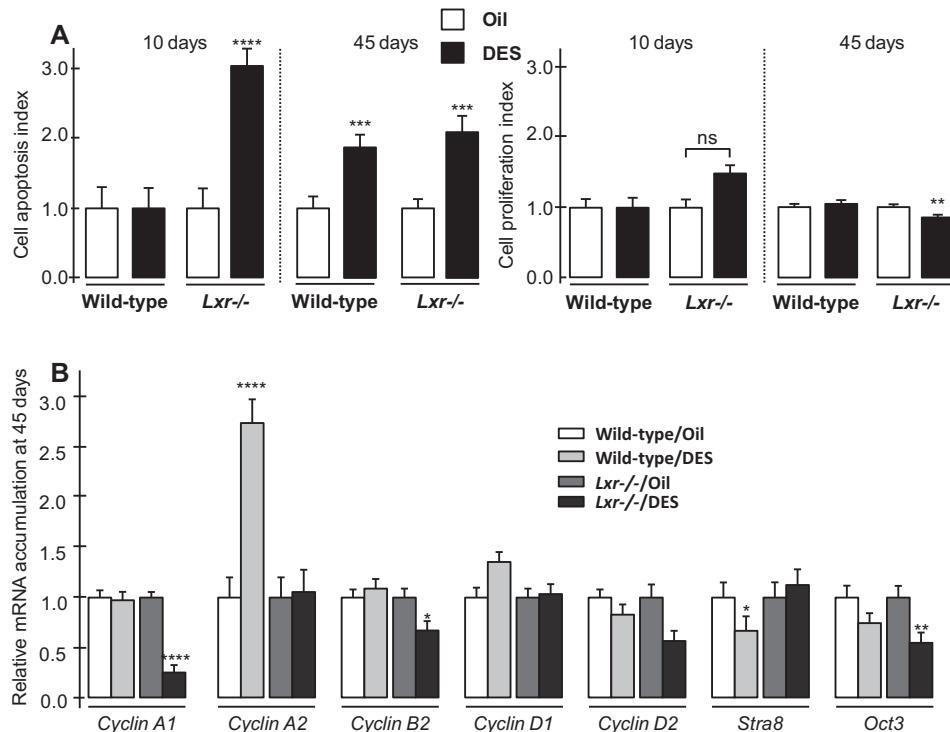


Fig. 2. Effects of neonatal DES treatment on cell apoptosis and proliferation and on meiosis and mitosis markers. (A) Cell apoptosis index (left panel) and cell proliferation index (right panel) determined by TUNEL analysis and Ki67 staining, respectively. Vehicle-treated wild-type and *Lxr*–/– mice were arbitrarily fixed at 1. Measurements were done at 10 and 45 days of age. Histograms represent mean ± SEM; $N = 3\text{--}5$ animals per group. Statistical analysis: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ vs. vehicle-treated mice. (B) Meiosis and mitosis marker encoding mRNA were measured by qPCR. Vehicle-treated wild-type and *Lxr*–/– mice were fixed at 1. Histograms represent mean ± SEM; $N = 6\text{--}8$ animals per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ vs. vehicle-treated mice.

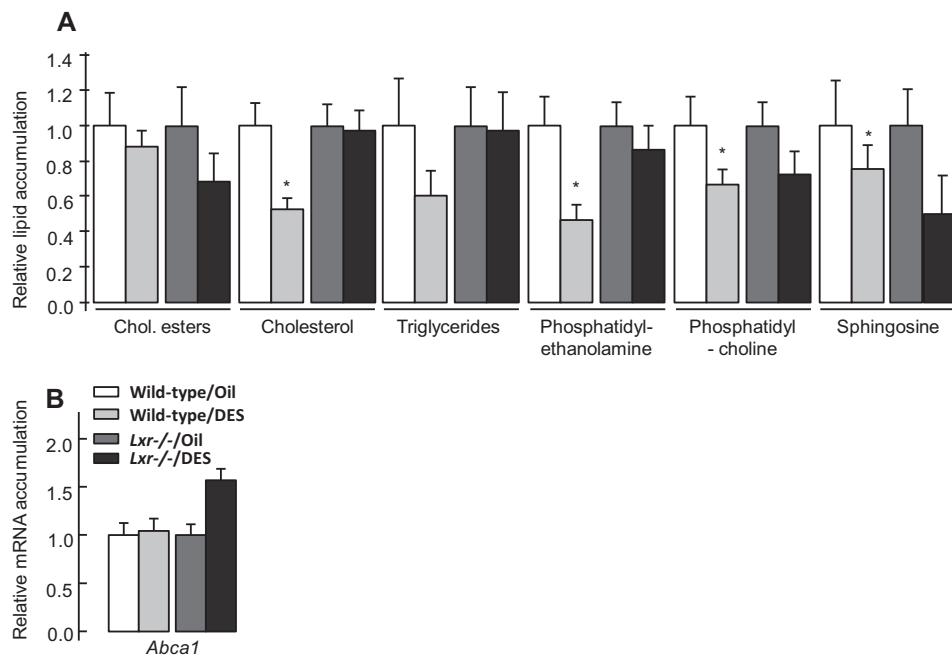


Fig. 3. Effects of neonatal DES treatment on lipid accumulation on testis from 45 days old animals. (A) Cholesterol esters, total cholesterol, triglycerides, phosphatidyl-ethanolamine, phosphatidyl-choline and sphingosine were measured by thin chromatography layer. Vehicle-treated wild-type and *Lxr*^{-/-} mice were arbitrarily fixed at 1. Histograms represent mean ± SEM; $N = 5\text{--}15$ animals per group. Statistical analysis: * $p < 0.01$ vs. vehicle-treated mice. (B) *Abca1* encoding mRNA was measured by qPCR. Vehicle-treated wild-type and *Lxr*^{-/-} mice were fixed at 1. Histograms represent mean ± SEM; $N = 8\text{--}12$ animals per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$ vs. vehicle treated mice.

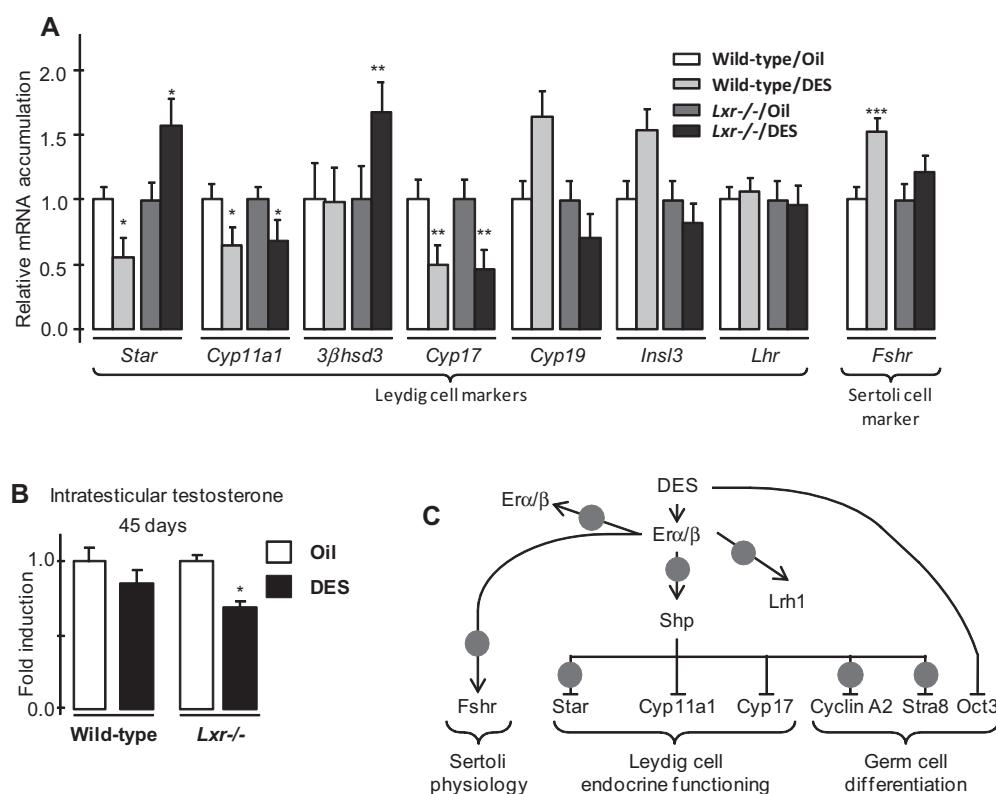


Fig. 4. Effects of neonatal DES treatment on Leydig and Sertoli cell markers from 45 days old animals. (A) Leydig and Sertoli cell markers were measured by qPCR. Vehicle-treated wild-type and *Lxr*^{-/-} mice were arbitrarily fixed at 1. Histograms represent mean ± SEM; $N = 6\text{--}8$ animals per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. vehicle treated mice. (B) Testosterone levels were measured in testis from 45 days old animals. Vehicle-treated wild-type and *Lxr*^{-/-} mice were arbitrarily fixed at 1. Histograms represent mean ± SEM; $N = 5\text{--}10$ animals per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$ vs. vehicle treated mice. (C) Proposed model for the role of *Lxr* α/β in DES-induced gene variations. Adapted from Volle et al. [27]. Grey disk, *Lxr* α/β ; arrow, induction; broken arrow, inhibition.

(Fig. 4B). Besides, DES significantly enhanced the accumulation of *Fshr* (FSH-receptor; 1.5-fold; Fig. 4B) as well as *Inha* (Inhibin A; 2-fold; data not shown), two Sertoli cell markers, in wild-type but not in *Lxr*–/– mice.

4. Discussion

In a previous study Volle et al. [27] demonstrated that mice treated with 0.75 µg DES induced the neonatal germ cell differentiation without gross abnormalities in the male genital tract, nor alteration in epididymis, vesicle seminales, and testis weights. The authors showed that Shp-deficient mice were protected from DES effects, which acts through several signaling pathways, such as estrogen receptors Erα and Erβ. Our study points out that DES does not always have a canonical effect on Lxr-deficient mice, i.e. repression of the steroidogenic encoding genes, modification of germ cell differentiation markers, and Sertoli cell physiology alteration. This has been observed on the testicular somatic index as well as on the accumulation of various transcripts involved in endocrine functions, cell differentiation and lipid accumulation, and encoded by Leydig, germ and Sertoli cells, respectively. Our data could potentially establish a link between DES, Shp, Erα/β and Lxrα/β.

The analysis of the transcript accumulation allowed classifying the genes sensitive to neonatal treatment by DES in 3 categories (Fig. 4C): (i) genes whose DES-variations are independent of Lxrα/β, such as *Cyp11a1* and *Cyp17*; (ii) genes whose DES-variations are countered by Lxrα/β, such as *Oct3* and *3βhSD*; (iii) genes whose induction by DES needs the presence of Lxrα/β, such as *Erα*, *Shp*, *Lrh1*, *Star*, and *Stra8*.

DES has been considered for years as the paradigm of the environmental endocrine disruptors with an estrogen-like activity. Indeed DES has been described to act through the estrogen receptors.

Regarding the results it appears that the nuclear receptors Lxrα and Lxrβ not only are basally important for testicular physiology but could also have a protective effect against estrogen-like endocrine disruptors as their absence induces a stronger variation of important testis target genes in Lxr-deficient mice.

Acknowledgments

We thank J.-P. Saru and A. De Haze for their excellent technical help; S. Plantade, K. Ouchen and P. Mazuel for expert technical assistance in breeding the transgenic mice; the members of the Chester's lab for critically reading the manuscript, assistance in animal dissections and discussions; Dr. D.J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing the mice; AO is recipient of a Grant from Algeria government. EV was recipient of Fond Européen de DÉveloppement Régional (FEDER) and Région Auvergne Grants. JMAL is supported by Fondation pour la Recherche Médicale and Fondation BNP-Paribas, Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comités Allier et Puy-de-Dôme), Association de Recherche contre le Cancer, Région Auvergne grants. J.M.A.L. is Professor at the Université Blaise Pascal. DHV is supported by Grants from Agence National de la Recherche "Programme Jeune Chercheur". DHV and SB are recipients of grants from Région Auvergne.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.005>.

References

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] D.J. Peet, B.A. Janowski, D.J. Mangelsdorf, The LXRs: a new class of oxysterol receptors, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8 (1998) 571–575.
- [5] 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.
- [6] B.A. Janowski, M.J. Grogan, S.A. Jones, G.B. Wisely, S.A. Kliewer, E.J. Corey, et al., Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 266–271.
- [7] E. Viennois, K. Mouzat, J. Dufour, L. Morel, J.-M. Lobaccaro, S. Baron, Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health?, *Mol. Cell. Endocrinol.* 351 (2012) 129–141.
- [8] E. Viennois, A.J.C. Pommier, K. Mouzat, A. Oumeddour, F.-Z. El Hajjaji, J. Dufour, et al., Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?, *Expert Opin Ther. Targets* 15 (2011) 219–232.
- [9] D.J. Peet, S.D. Turley, W. Ma, B.A. Janowski, J.M. Lobaccaro, R.E. Hammer, et al., Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha, *Cell* 93 (1998) 693–704.
- [10] S. Alberti, G. Schuster, P. Parini, D. Feltkamp, U. Diczfalussy, M. Rudling, et al., Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRβ-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 565–573.
- [11] K. Mouzat, M. Prod'homme, D.H. Volle, B. Sion, P. Déchelotte, K. Gauthier, et al., Oxysterol nuclear receptor LXRβ regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 4693–4701.
- [12] K. Mouzat, F. Volat, S. Baron, G. Alves, A.J.C. Pommier, D.H. Volle, et al., Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice, *Endocrinology* 150 (2009) 3369–3375.
- [13] F.-Z. El-Hajjaji, A. Oumeddour, A.J.C. Pommier, A. Ouivrier, E. Viennois, J. Dufour, et al., Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male, *Biochim. Biophys. Acta* 2011 (1812) 974–981.
- [14] K.M. Robertson, G.U. Schuster, K.R. Steffensen, O. Hovatta, S. Meaney, K. Hultenby, et al., The liver X receptor-(beta) is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis, *Endocrinology* 146 (2005) 2519–2530.
- [15] D.H. Volle, K. Mouzat, R. Duggavathi, B. Siddeek, P. Déchelotte, B. Sion, et al., Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 21 (2007) 1014–1027.
- [16] D.M. Stocco, Tracking the role of a star in the sky of the new millennium, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 15 (2001) 1245–1254.
- [17] T.K. Jensen, A.-M. Andersson, N.E. Skakkebaek, U.N. Joensen, M.B. Jensen, T.H. Lassen, et al., Association of sleep disturbances with reduced semen quality: a cross-sectional study among 953 healthy young Danish men, *Am. J. Epidemiol.* 177 (2013) 1027–1037.
- [18] T.K. Jensen, T. Sobotka, M.A. Hansen, A.T. Pedersen, W. Lutz, N.E. Skakkebaek, Declining trends in conception rates in recent birth cohorts of native Danish women: a possible role of deteriorating male reproductive health, *Int. J. Androl.* 31 (2008) 81–92.
- [19] C. Wohlfahrt-Veje, K.M. Main, N.E. Skakkebaek, Testicular dysgenesis syndrome: foetal origin of adult reproductive problems, *Clin. Endocrinol. (Oxford)* 71 (2009) 459–465.
- [20] K. Bay, C. Asklund, N.E. Skakkebaek, A.-M. Andersson, Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disruptors, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20 (2006) 77–90.
- [21] A.L. Herbst, H. Ulfelder, D.C. Poskanzer, Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women, *N. Engl. J. Med.* 284 (1971) 878–881.
- [22] B.E. Henderson, B. Benton, M. Cosgrove, J. Baptista, J. Aldrich, D. Townsend, et al., Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol, *Pediatrics* 58 (1976) 505–507.
- [23] T. Ishikawa, I.S. Yuhanna, J. Umetani, W.-R. Lee, K.S. Korach, P.W. Shaul, et al., LXRβ/estrogen receptor-α signaling in lipid rafts preserves endothelial integrity, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 3488–3497.
- [24] 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.
- [25] L. Lundholm, S. Movéare, K.R. Steffensen, M. Nilsson, M. Otsuki, C. Ohlsson, et al., Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue, *J. Mol. Endocrinol.* 32 (2004) 879–892.
- [26] H. Gong, P. Guo, Y. Zhai, J. Zhou, H. Uppal, M.J. Jarzynka, et al., Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 21 (2007) 1781–1790.
- [27] D.H. Volle, M. Decourteix, E. Garo, J. McNeilly, P. Fenichel, J. Auwerx, et al., The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3752–3764.

- [28] H.E. Virtanen, A. Adamsson, Cryptorchidism and endocrine disrupting chemicals, *Mol. Cell. Endocrinol.* 355 (2012) 208–220.
- [29] K. Warita, K. Okamoto, K.-I. Mutoh, Y. Hasegawa, Z.-P. Yue, T. Yokoyama, et al., Activin A and equine chorionic gonadotropin recover reproductive dysfunction induced by neonatal exposure to an estrogenic endocrine disruptor in adult male mice, *Biol. Reprod.* 78 (2008) 59–67.
- [30] 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.
- [31] B. Mascrez, N.B. Ghyselinck, M. Watanabe, J.-S. Annicotte, P. Chambon, J. Auwerx, et al., Ligand-dependent contribution of RXR β to cholesterol homeostasis in Sertoli cells, *EMBO Rep.* 5 (2004) 285–290.
- [32] M. Chen, B. Xu, W. Ji, S. Qiao, N. Hu, Y. Hu, et al., Bisphenol A alters n-6 fatty acid composition and decreases antioxidant enzyme levels in rat testes: a LC-QTOF-based metabolomics study, *PLoS ONE* 7 (2012) e44754.

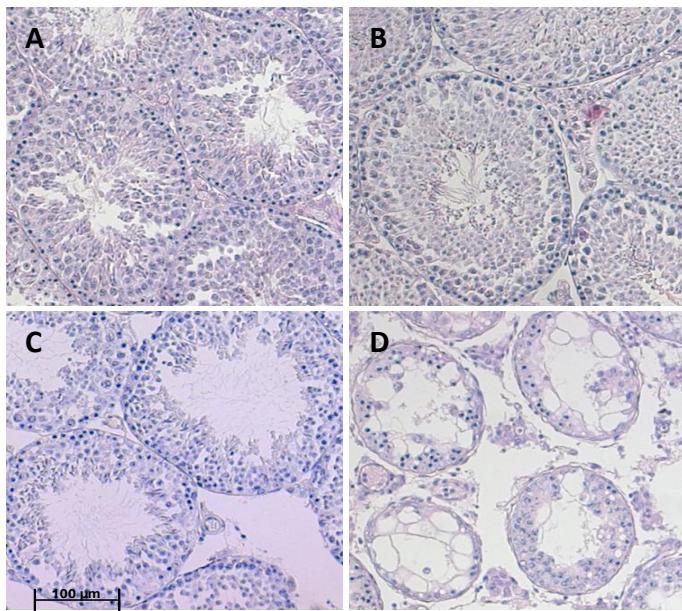


Figure 38: Coloration à l'hématoxyline-éosine des testicules montrant la structure du testicule à l'âge de 3 mois chez les souris sauvages traitées à l'huile (A) ou au DES (B), et chez les souris KO traitées à l'huile ou au DES (D). Chez les souris KO la présence des récepteurs LXR semble protéger les testicules contre l'action délétère du DES à l'âge de 3 mois.

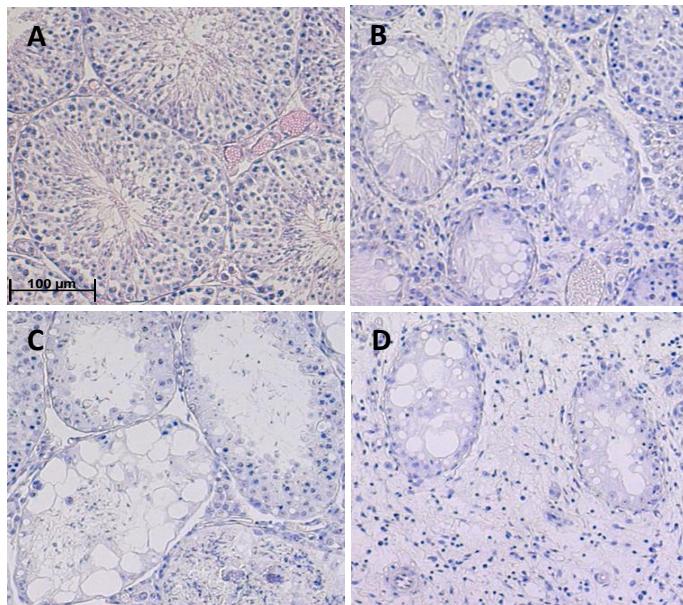


Figure 39: Coloration à l'hématoxyline-éosine des testicules montrant la structure du testicule à l'âge de 6 mois chez les souris sauvages traitées à l'huile (A) ou au DES (B), et chez les souris KO traitées à l'huile ou au DES (D). Le phénotype DES apparaît dès l'âge de 6 mois (apparition de vacuoles dans les tubes séminifères). Le phénotype LXR montre aussi des vacuoles dans les tubes séminifères. Le phénotype DES-LXR montre des testicules complètement désorganisés, avec absence totale des tubes séminifères.

Résultats complémentaires à l'article

Une étude préalable a été menée sur des souris sauvages et *lxra $\beta^{-/-}$* pour voir l'effet du DES sur la fonction de reproduction chez le mâle adulte. Les souris ont été injectées avec du DES à une dose de 5 μ g/souris pendant les cinq premiers jours postnataux. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 1.5, 3 et 6 mois. Les organes ont été récupérés et stockés à -80°C pour les analyses moléculaires ou dans la PFA pour l'histologie.

1. Effet d'une forte dose de DES sur la morphologie du testicule ?

L'analyse phénotypique de nos résultats obtenus sur des souris âgées de 3 mois traitées par le DES à une dose de 5 μ g/souris pendant les 5 premiers jours postnataux, montre que l'effet du DES n'apparaît que chez les souris LXR-/. Les tubes séminifères montrent de grandes vacuoles qui occupent une grande partie des tubules, en plus, d'une absence totale de spermatogenèse, avec augmentation de l'espace intertubulaire (**Figure 38**). Chez les souris âgées de 6 mois, on a remarqué l'apparition de trois phénotypes : un phénotype DES qui se traduit par l'apparition de vacuoles dans les tubes séminifères, avec un testicule déstructuré. Le deuxième est un phénotype induit par l'absence des LXRs. Le phénotype induit par le DES montre le même aspect que celui des souris LXR-/. Le troisième est un phénotype induit l'effet du DES combiné à l'absence des LXRs. Les souris *lxra $\beta^{-/-}$* traitées au DES montrent un aspect plus désorganisé que les deux autres phénotypes précédents, qui se traduit par un testicule qui ne contient que quelques tubes séminifères complètement désorganisés (**Figure 39**). Nos résultats d'apoptose chez les souris âgées de 1,5 et 3 mois montrent un très fort taux apoptotique chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* traitées au DES, ce qui explique en partie la diminution du poids testiculaire chez ces souris. Ces résultats montrent qu'une forte dose de DES peut entraîner une diminution du poids testiculaire et des altérations histologique plus sévères chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* que les souris sauvages.

2. Existe-t-il une dose qui permette l'étude moléculaire ?

L'exposition aux fortes doses au DES induit une diminution sévère dans le poids testiculaire provoquée par l'apoptose des cellules germinales, ce qui conduit à des variations dans la proportion des différentes types cellulaires. Au niveau moléculaire, ces pertes de la masse cellulaire peuvent conduire à des fausses interprétations, parce que les différences observées dans l'expression des gènes sont dues au changement du contenu cellulaire du testicule plutôt que la régulation réelle de l'expression génique. Volle *et al.* (2009) ont pu déterminer la concentration du DES (0.75 μ g) qui n'affecte pas le poids du testicule.

Cette étude a consisté à injecter le DES par voie intrapéritonéale à des souris sauvages et LXR-/- à une dose de 0,75 µg/souris pendant les cinq premiers jours postnataux. Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 45 jours postnataux. Pour s'assurer de l'efficacité du traitement, nous avons mesuré l'expression de certains gènes cibles oestrogénorégulés comme *insl3* et *ren1*. L'étude de la prolifération et de l'apoptose chez les souris sauvages montrent une augmentation de la prolifération et l'apoptose chez les souris traitées au DES. Chez les souris KO/DES, une augmentation du taux apoptotique est compensée par le déclin de la prolifération cellulaire et serait à l'origine de la diminution du poids du testicule chez ces souris. On a étudié l'expression de certains marqueurs cellulaires pour s'assurer que cette diminution du poids du testicule n'était pas causée par un changement dans la masse cellulaire. Une augmentation du *fshr* a été remarquée chez les souris sauvages traitées au DES. Cette variation est due à une augmentation de l'expression d'un gène en aval, l'inhibine α . Les résultats des souris âgées de 45 jours sont représentés dans l'article 1.

Conclusion

Ce travail nous a permis de conclure que l'action délétère du DES ($0.75\mu\text{g}/\text{kg}$) sur la physiologie du testicule fait intervenir les LXR_s. Il a été démontré que le récepteur nucléaire SHP (*Nr0b2*) joue un rôle crucial dans les changements physiopathologiques induites par le DES dans le testicule de souris, et que la délétion de *Nr0b2* protège les testicules contre l'effet du DES (Volle *et al.*, 2009). Nos résultats montrent que les transcrits des gènes de la stéroïdogenèse et le taux de testostérone intra-testiculaire sont significativement perturbés. L'action du DES chez les souris KO traitées semble plus délétère que chez les souris sauvages traitées. L'interférence entre le DES et les LXR_s apparaît aussi au niveau des transcrits des cyclines A1, B2 et D2. Ces résultats expliquent que les voies de signalisation intracellulaire du DES pourraient passer; au moins en partie, par les LXR_s. Le mécanisme moléculaire de la stéroïdogenèse est bien établi, il fait intervenir plusieurs récepteurs nucléaires dont SF-1, LRH-1, LXR, SHP et FXR. Nos résultats actuels ne nous nous permettent pas d'élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents. Au total, ce travail montre que les souris *lxra $\beta^{-/-}$* ont un phénotype accentué suggérant un rôle protecteur des LXR_s *in vivo* contre les perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique.

Discussion
&
Perspectives

Discussion

L'objectif de ce travail de thèse était de comprendre le rôle des LXR_s dans les voies de signalisations du DES dans le testicule de souris. Nous avons choisi d'étudier l'effet postnatal et non pas *in utero* d'une faible dose de DES chez le mâle, cela nous a permis d'éviter la confusion entre les effets secondaires du DES *in utero* (cryptorchidies, hypospadias) et les effets propres du DES sur la fonction testiculaire. Spearow et Barkley en 2001 ont montré que l'exposition à de fortes doses de xénoestrogènes pendant la gestation peut provoquer tous les symptômes de TDS. Ces altérations dépendent de la nature de la molécule et le timing de l'exposition. Le DES est plus puissant que l'œstradiol (Kuiper *et al.*, 1997) et une exposition précoce est la plus néfaste, en raison des effets très rapides sur les fonctions et l'histologie des testicules, et l'induction probable d'effets irréversibles.

1. Quel est l'effet d'une forte dose de DES sur l'histologie du testicule ?

L'analyse structurale des testicules montre que l'effet néfaste d'un traitement néonatal au DES est fonction de la dose et l'âge des souris. Une désorganisation des tubes séminifères n'est observée qu'à partir de l'âge de 3 mois suite à un traitement à une forte dose (5µg/souris). De plus, l'effet du DES est plus remarqué chez les souris LXR. Les tubes séminifères montrent de grandes vacuoles qui occupent une grande partie des tubules, en plus, il y a absence totale de la spermatogenèse, avec augmentation de l'espace intertubulaire. Cet effet est modéré chez les souris sauvages. Cependant, les tubes séminifères des souris invalidées pour les LXR_s présentent, en absence de traitement, des es travées et des vacuoles qui s'insinuent entre les différentes types de spermatogonies dont la taille augmente avec le traitement. Afin de préciser la cause de ce phénotype, il serait intéressant d'étudier si l'invalidation des LXR_s et le traitement au DES perturbent les jonctions entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies. Il a été démontré que la testostérone augmente l'expression des molécules d'adhésion entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales comme N-cadherine, E-cadherine, α-catenine, β-catenine (Lee *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2005). Une diminution de la quantité de la testostérone serait l'origine du détachement des spermatides des cellules de Sertoli dans les tubes séminifères ce qui provoque la perte totale de la production des spermatozoïdes (Wong *et al.*, 2005 ; Shupe *et al.*, 2011). Le traitement au DES et l'invalidation des LXR_s diminuent les taux de la testostérone plasmatique, ce qui pourrait entraîner une diminution de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire et expliquer la déstructuration des tubes séminifères. L'effet du DES peut s'exercer directement sur l'accumulation des protéines d'adhésion cellulaires. Salian *et al.*, en 2009 ont montré que l'exposition néonatale au bisphénol A, un perturbateur endocrinien œstrogéno-mimétique, entraîne une diminution des protéines de jonction des cellules de Sertoli. Donc, il serait

intéressant de réaliser une étude d'accumulation des transcrits (qPCR) ou des protéines (*western blot*) des molécules d'adhésion cellulaire entre les spermatogonies et les cellules de Sertoli.

Le traitement à de fortes doses de DES induit un chute sévère du poids testiculaire à cause de la mort des cellules germinales, ce qui provoque une modification importante dans les proportions relatives des types cellulaires. Ce changement peut conduire à des fausses interprétations, parce que la différence de l'expression des gènes observée est le résultat du changement du ratio cellulaire plutôt qu'une régulation réelle de l'expression des gènes (Volle et al., 2009). Pour ces raisons l'expression des gènes sur les souris traitées à une dose de 5 μ g n'a pu être réalisée. A partir des données bibliographiques, on a pu choisir une dose faible (0.75 μ g) qui n'affecte pas le poids testiculaire et permet de faire une étude d'expression des gènes.

2. Effet d'une faible dose du DES sur la morphologie testiculaire

L'exposition à une faible dose de DES (0.75 μ g/souris) ne provoque pas une désorganisation de la structure testiculaire mais induit la diminution du poids testiculaire chez les souris LXR^{-/-} et traitées au DES. Ceci est expliqué en partie par une augmentation du taux apoptotique associée à un déclin de la prolifération cellulaire expliquée par une diminution de l'expression de la cycline A1 et D1. En effet, une augmentation de l'apoptose est remarquée aussi chez les souris sauvages avec une augmentation du taux de la prolifération, ce qui compense le nombre de cellules perdues par apoptose. L'exposition néonatal au DES modifie l'expression des gènes associés à la différenciation ou à l'indifférenciation des spermatogonies comme *oct3/4*, la *cyclind2* et la *cyclin a1*. Une diminution sévère des spermatogonies différenciées a été remarquée surtout chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* . Ceci est expliqué aussi par le taux apoptotique augmenté dans ce génotype.

Le DES provoque une accumulation des lipides chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* . Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris sauvages. Le dosage des lipides neutres montre que les souris sauvage ne montrent aucune augmentation des taux d'esters de cholestérol, de cholestérol et de triglycérides. Le DES augmente le taux d'esters de cholestérol et de cholestérol total chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* ce qui explique l'accumulation des lipides visualisée par la coloration à l'huile rouge. L'accumulation des esters de cholestérol a été observée dans les cellules de Leydig des souris invalidées pour l'enzyme *estrogen sulfotransferase (est)*. En plus, il a été suggéré que les estrogènes régulent partiellement la synthèse *de novo* du cholestérol dans les cellules de Leydig (Strauss et al., 2009). Dans le foie, *est* a été trouvé comme gène cible des LXRs (Gong et al., 2007) ce qui nous laisse à penser qu'une voie métabolique perturbée impliquant les LXRs et EST pourrait être responsable, au moins d'une partie, dans

l'accumulation du cholestérol dans les tubes séminifères. Il semblerait que cette accumulation se fasse préférentiellement au niveau des cellules de Sertoli. Afin de confirmer cette observation, il serait bon de vérifier par marquage immunohistochimique quels sont les types cellulaires qui présentent une accumulation lipidique.

A la lumière de ces constats, l'effet délétère du DES est plus remarquable chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* suggérant que les LXR jouent un rôle protecteur chez les souris sauvages. Les LXR pourraient peut-être atténuer ou neutraliser l'effet du DES sur l'accumulation de lipides en inhibant son mécanisme d'action ou activer une voie parallèle qui compenserait cet effet.

3. Le métabolisme lipidique est-il perturbé par le traitement au DES ?

Le métabolisme lipidique est perturbé chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* traitées au DES. Les transcrits de *srebp1c* sont augmentés suivi par l'augmentation des transcrits *fas*, ce qui signifie une forte activité de lipogenèse chez ces souris. Dans le tissu adipeux, le muscle et le foie le traitement aux estrogènes diminue l'expression de *srebp1c*, et l'expression de *lxra*, un régulateur positif de *srebp1c* dans le tissu adipeux (Field et al., 2002). SREBP-1c favorise l'expression des gènes lipogéniques tels que *fas* et *acc1* (Horton, 2002). Bien que la diminution de l'expression de *lxra* sous l'effet des œstrogènes contribue dans le tissu adipeux à la diminution de l'expression *srebp1c*, l'expression de *lxra* n'est pas réduite dans le muscle et le foie en réponse aux œstrogènes. Ceci suggère un mécanisme alternatif par lequel les œstrogènes régulent l'expression de *srebp1c* et ses gènes cibles (D'Eon et al., 2005). Sur la base de ces données, il semblerait que, dans le testicule, l'effet du DES sur l'augmentation de l'expression de *srebp1c* chez les souris *lxra $\beta^{-/-}$* est dépendant des LXR. Dans cette optique, il serait intéressant de vérifier par des techniques de biologie moléculaire (*chromatine immunoprecipitation*) la liaison des LXR sur l'élément de réponse de *srebp1c* suite à un traitement aux œstrogènes. D'autre part, le dosage des triglycérides intratesticulaire ne montre aucune variation. A la vue de ces résultats, deux hypothèses peuvent être émises :

- Les acides gras synthétisés ne sont pas stockés sous la forme de triglycéride mais utilisés par d'autres voies métaboliques.
- Il n'y a pas de synthèse des acides gras : l'augmentation des transcrits *fas* n'est pas corrélée à une augmentation de la quantité du complexe enzymatique FAS ou une voie antagoniste de la synthèse des acides gras est activée.

Afin de vérifier ces hypothèses, il serait intéressant de poursuivre l'analyse de l'accumulation des transcrits impliquées dans les voies métaboliques impliquant les acides gras. Des analyses complémentaires par *western blot* du taux de protéines impliquées dans le

métabolisme lipidique des souris invalidées pour les LXR_s, en absence et en présence de DES, permettant d'expliquer et de préciser l'action du DES pourraient être réalisées.

4. Quel est l'effet du DES sur la stéroïdogenèse ?

Le traitement au DES diminue l'expression des gènes de la stéroïdogenèse *cyp11a1* et *cyp17a1* chez les deux génotypes et de *3β-hsd* uniquement chez les souris *lxraβ^{-/-}*. La diminution de l'expression de *cyp17a1* et *cyp11a1* est en relation avec l'augmentation de l'expression de *shp* (*small heterodimer partner*). Ceci est en accord avec d'autres études montrant que la surexpression de *shp* dans les cellules de Leydig réprime l'expression de *star* et *cyp11a1*, et que *shp* se lie au promoteur de ces deux gènes (Volle *et al.*, 2009). L'effet délétère du DES semble plus accentué chez les souris *lxraβ^{-/-}*, ce qui traduit la baisse observée du taux de la testostérone intratesticulaire. Donc, le DES pourrait accélérer l'apparition de l'hypofertilité observée en absence du traitement. Certaines études ont démontré une diminution de la production de la testostérone chez les animaux traités aux œstrogènes sans diminution de LH plasmatique (Sholiton *et al.*, 1975 ; Delbes *et al.*, 2005), suggérant ainsi que les actions inhibitrices des œstrogènes peuvent se produire directement au niveau testiculaire et n'impliquent pas nécessairement l'altération de la fonction hypophysaire. Plusieurs équipes ont suggéré que les œstrogènes diminuent les activités de certains enzymes des cellules de Leydig. Par exemple, des études ont indiqué que l'oestradiol diminue l'activité de *cyp17a1*, et *17β-hsd*. D'autres montrent que l'exposition *in utero* chez le rat au DES conduit à une réduction spectaculaire du transcrit et de la protéine *Cyp17a1* (Majdic *et al.*, 1996). Le mécanisme par lequel les œstrogènes inhibent l'activité des enzymes de la stéroïdogenèse dans la cellule de Leydig est inconnu. Ces études suggèrent, cependant, que l'effet inhibiteur des œstrogènes sur la stéroïdogenèse n'implique pas nécessairement le récepteur des œstrogènes (Li, 1991 ; Mruk et Cheng, 2011).

Nous recommandons ainsi de confirmer les résultats de la stéroïdogenèse par quantification des protéines par *western blot*. Pour savoir si le traitement au DES accélère l'apparition de l'infertilité induite par l'invalidation des LXR_s, il serait intéressant de réaliser par un simple comptage des spermatozoïdes, au niveau de l'épididyme de souris *lxraβ^{-/-}* traitées ou non avec du DES, associé à une étude de leur structure, de leur mobilité et de leur pouvoir fécondant.

5. Un excès d'un xénoœstrogène est-il perturbant pour le testicule?

Il est bien connu qu'un équilibre délicat entre les œstrogènes et les androgènes, un processus contrôlé par l'aromatase, est fondamental pour le développement et le maintien de

la fonction testiculaire (Strauss et al., 2009 ; Haverfield et al., 2011). Les souris mâles invalidées pour le gène ER α (ER α KO) sont stériles mais montrent des taux plus élevés de testostérone plasmatique que leurs sœurs sauvages, ce qui indique que ER α a un rôle de médiateur du feedback des stéroïdes au niveau hypophysaire avec le récepteur aux androgènes (Radovick et al., 2012). L'expression basale de *P450arom* est plus élevée chez les souris *lxra β ^{-/-}* que chez les souris sauvages, ce qui explique que le métabolisme des œstrogènes est perturbé chez les souris *lxra β ^{-/-}*. Le DES augmente aussi l'expression de *P450arom* chez les souris sauvages, mais reste non significative. Malgré l'augmentation de l'expression de ER α et ER β , significative uniquement chez les souris sauvages traitées au DES, il reste difficile de savoir si l'action du DES sur la stéroïdogenèse est un événement dépendant des ERs ou si elle est, en partie, une action directe sur les enzymes cellulaires. Il est conceivable que certaines actions impliquent une interaction directe de la molécule du DES, tandis que d'autres actions se font par l'intermédiaire du récepteur des œstrogènes.

6. Quelle est la nature des relations associant la signalisation DES et LXR dans le testicule ?

Dans le tractus génital mâle, il est généralement admis que les voies œstrogéniques dépendantes ou indépendantes du récepteur aux œstrogènes sont impliquées dans les effets du DES (Couse et Korach, 2004 ; Cederroth et al., 2007). Dans l'utérus et le foie, il a été démontré que l'activation des LXRs induit l'expression de *est* ce qui favorise la désactivation métabolique des œstrogènes (Gong et al., 2007). Cette enzyme est exprimée dans les cellules de Leydig (Qian et Song, 1999) et les souris *est*^{-/-} montrent un phénotype de reproduction (Tong et al. 2005) avec un déficit de transport du cholestérol et le dysfonctionnement de la stéroïdogenèse (Tong et al., 2004). Nous recommandons de réaliser une étude en PCR quantitative ou par *western blot* de *est* chez les souris *lxra β ^{-/-}*. Nos résultats montrent que l'action du DES chez les souris KO traitées semble plus sévère que chez les souris sauvages, ce qui suggère que l'effet délétère du DES au niveau testiculaire fait intervenir, au moins en partie, les LXRs. Vu la complexité du rôle des œstrogènes dans le testicule et l'intervention de plusieurs récepteurs nucléaires dans la régulation de la fonction de reproduction chez le mâle, il est difficile à ce jour d'expliquer le rôle exacte des LXRs dans cette signalisation.

En conclusion, les résultats montrent que le DES amplifie la baisse de la stéroidogénèse observée chez les souris *lxrαβ^{-/-}*. Ce perturbateur endocrinien n'a pas d'effet sur le métabolisme lipidique chez les souris sauvage mais provoque une accumulation d'esters de cholestérol et de cholestérol chez les souris *lxrαβ^{-/-}*. L'effet perturbateur du DES est plus accentué chez les souris LXR^{-/-}, ce qui pourrait accélérer l'hypofertilité chez ces souris. Le mécanisme moléculaire par lequel les LXR^s interfèrent avec le DES pour diminuer son action au niveau testiculaire reste à préciser.

Annexes

Article 2 : 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.

* Premiers auteurs équivalents.



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 18 February 2011

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 *lxxr* $\alpha/-$, *lxxr* $\beta/-$ and *lxxr* $\alpha\beta/-$ 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-metabolisable 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-corepressor-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.

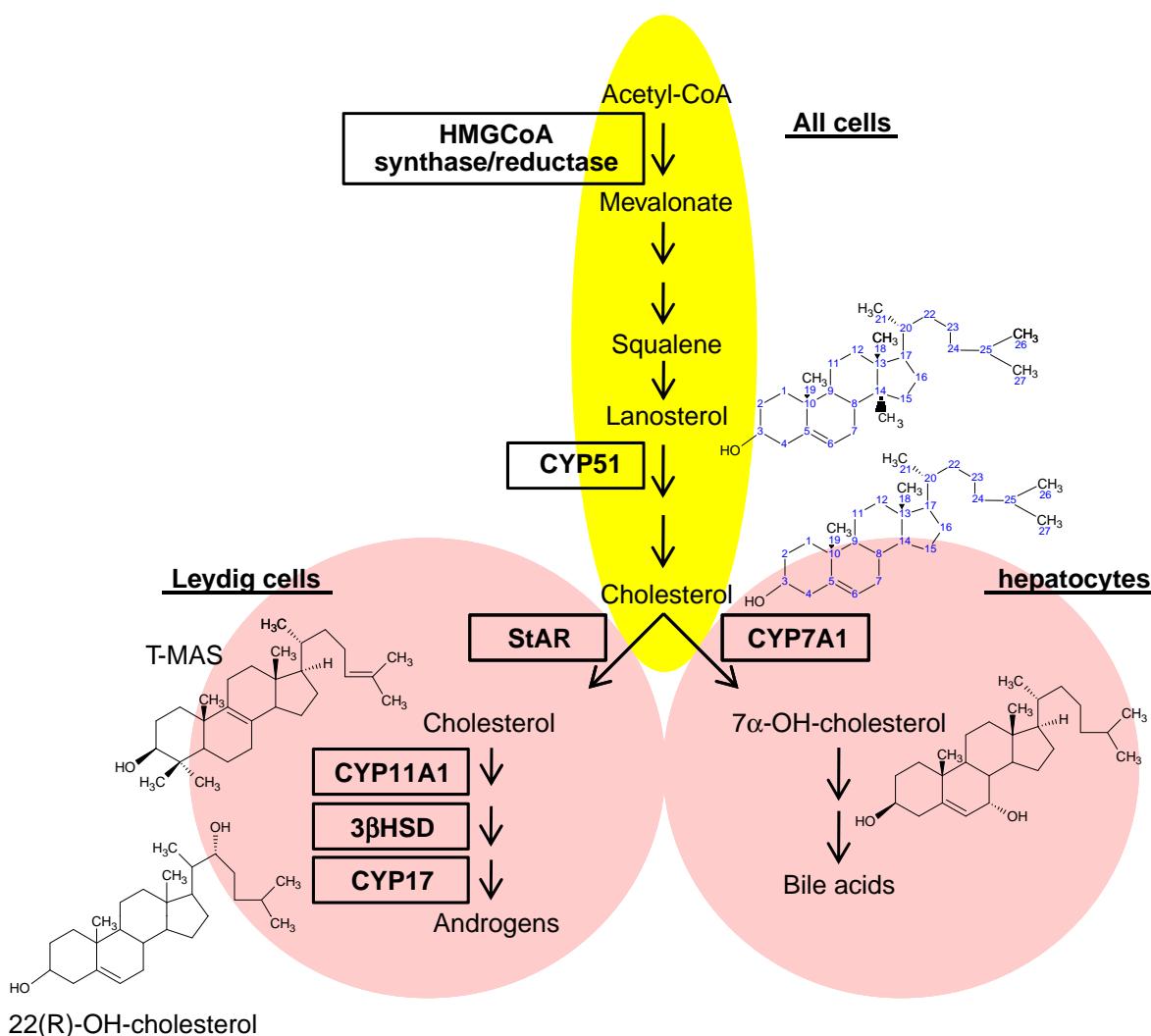


Fig. 1. Schematic representation of cholesterol synthesis and metabolism into androgens or bile acids. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase is the rate-controlling enzyme of the mevalonate pathway that produces cholesterol and other isoprenoids. This synthesis could virtually occur in 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 LXR α s have been extensively detailed in the homeostasis of cholesterol in the gut-liver axis [15]. The role of the LXR α s on cholesterol metabolism was determined using engineered knock-out mice lacking one (*lrx α -/-* or *lrx β -/-*) or both (*lrx α ;β-/-*) isoforms. Historically, the first analyses were performed on the *lrx α -/-* mice, which developed a hepatic steatosis, due to cholesterol-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). *Lrx β -/-* [17] and *lrx α ;β-/-* [17,18] mice were then obtained. The role of the LXR α s 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]. LXR α s, 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 LXR α s in intestine and macrophages efficiently prevents atherosclerosis [31,32]. This review will emphasize the physiological roles of LXR α s in the male and thus focus on testis, epididymis and prostate (Fig. 2).

The hypothesis that LXR α s 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]. LXR α -deficient mice presented an adrenomegaly due to a higher cholesterol-ester content and a Cushing-like syndrome, as shown by the increased levels of blood corticosterone [33]. This work emphasized the role of LXR α 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 LXR α - and LXR β -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

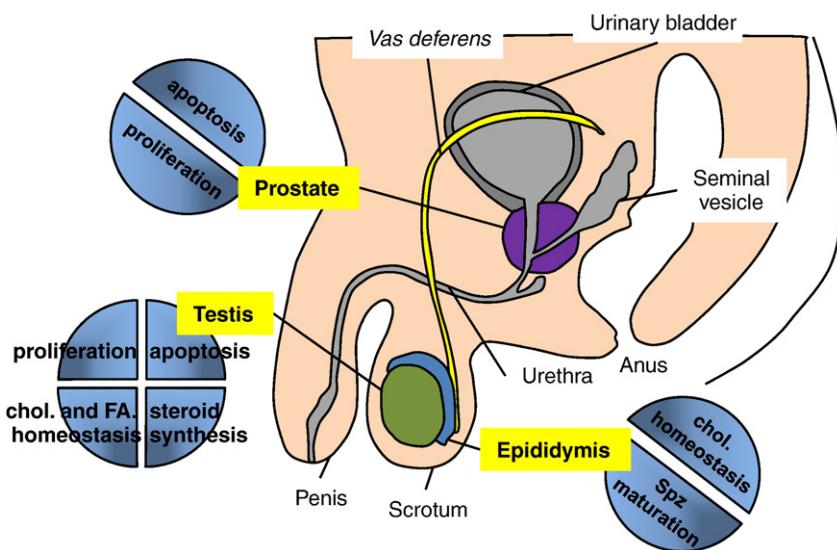


Fig. 2. Physiological roles of LXRs in male genital tract. Three main organs are targeted by LXR-disruption in male mice: testis, epididymis, and prostate. Schematically, LXRs regulate lipid homeostasis in testis and epididymis, as well as apoptosis–proliferation equilibrium of spermatozoa (spz), testicular 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. LXRx 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 LXRx- 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 LXRx 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. LXRx 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 LXRx is involved in the regulation of apoptosis in the testis [36]. TUNEL analyses revealed that *lxr α* −/− (as well as *lxr α ;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 LXRx-lacking mice. Conversely, LXR β -deficient (as well as *lxr α ;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. LXRx controls androgen synthesis in testis

The hypothesis that LXRx could regulate androgen production came from the decreased level of testicular testosterone observed in *lxr α* −/− and *lxr α ;β*−/− mice [36]. Type 1 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase (3 β hsdl) 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 LXRx-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, LXRx-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 LXRx regulates steroid synthesis not only in adrenal cells [33] but also in Leydig cells [36].

2.3. Both LXRx 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 ;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 *sr1*, encoding the scavenger receptor B1, *abca1* (ATP-binding cassette, sub-family A member 1), and *scd2*

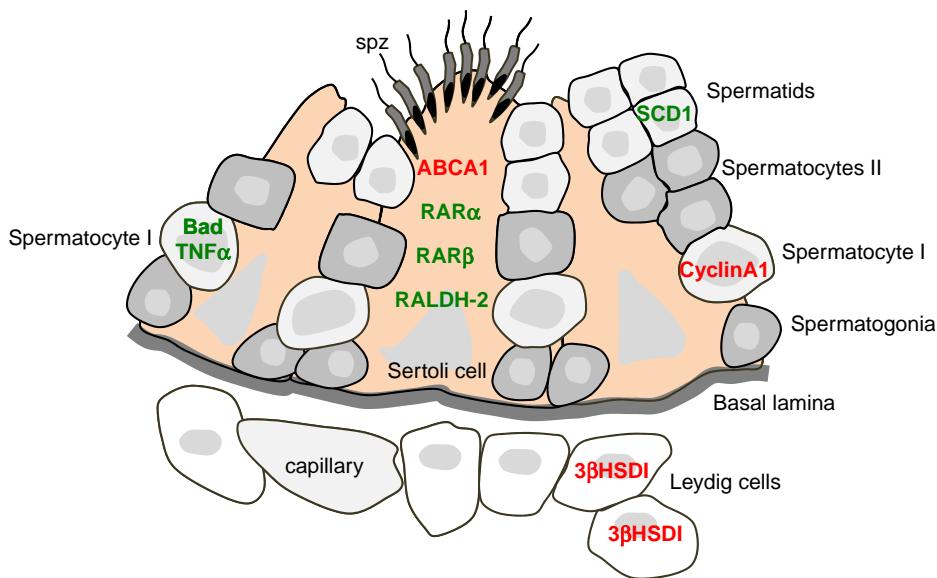


Fig. 3. Proteins which accumulation is altered by LXR-deficiency in the testis tubule. Schematically, LXRs regulate lipid homeostasis in testis, as well as apoptosis–proliferation equilibrium of spermatozoa (spz) and testicular germ cells. For clarity, fibroblasts and myoid cells below the basal lamina 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 *lxr α ;β $-/-$* mice [36], as suggested by Mascrez 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, NR0B2), 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, *lxr α ;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 *lxr α ;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 *lxr α ;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 *srebp1c*, *scd1* and *scd2* mRNAs were decreased in *lxr α ;β $-/-$* male *caput* epididymidis

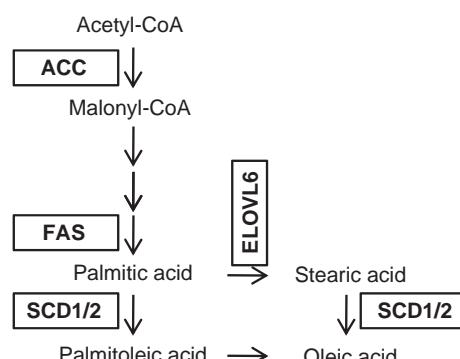


Fig. 4. Schematic representation of fatty acid synthesis in mammals. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is the rate-limiting (committed) step in fatty acid synthesis. There are two major isoforms of ACC in mammalian tissues; FAS, fatty acid synthase; SCD1/2, stearoyl CoA-desaturase 1 or 2; ELOVL, elongation of very long chain.

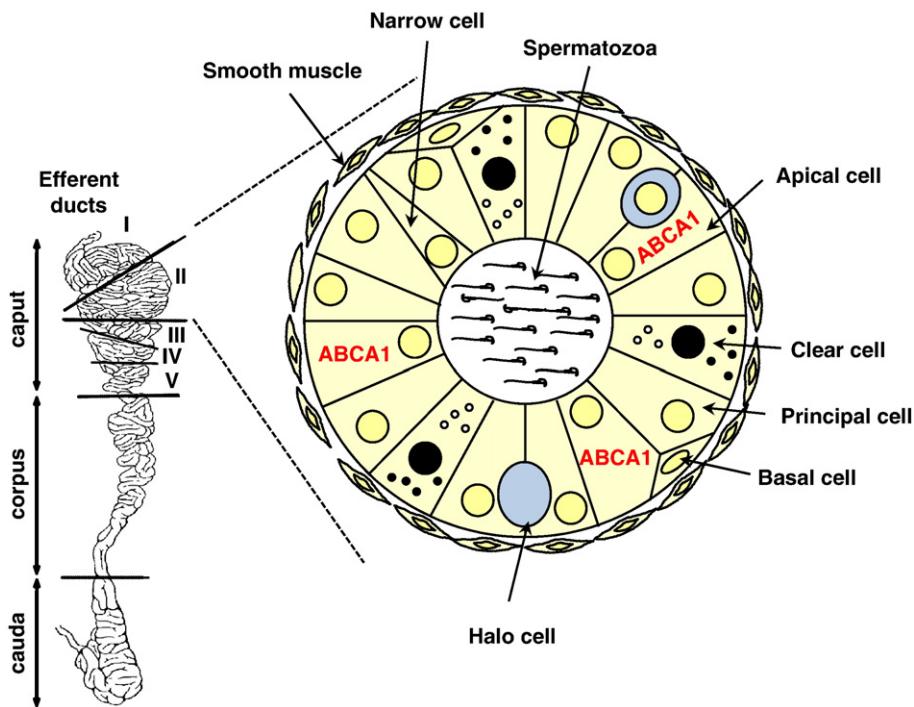


Fig. 5. Schematic representation of the role of LXR α in the *caput* epididymidis. Epididymis is organized in three parts (*caput*, *corpus* and *cauda*). The main cells are indicated. The major phenotype of the LXR-deficient mice is observed in the segments I and II of the *caput* with the lack of ABCA1 (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 *lxr α ;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 cholesterol-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 *lxr α ;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 *lxr α ;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 LXR α and LXR β 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 LXR α 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

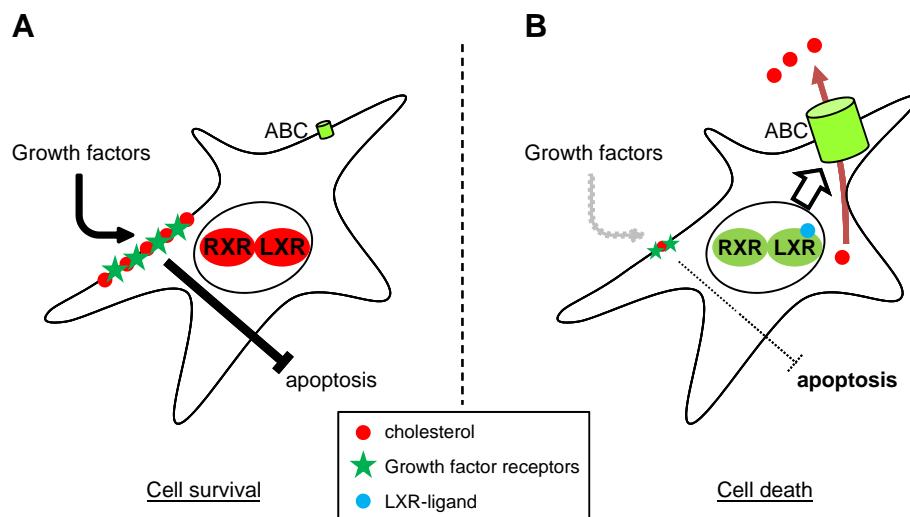


Fig. 6. Role of LXRs in apoptosis of prostate human cancer cells. A) When the level of cholesterol is high, it accumulates in membranes within the lipid rafts, which allows the growth factors to access to their receptors. Binding of these peptides increases cell proliferation and inhibits cell death 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 LXRLpha 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 LXR 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. Lepescha, 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. Diczfalussy, 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, LXRLpha, *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-keto reductase gene akr1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRLpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXR 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. Stuiling, 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. Mascréz, 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, LXR, 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. Ouvrier, 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 hypercholesterolemia 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. Sahmoun, 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. Tewodros, 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 3 : 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[†]
[†]"Génétique 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

| Article highlights. |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 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. <p>This box summarizes key points contained in the article.</p> |

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, sirtuin 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-tertraen-3-one derived from *Tolyphocladium inflatum* [17], a fungus isolated from Norwegian soil that produces cyclosporin in certain conditions; acanthoic acid from rollinia [18], an exotic tropical fruit; gynosaporine 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

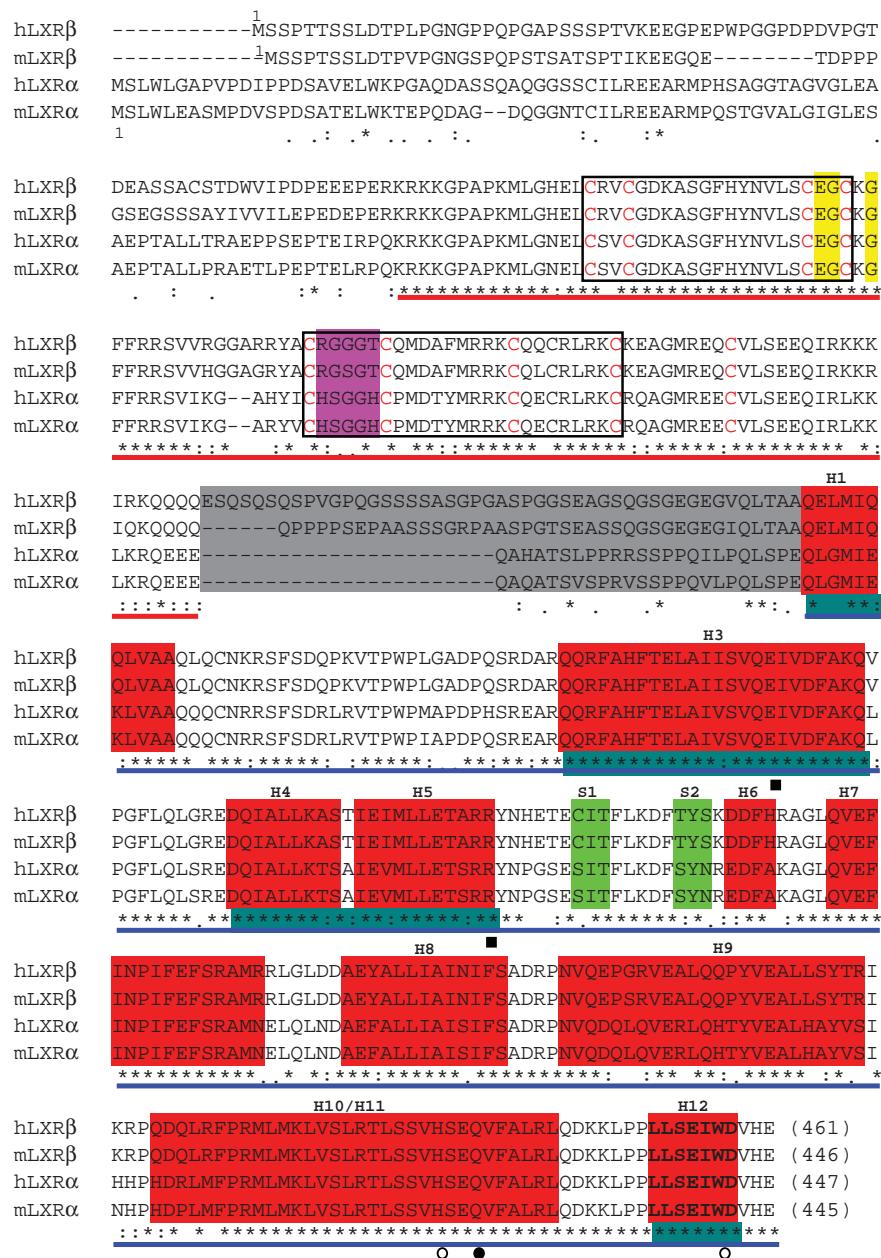


Figure 1. Protein sequence alignments of human (h) and mouse (m) LXR α and LXR β . (*) identical amino acids; (:) similar amino acids; (.) structurally related amino acids. The 9 Cys of the DNA-binding domain are indicated in red type. DNA- and ligand-binding domains are underlined in red and blue, respectively. 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

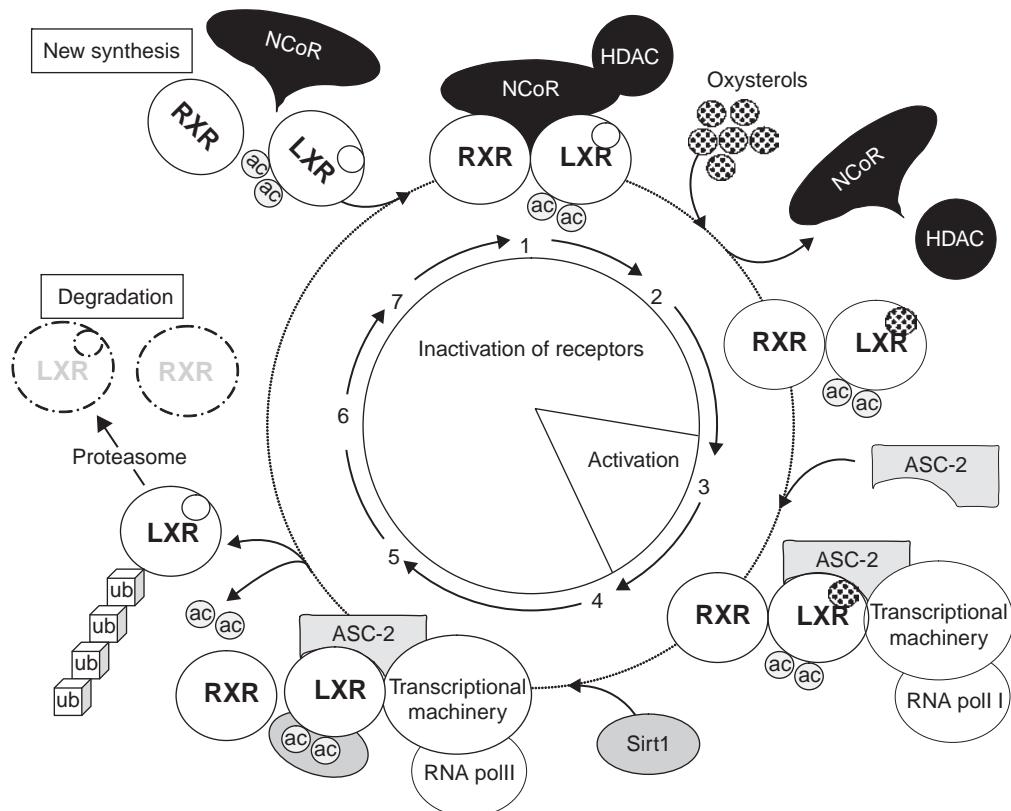


Figure 2. Schematic representation of the activation/inhibition cycle of liver X receptor (LXR) heterodimerizing with retinoid X receptor (RXR). In the absence of ligand, LXR/RXR is bound on DNA together with transcriptional co-repressor. Agonist binding of one of the two receptors will induce departure 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 Sirtuin 1 (Sirt1) is to deacetylate LXR, which will be ubiquitinylated 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: Sirtuin 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 LXR s 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 (Elov5; [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 cholesterol 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 $\alpha^{-/-}$ but not LXR $\beta^{-/-}$ 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].

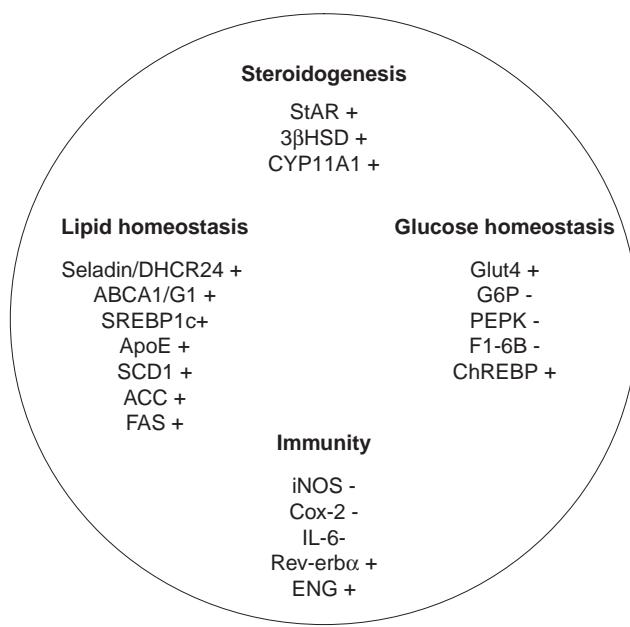


Figure 3. LXR target genes in steroidogenesis, lipid and glucose homeostasis, and immunity. The reported genes correspond to the list mentioned within the text. (+) upregulated gene; (-) down regulated gene.

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; 3 β -HSD: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; IL-6: Interleukin-6; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; PEPK: Phospho-enol pyruvate kinase; SCD1: Steroyl-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. LXR β - but not LXR α -deficient mice develop glucose intolerance and diabetes when fed a high-fat diet [55]. This suggests that insulinemia is mainly controlled by LXR β *in vivo* [56]. Therefore, activation of LXR lowers circulating glucose concentrations.

2.3 LXR and steroidogenesis

Cummins *et al.* underlined a major role of LXR α in controlling the steroidogenic function of the adrenal [57]. Indeed, corticosterone levels were increased in LXR α -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 (*3 β hsd*), 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. LXR α 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 3 β hsd transcripts. This effect was abrogated in mice lacking LXR α [58,59]. An induction of *star* transcript by T0901317 was also observed in the ovary [60]. Altogether these data demonstrate that activation of LXR α 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- κ B [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 LXR $\alpha\beta^{-/-}$ 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-erb α , 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-atherosclerotic 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

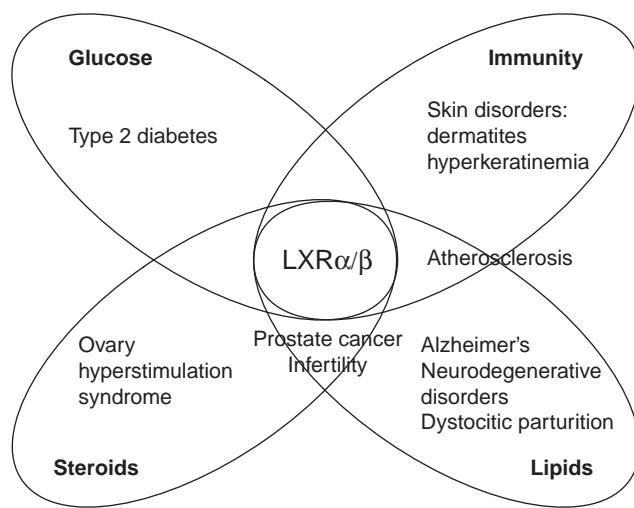


Figure 4. Synthesis of the role of liver X receptor (LXR) in physiology and putative associated diseases. The role of LXR in the control of lipid and glucose homeostasis, immunity and steroidogenesis has been extensively studied. Moreover, careful analysis of LXR-deficient mice led to the proposal of 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 $\text{A}\beta$ 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, $\text{A}\beta$ 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 $\text{A}\beta$ peptide, suggesting that ABCA1 plays a protective role preventing AD progression [77]. Moreover, the loss of *lxxrα* or *lxxrβ* in APP23 transgenic mice increases $\text{A}\beta$ 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 photoaging 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 $^{-/-}$ 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 cholestryler 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 cholestryler 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. Cholestryler 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 α and LXR β 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 α 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 α , and the interaction between LXR α and BARD1. This ligand effect might be critical for the early step of transcriptional activation of ligand-stimulated LXR α , through a stable binding of LXR α 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 α and LXR β 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 raloxifene 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 LXRA and RXR β 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
- 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
- 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
- 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
- Bradley MN, Hong C, Chen M, et al. Ligand activation of LXR β reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXRA and apoE. *J Clin Invest* 2007;117:2337-46
- 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.
- 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.
- 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 LXRA-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 LXRA 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. Peer DJ, Turley SD, Ma W, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXRA. *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 (LXRA). *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, LXRA 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. Efano 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. Ogihara T, Chuang JC, Vesterman 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, Rousseau 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 LXR β 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. Komubes LG, Schmuth 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 LXRA and LXRB 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 LXRB 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 LXRx 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 Ouemeddour^{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 Aubière,
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

Références bibliographiques

- Adam, E., Kaufman, R.H., Adler-Storthz, K., Melnick, J.L. and G.R. Dreesman (1985) A prospective study of association of herpes simplex virus and human papillomavirus infection with cervical neoplasia in women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Int J Cancer* 35(1):19-26.
- Akingbemi, B.T., Ge, R., Rosenfeld, C.S., Newton, L.G., Hardy, D.O., Catterall, J.F., Lubahn, D.B., Korach, K.S. and M.P. Hardy (2003). Estrogen receptor-alpha gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinol.* 144(1):84-93.
- Albrecht M, Rämsch R, Köhn FM, Schwarzer JU, Mayerhofer A (2006). Isolation and cultivation of human testicular peritubular cells: a new model for the investigation of fibrotic processes in the human testis and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(5):1956-60.
- Anbalagan M, Sriraman V, Jagannadha Rao A (2003). Isolation and characterization of Leydig cells from adult bonnet monkeys (*Macaca radiata*): evidence for low steroidogenic capacity in monkey Leydig cells in contrast to rat Leydig cells. *J Endocrinol.* 179(2):175-82.
- Andersson, S. and N. Moghrabi (1997) Physiology and molecular genetics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* 62(1):143-147.
- Anderson LM, Choe SE, Yukhananov RY, Hopfner RL, Church GM, Pratt RE, Dzau VJ. (2003). Identification of a novel set of genes regulated by a unique liver X receptor-alpha -mediated transcription mechanism. *J Biol Chem.* 278(17):15252-60.
- Anthonisen EH, Berven L, Holm S, Nygård M, Nebb HI, Grønning-Wang LM., (2010). Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J Biol Chem.* 285(3):1607-15.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81(3):1269-304.
- Ascoli, M., Fanelli, F. and D.L. Segaloff (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, 2002 perspective. *Endocr Rev* 23(2):141-174.
- Auwerx J, Cock TA, Knouff C. (2003). PPAR-gamma: a thrifty transcription factor. *Nucl Recept Signal.* 2003;1:e006. Epub 2003 Jun 27.
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 4(4):585-95.
- Baranowski M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 7:31-55.
- Belaisch J (1983) L'exposition au diéthylstilbestrol pendant la vie intra-utérine. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 12(5): 481-8.
- Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M., (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 74(1):68-85.
- Beltowski J, Semczuk A., (2011). Liver X receptor (LXR) and the reproductive system--a potential novel target for therapeutic intervention. *Pharmacol Rep.* 62(1):15-27.
- Björkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E., (1994). Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(18):8592-6.
- Björkhem I, Heverin M, Leoni V, Meaney S, Diczfalusy U., (2006) Oxysterols and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 185:43-9.
- Blanc, B., Bretelle, F. and A. Agostini (2007). Le Distilbène, trente ans après. ISBN-13: 978-2-287-73306-2. Springer-Verlag France, Paris.

- Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Collins A, Tontonoz P, Hsueh WA, Tangirala RK (2006) A nuclear receptor corepressor-dependent pathway mediates suppression of cytokine-induced C-reactive protein gene expression by liver X receptor. *Circ Res.* 99(12):e88-99.
- Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, Eggertsen G, Björkhem I, Diczfalussy U (2002). Metabolism of 4 beta -hydroxycholesterol in humans. *J Biol Chem.* 277(35):31534-40.
- 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 (Lond)* 375(6530):377–382.
- 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(10):381-8.
- Bouskine AM, Nebout B, Mograbi F, Brucker-Davis C, Roger, Fenichel P. (2008) Estrogens promote human testicular germ cell cancer through a membrane-mediated activation of extracellular regulated kinase and protein kinase A. *Endocrinology* 149:565—73.
- Bramlett KS, Houck KA, Borchert KM, Dowless MS, Kulanthaivel P, Zhang Y, Beyer TP, Schmidt R, Thomas JS, Michael LF, et al.,(2003). A natural product ligand of the oxysterol receptor, liver X receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 307(1):291-6.
- Brehm R, Zeiler M, Rüttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lécureuil C, Steger K, et al., (2007). A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol.* 171(1):19-31.
- Brown AJ, Jessup W (1999) Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 142(1):1-28.
- Brown AJ, Jessup W.(2009). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med.* 30(3):111-22.
- Byskov AG. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev.* 66(1):71-117.
- Calle EE, Mervis CA, Thun MJ, Rodriguez C, Wingo PA, Heath CW Jr. (1996) Diethylstilbestrol and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of US women. *Am J Epidemiol* 144(7): 645-52.
- Cao, G., Zhao, L., Stangl, H., Hasegawa , T., Richardson, J.A., Parker, K.L. and H.H. Hobbs (1999) Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol Endocrinol.* 13(9):1460-1473.
- Carr, B.R., Parker, Jr. CR., Ohashi, M., MacDonald, PC. and E. R. Simpson (1983) Regulation of human fetal testicular secretion of testosterone: low-density lipoprotein-cholesterol and cholesterol synthesized de novo as steroid precursor. *Am J Obstet Gynecol* 146(3):241-247.
- Cederroth CR, Schaad O, Descombes P, Chambon P, Vassalli JD, Nef S. (2007). Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism. *Endocrinol.* 148(11):5507-19.
- Chang KC, Shen Q, Oh IG, Jelinsky SA, Jenkins SF, Wang W, Wang Y, LaCava M, Yudt MR, Thompson CC, et al., (2008). Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol Endocrinol.* 22(11):2407-19.
- Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294(5548):1866-70.
- Chen, H., R.S. Ge and B.R. Zirkin (2009) Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol.* 306(1-2):9-16.

- Chen, H., E. Stanley, S. Jin and B.R. Zirkin (2010) Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 90(4):272-83.
- Chen, J.D. and R.M. Evans (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548):454-457.
- Chen M., Beaven S., Tontonoz P., (2005) Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor α . *J. Lipid Res.*, 46(12): 2570–2579.
- Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW., (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5(1):73-9.
- Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R., (1991). Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinol.* 128(5):2441-8.
- Chryssicopoulos A.; Kondi-Parhitis A.; Kairi D.; Vasiliadis T.; Maragoudakis A., (1990) Prise de diéthylstilbestrol pendant la grossesse. Sa responsabilité dans le syndrome du testicule féminisant. *Press Med* 19(30): 1397-400.
- Chung BC, Guo IC, Chou SJ., (1997) Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids* 62 (1), 37-42.
- Clermont Y, Harvey SC., (1965). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinol.* 76:80-9.
- Clermont Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 52(1):198-236.
- Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. (1996) Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature.* 30;381(6581):418-21.
- Cobb J, Handel MA., (1998) Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol.* 9(4):445-50.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP., (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol.* 23(3):255-75.
- Colton T, Greenberg ER, Noller K, Ressegue L, Van Bennekom C, Heeren T, Zhang Y., (1993) Breast cancer in mothers prescribed diethylstilbestrol in pregnancy. *Further follow-up. JAMA* 269(16): 2096-100.
- Cosgrove, M. D., Benton, B. and B. E. Henderson (1977) Male genitourinary abnormalities and maternal diethylstilbestrol. *J Urol* 177(2):220-2.
- Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. (2002) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 275(36):28240-5.
- Couse JF, Korach KS., (2004) Estrogen receptor-alpha mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. *Toxicology.* 1;205(1-2):55-63.
- Cruz-Garcia L, Sánchez-Gurmaches J, Gutiérrez J, Navarro I., (2011) Regulation of LXR by fatty acids, insulin, growth hormone and tumor necrosis factor- α in rainbow trout myocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 160(2):125-36.
- Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefrançois-Martinez AM, Caira F, Veyssiére G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM. (2006). Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest.* 116(7):1902-12.

- Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI. (2003) Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem.* 278(48):48283-91.
- Davidoff MS, Middendorff R, Pusch W, Müller D, Wichers S, Holstein AF. (1999) Sertoli and Leydig cells of the human testis express neurofilament triplet proteins. *Histochem Cell Biol.* 111(3):173-87.
- de Robertis E, de Plazas SF. (1970). Acetylcholinesterase and acetylcholine proteolipid receptor: two different components of electroplax membranes. *Biochim Biophys Acta.* 219(2):388-97.
- de Rooij DG, Russell LD (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 21(6):776-98.
- de Rooij DG (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction.* 121(3):347-54.
- Decherney A, Cholst I, Naftolin F (1981) Structure and function of the fallopian tubes following exposure to DES during gestation. *Fertil Steril* 36(6): 741-5.
- DeFalco T, Takahashi S, Capel B. (2011). Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol.* 352(1):14-26
- Delbès G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P, Habert R. (2005). Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinol.* 146:2454–2461.
- Delbès G, Levacher C, Habert R (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction.* 132(4):527-38.
- Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, Millatt L, Staels B, Girard J, Postic C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest.* 118(3):956-64.
- D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Obin MS, Fried SK, Greenberg AS. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem.* 2005 Oct 28;280(43):35983-91.
- Devoto L, Kohen P, Vega M, Castro O, González RR, Retamales I, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF. (2002). Control of human luteal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 186(2):137-41.
- Dieckmann KP, Skakkebaek NE. (1999). Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *Int J Cancer.* 83(6):815-22.
- Dieckmann, W. J., Davis, M. E., Rynkiewicz, L. M. and R. E. Pottinger 1953. (1999) Does the administration of diethylstilbestrol during pregnancy have therapeutic value? *Am J Obstet Gynecol* 66: 1062-81.
- Docimo, S. G., Silver, R. I. and W. Cromie (2000). The undescended testicle: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 62:2037-44, 2047-8.
- Drapier, E. (1984). Fertility disorders attributable to the use of diethylstilbestrol during intrauterine life. *Rev Fr Gynecol Obstet* 79(4): 297-300; 303-5.
- Drouineaud V, Sagot P, Garrido C, Logette E, Deckert V, Gambert P, Jimenez C, Staels B, Lagrost L, Masson D. (2007). Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol Hum Reprod.* 13(6):373-9.
- Dube', C., Bergeron, F., Vaillant, M. J., Robert, N. M., Brousseau, C. and J. J. Tremblay (2009) The nuclear receptors SF1 and LRH1 are expressed in endometrial cancer cells and regulate steroidogenic gene transcription by cooperating with AP-1 factors. *Cancer Lett* 275(1):127-138.
- Ducheix, S., Lobaccaro, J.M., Martin, P.G., and H., Guillou (2011) Liver X Receptor: an oxysterol sensor and a major player in the control of lipogenesis. *Chem Phys Lipids.* 164(6):500-14.

- Dupont E, Labrie F, Luu-The V, Pelletier G (1993). Ontogeny of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3beta-HSD) in rat testis as studied by immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*. 187(6):583-9.
- Eckstein B, Borut A, Cohen S. (1987). Metabolic pathways for androstanediol formation in immature rat testis microsomes. *Biochim Biophys Acta*. 924(1):1-6.
- Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, Gladen BC, Lubahn DB, Korach KS. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinol*. 137(11):4796-805.
- Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S (2006). Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update*. 12(3):275-82.
- 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. (2011) Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta*. 1812(8):974-81.
- Escriva H, Safi R, Hänni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V., (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(13):6803-8.
- Escriva H, Delaunay F, and Laudet V., (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22(8):717-27.
- Euskirchen GM, Auerbach RK, Davidov E, Gianoulis TA, Zhong G, Rozowsky J, Bhardwaj N, Gerstein MB, Snyder M. (2011) Diverse roles and interactions of the SWI/SNF chromatin remodeling complex revealed using global approaches. *PLoS Genet*. 7(3):e1002008. Epub 2011 Mar 3.
- Fan, X., Kim, H. J., Bouton, D., Warner, M. and J. A. Gustafsson (2008). Expression of liver X receptor beta is essential for formation of superficial cortical layers and migration of later-born neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(36):13445-50.
- Farkash, Y., Timberg, R. and J. Orly (1986). Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique. *Endocrinol*. 118(4):1353-1365.
- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K (2010). Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 10(6):692-7
- Fawcett DW (1975). Gametogenesis in the male: prospects for its control. *Symp Soc Dev Biol*. (33):25-53
- Feltkamp D, Wiebel FF, Alberti S, Gustafsson JA. (1999). Identification of a novel DNA binding site for nuclear orphan receptor OR1. *J Biol Chem*. 274(15):10421-9.
- Ferguson, J. H. (1953) Effect of stilbestrol on pregnancy compared to the effect of a placebo. *Am J Obstet Gynecol* 65(3): 592-601.
- Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. (2002) Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport. *Biochem J*. 15;368(Pt 3):855-64.
- Fielden MR, Halgren RG, Fong CJ, Staub C, Johnson L, Chou K, Zacharewski TR. (2002). Gestational and lactational exposure of male mice to diethylstilbestrol causes long-term effects on the testis, sperm fertilizing ability in vitro, and testicular gene expression. *Endocrinol*. 143(8):3044-59.

- Fiévet, C., and B., Staels (2009) Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochem Pharmacol.* 77(8):1316-27.
- Flück CE, Miller WL, Auchus RJ., (2003) The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(8):3762-6.
- Ford CT, Sherratt MJ, Griffiths CE, Watson RE., (2009). Liver X receptor β : maintenance of epidermal expression in intrinsic and extrinsic skin aging. *Age (Dordr).* 31(4):365-72.
- Francis GA, Knopp RH, Oram JF., (1995) Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* 96(1):78-87.
- Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, Kocer A, Henry-Berger J, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM, Drevet JR., (2004) Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol.* 33(2):361-75.
- Fujiyoshi M, Ohtsuki S, Hori S, Tachikawa M, Terasaki T., (2007) 24S-hydroxycholesterol induces cholesterol release from choroid plexus epithelial cells in an apical- and apoE isoform-dependent manner concomitantly with the induction of ABCA1 and ABCG1 expression. *J Neurochem.* (4):968-78.
- 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(21):7686-9.
- Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow CP, Zhou G, Wright SD, Cai TQ., (2001) Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem.* 276(52):48702-8.
- Ge RS, Hardy MP. Decreased cyclin A2 and increased cyclin G1 levels coincide with loss of proliferative capacity in rat Leydig cells during pubertal development. *Endocrinol.* 1997 Sep;138(9):3719-26
- Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, Kennedy RT, Chiang SH, Burant CF, Steffensen KR, Gustafsson JA, MacDougald OA., (2005). LXR β is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem.* 280(24):23024-31.
- Germain P, Kammerer S, Perez E, Peluso-Iltis C, Tortolani D, Zusi FC, Starrett J, Lapointe P, Daris JP, Marinier A, et al., (2004) Rational design of RAR-selective ligands revealed by RAR crystal structure. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) Rep* 5(9):877–882.
- Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V., (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 58 (4):685-704. Review.
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, and Evans RM (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46(5):645–652.
- Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20(5):689-725.
- Gill S, Chow R, Brown AJ (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res.* 47(6):391-404.
- Giusti, R. M., Iwamoto, K. and E. E. Hatch (1995) Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med* 122(10): 778-88.
- Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15(3):391-407.
- Gong H, Guo P, Zhai Y, Zhou J, Uppal H, Jarzynka MJ, Song WC, Cheng SY, 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(8):1781-90.

- Gronemeyer H, Laudet V. (1995) Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile*. 2(11):1173-308.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A., Laudet, V., (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(11):950–964.
- Habert R, Brignaschi P. (1991). Developmental changes in vitro testosterone production by dispersed Leydig cells during fetal life in rats. *Arch Androl.* 27(2):65-71.
- Habert R, Lambrot R, Lécureuil C, Frydman R, Pairault C, Angenard G, Coffigny H, et V. Rouiller-Fabre (2007) Le testicule foetal humain est-il la cible des perturbateurs endocriniens. *Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition* (XI), n° 3, 119-124.
- Haider, SG. (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol.* 233:181-241.
- Hampton, R.Y. (2002) Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:345-78.
- Handel MA, Cobb J, Eaker S. (1999). What are the spermatocyte's requirements for successful meiotic division? *J Exp Zool.* 285(3):243-50.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. (1989). Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinol.* 124(2):762-70.
- Hatano, O., Takakusu, A., Nomura, M., and K., Morohashi (1996) Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells.* 1(7):663-71.
- Haverfield, J.T., Ham, S., Brown, K.A., Simpson, E.R., and S.J., Meachem (2011) Teasing out the role of aromatase in the healthy and diseased testis. *Spermatogenesis.* 1(3):240-249.
- Hayley M. Scott, J. Ian Mason, and Richard M. Sharpe (2009). Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocrine Reviews,* 30(7):883–925.
- He Z, Jiang J, Hofmann MC, Dym M. (2007) Gfra1 silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biol Reprod.* 77(4):723-33.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387(6634):733–736.
- Heller CG, Clermont Y. (1963) Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science.* 140:184-6.
- Herbst AL, Scully RE (1970). Adenocarcinoma of the vagina in adolescence. *Cancer* 25(4): 745-57.
- Herbst AL, Robboy SJ, Scully RE, Poskanzer DC (1974). Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix in girls: analysis of 170 registry cases. *Am J Obstet Gynecol* 119(5): 713-24.
- Herbst AL, Hubby MM, Blough RR, Azizi F. (1980). A comparison of pregnancy experience in DES exposed and unexposed daughters. *J Reprod Med.* 24(2):62-9.
- Herbst, A. L., Hubby, M. M. and F. Azizi (1981). Reproductive and gynecologic surgical experience in diethylstilbestrol exposed daughters. *Am J Obstet Gynecol* 141(8): 1019-28.
- Hermo L, Clermont Y (1976). Light cells within the limiting membrane of rat seminiferous tubules. *Am J Anat.* 145(4):467-83.
- Hermo L, Dworkin J. (1988). Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane. *Am J Anat.* 181(2):111-31.
- Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech.* 73(4):241-78.

- Hoerer S, Schmid A, Heckel A, Budzinski RM, Nar H. (2003). Crystal structure of the human liver X receptor beta ligand-binding domain in complex with a synthetic agonist. *J Mol Biol.* 334(5):853-61.
- Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, Davidoff MS. (1996). Myofibroblasts in the lamina propria of human semi-niferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol.* 59(2):109-25.
- Hoover RN, Hyer M, Pfeiffer RM, Adam E, Bond B, Cheville AL, Colton T, Hartge P, Hatch EE, Herbst AL, Karlan BY, et al., (2011) Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *N Engl J Med.* 6;365(14):1304-14.
- Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamel Y, Soderstrom M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548): 397–404.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 109(9):1125-31.
- Horton JD. (2002). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans.* 30(Pt 6):1091-5.
- Hosokawa S, Murakami M, Ineyama M, Yamada T, Koyama Y, Okuno Y, Yoshitake A, Yamada H, Miyamoto J. (1993). Effects of procymidone on reproductive organs and serum gonadotropins in male rats. *J Toxicol Sci.* 18(2):111-24.
- Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, Thomas JS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP. (2004). T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab.* 83(1-2):184-7.
- Hozoji-Inada M, Munehira Y, Nagao K, Kioka N, Ueda K. (2011). Liver X receptor beta (LXR β) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. *J Biol Chem.* 286(22):20117-24.
- Hu MC, Hsu NC, El Hadj NB, Pai CI, Chu HP, Wang CK, Chung BC. (2002). Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1. *Mol Endocrinol.* 16(8):1943-50.
- Hu X, Li S, Wu J, Xia C, Lala DS. (2003). Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol.* 17(6):1019-26.
- Huckins C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec.* 169(3):533-57.
- Huckins C. (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec.* 190(4):905-26.
- Hughes I. A., (2001) Minireview: sex differentiation. *Endocrinol.* 142(8):3281-3287.
- Huhtaniemi, I. (1994). Fetal testis: a very special endocrine organ. *Eur J Endocrinol* 130(1):25-31.
- Huuskonen J, Fielding PE, Fielding CJ. (2004). Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(4):703-8.
- Ito M, Roeder RG (2001). The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab.* 12(3):127-34.
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 383(6602):728-31.

- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LX α and LX β . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(1):266-71.
- Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. (2003). Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development.* 130(16):3663-70.
- Johnson, A.B., abd B.W., O'Malley (2011) Steroid receptor coactivators 1, 2, and 3: critical regulators of nuclear receptor activity and steroid receptor modulator (SRM)-based cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 30;348(2):430-9.
- Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P (2002). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem.* 277(13):11019-25.
- Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P.(2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 9(2):213-9.
- Kalla NR, Nisula BC, Menard R, Loriaux DL. (1980). The effect of estradiol on testicular testosterone biosynthesis. *Endocrinol.* 106(1):35-9.
- Kallen, J. A., Schlaeppi, J. M., Bitsch, F., Geisse, S., Geiser, M., Delhon, I. & Fournier, B. (2002). X-Ray structure of the hROR α LBD at 1.63A°. Structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of ROR α . *Structure.* 10(12):1697-707.
- Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, Højlund K, Levin K, Thoresen GH, Beck-Nielsen H, Rustan AC, Gaster M., (2005). Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes.* 54(4):1108-15.
- Kaufman RH, Binder GL, Gray PM Jr, Adam E., (1977) Upper genital tract changes associated with exposure in utero to DES. *Am J Obstet Gynecol.* 128 (1):51-9.
- Kaufman, R. H. and E. Adam (2002) Findings in female offspring of women exposed in utero to diethylstilbestrol. *Obstet Gynecol* 99(2):197-200.
- Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 375(6532):581-5.
- Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA (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(42):39438-47.
- Kerr JB, Knell CM. (1988). The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development.* 103(3):535-44.
- Kim HH, Kwak DH, Yon JM, Baek IJ, Lee SR, Lee JE, Nahm SS, Jeong JH, Lee BJ, Yun YW, Nam SY. (2007). Differential expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in rat testes exposed to endocrine disruptors. *Journal of Reproduction and Development* 53 (3), 465–471.
- Kim, J.H., Li, H., Stallcup, M.R. (2003). CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators. *Mol. Cell.* 12(6):1537–1549.
- Kim JH, Yang CK, Heo K, Roeder RG, An W, Stallcup MR. (2008) CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes. *Mol Cell.* 22;31(4):510-9.

- Kiss L., Chen M., Gero D., Modis K., Lacza Z., Szabo C. (2006) Effects of 7-ketocholesterol on the activity of endothelial poly(ADP-ribose) polymerase and on endothelium-dependent relaxant function. *Int J Mol Med.* 18(6): 1113–1117.
- Kleene KC. (2001). A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev.* 106(1-2):3-23.
- Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. (1999). Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science.* 284(5415):757-60.
- Klip, H., Verloop, J., van Gool, J. D., Koster, M. E., Burger, C.W. and F. E. van Leeuwen (2002) Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Lancet* 359(9312):1102-7.
- Knaus HG, McManus OB, Lee SH, Schmalhofer WA, Garcia-Calvo M, Helms LM, Sanchez M, Giangiacomo K, Reuben JP, Smith AB 3rd, et al. (1994). Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry.* 33(19):5819-28.
- Kraemer, F. B., Shen, W.J., Harada, K., Patel, S., Osuga, J., Ishibashi, S. and S. Azhar (2004) Hormone-sensitive lipase is required for high density lipoprotein cholesteroyl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol.* 18(3):549-557.
- Kramer PR, Wray S. (2002) 17-Beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 81(3):203-16.
- Kruse, K., Lauver, D. and K. Hanson (2003) Clinical implications of DES. *Nurse Pract* 28(7): 26-35.
- Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, and Chambon P (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO (Eur Mol Biol Organ)* J 5(5):891–897.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Hagglad J, Nilsson S & Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol.* 138 863–870.
- Kumar, R., and B.W., O'Malley (2008) Nuclear Receptor Coregulators And Human Diseases (ebook). *World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.* ISBN-13 978-981-270-536-5.
- Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. (1989) Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development.* 107(2):213-20.
- Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, Castrillo A, Wilpitz DC, Mangelsdorf DJ, Collins JL, 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 U S A.* 100(9):5419-24.
- Lala, D. S., Rice , D. A. and K. L. Parker (1992) Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol.* 6(8):1249-1258.
- Laronda MM, Unno K, Butler LM, Kurita T (2012) The development of cervical and vaginal adenosis as a result of diethylstilbestrol exposure in utero. *Differentiation.* 84(3):252-60.
- Larsson DA, Baird S, Nyhalah JD, Yuan XM, Li W (2006) Oxysterol mixtures, in atherosclerosis-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. *Free Radic Biol Med.* 41(6):902-10.
- Lastérade, J. (2006) Les oubliés du Distilbène. *Libération*, lundi 7 février.
- Laudet V (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol.* 19(3):207–226.

- Laudet V, Gronemeyer H. (2002). The Nuclear Receptor - FactsBook. Academic press. ISBN 0-12-4377351. 462 pages.
- Leblond CP, Clermont Y., (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci.* 55(4):548-73.
- Lee MS, Kliwera SA, Provencal J, Wright PE, Evans RM., (1993) Structure of the retinoid X receptor- α DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Sci.* 260(5111):1117-21.
- Lee NP, Mruk D, Lee WM, Cheng CY., (2003) Is the cadherin/catenin complex a functional unit of cell-cell actin-based adherens junctions in the rat testis? *Biol Reprod.* 68(2):489-508.
- Lee S, Lee J, Lee SK, Lee JW., (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(6):1312-9.
- Lee, J. H., Zhou, J. and W. Xie (2008b) PXR and LXR in hepatic steatosis: a new dog and an old dog with new tricks. *Molecular Pharmaceutics* 5(1): 60-66.
- Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J. I. and M. H. Melner (1997) Synergistic activation of the human type II 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/ adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem* 272(12):7960-7967.
- Lehmann JM, Kliwera SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 272(6):3137-40.
- Leinonen, P.J. and R. B. Jaffe (1985) Leydig cell desensitization by human chorionic gonadotropin does not occur in the human fetal testis. *J Clin Endocrinol Metab* 61(2):234-238 67.
- Leoni V, Caccia C. (2011). Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids.* 164(6):515-24.
- Li D, Hu Y, Shen X, Dai X, Han X. (2010). Combined effects of two environmental endocrine disruptors nonyl phenol and di-n-butyl phthalate on rat Sertoli cells in vitro. *Reprod Toxicol.* 30(3):438-45.
- Li PS. (1991). In vitro effects of estradiol, diethylstilbestrol and tamoxifen on testosterone production by purified pig Leydig cells. *Chinese J Physiol.* 34:287-301.
- Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarante L. (2007) SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 28(1):91-106.
- Liebe B, Petukhova G, Barchi M, Bellani M, Braselmann H, Nakano T, Pandita TK, Jasinska M, Fornace A, Meistrich ML, et al., (2006). Mutations that affect meiosis in male mice influence the dynamics of the mid-preleptotene and bouquet stages. *Exp Cell Res.* 312(19):3768-81.
- Li-Hawkins J, Lund EG, Bronson AD, Russell DW (2000). Expression cloning of an oxysterol 7alpha-hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol. *J Biol Chem.* 275(22):16543-9.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352(6335):497-505.
- Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP, Russell DW (1998) cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *J Biol Chem.* 273(51):34316-27.
- Lundholm L, Movérare S, Steffensen KR, Nilsson M, Otsuki M, Ohlsson C, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. (2004) Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J Mol Endocrinol.* 32(3):879-92.

- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 77(4):481-90.
- Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalussy U, Björkhem I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(18):9799-804.
- Luu-The V, Bélanger A, Labrie F. (2008) Androgen biosynthetic pathways in the human prostate. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 22(2):207-21.
- Ma A, Yang X, Wang Z, Shi D, Chen Y., (2008) Adult exposure to diethylstilbestrol induces spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased oxidative stress in male hamster. *Reproductive Toxicology* 25(3) 367–373.
- Majdic G, Millar MR, Saunders PT. (1995). Immunolocalisation of androgen receptor to interstitial cells in fetal rat testes and to mesenchymal and epithelial cells of associated ducts. *J Endocrinol.* 147(2):285-93.
- Majdic G, Saunders PT. (1996). Differential patterns of expression of DAX-1 and steroidogenic factor-1 (SF-1) in the fetal rat testis. *Endocrinol.* 137(8):3586-9.
- Majdic G, Sharpe RM, O'Shaughnessy PJ, Saunders PT. (1996) Expression of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. *Endocrinol.* 137:1063-70.
- Mak, P. A., H. R. Kast-Woelbern, A. M. Anisfeld, and P. A. Edwards. (2002) Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J. Lipid Res.* 43(12): 2037–2041.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83(6):841-50.
- Marieb E. N., (2006). Human Anatomy & Physiology (7th Edition). Published by Benjamin Cummings. ISBN 0805359095 (ISBN13: 9780805359091).
- Mascaro', C., Nadal, A., Hegardt, F. G., Marrero, P. F. and D. Haro (2000) Contribution of steroidogenic factor 1 to the regulation of cholesterol synthesis. *Biochem J* 350(3):785-790.
- Mascrez B, Ghyselinck NB, Watanabe M, Annicotte JS, Chambon P, Auwerx J, Mark M. (2004). Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep.* 5(3):285-90.
- Mayerhofer A, Frungieri MB, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt HJ. (1999). Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *J Androl.* 20(3):341-7.
- McKenna NJ, O'Malley BW. (2002) Minireview: nuclear receptor coactivators-an update. *Endocrinol.* 143(7):2461-5.
- McLachlan JA, Newbold RR, Shah HC, Hogan MD, Dixon RL (1982). Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to DES. *Fertil Steril* 38(3): 364-71.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, Teunissen van Manen KR, Haupt RL. (1998) Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod.* 59(2):351-7.
- Middendorff R, Davidoff M, Holstein AF (1993) Neuroendocrine marker substances in human Leydig cells-changes by disturbances of testicular function. *Andrologia.* 25(5):257-62

- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreusch A, Saez E (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*. 445(7124):219-23.
- Monosson E, Kelce WR, Lambright C, Ostby J, Gray LE Jr. (1999). Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol Ind Health*. 15(1-2):65-79.
- Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, Gnechi M, Chisholm JW, Boomsma F, Anderson LM, Lawn RM, Gustafsson JA, Lopez-Illasaca M, et al., (2005). Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J Clin Invest*. 115(7):1913-22.
- Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H. and T. Omura (1992) A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem* 267(5): 17913-17919.
- Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Déchelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JM (2007). Oxysterol nuclear receptor LXRBeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem*. 282(7):4693-701.
- Mruk DD, Cheng CY. (2011). Environmental contaminants: Is male reproductive health at risk? *Spermatogenesis*. 1(4):283-290.
- Murakami M, Hosokawa S, Yamada T, Harakawa M, Ito M, Koyama Y, Kimura J, Yoshitake A, Yamada H. (1995). Species-specific mechanism in rat Leydig cell tumorigenesis by procymidone. *Toxicol Appl Pharmacol*. 131(2):244-52.
- Murono EP, Washburn AL. (1989). 5 alpha-reductase activity regulates testosterone accumulation in two bands of immature cultured Leydig cells isolated on Percoll density gradients. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 121(4):538-44.
- Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL (2001). Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biol Reprod*. 64(5):1409-16.
- Nassouri AS, Archambeaud F, Desailloud R (2012) Endocrine disruptors: echoes of congress of Endocrinology in 2012. [Article in French]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 73 Suppl 1:S36-44.
- Neigeborn L & Carlson M (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108(4): 845-858.
- Ness GC, Chambers CM. (2000). Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 224(1):8-19.
- Nishino K, Yamanouchi K, Naito K, Tojo H. (2001) Characterization of mesonephric cells that migrate into the XY gonad during testis differentiation. *Exp Cell Res*. 267(2):225-32.
- Nuclear Receptor Nomenclature Committee (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97(2):161-163.
- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P. J., Heikkila, M., Vainio, S. and A. P. McMahon (2000) Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis- androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal Leydig cells. *Endocrinol*. 141(7): 2631-2637.
- Oakberg EF. (1957). Duration of spermatogenesis in the mouse. *Nature*. 180(4595):1137-8.
- Oakes CC, Kelly TL, Robaire B, Trasler JM (2007). Adverse effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on spermatogenesis include reduced sperm function and selective inhibition of de novo DNA methylation. *J Pharmacol Exp Ther*. 322(3):1171-80.

- Oberkofler, H., E. Schraml, F. Krempler et W. Patsch, (2003) Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* 371(1):89-96.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev.* 22(3):289-318.
- Onoda M, Hall PF (1981). Inhibition of testicular microsomal cytochrome P-450 (17 alpha-hydroxylase/C-17, 20-lyase) by estrogens. *Endocrinol.* 109(3):763-7.
- Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. (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(11):6027-32
- Ouvrier A, Cadet R, Vernet P, Laillet B, Chardigny JM, Lobaccaro JM, Drevet JR, Saez F (2009). LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J Lipid Res.* 50(9):1766-75.
- Palmer JR, Hatch EE, Rosenberg CL, Hartge P, Kaufman RH, Titus-Ernstoff L, Noller KL, Herbst AL, Rao RS, Troisi R, et al., (2002) Risk of breast cancer in women exposed to diethylstilbestrol in utero: preliminary results (United States). *Cancer Causes Control* 13(8): 753-8.
- Palmer JR, Wise LA, Robboy SJ, Titus-Ernstoff L, Noller KL, Herbst AL, Troisi R, Hoover RN., (2005) Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Epidemiology.* 16(4):583-6.
- Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohsnitter W, Kaufman R, Herbst AL, Noller KL, Hyer M, Hoover RN. (2006) Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(8): 1509-14.
- Patel MD, Thompson PD. (2006) Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis.* 2006 May;186(1):12-9.
- Patel DC, Albrecht C, Pavitt D, Paul V, Pourreyon C, Newman SP, Godsland IF, Valabhji J, Johnston DG (2011). Type 2 Diabetes Is Associated with Reduced ATP-Binding Cassette Transporter A1 Gene Expression, Protein and Function. *PLoS One.* 6(7):e22142.
- Payne AH, Hales DB (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* 25(6):947-70.
- Payne, A.H. and M.P. Hardy (2007) The Leydig cell in health and disease (ebook). P 33-54. ISBN: 978-1-58829-754-9.
- Pedruzzi E., Guichard C., Ollivier V., Driss F., Fay M., Prunet C., Marie J.C., Pouzet C., Samadi M., Elbim C., et al., (2004) NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* 24(24):10703-10717.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell.* 93(5):693-704.
- Prufer, K. and J. Boudreaux (2007). Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated. *J Cell Biochem* 100(1): 69-85.
- Qian YM, Song WC. (1999). Regulation of estrogen sulfotransferase expression in Leydig cells by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and androgen. *Endocrinol.* 140(3):1048-53.
- Radovick S, Levine JE, Wolfe A. (2012). Estrogenic regulation of the GnRH neuron. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3:52.
- Rastinejad, F., (2001) Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol.* 11(1):33-8.

- Renaud JP, Moras D. (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci.* 57(12):1748-69.
- Renaud, J. P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378(6558): 681-9.
- Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, Hovatta O, Meaney S, Hultenby K, Johansson LC, Svechnikov K, Söder O, Gustafsson JA. (2005). The liver X receptor-{beta} is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinol.* 146(6):2519-30.
- Roeder RG (1996) The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21(9): 327-335.
- Roger C, Lombard S, Mograbi B, Chevallier D, Nebout M, Pointis G, et al., (2005) Human testicular seminoma cells express functional aromatase, estrogen receptor and can be regulated in vitro by estradiol. *J Mol Endocrinol* 35:191—99.
- Rone, M. B., Fan, J. and V. Papadopoulos (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 1791(7): 646-658.
- Roosen-Runge EC. (1961). The rete testis in the albino rat: its structure, development and morphological significance. *Acta Anat (Basel)*.45:1-30.
- Rosenfeld MG, Glass CK. (2001). Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem.* 276(40):36865-8.
- Russell LD, Alger LE, Nequin LG (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinol.* 120(4):1615-32.
- Sablin EP, Krylova IN, Fletterick RJ, and Ingraham HA (2003) Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* 11(6):1575-1585.
- Salian S, Doshi T, Vanage G. (2009) Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*. 9;265(1-2):56-67.
- Sanderson M, Williams MA, Malone KE, Stanford JL, Emanuel I, White E, Daling JR. (1996) Perinatal factors and risk of breast cancer. *Epidemiology* 7(1): 34-7.
- Schäfers BA, Schlutius BG, Haider SG. (2001). Ontogenensis of oxidative reaction of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells, a histochemical study. *Histochem J.* 33(9-10):585-95.
- Schell C, Albrecht M, Mayer C, Schwarzer JU, Frungieri MB, Mayerhofer A (2008). Exploring human testicular peritubular cells: identification of secretory products and regulation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinol.* 149(4):1678-86.
- Schrager S, Potter BE (2004) Diethylstilbestrol exposure. *Am Fam Physician*. 69(10): 2395-400.
- Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. (2000). Role of LXR α s in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14(22):2831-8.
- Schuster GU, Parini P, Wang L, Alberti S, Steffensen KR, Hansson GK, Angelin B, Gustafsson JA. (2002). Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation*. 106(9):1147-53.
- Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*. 75(3):567-78.
- Scott HM, Mason JI, Sharpe RM. (2009) Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. *Endocrine Reviews*, 30(7):883-925.

- Shan LX, Hardy MP. (1992). Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinol.* 131(3):1107-14.
- Shang Q, Pan L, Saumoy M, Chiang JY, Tint GS, Salen G, Xu G. (2006). The stimulatory effect of LXRA is blocked by SHP despite the presence of a LXRA binding site in the rabbit CYP7A1 promoter. *J Lipid Res.* 47(5):997-1004.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptorregulated transcription. *Cell* 103(6):843-852.
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet.* 29;341(8857):1392-5.
- Sharpe RM. (2003). The “oestrogen hypothesis” - where do we stand now? *Int J Androl.* 26(1):2-15.
- Sharpe RM, Irvine DS. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ.* 328(7437):447-51.
- Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O, et al., (1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn.* 204(1):22-9.
- Sholiton LJ, Srivastava L, Taylor BB. (1975). The in vitro and in vivo effects of diethylstilbestrol on testicular synthesis of testosterone. *Steroids* 26:797– 806.
- Shulman AI, Larson C, Mangelsdorf DJ, Ranganathan R. (2004) Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell.* 116(3):417-29.
- Shupe J, Cheng J, Puri P, Kostereva N, Walker WH. (2011). Regulation of Sertoli-germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. *Mol Endocrinol.* 25(2):238-52.
- Sikka SC, Wang R. (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl.* 10(1):134-45.
- Singh SB, Ondeyka JG, Liu W, Chen S, Chen TS, Li X, Bouffard A, Dropinski J, Jones AB, McCormick S, et al., (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(11):2824-8.
- Siril Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S, Buchanan Hales D, Ian Mason J. (2000). Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol Reprod.* 63(1):165-71.
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod.* 16(5):972-8.
- Skinner MK. (2001). Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev.* 12(1):45-77.
- Son YL, Lee YC (2009). Molecular determinants of the interactions between LXR/RXR heterodimers and TRAP220. *Biochem Biophys Res Commun.* 384(3):389-93.
- Son YL, Lee YC. (2010). Molecular determinants of the interactions between SRC-1 and LXR/RXR heterodimers. *FEBS Lett.* 584(18):3862-6.
- Song, C., Kokontis, J. M., Hiipakka, R. A. and S. Liao (1994) Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(23):10809-13.
- Song C, Hiipakka RA, Liao S. (2001). Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids.* 66(6):473-9.

- Spearow JL & Barkley M 2001 Reassessment of models used to test xenobiotics for oestrogenic potency is overdue. *Human Reproduction* 16 1027–1029.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O’Malley BW. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389(6647): 194-198.
- Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, Andersen CY (2006). Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. *Mol Cell Endocrinol.* 256(1-2):9-16.
- Stehlin, C., Wurtz, J. M., Steinmetz, A., Greiner, E., Schule, R., Moras, D. & Renaud, J. P. (2001). X-ray structure of the orphan nuclear receptor ROR β ligand-binding domain in the active conformation. *EMBO J.* 20(21): 5822–5831.
- Stocco, D. M. (2001) Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol.* 15(8):1245-1254.
- Strauss L, Kallio J, Desai N, Pakarinen P, Miettinen T, Gylling H, Albrecht M, Mäkelä S, Mayerhofer A, Poutanen M. (2009). Increased exposure to estrogens disturbs maturation, steroidogenesis, and cholesterol homeostasis via estrogen receptor alpha in adult mouse Leydig cells. *Endocrinol.* 150(6):2865-72.
- Strohsnitter WC, Noller KL, Hoover RN, Robboy SJ, Palmer JR, Titus-Ernstoff L, Kaufman RH, Adam E, Herbst AL, Hatch EE. (2001) Cancer risk in men exposed in utero to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* 93 (7): 545-51.
- Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Söder O. (2010). Endocrine disruptors and Leydig cell function. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010. pii: 684504.
- Svensson, S., T. Ostberg, M. Jacobsson, C. Norstrom, K. Stefansson, D. Hallen, I. C. Johansson, K. Zachrisson, D. Ogg and L. Jendeberg (2003) Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRA and RXR β ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *Embo J.* 22(18):4625-33.
- 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) α agonist and an LXR β antagonist. *FEBS Lett.* 579(24):5299-304.
- Tamura K, Chen YE, Horiuchi M, Chen Q, Daviet L, Yang Z, Lopez-Illasaca M, Mu H, Pratt RE, Dzau VJ.(2000). LXRA functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(15):8513-8.
- Tamura K, Chen YE, Tanaka Y, Sakai M, Tsurumi Y, Koide Y, Kihara M, Pratt RE, Horiuchi M, Umemura S, Dzau VJ (2004). Nuclear receptor LXRA is involved in cAMP-mediated human renin gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 224(1-2):11-20.
- Teboul, M., Enmark, E. L. Q., Wikstrom, A. C., Pelto-Huikko, M. and J. A. Gustafsson (1995). OR-1 a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *PNAS* 92(6): 2096-2100.
- Thompson, C. J., Ross, S. M. and K. W. Gaido (2004). Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinol.* 145(3):1227-1237.
- Titus-Ernstoff L, Hatch EE, Hoover RN, Palmer J, Greenberg ER, Ricker W, Kaufman R, Noller K, Herbst AL, Colton T, Hartge P (2001) Long term cancer risk in women given diethylstilbestrol (DES) during pregnancy. *Br J Cancer* 84(1): 126-33.
- Tocchini-Valentini G, Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Moras D. (2001). Crystal structures of the vitamin D receptor complexed to superagonist 20-epi ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(10):5491-6.
- Tong MH, Christenson LK, Song WC. (2004) Aberrant cholesterol transport and impaired steroidogenesis in Leydig cells lacking estrogen sulfotransferase. *Endocrinol.* 145(5):2487-97. Epub 2004 Jan 28.

- Tong MH, Jiang H, Liu P, Lawson JA, Brass LF, Song WC. (2005) Spontaneous fetal loss caused by placental thrombosis in estrogen sulfotransferase-deficient mice. *Nat Med.* 11(2):153-9. Epub 2005 Jan 30.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jégou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, et al., (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect.* 104 Suppl 4:741-803.
- Troiano, R.N., and S.M., McCarthy (2004) Mullerian duct anomalies: imaging and clinical issues. *Radiology.* 233(1):19-34.
- Tunc O, Tremellen K. (2009). Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 26(9-10):537-44.
- Umesono K and Evans RM (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57(7):1139-1146.
- Unno, A., I. Takada, S. Takezawa, H. Oishi, A. Baba, T. Shimizu, A. Tokita, J. Yanagisawa and S. Kato (2005). TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun* 327(3):933-8.
- Van Beek ME, Meistrich ML, de Rooij DG (1990). Probability of self-renewing divisions of spermatogonial stem cells in colonies, formed after fission neutron irradiation. *Cell Tissue Kinet.* 23(1):1-16.
- Van Der Laan R, Uringa EJ, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Sleddens E, Odijk H, Roest HP, de Boer P, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA, Baarens WM. (2004). Ubiquitin ligase Rad18Sc localizes to the XY body and to other chromosomal regions that are unpaired and transcriptionally silenced during male meiotic prophase. *J Cell Sci.* 117(21):5023-33.
- Varga G, Su C, (2007) Classification and predictive modeling of liver X receptor response elements. *BioDrugs.* 2007;21(2):117-24.
- Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lutjohann D, Moore C, Svetlik D. (2003) Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 60(4):510-5.
- Veurink, M., Koster, M. and T.W. de Jong-van den Berg Lolkje (2005) The history of DES. *Pharm World Sci* 27(3): 139-143.
- Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, Dufour J, Cairra F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JM. (2011). Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets.* (2):219-32.
- 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.
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, Veyssiére G, Benahmed M, Lobaccaro JM. (2007) Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol.* 21(5):1014-27.
- Volle DH, Decourteix M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, Auwerx J, McNeilly AS, Schoonjans K, Benahmed M. (2009) The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest.* 119(12):3752-64.
- Xu W. (2005) Nuclear receptor coactivators: the key to unlock chromatin. *Biochem Cell Biol.* 83(4):418-28.
- Walker, B.E. (1984). Tumors of female offspring of mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *J Natl Cancer Inst* 73(1): 133-40.
- Walker, B.E. and M. I. Haven (1997). Intensity of multigenerational carcinogenesis from diethylstilbestrol in mice. *Carcinogenesis* 18(4):791-3.

- Wang H, Goland S, Burton K, Czer LS, Schwarz ER, Trento A. (2010). An agonist of liver X receptor slows valvular disease in a hypercholesterolemia mouse model. *J Heart Valve Dis.* 19(5):653-64.
- Wang L, Schuster GU, Hultenby K, Zhang Q, Andersson S, Gustafsson JA. (2002). Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(21):13878-83.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, and Perlmann T (2003). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligandindependent nuclear receptors. *Nature* 423 (6939): 555–560.
- Warita K, Mitsuhashi T, Sugawara T, Tabuchi Y, Tanida T, Wang ZY, Matsumoto Y, Yokoyama T, Kitagawa H, Miki T, Takeuchi Y, Hoshi N Direct effects of diethylstilbestrol on the gene expression of the cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc) in testicular Leydig cells. *Life Sci.* 2010 Aug 28;87(9-10):281-5.
- Weiss HA, Potischman NA, Brinton LA, Brogan D, Coates RJ, Gammon MD, Malone KE, Schoenberg JB. (1997) Prenatal and perinatal risk factors for breast cancer in young women. *Epidemiology* 8(2): 181-7.
- Whitesel, J. A. (2003). The case for diethylstilbestrol. *J Urol:* 169(1):290-1.
- Wilcox, A. J., Umbach, D. M., Hornsby, P. P. and A. L. Herbst (1995). Age at menarche among diethylstilbestrol granddaughters. *Am J Obstet Gynecol* 173(3 pt 1): 835-6.
- Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9(9):1033-45.
- Willy, P.J., Mangelsdorf, D.J., (1997). Unique requirements for retinoid dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev.* 11(3): 289–298.
- Wilson JD, Leihy MW, Shaw G, Renfree MB (2002) Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. *Mol Cell Endocrinol.* 30;198(1-2):1-5.
- Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw* (Online). 61:736-59.
- Wong C, Kelce WR, Sar M, Wilson EM. (1995). Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozolin relative to hydroxyflutamide. *J Biol Chem.* 270(34):19998-20003.
- Wong CH, Xia W, Lee NP, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY., (2005) Regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the seminiferous epithelium by focal adhesion-associated proteins in testosterone-suppressed rat testes. *Endocrinol.* 146(3):1192-204.
- Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, Westover EJ, Covey DF, Mangelsdorf DJ, Cohen JC, Hobbs HH., (2006). Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem.* 281(38):27816-26.
- York B, O'Malley BW.(2010). Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *J Biol Chem.* 285(50):38743-50.
- Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, Suda T, Nabeshima Y. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol.* 269(2):447-58.
- Zelcer N, Tontonoz P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest.* 116(3):607-14.
- Zhang C, Yeh S, Chen YT, Wu CC, Chuang KH, Lin HY, Wang RS, Chang YJ, Mendis-Handagama C, Hu L, Lardy H, Chang C. (2006). Oligozoospermia with normal fertility in male mice lacking the androgen receptor in testis peritubular myoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(47):17718-23.

- Zhang J, Wong CH, Xia W, Mruk DD, Lee NP, Lee WM, Cheng CY., (2005) Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics via changes in protein-protein interactions of the N-cadherin-beta-catenin protein complex which are possibly mediated by c-Src and myotubularin-related protein 2. *Endocrinol.* 146(3):1268-84.
- Zhang, Y. and M.L., Dufau (2004) Gene Silencing by Nuclear Orphan Receptors. In Begley, T.P., Means A.R., O'Malley B.W., Riddiford L., Tashjian, Jr.A.H. (Ed.) *Nuclear Receptor Coregulators, Vitamins & Hormones - Volume 68.* (P 28). California: Gerald Litwack.
- Ziegler HG, Haider SG, Passia D, Hilscher W., (1983) Enzymhistochemical and morphometrical studies on delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during the fetal and neonatal development of rat Leydig cells. *Andrologia.* 15(4):392-7.
- Zilliacus, J., J. Carlstedt-Duke, J. A. Gustafsson and A. P. Wright (1994) Evolution of distinct DNA binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(10):4175-9.
- Zirkin, B. R. et H. Chen (2000) Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol Reprod* 63(4):977-981.
- Zitzer H, Wente W, Brenner MB, Sewing S, Buschard K, Gromada J, Efanov AM., (2006) Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinol.* 147(8):3898-905.

ملخص

تمتلك خصية الثبيبات إثنين من الوظائف الرئيسية: إنتاج الحيوانات المنوية وتخلق الهرمونات الذكرية. يرتبط الحفاظ والسيطرة على هذه الوظيفة على عمل الغدد الصماء والجهاز النخفي المسموي، كذلك على الإستقبال الدهني، وخاصة الكوليسترون. تعتبر المستقبلات النووية للأوكسيستيرون (LXRs) من عوامل الاستئناف التي تنتهي إلى فصيلة المستقبلات النووية. تنشط هذه المستقبلات النووية في الجهاز التناسلي الذكري والخصية حيث تتوارد محفزاتها بتراكير فسيولوجية فعالة، وترتبط وظيفتها في تنظيم توازن الكوليسترون الذي يعتبر ضروري لثوليد ستيرويد. تنظم هذه المستقبلات النووية مختلف مراحل تكوين الحيوانات المنوية وذلك بتنظيم مختلف الانزيمات التي تتحكم في تلك المراحل، كما تلعب دور كبير في التوازن بين الكاثار وموت الخلايا الجرثومية المبرمج.

لوحظ في العقود الأخيرة زيادة حالات تشوّه في الأعضاء التناسلية الذكرية (أحبل تحتي، احتقام الخصيدين)، وسرطان الخصية، كذلك إنخفاض كمّي ونوعي في إنتاج الحيوانات المنوية. أرجعت بعض الدراسات هذه التشوّهات إلى تعطيل نمو الخصية أثناء المراحل الجنينية، كما أشارت بعض الأدلة البيانية، التجريبية والسريرية أن هذه الإضطرابات تكون قد نشأت، على الأقل جزئياً، نتيجة لزيادة تركيز المواد المسببة لاختلال الغدد الصماء في البيضة والأغذية. وبالتالي، الأستروجينات الخارجية مثل ثائي إيثيل ستيلبيستيرون (DES) تؤثر في مستقبلات هرمون الأستروجين مما يسبب آثار سلبية على الوظيفة التناسلية الذكرية.

تهدف هذه الدراسة لتقييم تأثير التعرض لـ DES في مرحلة ما بعد الولادة على وظيفة الجهاز التناسلي الذكري عند قرآن المختبر. لتوضيح وفهم دور المستقبلات النووية للأوكسيستيرون (LXRs)، أختربنا دراسة تأثير DES عند قرآن لا تمتلك كل نوعيّاته المستقبلات ($Ixra\beta^{-/-}$). سيمكناً هذا النموذج من معرفة ما إذا كانت الآثار الضارة لـ DES على الخصية تتطلب تدخل $Ixra\beta$ ، كما يمكننا من تحديد الآليات المعنية. أظهرت النتائج أنـ DES يؤثّر سلباً على استئناف معظم الجينات التي تتدخل في عملية ثوليد ستيرويد (StAR, Cyp11A1, Cyp17a1). كما بینت التحاليل النسيجية أنـ DES يبيّد في التوازن بين الكاثار و الموت الخلوي المبرمج للخلايا الجرثومية كـ الماء مقارنة بـ الماء، مبنينا إلى وجود اختلال في نسب الخلايا الجرثومية قيل و بعد الانقسام المنصف. كما بینت النتائج كذلك أنـ DES على النطـ المـ الـ (Ixra $\beta^{-/-}$) يكون أكثر حدة مقارنة بالـ المـ الـ (Ixra $\beta^{+/+}$)، مما يشير إلى آثر وقائي لـ LXRs في الجسم الحي ضد التأثير الضار للثائي إيثيل ستيلبيستيرون.

الكلمات المفتاحية: ثائي إيثيل ستيلبيستيرون، المستقبلات النووية للأوكسيستيرون (LXRs)، ثوليد ستيرويد، الكاثار، الموت الخلوي المبرمج.

Résumé

Le testicule des mammifères possède deux fonctions majeures : la production des spermatozoïdes et la synthèse des androgènes. Le maintien et la régulation de cette fonction sont sous le contrôle des facteurs endocrines et paracrinés, mais sont aussi liés à l'homéostasie des lipides, notamment le cholestérol. Les récepteurs nucléaires des oxystérols (LXRs) sont des facteurs de transcription appartenant à la super-famille des récepteurs nucléaires. Les LXRs sont exprimés dans le tractus génital mâle et les testicules et leurs ligands y sont présents à des concentrations physiologiquement actives. Dans ces organes, ces récepteurs régulent l'homéostasie du cholestérol, un précurseur indispensable pour la synthèse des stéroïdes testiculaire. Ils contrôlent aussi les différentes étapes de la stéroïdogenèse en régulant les enzymes de la stéroïdogenèse. Enfin, leur rôle dans la balance prolifération/apoptose des cellules germinales est éminent.

On assiste depuis ces dernières décennies à une augmentation des anomalies de la différenciation de l'appareil génital mâle (hypospadias, cryptorchidie) et du cancer du testicule, ainsi qu'à une diminution quantitative et qualitative de la production de spermatozoïdes. Il a été proposé que ces anomalies aient pour origine une perturbation du développement du testicule pendant la vie fœtale. Des arguments écologiques, expérimentaux et cliniques laissent supposer que ces troubles résultent, au moins en partie, de l'augmentation du nombre et de la concentration des perturbateurs endocriniens dans l'environnement et dans la nourriture. Ainsi, les xénostrogènes comme le diéthylstilbestrol (DES) agissent sur le récepteur des œstrogènes en provoquant des effets néfastes sur la fonction de reproduction masculine.

Le but de ce travail a été d'évaluer l'effet postnatal du DES sur la fonction de reproduction chez la souris mâle. Pour pouvoir comprendre l'intervention des récepteurs LXRs, nous avons choisi d'étudier cet effet chez les souris KO pour les deux isoformes de ces récepteurs nucléaires ($Ixra\beta^{-/-}$). Ce modèle doit nous permettre d'identifier si les effets délétères du DES sur le testicule passent par $Ixra\beta$ et d'identifier plus précisément les mécanismes mis en jeu. Nous avons pu montrer que le DES provoque la perturbation de la stéroïdogenèse en diminuant les transcrits de la plupart des gènes stéroïdogènes (StAR, Cyp11A1, Cyp17a1). Les analyses histologiques montrent que le DES altère la balance prolifération/apoptose quel que soit le génotype, indiquant la perturbation des spermatogonies pré- et post-méiotiques. Nous avons pu montrer également que l'effet du DES sur le phénotype $Ixra\beta^{-/-}$ est plus accentué, suggérant un effet protecteur des LXRs *in vivo* contre l'effet délétère du diéthylstilbestrol.

Mots clés : Diéthylstilbestrol, LXR, Stéroïdogenèse, Prolifération, Apoptose.

Abstract

The mammalian testis has two major functions, sperm production, and synthesis of androgens. The maintenance and regulation of those two functions are under the control of endocrine and paracrine factors, but are also related to lipid homeostasis, including cholesterol. The nuclear oxysterol receptors (LXRs) are transcription factors belonging to the superfamily of nuclear receptors. The LXRs are expressed in the male genital tract and testis, and their ligands are active at physiological concentrations. In these organs, these receptors regulate cholesterol homeostasis, a precursor essential for the synthesis of testicular steroids. They also control the different steps of steroidogenesis by regulating the enzymes of steroidogenesis. In the end, their role in the balance proliferation / apoptosis of germ cells is prominent.

In recent decades, there has been an increase in abnormal differentiation of the male genital tract (hypospadias, cryptorchidism) and testicular cancer, as well as a decrease in quantity and quality of sperm production. It was proposed that these abnormalities originate from a disturbance of testicular development during fetal life. Environmental, experimental and clinical arguments suggest that these disorders result, at least in part, to the increased number and concentration of endocrine disruptors in the environment and in food. Thus, xenoestrogens such as diethylstilbestrol (DES) act on the estrogen receptors, causing adverse effects on male reproductive function.

The aim of this study was to assess the effect of DES on postnatal reproductive function in male mice. To understand the involvement of nuclear oxysterol receptors, we chose to study this effect in LXR $\alpha\beta$ -null mice ($Ixra\beta^{-/-}$). This model should allow us to determine whether the deleterious effects of DES on testis go through $Ixra\beta$ and to identify more precisely the mechanisms involved. We have shown that DES causes disruption of steroidogenesis by decreasing transcripts of most steroidogenic genes (StAR, CYP11A1 and Cyp17a1). The histological analysis showed that DES alters the proliferation / apoptosis ratio whatever the genotype, indicating the disruption of pre-and post-meiotic spermatogonia. We have also shown that the effect of DES on the phenotype $Ixra\beta^{-/-}$ is more pronounced, suggesting a protective effect of LXRs *in vivo* against the deleterious effect of diethylstilbestrol.

Key words: Diethylstilbestrol, LXR, Steroidogenesis, Proliferation, Apoptosis.