



# Etude du rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR alpha et LXR bêta dans la physiologie de la reproduction chez la souris femelle

Kevin Mouzat

► **To cite this version:**

Kevin Mouzat. Etude du rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR alpha et LXR bêta dans la physiologie de la reproduction chez la souris femelle. Reproduction sexuée. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2007. Français. <NNT : 2007CLF21802>. <tel-00926323>

**HAL Id: tel-00926323**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00926323>**

Submitted on 9 Jan 2014

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

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

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

N° D.U. : 1802

UNIVERSITE D'Auvergne

ANNEE 2007

ECOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
N° d'ordre : 472

**Thèse**

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

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

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

Soutenue le 11 décembre 2007

**KEVIN MOUZAT**

**Etude du rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR alpha et  
LXR bêta dans la physiologie de la reproduction chez la souris femelle**

Président du jury : Pr. Vincent SAPIN, INSERM U384 et CHU CLERMONT-FD

Rapporteurs : Pr. Serge LUMBROSO, Faculté de Médecine MONTPELLIER-NÎMES,  
Université de Montpellier I

Dr. Stéphane ROCCHI, INSERM U597 NICE

Invité : Dr. André MAZUR, INRA UMR 1019 CLERMONT-FD-THEIX

Directeur de thèse : Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO, UMR CNRS-UBP 6547, CLERMONT-FD

Laboratoire de Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire

UMR CNRS-UBP 6547



A Estelle



## ***Remerciements***

Je tiens à remercier :

Le Professeur Vincent Sapin d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Le Professeur Serge Lumbroso, le Docteur Stéphane Rocchi et le Docteur André Mazur d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Le Professeur Georges Veyssière pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour tous ses précieux conseils, son enthousiasme et toutes nos discussions scientifiques, ainsi que pour sa relecture de ce manuscrit.

Le Professeur Jean-Marc A. Lobaccaro de m'avoir choisi pour la réalisation de cette thèse. Merci infiniment pour sa présence et pour avoir su répondre à tous mes besoins de chaque instant tout en faisant des efforts pour m'apporter un maximum d'autonomie, dans une ambiance de joie permanente. Je tiens à lui témoigner toute mon admiration devant l'étendue sa culture, tant scientifique que générale. Merci également pour tous les moments que nous avons passés ensemble en dehors du laboratoire et pour avoir su me soutenir dans les montées des cols reliant Roanne à Thiers. Même s'il est évident que nous garderons des contacts amicaux personnels, mon plus vif souhait est de pouvoir de nouveau interagir professionnellement avec toi.

Les Docteurs Silvère Baron et Françoise Caira pour leur relecture attentive de ce manuscrit, leur aide technique et l'intérêt qu'ils ont su apporter à ce travail.

Le Docteur David Volle pour m'avoir guidé lors de mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Le Docteur Magali Prod'Homme pour son aide précieuse dans le développement de la PCR en temps réel. Je te témoigne tous mes vœux de réussite dans ta nouvelle carrière.

Fanny Volat et Samuel Guyot pour leur aide dans l'étude de l'ovulation et de la cytologie vaginale des souris.

Tous les étudiants et les stagiaires du laboratoire, passés et actuels : Jérôme Allemand, Georges Alvès, Antonine Blondet, Céline Chambon, Cédric Chaveroux, Delphine Denoyer, Teresa Esposito, Ayhan Kocer, Sarah Lambert-Langlais, Laurent Léotoing, Sabrina Maquaire, Claire Martin, Aurélia Ouvrier, Aurélien Pommier, Bruno Ragazzon et Virginie Rimbart pour tous les moments



agréables que j'ai passés en votre compagnie. Je vous souhaite à tous une grande réussite personnelle et professionnelle.

Jean-Paul Saru pour m'avoir initié au *western-blot* et pour sa bonne humeur permanente.

Christine Puchol et Sandrine Plantade pour leur gestion de l'animalerie et pour avoir toujours su répondre à nos besoins.

Sophie Monceau, le Docteur Michel Dalle et le Docteur Denis Gallot (Service de Gynécologie Obstétrique, CHU Clermont-Ferrand) pour leur aide dans l'étude des contractions des utérus.

Tous les autres membres du laboratoire.

Ce travail de thèse a été le fruit de collaborations multiples. C'est pourquoi je tiens à remercier :

Le Professeur Pierre Déchelotte pour m'avoir autorisé l'accès à son service et ses conseils ainsi que tous les membres du service d'Anatomie Pathologique du CHU de Clermont-Ferrand pour leur aide technique.

Les Docteurs Karine Gauthier et Jean-Marc Vanacker (Institut de Génomique Fonctionnelle, Université Claude Bernard, Lyon) pour leur aide dans la qPCR et leurs discussions scientifiques.

Le Docteur Benoît Sion (Biologie de la Reproduction, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand) pour m'avoir initié aux techniques des dosages intra-tissulaires des lipides.

Le Professeur René-Jean Bègue et les Docteurs Geoffroy Marceau et Michèle Colombier (Service de Biochimie – Hormonologie, CHU Clermont-Ferrand) pour les dosages des stéroïdes ovariens.

Le Professeur Gérard Prensier (Laboratoire de Biologie des Protistes, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand) pour m'avoir initié au vaste monde de la microscopie électronique.

Le Professeur Mohamed Benahmed (ancienne unité INSERM 407, Lyon et unité INSERM 895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Nice) pour m'avoir autorisé l'accès à son laboratoire ainsi que pour ses conseils, Stéphanie Cunha et Bénazir Siddeek pour m'avoir appris les techniques de TUNEL et d'élutriation des cellules testiculaires.

Le Docteur Maâmar Souidi (IRSN, Fontenay aux Roses) pour son expertise dans les oxystérols.

Martine Tridde-Mazloum (déléguée générale de la Fondation BNP-Paribas) pour son soutien indéfectible du laboratoire depuis 2000, tant du point de vue financier que moral et culturel.



Je tiens à remercier chaleureusement Estelle pour avoir accepté de partager ma vie pendant toute la durée de ma thèse, pour m'avoir soutenu au quotidien et pour m'avoir accompagné dans tous les moments de ma vie personnelle et professionnelle.

Je souhaite remercier également mes parents pour m'avoir soutenu à tous les niveaux pendant ces années. Merci pour votre disponibilité de chaque instant. Merci à ma mère en particulier pour son sourire constant et radieux qui la caractérise et à mon père pour toutes nos discussions. Je te souhaite la brillante réussite que tu mérites dans tes nouvelles carrières d'auteur et de metteur en scène.

J'adresse une pensée particulière à mon frère Renaud et ma sœur Sarah. Si nous ne nous sommes pas vu autant que vous l'auriez souhaité, je vous exprime toute mon affection et vous adresse tous mes souhaits de bonheur.

Merci à mes Grands-parents pour leur présence et pour avoir suivi avec intérêt mon parcours universitaire.

J'adresse une pensée amicale à Alexandre et lui apporte tous mes vœux de réussite dans sa nouvelle aventure professionnelle.

Merci également à Audrey, Claudine, Julie, Benoît, Sébastien et Yvain pour tous les moments agréables que nous avons passés ensemble.

Je tiens enfin à saluer tous les archers de l'ASCAIA de Lempdes.



***Une partie des travaux a été présentée dans les congrès suivants :***

Communications orales à des congrès et conférences avec comité de sélection :

23ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE, Montpellier, septembre 2006). Le récepteur nucléaire des oxystérois LXR bêta régule l'homéostasie du cholestérol et la fonction contractile de l'utérus. Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, David H. Volle, Benoît Sion, Jean-Marc Vanacker, Gérard Prensier, Pierre Déchelotte, Georges Veysière, Jean-Marc A. Lobaccaro. Résumé publié dans Annales d'Endocrinologie, 2006, 67 (5):390.

Colloque de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM, Clermont-Ferrand, septembre 2006). Le récepteur nucléaire des oxystérois LXR bêta régule l'homéostasie du cholestérol dans l'utérus et la physiologie de la parturition. Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, David H. Volle, Benoît Sion, Gérard Prensier, Pierre Déchelotte, Georges Veysière, Jean-Marc Vanacker, Jean-Marc A. Lobaccaro.

European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) / Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) 7th Joint Meeting Paediatric Endocrinology (Congrès international, Lyon, septembre 2005). Oxysterol receptor LXRs are involved in female reproduction. Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, David H. Volle, Pierre Dechelotte, Benoît Sion, David J Mangelsdorf, Georges Veysiere, Jean-Marc A. Lobaccaro. Résumé publié dans Hormone Research, 2005, 64 (suppl 1):34-35.

Autres communications :

XXXIIIème Forum des Jeunes Chercheurs (Clermont-Ferrand, septembre 2006, conférence de Jean-Marc A. Lobaccaro). Régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires : exemple de la régulation du métabolisme lipidique. Kevin Mouzat, Silvère Baron, Françoise Caira, Cédric Chaveroux, Joëlle Henry-Berger, Jean-Paul Saru, Jean-Marc A. Lobaccaro.

Premières Journées Scientifiques du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (Clermont-Ferrand, mars 2006, Poster). Rôle des récepteurs LXR dans la physiologie prostatique. Teresa Esposito, Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, Pierre Déchelotte, Georges Veysière, Silvère Baron, Jean-Marc A. Lobaccaro. Résumé publié dans le Bulletin du Cancer, 2006, 93 (numéro spécial):101.



VIII Congresso Associazione Italiana di Biologia e Genetica Generale e Molecolare (AIBG, Sirolo, Italie, septembre 2005, communication orale de Teresa Esposito) Role of nuclear receptors for oxysterol LXR in prostate. Teresa Esposito, Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, Pierre Déchelotte, David J. Mangelsdorf, Jean-Marc A. Lobaccaro.

XXIème congrès de la société d'andrologie de langue française (SALF, Clermont-Ferrand, décembre 2004, conférence de Jean-Marc A. Lobaccaro). Cholestérol : Fonctions et intégrités testiculaires et épидидymaires. Jean-Marc A. Lobaccaro, Jean-Marie Frenoux, Patrick Vernet, Aurore Britan, Fabrice Saez, Ayhan Kocer, Joëlle Henry-Berger, Françoise Caira, Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, David J. Mangelsdorf, Georges Veysière, Joël R. Drevet.



***Et a fait l'objet des publications suivantes :***

Articles originaux :

Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, David H. Volle, Benoît Sion, Pierre Dechelotte, Karine Gauthier, Jean-Marc Vanacker, Jean-Marc A. Lobaccaro. Oxysterol Nuclear Receptor LXRbeta Regulates Cholesterol Homeostasis and Contractile Function in Mouse Uterus. J Biol Chem. 2007 Feb 16;282(7):4693-4701.

David H. Volle, Kevin Mouzat, Rajesha Duggavathi, Bénazir Siddeek, Pierre Déchelotte, Benoît Sion, Georges Veysière, Mohamed Benahmed, and Jean-Marc A. Lobaccaro. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. Mol endocrinol. 2007 May;21(5):1014-27.

Joëlle Henry-Berger, Kevin Mouzat, Silvère Baron, Carmelo Bernabeu, Geoffroy Marceau, Jean-Paul Saru, Vincent Sapin, Jean-Marc Lobaccaro and Françoise Caira. Endoglin (CD105) Expression Is Regulated by the Liver X Receptor Alpha (NR1H3) in Human Trophoblast Cell Line JAR. Biol Reprod. 2007 Feb 14; [epub ahead of print].

Revue générale et chapitres d'ouvrages :

Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. Ann Biol Clin (Paris). 2006 Nov-Dec;64(6):535-48.

Ayhan Kocer, Fabrice Saez, Kevin Mouzat, Patrick Vernet, Jean-Marc A. Lobaccaro, Joël R. Drevet. Criblage de nouveaux gènes cibles des récepteurs des oxystérols LXRs impliqués dans le maintien de l'épithélium épидидymaire et la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme. Andrologie, 2006, 16 (1):16-23.

David Volle, Jean-Marie Frenoux, Kevin Mouzat, Patrick Vernet, Magali Prod'Homme, Aurore Britan, Fabrice Saez, Joëlle Henry-Berger, Ayhan Kocer, Françoise Caira, Georges Veysière, Joël R. Drevet, Jean-Marc Lobaccaro. Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Andrologie, 2005, 15 (2):151-159.



## *Résumé*



## Résumé

Le cholestérol est un élément nutritif indispensable, ayant un impact majeur sur l'expression génique. Un excès de cholestérol étant cytotoxique, ses taux intracellulaires doivent être régulés de façon précise. Les oxystérols sont des dérivés hydroxylés du cholestérol, exerçant un rôle actif dans la signalisation intracellulaire. Leur concentration dans la cellule est étroitement corrélée à celle du cholestérol. Au sein de l'organisme, parmi les régulateurs du métabolisme lipidique, les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR (*Liver X Receptor*)  $\alpha$  et LXR  $\beta$  exercent un rôle clé dans le contrôle du métabolisme du cholestérol. Ainsi ces facteurs de transcription peuvent-ils être qualifiés de « senseurs » du cholestérol intracellulaire. Au-delà de leur rôle hypocholestérolémiant, ils interviennent dans la régulation de nombreuses autres fonctions physiologiques, notamment le métabolisme des acides gras et du glucose, les processus immunitaires et la production des hormones stéroïdes. Ils sont également indispensables dans le maintien de l'intégrité et de la fonction testiculaires.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle des LXRs dans la fonction de reproduction chez la femelle par l'analyse *in vivo* du phénotype ovarien et utérin des souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*. Au niveau ovarien, l'induction de l'ovulation par une stimulation hormonale au moyen de gonadotrophines provoque un phénotype d'hyperstimulation ovarienne (OHSS). Les femelles présentent en effet la majorité des symptômes de la pathologie : augmentation de la masse ovarienne, hémorragies lutéales, perturbation de la perméabilité vasculaire ovarienne et sensibilité aux gonadotrophines accrue. En parallèle, l'activation des LXRs par un agoniste synthétique (T0901317) stimule la production d'œstradiol.

Au niveau utérin, nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence d'un mécanisme de régulation du métabolisme lipidique spécifique de LXR $\beta$ . Les souris déficientes pour cette isoforme présentent en effet une accumulation anormale d'esters de cholestérol à l'intérieur des myocytes, causée par une absence de régulation des gènes *abca1* et *abcg1* impliqués dans l'efflux du cholestérol intracellulaire, ainsi qu'une diminution basale de l'expression d'*abcg1*. Ce phénotype s'accompagne d'un défaut de contractilité des utérus en réponse à une stimulation hormonale.

Au total, nos travaux soulignent l'importance des LXRs dans le maintien de la fonction de reproduction chez la souris femelle et mettent en lumière l'utilisation des souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* dans l'analyse des pathologies de la reproduction chez la femme. A long terme, ces animaux permettront de comprendre comment des déséquilibres alimentaires entraînent des troubles de la fertilité.



# *Abstract*



**Abstract**

Cholesterol is an essential nutrient that has a major impact on gene expression. As an excess of cholesterol is toxic for the cells, its cellular concentration must be tightly regulated. Oxysterols are hydroxylated derivatives of cholesterol that possess an active role in cell signaling. Their cellular concentration is linked to cholesterol content. Among the regulators of lipid metabolism, the nuclear receptors for oxysterols LXR (Liver X Receptor)  $\alpha$  and  $\beta$  play a key role in the control of cholesterol metabolism. Hence, these transcription factors can be considered as intracellular cholesterol sensors. Beyond their hypocholesterolemic function, they regulate numerous physiologic functions such as fatty acids and glucose metabolisms, immunity process and steroid hormone production. They are also necessary to maintain both testicular integrity and function.

The aim of this work was to study LXR roles in the female reproductive physiology *in vivo* by analysis of ovarian and uterine phenotypes of *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice. In the ovary, ovulation induction by hormonal stimulation with gonadotropins induced an ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) phenotype. Indeed, the females present many of the syndrome characteristics: ovarian enlargement, luteal hemorrhages, ovarian vascular permeability defect and increased gonadotropins sensitivity. In parallel, LXR activation by a synthetic agonist (T0901317) stimulates estradiol production.

In the uterus, we pointed for the first time the existence of a mechanism specific of LXR $\beta$  that regulates lipid metabolism. Mice deficient for this isoform present indeed abnormal cholesteryl ester accumulation within the myocytes, due to absence of regulation of *abca1* and *abcg1* genes implicated in intracellular cholesterol efflux, as well as a decrease in *abcg1* expression. This phenotype is paralleled with an uterine contractility defect in response to hormonal stimulation.

Altogether, these data point the importance of the LXRs in maintaining reproductive function in female mice enlighten the use of *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice in the analysis of reproductive disease in women. Further study of these nuclear receptors will help in the future to understand molecular mechanisms involved in fertility defects due to alimentary disequilibrium.



***Abréviations***

17 $\beta$ -hsd : <i>17<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase</i>	EcR : <i>Ecdysone Receptor</i>
3 $\beta$ HSD : <i>3<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase</i>	ER : <i>Estrogen Receptor</i>
ABC : <i>ATP Binding Cassette</i>	ER : <i>Everted Repeat</i>
ACC : <i>Acetyl CoA Carboxylase</i>	ETO : <i>Eight Twenty One</i>
AF : <i>Activating Function</i>	ETS : <i>E Twenty Six</i>
akr1b7 : <i>Aldo-Keto-Reductase 1b7</i>	F3MéthylAA : <i>acide 3-chloro-4-(3-(7-propyl-3-trifluorométhyl-6-(4,5)-isoxazolyl)propylthio)-phenyl acétique</i>
AMH : <i>Anti-Müllerian Hormone</i>	FAS : <i>Fatty Acid Synthase</i>
ANGPTL3 : <i>Angiopoietin-like 3</i>	FF-MAS : <i>Follicular Fluid-Meiosis Activating Sterol</i>
APD : <i>Acetyl-Podocarpic Dimer</i>	FIV : <i>Fécondation in vitro</i>
APO : <i>Apolipoprotéine</i>	FRET : <i>Fluorescence Resonance Energy Transfert</i>
APP : <i>Amyloid Precursor Protein</i>	FSH : <i>Folliculo-Stimulating Hormone</i>
AR : <i>Androgen Receptor</i>	FXR : <i>Farnesoid X Receptor</i>
bHLH : <i>basic Helix-Loop-Helix</i>	G6P : <i>Glucose-6-Phosphate</i>
BMP : <i>Bone Morphogenic Protein</i>	GGPP : <i>Géranylgéranyl Phyrophosphate</i>
BRG-1 : <i>Brahma-Related Gene 1</i>	GR : <i>Glucocorticoid Receptor</i>
BRM : <i>Brahma</i>	GRIP-1 : <i>Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1</i>
C/EBP : <i>CCAAT-box/Enhancer Binding Protein</i>	HAT : <i>Histone Acétyl-Transférase</i>
CDCA : <i>Chenodeoxycholic Acid</i>	hCG : <i>human Chorionic Gonadotropin</i>
CETP : <i>Cholesteryl Ester Transfert Protein</i>	HDAC : <i>Histone déacétylase</i>
CFTR : <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>	HDL : <i>High Density Lipoprotein</i>
ChIP : <i>Chromatin Immunoprecipitation</i>	HPLC : <i>High-Pressure Liquid Chromatography</i>
ChREBP : <i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>	HSP : <i>Heat Shock Protein</i>
CNRE : <i>an overlapping cAMP response element and a negative response element</i>	I-BABP : <i>Ileal Bile Acid-Binding Protein</i>
Coup-TF : <i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor</i>	ID : <i>Interaction Domain</i>
COX-2 : <i>Cyclooxygenase 2</i>	IDL : <i>Intermediary Density Lipoprotein</i>
CPB : <i>CREB binding protein</i>	IL : <i>Interleukin</i>
CREB : <i>c-AMP Response Element Binding Protein</i>	IMC : <i>Indice de Masse Corporelle</i>
CTE : <i>Carboxy-Terminal Extension</i>	iNOS : <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
DBD : <i>DNA Binding Domain</i>	ins2 : <i>insulin gene 2</i>
DHEA : <i>Déhydroépiandrostérone</i>	INSIG : <i>Insulin-Induced Gene</i>
DMHCA : <i>N,N-Dimethyl-3<math>\beta</math>-hydroxycholenamide</i>	IR : <i>Indirect Repeat</i>
DR : <i>Direct Repeat</i>	IUPAC : <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
E2 : <i>Œstradiol</i>	JAM : <i>Junctional Adhesion Molecule</i>
ELK1 : <i>Ets-Like transcription factor</i>	Ki : <i>Constante d'inhibition</i>



LBD : <i>Ligand Binding Domain</i>	RD : <i>Repression Domain</i>
LDL : <i>Low Density Lipoprotein</i>	RXR : <i>Retinoid X Receptor</i>
LDLR : <i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>	S1P : <i>Site 1 Protease</i>
LH : <i>Luteinizing Hormone</i>	S2P : <i>Site 2 Protease</i>
LIF : <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>	SAR : <i>Structure Activity Relationship</i>
LPL : <i>Lipoprotein Lipase</i>	SCAP : <i>Srebp Cleavage Activating Protein</i>
LPS : <i>Lipopolysaccharide</i>	SCD : <i>Stearoyl CoA Desaturase</i>
LRH-1 : <i>Liver Receptor Homolog-1</i>	SERM : <i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
LXR : <i>Liver X Receptor</i>	SHP : <i>Small Heterodimer Partner</i>
LXRE : <i>LXR Responsive Element</i>	SMRT : <i>Silencing Mediator for RAR and TR</i>
MAS : <i>Meiosis Activating Sterol</i>	SPA : <i>Scintillation Proximity Assay</i>
MMP-9 : <i>Matrix Metalloproteinase-9</i>	SP-A : <i>Surfactant Protein-A</i>
N-CoR : <i>Nuclear Receptor Co-Repressor</i>	SRC-1 : <i>Steroid Receptor Coactivator – 1</i>
NLS : <i>Nuclear Localization Signal</i>	SRE : <i>Serum Response Element</i>
NR : <i>Nuclear Receptor</i>	SRE : <i>Sterol Response Element</i>
OHSS : <i>Ovarian Hyperstimulation Syndrome</i>	SREBP : <i>Sterol Response Element Binding Protein</i>
OST : <i>Organic Solute Transporter</i>	SRF : <i>Serum Response Factor</i>
P4 : <i>Progestérone</i>	STAR : <i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
P450c17 : <i>17<math>\alpha</math>-hydroxylase</i>	SUMO : <i>Small Ubiquitin-Related Modified</i>
P450scc : <i>Cytochrome P450 side chain cleavage</i>	SWI/SNF : <i>mating type switching/sucrose nonfermenting</i>
PBR : <i>Peripheral Benzodiazepine Receptor</i>	TGF $\beta$ : <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
PCOS : <i>Polycystic Ovary Syndrome</i>	TLR : <i>Toll-Like Receptor</i>
PDX-1 : <i>Pancreatic Duodenal Homeobox 1</i>	TNF- $\alpha$ : <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
PEPCK : <i>Phospho-enolpyruvate-carboxykinase</i>	TOFA : <i>acide 5-tétradécycloxy-2-furancarboxylique</i>
PGC1 : <i>Peroxisome Proliferator-Activated receptor-gamma coactivator 1</i>	TR : <i>Thyroid hormone Receptor</i>
PGE2 : <i>Prostaglandine E2</i>	TRAP/DRIP : <i>Tyroid Receptor-Associated Protein / Vitamin D Receptor Interacting Protein</i>
PGF2 $\alpha$ : <i>Prostaglandine F2 alpha</i>	TRH : <i>Thyroid-Releasing Hormone</i>
PIC : <i>Pre-initiation Complex</i>	TRRAP : <i>Transformation/Transcription Domain Associated Protein</i>
PLA2 : <i>Phospholipase A2</i>	UTR : <i>Untranslated Region</i>
PLTP : <i>Phospholipids Transfert Protein</i>	VDR : <i>Vitamin D Receptor</i>
PMA : <i>Procréation Médicalement Assistée</i>	VEGF : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PPAR : <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>	VLDL : <i>Very Low Density Lipoprotein</i>
PPRE : <i>PPAR Response Element</i>	WT : <i>Wild-Type</i>
PR : <i>Progesterone Receptor</i>	YFP : <i>Yellow Fluorescent Protein</i>
PUFA : <i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>	ZO : <i>Zona Occludens</i>
PXR : <i>Pregnane X Receptor</i>	
Rap250 : <i>Nuclear Receptor-Activating Protein</i>	
RAR : <i>Retinoic Acid Receptor</i>	
RARE : <i>Retinoic Acid Response Element</i>	



Sommaire .....	1
Table des illustrations .....	4
Introduction bibliographique .....	5
I. Les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR $\alpha$ ( <i>Liver X Receptor</i> ) .....	6
A. Généralités sur les récepteurs nucléaires .....	6
B. Structure et mode d'action des LXR $\alpha$ .....	7
1. La structure biochimique .....	7
a) Le domaine N-terminal (domaine A/B) .....	8
b) Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C) .....	8
(1) La boîte P (P box, boîte proximale) .....	8
(2) La boîte D (D box ; boîte distale ou de dimérisation) .....	9
(3) L'extension carboxy-terminale (CTE) .....	9
(4) Le signal de localisation nucléaire (NLS) .....	9
c) Le domaine charnière (hinge ; domaine D) .....	10
d) Le domaine C-terminal : le domaine de liaison du ligand (LBD) .....	10
(1) La liaison du ligand .....	10
(2) La dimérisation .....	11
(3) Le contrôle du mode d'action des récepteurs des hormones stéroïdes .....	11
2. Régulation de l'expression des gènes codant LXR $\alpha$ et LXR $\beta$ .....	11
a) Structure des gènes <i>lxr<math>\alpha</math></i> et <i>lxr<math>\beta</math></i> .....	11
b) Régulation du gène <i>lxr<math>\alpha</math></i> .....	13
c) Régulation du gène <i>lxr<math>\beta</math></i> .....	17
3. Mode d'action des LXR $\alpha$ .....	17
a) Les éléments de réponse des LXR $\alpha$ .....	17
(1) Les éléments de réponse des NRs .....	17
(2) Les éléments de réponse aux LXR $\alpha$ .....	18
b) En l'absence de ligand : les co-répresseurs .....	21
c) En présence de ligand .....	21
(1) Les co-activateurs .....	22
(a) Les facteurs remodelant la chromatine .....	22
(b) Les facteurs modifiant les histones .....	23
(i) Les Histone acétyl-transférases (HAT) .....	23
(ii) Les facteurs affectant la méthylation des histones .....	25
(c) Les facteurs qui s'associent aux facteurs de transcription généraux .....	25
(2) L'activation transcriptionnelle des gènes cibles .....	26
C. Régulation de l'activité transcriptionnelle des LXR $\alpha$ .....	27
1. Les ligands agonistes naturels .....	27
a) Les dérivés du cholestérol .....	27
(1) Les oxystérols .....	27
(2) Les autres stérols .....	29
(a) Dérivés du cholestérol .....	29
(b) Dérivés de la voie des acides biliaires .....	30
(c) D'origines microbiennes et végétales .....	30
b) Les ligands naturels non oxystérols .....	32
2. Les ligands agonistes synthétiques .....	33
a) Les oxystérols synthétiques .....	33
b) Les ligands synthétiques non oxystérols .....	35
3. Les ligands inhibiteurs et antagonistes .....	38
a) Les antagonistes naturels .....	38
b) Les antagonistes synthétiques .....	40
4. Les LXR $\alpha$ : vers le développement de SLIMs ( <i>Selective Liver x receptor Modulators</i> ) ? .....	41
5. Régulations de l'activité indépendantes du ligand .....	43



a)	Les phosphorylations.....	43
b)	La SUMOylation.....	44
c)	La déacétylation.....	45
d)	Les PPARs.....	46
e)	Les récepteur Toll-like (TLRs).....	47
f)	TR.....	47
g)	Coup-TFs.....	48
h)	LRH-1.....	48
i)	SHP.....	48
D.	Fonctions physiologiques régulées par les LXRs.....	49
1.	Le métabolisme du cholestérol.....	49
a)	La synthèse des acides biliaires.....	49
b)	La synthèse de novo.....	50
c)	Le transport inverse.....	50
2.	Le métabolisme des acides gras.....	52
a)	Les cibles directes.....	52
b)	SREBP-1c.....	53
3.	Le métabolisme du glucose.....	54
4.	L'immunité et la vascularisation.....	55
5.	La maladie d'Alzheimer.....	57
6.	Les organes stéroïdogènes et la stéroïdogénèse.....	58
a)	La détoxification des produits secondaires de la stéroïdogénèse.....	58
b)	La surrénale.....	59
c)	Le testicule.....	59
d)	Le placenta.....	60
e)	L'ovaire.....	60
II.	La fonction de reproduction chez la femelle.....	61
A.	L'ovaire.....	61
1.	Structure de l'ovaire.....	61
2.	Le fonctionnement de l'ovaire.....	62
a)	Le cycle ovarien.....	62
(1)	L'ovaire exocrine.....	62
(a)	La maturation des follicules.....	63
(i)	La folliculogénèse basale.....	63
(ii)	La folliculogénèse terminale.....	64
(2)	L'ovaire endocrine.....	67
(a)	Le cycle œstrien.....	67
(b)	Les hormones ovariennes.....	68
(i)	Les hormones stéroïdiennes.....	68
(ii)	Les hormones peptidiques.....	69
(c)	Contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	70
(d)	Rôle des stéroïdes ovariens sur les organes périphériques.....	71
3.	La gestation.....	72
B.	L'utérus.....	72
1.	Données anatomiques.....	72
2.	La parturition.....	73
a)	Le signal déclencheur de la parturition.....	73
b)	La physiologie de la parturition.....	74
III.	Conclusions et projet de recherche.....	75
	Résultats.....	77



Chapitre I : Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXRs dans la physiologie ovarienne .....	78
Présentation du contexte scientifique .....	79
Article 1 : Absence of the nuclear receptors for oxysterols LXRs induces ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in mice .....	81
Conclusions .....	90
Chapitre II : Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXRs dans la fonction de l'utérus	91
Présentation du contexte scientifique .....	92
Article 2 : Oxysterol Nuclear Receptor Regulates Cholesterol Homeostasis and contractile function in mouse uterus.....	94
Conclusion.....	104
Discussion et perspectives .....	105
I. Au niveau ovarien.....	106
A. Les LXRs régulent la stéroïdogenèse ovarienne .....	106
B. L'intégrité vasculaire des ovaires est-elle à l'origine de l'OHSS ?.....	107
C. Existe-t-il un lien entre les voies de signalisation par la FSH et les oxystérols ?.....	109
D. Le phénotype ovarien est-il un phénotype primaire ? .....	109
E. Les LXRs à l'origine de la pathologie humaine ? .....	111
II. Au niveau utérin.....	111
A. LXR $\beta$ est essentiel pour les contractions musculaires utérines.....	111
B. Pourquoi LXR $\alpha$ ne peut-il pas compenser l'absence de LXR $\beta$ ? .....	113
1. Existe-il des LXRE spécifiques de LXR $\beta$ ? .....	113
2. Certains ligands sont spécifiques des isoformes des LXRs.....	114
3. A la recherche de nouveaux co-facteurs.....	115
C. La signalisation par LXR $\beta$ est-elle perturbée chez les femmes enceintes en surpoids ?.....	116
Annexes .....	117
Articles originaux .....	118
Revue générale et chapitres d'ouvrages.....	144
Références bibliographiques.....	184



**Table des illustrations**

Figure 1 : Classification fonctionnelle des récepteurs nucléaires.....	6
Figure 2 : Classification phylogénétique des récepteurs nucléaires.....	7
Figure 3 : Sites et niveaux d'expression des gènes codant LXR $\alpha$ et LXR $\beta$ .....	7
Figure 4 : Représentation schématique d'un récepteur nucléaire.....	7
Figure 5 : Alignement des séquences protéiques de LXR $\beta$ et LXR $\alpha$ chez l'homme et la souris.....	8
Figure 6 : Représentation schématique de la structure du DBD d'un NR.....	9
Figure 7 : Le modèle du « piège à souris ».....	10
Figure 8 : Structure des domaines de liaison de l'hétérodimère RXR $\beta$ /LXR $\alpha$ .....	11
Figure 9 : Structure du gène <i>lxr<math>\alpha</math></i> .....	12
Figure 10 : Structure du gène <i>lxr<math>\beta</math></i> .....	13
Figure 11 : Les différents éléments de réponse.....	18
Figure 12 : Structure schématique des co-répresseurs N-CoR 1 et SMRT 1.....	21
Figure 13 : Le mécanisme d'action des LXRs.....	22
Figure 14 : Structure schématique des co-activateurs de type p160 et CBP/p300.....	23
Figure 15 : Les différents types d'hétérodimères avec RXR.....	26
Figure 16 : L'effet « <i>phantom ligand</i> ».....	27
Figure 17 : Les ligands agonistes naturels dérivés du cholestérol : les oxystérols.....	28
Figure 18 : Les ligands agonistes naturels, autres stérols dérivés du cholestérol.....	29
Figure 19 : Les ligands agonistes naturels, autres stérols dérivés de la voie des acides biliaires.....	29
Figure 20 : Les ligands agonistes naturels, autres stérols d'origine microbienne et végétale.....	30
Figure 21 : Les ligands agonistes naturels, non stérols.....	32
Figure 22 : Les ligands agonistes oxystérols synthétiques.....	33
Figure 23 : Les ligands agonistes synthétiques non stérols.....	35
Figure 24 : Les ligands antagonistes naturels.....	39
Figure 25 : Les ligands antagonistes synthétiques.....	40
Figure 26 : Les six catégories de ligands des LXRs.....	42
Figure 27 : Modèle d'action de SIRT1 dans la « mise à zéro » et l'activation des promoteurs des gènes cibles des LXRs.....	45
Figure 28 : Régulation de l'homéostasie des acides biliaires par les récepteurs nucléaires.....	48
Figure 29 : Relations entre les LXRs et le métabolisme du cholestérol.....	50
Figure 30 : Le mécanisme d'action des SREBP.....	30
Figure 31 : Synthèse du rôle des LXRs dans la physiologie.....	61
Figure 32 : Représentation schématique d'un ovaire de rate.....	62
Figure 33 : Histologie des follicules ovariens.....	63
Figure 34 : Profils hormonaux au cours d'un cycle œstrien de 4 jours chez la souris.....	67
Figure 35 : Voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans les ovaires.....	68
Figure 36 : La production des hormones stéroïdiennes dans le follicule.....	69
Figure 37 : Le contrôle du cycle œstrien par les hormones ovariennes.....	70
Figure 38 : Les différents types d'utérus.....	72
Figure 39 : Evolution de la fertilité des femelles <i>lxr<math>\alpha</math>; <math>\beta</math><sup>-</sup></i> .....	75



*Introduction bibliographique*

	Récepteurs endocriniens	Récepteurs orphelins « adoptés »	Récepteurs orphelins
Ligand	Hormones stéroïdiennes Haute affinité	Lipides alimentaires Faible affinité	Inconnus
	<div style="background-color: #0070C0; color: white; padding: 5px;"> ER <math>\alpha, \beta</math>  PR  AR  GR  MR </div> <div style="background-color: #6A329F; color: white; padding: 5px; margin-top: 10px;"> RAR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  TR <math>\alpha, \beta</math>  VDR  EcR </div>	<div style="background-color: #FF0000; color: white; padding: 5px;"> RXR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  PPAR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  LXR <math>\alpha, \beta</math>  FXR  PXR / SXR  CAR </div>	<div style="background-color: #000000; color: white; padding: 5px;"> SF-1  LRH-1  DAX-1  SHP  TLX  PNR  NGFI-N <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  ROR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  ERR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  RVR <math>\alpha, \beta, \gamma</math>  GCNF  TR 2,4  HNF-4  COUP-TF <math>\alpha, \beta, \gamma</math> </div>

**Figure 1 : Classification fonctionnelle des récepteurs nucléaires**

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

## I. Les récepteurs nucléaires des oxystérols LXRs (*Liver X Receptor*)

Depuis la fin des années 1990, le nombre de travaux publiés concernant l'identification de gènes cibles des LXRs est en augmentation constante. Dans ce manuscrit, nous avons volontairement choisi de centrer l'étude bibliographique sur les ligands des LXRs, leurs co-facteurs partenaires protéiques et les relations ligands / co-facteurs.

### A. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (NRs ; *Nuclear Receptors*) sont des facteurs de transcription potentiellement activables par un signal habituellement lipophile. La nature des ligands leur permet de franchir facilement les membranes cellulaires, même si des transporteurs membranaires ont parfois été décrits et d'activer leurs récepteurs dont la localisation est intra-cellulaire. Les NRs sont largement répandus dans le règne animal et semblent être apparus tôt dans l'évolution des métazoaires (Escriva, *et al.*, 1997). D'un point de vue fonctionnel, on peut définir trois classes de récepteurs nucléaires : les récepteurs endocriniens ayant un ligand de forte affinité, les récepteurs nucléaires orphelins « adoptés » possédant un ligand de faible affinité et les récepteurs nucléaires orphelins, pour lesquels aucun ligand naturel n'a encore été identifié à ce jour (Fig 1 ; Chawla, *et al.*, 2001b).

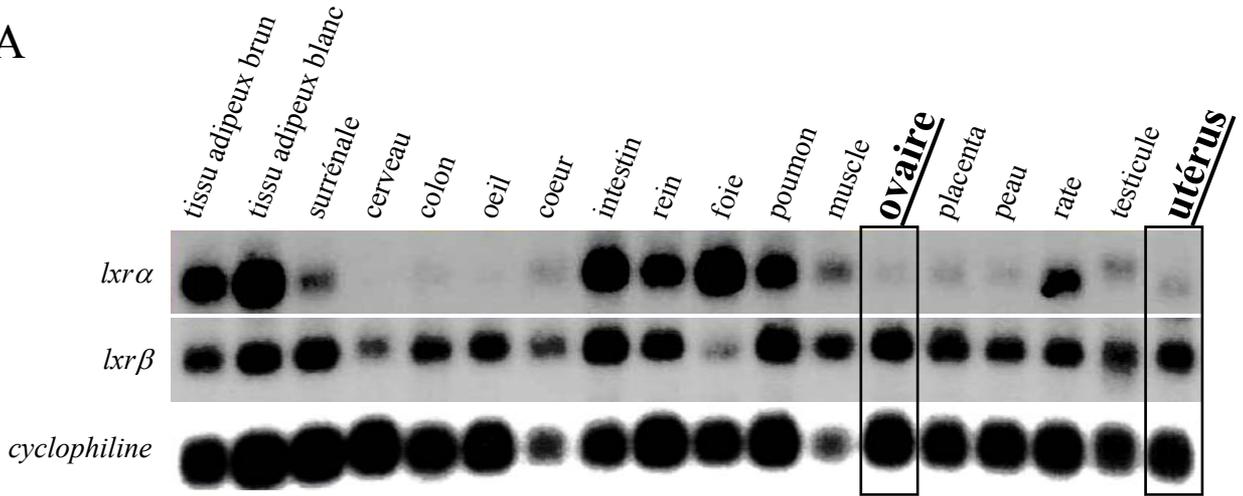
Le premier NR cloné a été celui des glucocorticoïdes en 1985 (Hollenberg, *et al.*, 1985). Entre 1985 et 1987, d'autres récepteurs ont été identifiés, notamment : ER (*Estrogen Receptor*), PR (*Progesterone Receptor*) et TR (*Thyroid hormone Receptor* ; pour une revue, voir McKenna et O'Malley, 2002). C'est l'observation de la forte homologie de séquence du domaine de liaison de l'ADN de tous ces récepteurs qui a permis l'identification de nouveaux gènes, dont le premier a été RAR $\alpha$  (*Retinoic Acid Receptor* ; Petkovich, *et al.*, 1987). Cette technique de criblage a été le point de départ du concept d'« endocrinologie inverse » décrit par Kliewer *et al.* (Kliewer, *et al.*, 1999), par lequel la découverte du gène codant le récepteur précède la découverte du ligand et de la fonction physiologique. Plusieurs récepteurs nucléaires sans ligand connu ont ainsi été découverts, baptisés « récepteurs nucléaires orphelins ». Bien que certains ligands soient aujourd'hui connus, certains NRs sont toujours orphelins. Chez l'homme, 48 récepteurs nucléaires ont été identifiés définis en 7 sous-familles définies d'après la classification phylogénétique de V. Laudet (Fig 2 ; Laudet, 1997). Pour établir cette classification, les séquences correspondant aux domaines C, D et E de 63 NRs ont été alignées. V. Laudet a suggéré lors de cette étude que tous les récepteurs nucléaires dérivent d'un ancêtre commun orphelin, la capacité à lier potentiellement un ligand n'étant apparue que tardivement.

Nom	Nomenclature	Ligand
TR $\alpha$	NR1A1	Hormones thyroïdiennes
TR $\beta$	NR1A2	Hormones thyroïdiennes
RAR $\alpha$	NR1B1	Acide rétinoïque tout <i>trans</i>
RAR $\beta$	NR1B2	Acide rétinoïque tout <i>trans</i>
RAR $\gamma$	NR1B3	Acide rétinoïque tout <i>trans</i>
PPAR $\alpha$	NR1C1	Acides gras, leucotriène B <sub>4</sub> , fibrates
PPAR $\beta$	NR1C2	Acides gras
PPAR $\gamma$	NR1C3	Acides gras, prostaglandine J <sub>2</sub> , thiazolidinediones
Rev-erb $\alpha$	NR1D1	Orphelin
Rev-erb $\beta$	NR1D2	Orphelin
ROR $\alpha$	NR1F1	Cholestérol, sulfate de cholestérol
ROR $\beta$	NR1F2	Acide rétinoïque
ROR $\gamma$	NR1F3	Orphelin
LXR $\alpha$	NR1H3	Oxystérols, T0901317, GW3965
LXR $\beta$	NR1H2	Oxystérols, T0901317, GW3965
FXR $\alpha$	NR1H4	Acides biliaires, fexaramine
FXR $\beta$	NR1H5	Lanostérol
VDR	NR1I1	Vitamine D, 1,25-dihydroxy-vitamine D <sub>3</sub> , acide lithocholique
PXR	NR1I2	Xénobiotiques, 16 $\alpha$ -cyanopregnénolone
CAR	NR1I3	Xénobiotiques, phénobarbital
HNF4 $\alpha$	NR2A1	Orphelin
HNF4 $\gamma$	NR2A2	Orphelin
RXR $\alpha$	NR2B1	Acide Rétinoïque
RXR $\beta$	NR2B2	Acide Rétinoïque
RXR $\gamma$	NR2B3	Acide Rétinoïque
TR2	NR2C1	Orphelin
TR4	NR2C2	Orphelin
TLL	NR2E2	Orphelin
PNR	NR2E3	Orphelin
COUP-TFI	NR2F1	Orphelin
COUP-TFII	NR2F2	Orphelin
EAR2	NR2F6	Orphelin
ER $\alpha$	NR3A1	17 $\beta$ -œstradiol, tamoxifène, raloxifène
ER $\beta$	NR3A2	17 $\beta$ -œstradiol, divers composés synthétiques
ERR $\alpha$	NR3B1	Orphelin
ERR $\beta$	NR3B2	Diéthylstilbœstrol, 4-hydroxy-tamoxifène
ERR $\gamma$	NR3B3	Diéthylstilbœstrol, 4-hydroxy-tamoxifène
GR	NR3C1	Cortisol, dexaméthasone, RU486
MR	NR3C2	Aldostérone, spiro lactone
PR	NR3C3	Progéstérone, acétate de medroxyprogestérone, RU486
AR	NR3C4	Testostérone, dihydrotestostérone, flutamide
NGFI-B	NR4A1	Orphelin
NURR1	NR4A2	Orphelin
NOR1	NR4A3	Orphelin
SF1	NR5A1	Orphelin
LRH-1	NR5A2	Orphelin
GCNF	NR6A1	Orphelin
DAX-1	NR0B1	Orphelin
SHP	NR0B2	Orphelin

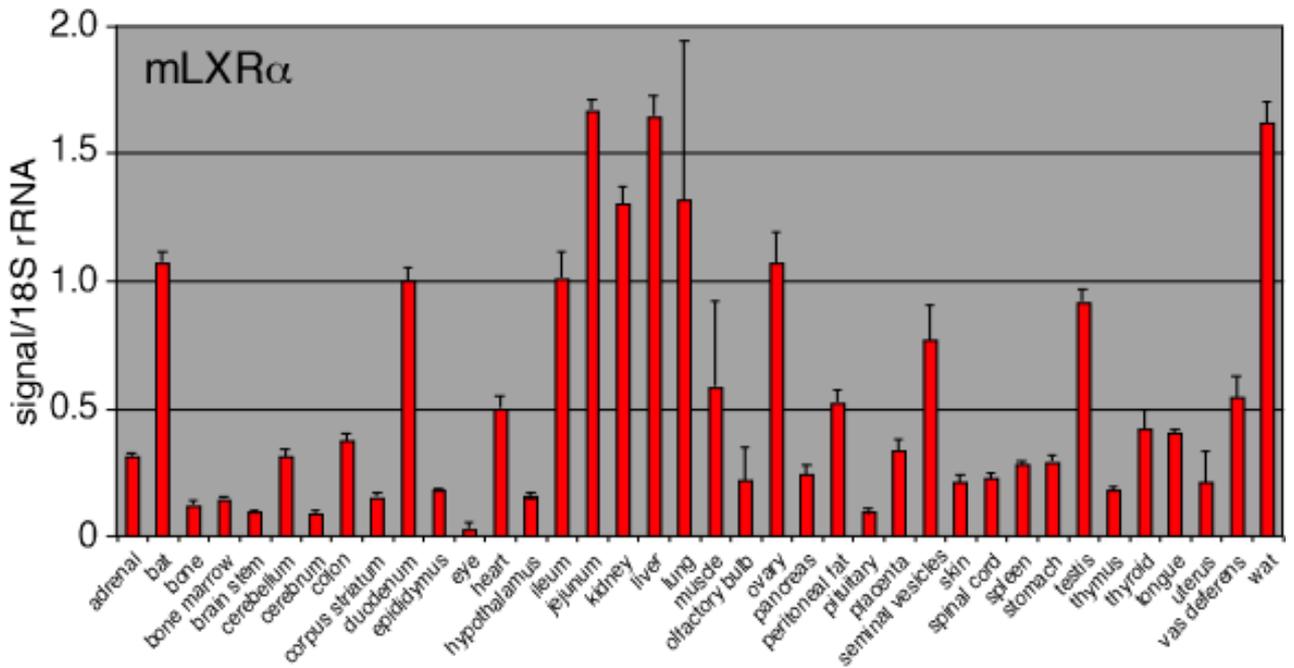
## Figure 2 : Classification phylogénétique des récepteurs nucléaires

Les récepteurs sont représentés en 7 classes selon la classification phylogénétique de V. Laudet (Laudet, 1997). Les ligands les plus connus sont indiqués. Les 48 NRs humains sont représentés. FXR $\beta$  est un pseudogène chez l'homme mais est fonctionnel chez la souris. Adapté d'après Germain et al., 2006.

A



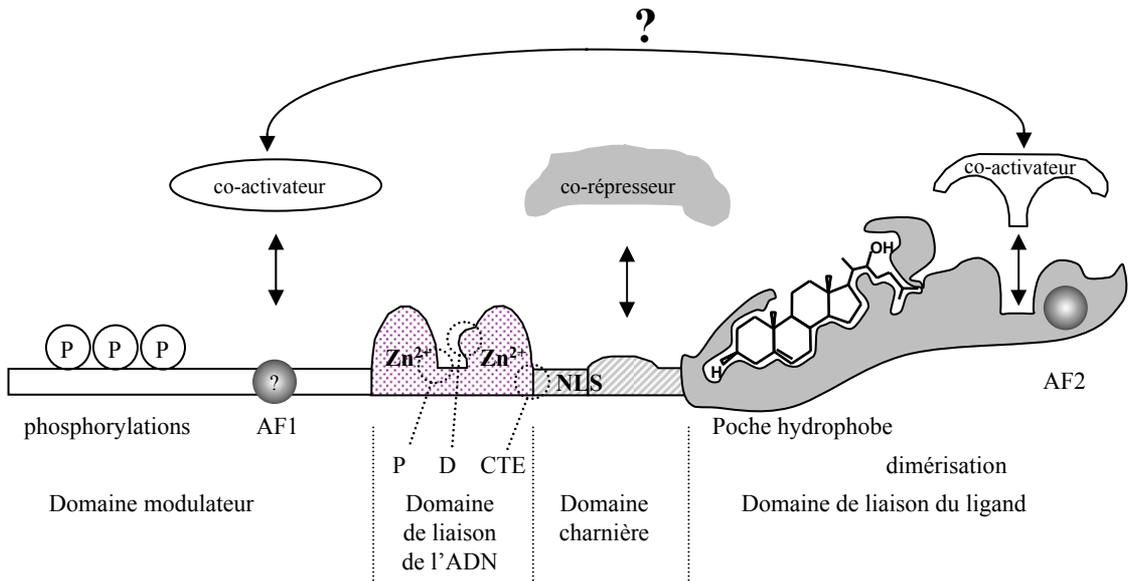
B



**Figure 3 : Sites et niveaux d'expression des gènes codant LXR $\alpha$  et LXR $\beta$**

A : Les ARNm de deux souris sauvages ont été utilisés pour le northern blot. Le gène ancillaire est la cyclophiline. D'après Repa et Mangelsdorf, 2000.

B : Profil d'expression de *Lxrα* réalisé par qPCR normalisé par rapport à l'ARN ribosomique 18S (Bookout et Mangelsdorf, 2003).



**Figure 4 : Représentation schématique d'un récepteur nucléaire**

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

Le mode d'action des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes est spécifique de la sous-famille 3 des NRs. Ces hormones sont synthétisées à partir du cholestérol et leur nature dépend de leur lieu de synthèse. Il existe 5 classes d'hormones stéroïdes activant chacune un récepteur différent : les androgènes, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les œstrogènes et les progestines. Schématiquement, en l'absence de ligand, ces NRs sont complexés à des protéines chaperonnes de type HSP (*Heat Shock Protein*), les maintenant à l'état inactif. La fixation du ligand, directement ou après transformation enzymatique, entraîne le départ des protéines HSP, la translocation nucléaire du récepteur et sa dimérisation. Le dimère formé se fixe ensuite au niveau de ses éléments de réponse spécifiques et induit la transcription de ses gènes cibles.

Canoniquement, il est admis que les récepteurs des hormones non stéroïdiennes sont en permanence fixés sur leurs éléments de réponse dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. En l'absence de ligand, le contact de co-répresseurs permet le maintien de la chromatine dans un état non permissif vis-à-vis de la transcription. L'entrée passive du ligand dans le noyau et sa fixation sur son récepteur induit l'initiation de la transcription des gènes cibles. Ces récepteurs peuvent agir sous forme d'homodimère, d'hétérodimère avec le partenaire obligatoire RXR (*Retinoid X Receptor*, récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis*) ou bien de monomère. Les récepteurs dimériques peuvent se fixer sur des éléments de réponse ADN définis comme des répétitions directes (*Direct Repeat* ; DR), des palindromes (*Indirect Repeat* ; IR) ou des palindromes inversés (*Everted Repeat* ; ER ; Glass, 1994).

## B. Structure et mode d'action des LXRs.

### 1. La structure biochimique

Les LXRs font partie des NRs qui forment des hétérodimères avec RXR. Il existe deux isoformes LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  provenant chacune de deux gènes distincts. LXR $\alpha$  (NR1H3, RLD-1) a été identifié à partir d'une banque humaine d'ADNc de foie, avec une sonde ADNc correspondant au domaine de liaison de l'ADN de RAR $\alpha$  (Willy, *et al.*, 1995). LXR $\beta$  (NR1H2, NER, UR, RIP15 ou OR-1) a été pour la première fois cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules d'ostéosarcome humain (Shinar, *et al.*, 1994).

L'analyse des profils d'expression (Fig 3) montre que LXR $\beta$  est ubiquiste, alors que LXR $\alpha$  a de forts niveaux d'expression dans les organes présentant un fort métabolisme lipidique (Repa et Mangelsdorf, 2000 ; Bookout et Mangelsdorf, 2003). D'un point de vue structural, ils sont constitués de quatre domaines fonctionnellement indépendants (Fig 4 ; Pour une revue, voir Volle, *et al.*, 2005).



a) *Le domaine N-terminal (domaine A/B)*

Ce domaine, également appelé domaine modulateur ou domaine A/B, est le plus variable dans la superfamille des NRs aussi bien en longueur qu'en séquence. Ce domaine porte une fonction activatrice AF1 (*Activating Function 1*) qui est dépendante du contexte cellulaire et qui a été identifiée récemment pour LXR $\alpha$  (Chen, *et al.*, 2005). Contrairement à ce qui a été décrit pour certains récepteurs nucléaires, aucune phosphorylation des LXR $\alpha$  au niveau du domaine A/B n'a aujourd'hui été décrite. Il est à noter qu'il n'existe pas de séquence consensus définissant l'AF1 des différents NRs. C'est également à ce niveau qu'on trouve le plus de divergence de séquence entre LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (Fig 5).

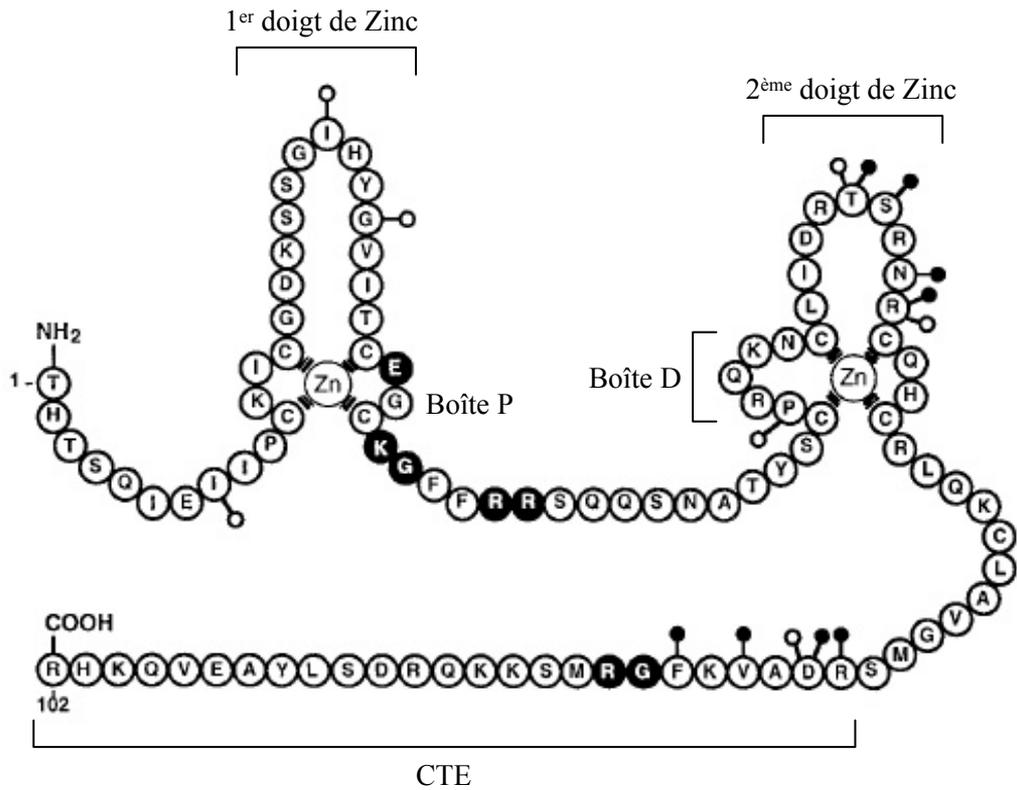
b) *Le domaine de liaison à l'ADN (domaine C)*

Ce domaine, qui confère la possibilité aux NRs de reconnaître leurs séquences spécifiques cibles sur l'ADN présente une homologie de séquence dans la superfamille. C'est sur la base de cette homologie qu'ont été clonés la majorité des récepteurs nucléaires dès le début des années 1990. Ce domaine définit également en partie l'appartenance à la superfamille des NRs.

Ce domaine (DBD ; *DNA Binding Domain*) est caractérisé par la présence de deux doigts de zinc de type C<sub>2</sub>C<sub>2</sub>. Dans chaque doigt, la disposition de quatre cystéines invariables permet la chélation d'un ion de zinc. Le DBD possède une taille de 66 à 70 acides aminés. Il est composé de deux hélices alpha et sa séquence protéique est riche en acides aminés basiques (Aranda et Pascual, 2001 ; Schwabe, *et al.*, 1990). On peut à l'intérieur du DBD définir quatre sous domaines (Fig 6) :

(1) La boîte P (P box, boîte proximale)

Cette région est portée par le premier doigt de zinc. C'est elle qui est impliquée dans la reconnaissance du demi-site de l'élément de réponse, dont la séquence canonique est AGA/GTCA (Giguere, 1999). Pour les récepteurs monomériques, le demi-site est flanqué de séquences riches en A/T en 5'. Elle est composée de trois acides aminés (EGCKG ; Fig 5). Des expériences de mutagenèse dans la boîte P permettent d'interchanger la spécificité de reconnaissance de l'élément de réponse de GR et ER (Zilliacus, *et al.*, 1994).



**Figure 6 : Représentation schématique de la structure du DBD d'un NR**

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

(2) La boîte D (D box ; boîte distale ou de dimérisation)

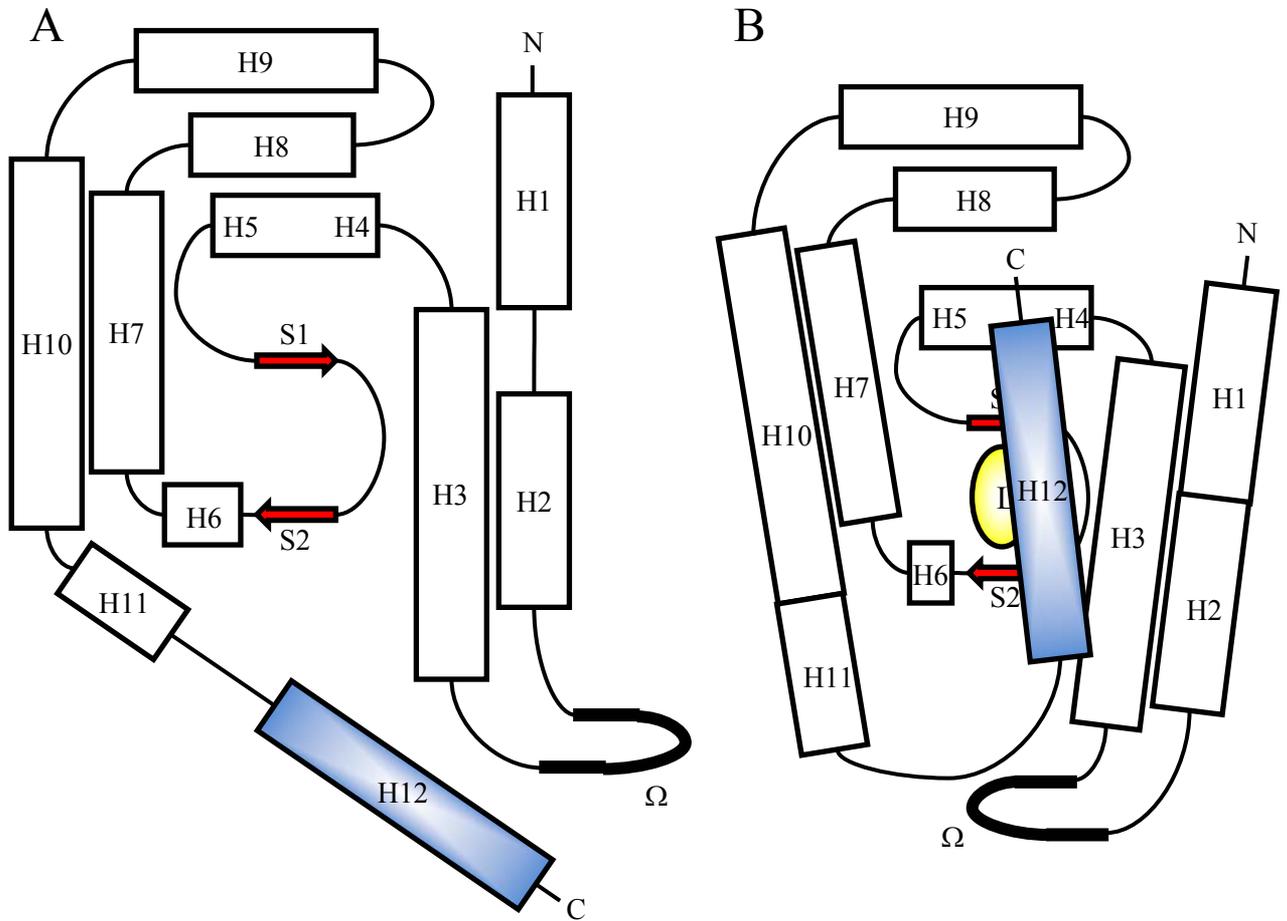
Ce sous-domaine, situé dans le second doigt de zinc, définit l'écartement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse sur l'ADN. Cette partie du DBD définit aussi le caractère homodimérique ou hétérodimérique du récepteur nucléaire. Aumais *et al.* (Aumais, *et al.*, 1996) ont proposé un modèle selon lequel le domaine de dimérisation présent dans le DBD des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes est responsable d'une plus forte affinité de l'homodimère pour des éléments de réponse de type palindromiques (IR) plutôt que pour des éléments de type répétition directe. La boîte D n'est donc impliquée que dans la fixation sur des éléments de réponse de type IR (Glass, 1994).

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

Cette région de 25 acides aminés, située en C-terminal du second doigt de zinc, permet l'interface protéine / protéine et protéine / ADN, 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.

(4) 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. Une étude récente utilisant un récepteur chimérique LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$  couplé à YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) a permis de préciser le rôle du NLS (*Nuclear Localization Signal*) dans la localisation cellulaire (Prufer et Boudreaux, 2007). Des cellules exprimant de manière stable ces deux récepteurs présentent une fluorescence exclusivement nucléaire. 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 lors de cette étude, dans le domaine A/B. Des mutations ponctuelles des différents NLS montrent que tous ne participent pas de la même manière à l'internalisation nucléaire du récepteur et les auteurs montrent un mécanisme de coopération entre ces signaux pour l'entrée du récepteur dans le noyau. De plus, un défaut de localisation cellulaire entraîne



**Figure 7 : Le modèle du « piège à souris »**

Représentation schématique des changements de conformation se produisant en présence d'un ligand. A : En l'absence de ligand, l'hélice H12 portant le domaine AF2 contacte la boucle  $\Omega$  et est exposée vers l'extérieur. B : En présence d'un ligand, les hélices 10 et 11 se condensent en une seule hélice, libérant l'hélice H12 de la boucle  $\Omega$ . L'hélice H12 « referme » le LBD, mettant le NR dans une conformation favorable au recrutement de co-activateurs. H1-12 : hélices  $\alpha$  ; S1 et S2 : feuillets  $\beta$  ;  $\Omega$  : boucle  $\Omega$ . Adapté d'après Parker et White, 1996.

une diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur. Ainsi, s'il est connu que ces signaux sont primordiaux pour la localisation nucléaire, il sera important d'étudier leur part relative dans le mode d'action des LXR. De plus, l'analyse des mécanismes par lesquels la liaison d'un agoniste permet un contrôle de la localisation cellulaire pourra permettre à terme de développer des molécules pouvant moduler l'action activatrice des LXRs.

c) *Le domaine charnière (hinge ; domaine D)*

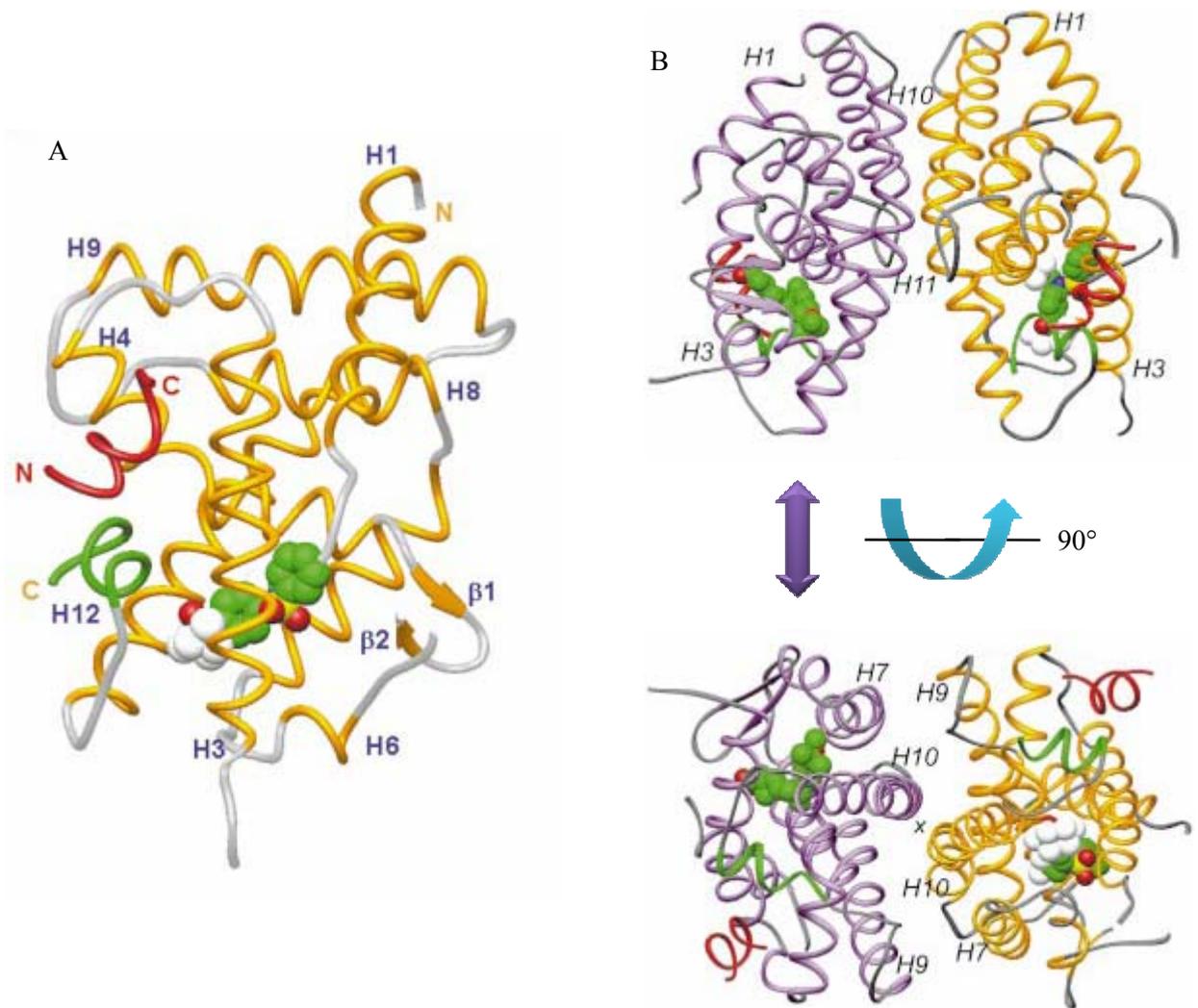
Ce domaine est variable à la fois en séquence primaire et en longueur. Cette région constitue la charnière entre le DBD et le LBD du récepteur. Elle permettrait une rotation de 180° du LBD pour permettre la fixation du dimère de récepteurs sur des éléments de réponse de type DR ou IR. Le rôle principal du domaine charnière est le contact de co-répresseurs en l'absence de ligand, maintenant la transcription inactive (Horlein, *et al.*, 1995 ; Chen et Evans, 1995).

d) *Le domaine C-terminal : le domaine de liaison du ligand (LBD)*

Ce domaine multifonctionnel est très documenté. Il est le siège de plusieurs fonctions notamment :

(1) La liaison du ligand

Malgré une grande variabilité dans la séquence primaire du LBD, les analyses cristallographiques montrent que tous les LBD ont une structure tridimensionnelle identique. Ils sont composés de 11 à 13 hélices alpha arrangées en trois couches avec deux «  $\beta$ -turns ». Il faut noter un motif présent sur l'hélice H4 qui permet également de définir l'appartenance à la superfamille. L'organisation structurale du LBD définit ainsi une poche hydrophobe dans laquelle le ligand de nature lipophile peut venir se fixer. L'étude cristallographique comparant les structures de RXR $\alpha$  en l'absence de son ligand (Bourguet, *et al.*, 1995) et RAR $\gamma$  en présence de son ligand a montré le rôle primordial de la fonction AF-2 (*Activating function 2*) portée par l'hélice 12 (Renaud, *et al.*, 1995). En l'absence de ligand, l'hélice 12 est orientée vers l'extérieur du LBD. La liaison de l'hormone permet le réarrangement des hélices 10 et 11 en une hélice unique, ce qui a pour conséquence de libérer l'hélice 12 de son contact avec la boucle  $\Omega$  (entre les hélices 2 et 3). L'hélice 12 se réaligne ainsi contre la poche hydrophobe de liaison du ligand, agissant ainsi comme un « couvercle » qui scelle la poche en



**Figure 8 : Structure des domaines de liaison de l'hétérodimère RXRβ/LXRα**

LXRα est représenté en jaune et RXRβ en violet. Les atomes de carbone, oxygène, azote, soufre et fluor des ligands de LXRα (T0901317) et de RXRβ (Acide méthoprénique) sont représentés en vert, rouge, bleu, jaune et blanc respectivement. Le peptide du cofacteur GRIP1 est représenté en rouge. A : structure du LBD de LXRα. Noter la position de l'hélice H12 qui s'aligne contre la poche hydrophobe de liaison du ligand. B : Deux représentations de l'hétérodimère RXRβ/LXRα décalées de 90°. D'après Svensson et al., 2003.

renforçant les interactions entre le ligand et le LBD. Ce modèle est décrit comme le modèle « mouse trap » (modèle du piège à souris ; Fig 7). La cristallisation de LXR $\alpha$  en présence de RXR $\beta$ , d'un ligand synthétique et d'un co-activateur a révélé que LXR $\alpha$  adopte une conformation classique en présence de son ligand (Fig 8 ; Svensson, *et al.*, 2003). Cette étude a par ailleurs montré l'importance des deux résidus H421 et W443 de l'AF2 dans l'activation transcriptionnelle induite par ce NR.

## (2) La dimérisation

Le LBD des NRs est primordial pour permettre la dimérisation. Tous les récepteurs nucléaires ne possèdent pas de boîte D fonctionnelle dans le LBD, mais tous ceux qui forment des dimères sont liés par leur LBD. Mangelsdorf et Evans (Mangelsdorf et Evans, 1995) ont décrit un modèle de dimérisation en deux étapes pour les hétérodimères impliquant RXR : en premier lieu les deux partenaires hétérodimérisent en solution par leur LBD. C'est dans un deuxième temps que l'hétérodimère ainsi formé va reconnaître ses éléments de réponse sur l'ADN. Ce modèle n'a, à ce jour, jamais été validé expérimentalement.

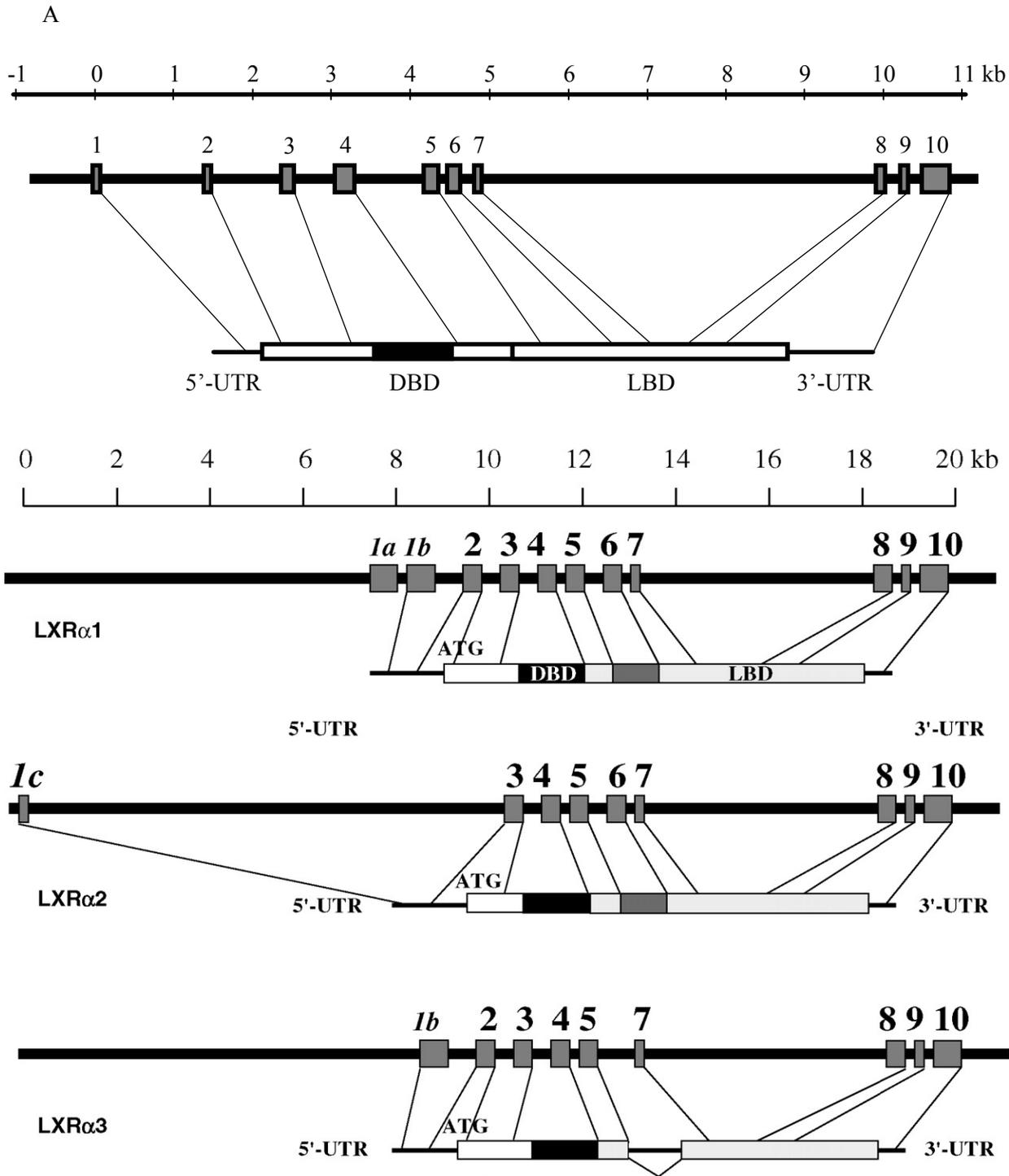
## (3) Le contrôle du mode d'action des récepteurs des hormones stéroïdes

Le LBD des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes est également responsable de trois fonctions primordiales dans leur mode d'action : l'interaction avec les protéines HSP en l'absence de ligand et la translocation nucléaire. Il faut noter que la liaison des protéines HSP avec le LBD protège le récepteur de la dégradation et le maintient dans une conformation permettant l'accueil du ligand (Georget, *et al.*, 2002).

## 2. Régulation de l'expression des gènes codant LXR $\alpha$ et LXR $\beta$

### a) Structure des gènes *lxra* et *lxrb*

Le gène murin *lxra* s'étend sur 11 kb et comporte dix exons (Fig 9A ; Alberti, *et al.*, 2000 ; Peet, *et al.*, 1998). Ce gène se situe sur le chromosome 2, à la position 2E1 ; 40,4 cM. Il comporte dix



**Figure 9 : Structure du gène *lxrα***

A : Représentation schématique du gène *lxrα* murin. Il s'étend sur 11 kb et comprend 10 exons. Adapté d'après Alberti et al., 2000.

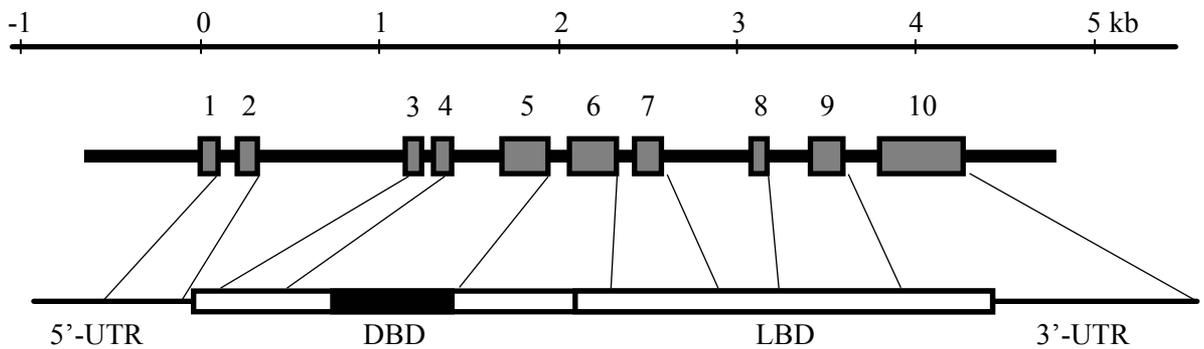
B : Représentation schématique du gène *lxrα* humain. Les trois variants d'épissage sont indiqués. Pour la forme LXRα1, les deux sites d'épissage dans le premier exon sont indiqués. Cependant, le premier exon n'est pas traduit ; cet épissage alternatif n'a aucun impact sur la séquence protéique.

DBD : DNA Binding Domain ; LBD : Ligand Binding Domain ; UTR : Untranslated Region. D'après Chen et al., 2005.

exons ; le premier se situe dans la région 5' non traduite et les neuf autres dans la région codante. Le LBD de LXR $\alpha$  est codé par les cinq derniers exons. Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, le DBD de LXR $\alpha$  est codé par un seul exon. Les sites donneurs et accepteurs d'épissage suivent la règle consensus GT-AG. L'analyse de la séquence de l'ADNc a révélé qu'il existe deux sites donneurs d'épissage dans l'exon 1, générant deux ARNm différents (LXR $\alpha$ 1A et LXR $\alpha$ 1B). A ce jour, aucun rôle physiologique concernant ces variants d'épissage n'a été décrit. De plus, l'exon concerné étant dans une région non traduite, la protéine formée est identique quel que soit le site d'épissage. Le promoteur de ce gène ne possède pas de boîte TATA ni d'élément CAAT.

Chez l'homme, le gène *lxr $\alpha$*  se situe sur le chromosome 11 en position 11p11.2 et possède 12 exons potentiels. Comme chez la souris, il existe deux variants d'épissage pour le premier exon sans impact sur la séquence protéique en raison de sa position en région 5' non traduite. Deux transcrits supplémentaires ont toutefois été décrits (Chen, *et al.*, 2005). L'ARNm LXR $\alpha$ 2 est transcrit à partir d'un promoteur alternatif situé environ 10 kb en amont des exons 1A et 1B. La traduction de ce transcrit débute à l'exon 3, produisant une protéine tronquée des 45 acides aminés en position N-terminale (Fig 9B). L'ARNm LXR $\alpha$ 3 est généré par épissage alternatif, conduisant à la perte de l'exon 6, générant une protéine à laquelle il manque 50 acides aminés du LBD. Les trois isoformes sont capables d'hétérodimériser avec RXR et de fixer *in vitro* un LXRE (*LXR Responsive Element*). Cependant, tandis que LXR $\alpha$ 3 est inactif d'un point de vue transcriptionnel, LXR $\alpha$ 2 est capable d'initier l'expression de gènes cibles en réponse à un agoniste, mais à des taux moindres par rapport à LXR $\alpha$ 1. Ces données permettent aux auteurs d'identifier un domaine AF1 fonctionnel dans la région A/B de LXR $\alpha$ . L'absence des hélices 3 et 4 ainsi qu'une partie de l'hélice 5 du LBD de LXR $\alpha$ 3 le rend potentiellement incapable de fixer un ligand. Ce récepteur tronqué ne se comporte toutefois pas comme un dominant négatif. L'analyse de l'expression des trois isoformes révèle comme attendu de forts taux d'expression de LXR $\alpha$ 1 au niveau du foie, du cœur, du cerveau, de la rate et du rein. LXR $\alpha$ 2 est quant à lui exprimé au niveau testiculaire, où il représente l'isoforme majeure. En revanche, les niveaux d'expression de LXR $\alpha$ 3 sont très faibles, quels que soient les organes étudiés. Les isoformes  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3 sont exprimées à de plus forts taux dans plusieurs lignées cellulaires tumorales. Toutefois, l'implication de ces isoformes dans le processus de transformation n'a pas été décrite à ce jour.

Le gène murin *lxr $\beta$*  est beaucoup plus court (Fig 10 ; Alberti, *et al.*, 2000) : il occupe 5 kb du chromosome 7, en position 7B4. Il comporte également dix exons et l'épissage est réalisé à partir des séquences consensus GT-AG. Les deux premiers exons sont inclus dans la région 5' non traduite. Le LBD de LXR $\beta$  est codé par seulement quatre exons et comme pour LXR $\alpha$ , le DBD est codé par un seul exon. Comme pour *lxr $\alpha$* , le promoteur du gène *lxr $\beta$*  ne possède pas de boîte TATA ni d'élément CAAT. Les auteurs ont identifié une région génomique murine qui présente une forte homologie de



**Figure 10 : Structure du gène *lxrβ***

Représentation schématique du gène *lxrβ* murin. Il s'étend sur 5 kb et comprend 10 exons. DBD : *DNA Binding Domain* ; LBD : *Ligand Binding Domain* ; UTR : *Untranslated Region*. Adapté d'après Alberti et al., 2000.

séquence (83 % d'identité) avec les exons 8 à 10 du gène *lxb*. Cette séquence, identifiée comme un pseudogène *lxb*:  $\psi$ *lxb*, ne possède pas d'introns et ne partage pas d'homologie de séquence avec les exons 1 à 7 du gène *lxb*. Il se situe sur le chromosome 9, en position 9D. Le gène *lxb* humain se situe sur le chromosome 19 en position 19q13.3-q13.3. Comme le gène murin, il possède 10 exons, dont les deux premiers ne sont pas traduits. Une étude a rapporté l'existence de variants d'épissage de LXR $\beta$  dans plusieurs tumeurs cancéreuses humaines (Saito, *et al.*, 1997). Cependant, l'existence de ces variants n'a jamais été confirmée par ailleurs.

b) *Régulation du gène lxa*

Le fait que l'expression de LXR $\alpha$  soit restreinte aux tissus présentant un fort métabolisme lipidique suggère que le gène codant ce récepteur nucléaire est soumis à de multiples régulations, notamment hormonales.

Les TRs sont les récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes. Il existe deux isoformes TR $\alpha$  et TR $\beta$ , fonctionnant en hétérodimère avec RXR et capables de fixer le même DR4 que les LXRs (Kawai, *et al.*, 2004). Une étude récente montre que l'activation de TR $\beta$  par les hormones thyroïdiennes augmente les ARNm de LXR $\alpha$  murin (Hashimoto, *et al.*, 2007). Cette activation est dépendante de l'intégrité du promoteur du gène. Cependant, des expériences de retardement sur gel ne révèlent pas de fixation directe de TR. En revanche, les données d'immunoprécipitation de chromatine montrent que RXR $\alpha$  et TR $\beta$  sont recrutés en présence d'hormones thyroïdiennes au niveau du promoteur de LXR $\alpha$ . Les auteurs proposent ainsi un modèle selon lequel RXR $\alpha$  et TR $\beta$  sont recrutés au niveau du promoteur par l'intermédiaire d'une protéine « X » restant à découvrir.

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) : Steffensen *et al.* (Steffensen, *et al.*, 2003) ont identifié par une approche *in silico* plusieurs éléments de réponse aux glucocorticoïdes putatifs. La transfection d'un vecteur exprimant GR stimule l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *lxa*. De manière surprenante, l'ajout de dexaméthasone, un agoniste de GR, abolit cette activation. En absence de ligand, GR semble donc être un activateur de l'expression de LXR $\alpha$  mais devient répresseur après activation par son ligand. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce phénomène restent toutefois à préciser, d'autant plus que l'interaction directe entre GR et le promoteur n'a pas été démontrée.

Les œstrogènes permettent une réduction de la masse de tissu adipeux, notamment par l'induction de la lipase hormono sensible, se traduisant par une lipolyse adipocytaire. Le traitement de souris par de l'œstradiol (E2) provoque une diminution des ARNm LXR $\alpha$  dans le tissu adipeux



(Lundholm, *et al.*, 2004). Lorsqu'un plasmide portant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *lxra* et un vecteur exprimant le récepteur ER $\alpha$  sont co-transfectés, le traitement par de l'œstradiol diminue l'induction du gène rapporteur, suggérant une interaction directe de ER $\alpha$  avec le promoteur de *lxra*. (Kramer et Wray, 2002). Toutefois, le blocage de la synthèse protéique par le cycloheximide abolit cette induction, suggérant une action indirecte de l'œstradiol sur le contrôle du gène *lxra*. Au total, s'il apparaît aujourd'hui clair que les œstrogènes inhibent la transcription de *lxra*, le mécanisme moléculaire mis en jeu reste à étudier.

L'insuline permet l'augmentation des quantités d'ARNm LXR $\alpha$  dans le foie de rat en culture et *in vivo* (Tobin, *et al.*, 2002). L'utilisation de cycloheximide abolit cette induction, montrant que cette activation est indirecte et dépend de la synthèse de protéines intermédiaires. De plus, l'insuline semble augmenter la stabilité des ARN messagers de LXR $\alpha$ . L'effet activateur de cette hormone sur de multiples gènes cibles des LXRs souligne que ces récepteurs nucléaires sont des régulateurs importants de la signalisation par l'insuline dans le métabolisme hépatique, notamment lipidique.

La protéine C/EBP (CCAAT-box/enhancer binding protein) est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation adipocytaire. Les trois isoformes C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont capables de se fixer sur le promoteur du gène *lxra* humain et murin (Steffensen, *et al.*, 2002). Cette étude montre que C/EBP $\alpha$  a un effet activateur sur le promoteur de LXR $\alpha$ . A l'inverse, C/EBP $\beta$  abolit l'induction de l'expression de LXR $\alpha$ , tandis que C/EBP $\gamma$  n'a aucun effet transcriptionnel. De plus, l'expression de LXR $\alpha$  est induite au cours de la différenciation de l'adipocyte.

Les PPARs : La découverte que les acides gras pouvaient stimuler la transcription du gène *lxra* a conduit Tobin *et al.* (Tobin, *et al.*, 2000) à étudier la régulation de ce gène par un de leurs récepteurs : PPAR $\alpha$ . Ainsi, des agonistes de PPAR $\alpha$  sont capables d'induire un gène rapporteur placé en aval du promoteur murin du gène *lxra*. Les auteurs ont par ailleurs identifié par une approche bioinformatique plusieurs éléments de réponse à PPAR putatifs dans ce promoteur. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* au niveau hépatique chez le rat.

Le gène murin *lxra* est une cible directe du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (Chawla, *et al.*, 2001a). Les auteurs ont montré une régulation directe de *lxra* par des ligands spécifiques de PPAR $\gamma$  via un élément de réponse PPRE (*PPAR Response Element*). Ainsi, PPAR $\gamma$  permet-il l'induction du gène *abca1* par une cascade de signalisation impliquant LXR $\alpha$ . A l'inverse, contrairement aux données de Tobin *et al.* (Tobin, *et al.*, 2000), PPAR $\alpha$  et PPAR $\delta$  sont incapables de réguler LXR $\alpha$ . Lors de l'étude du promoteur de *lxra*, Laffitte *et al.* (Laffitte, *et al.*, 2001a) ont également montré que le gène *lxra* humain est activé par des ligands spécifiques de PPAR $\gamma$  dans des cultures de macrophages. Cependant, le PPRE décrit par Chawla *et al.* n'est pas conservé chez la souris. Chez l'homme, la signalisation par



PPAR $\gamma$  dépend d'un autre PPRE. La régulation du gène *lxra* humain par PPAR $\gamma$  n'est pas retrouvée dans des hépatocytes en culture.

Sachant que (1) l'insuline est un facteur adipogénique et active la transcription de LXR $\alpha$  (Tobin, *et al.*, 2002) et (2) qu'il est actuellement admis que les facteurs de transcription intervenant majoritairement dans l'adipogenèse et le maintien de l'état différencié des adipocytes sont les facteurs C/EBP, PPAR $\gamma$  et SREBP1 (Rocchi et Auwerx, 2000), la découverte de l'interaction entre ces voies de signalisation intra-cellulaires et la signalisation par LXR $\alpha$  suggère ainsi que ce NR pourrait également être un acteur clé dans les processus processus adipogéniques.

Le resvératrol est un polyphénol naturel présent dans plusieurs végétaux, notamment dans les racines d'une plante utilisée dans l'herboristerie médicinale japonaise et chinoise (*Poligonum cuspidatum*) et dans le vin rouge (pour une revue, voir Soleas, *et al.*, 1997). Les polyphénols de vin rouge semblent avoir un effet protecteur contre l'athérosclérose. Toutefois, les mécanismes physiologiques mis en jeu ne sont pas clairs actuellement. Le traitement de macrophages en culture par du resvératrol provoque une augmentation des taux d'ARNm et de protéine LXR $\alpha$  (Sevov, *et al.*, 2006). Par immunoprécipitation de chromatine, les auteurs montrent que le traitement par ce polyphénol permet le recrutement de l'ARN polymérase de type II au niveau du promoteur de LXR $\alpha$ , suggérant que cette activation est au moins en partie de nature transcriptionnelle. Son effet inducteur sur l'expression des gènes cibles des LXRs *abca1*, *abcg1* et *apoE* suggère que les propriétés anti-athérogéniques du resvératrol pourraient en partie dépendre de l'augmentation de l'expression du gène codant LXR $\alpha$ .

La phase de réponse aigüe, induite par une infection ou une inflammation est associée à de multiples changements dans le statut lipidique, notamment une hypertriglycéridémie, une diminution des niveaux de LDL-cholestérol, une lipolyse accrue au niveau du tissu adipeux, une augmentation de la synthèse *de novo* d'acides gras et une diminution de leur oxydation (Khovidhunkit, *et al.*, 2004). Considérant leur rôle dans le métabolisme lipidique, Beigneux *et al.* (Beigneux, *et al.*, 2000) ont étudié l'expression des RXRs, PPARs (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) et LXRs en situation inflammatoire. L'injection de lipopolysaccharides (LPS) à des hamsters syriens provoque une diminution hépatique des taux d'ARNm de RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ . La diminution de transcrits de LXR $\alpha$ , retrouvée au niveau rénal chez la souris, est induite par plusieurs substances conduisant à une phase de réponse aigüe : IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  et les LPS (Wang, *et al.*, 2005). Cette inhibition transcriptionnelle, associée à une diminution des cofacteurs PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 – alpha*), PGC-1 $\beta$  et SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator – 1* ; Kim, *et al.*, 2007), est responsable d'une diminution de l'expression de gènes cibles des LXRs : *abca1*, *abcg1* et *srebp1c* (*sterol response element binding protein 1c*). De manière



surprenante, l'expression de *lxra* est stimulée au niveau des macrophages après une infection bactérienne (Joseph, *et al.*, 2004). Le traitement par des LPS de macrophages dérivés de moelle osseuse provoque également une augmentation des taux de transcrits LXR $\alpha$  (Barish, *et al.*, 2005). Il est intéressant de constater que cette activation est diminuée dans des macrophages dérivés de souris *cfr*<sup>-/-</sup> (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), modèles d'étude de la mucoviscidose (Andersson, *et al.*, 2007). Les auteurs soulèvent ainsi l'hypothèse que la perturbation de la régulation de LXR $\alpha$  pourrait en partie contribuer au statut inflammatoire excessif des patients atteints de mucoviscidose. Au total, si les mécanismes mis en jeu dans la régulation de LXR $\alpha$  par les LPS sont loin d'être élucidés, il apparaît clair que les LXRs sont des acteurs clés dans la médiation des voies de l'inflammation.

Les LXRs : Une boucle d'autorégulation de LXR $\alpha$  a été décrite (Laffitte, *et al.*, 2001a ; Li, *et al.*, 2002). Ces deux études montrent que le gène humain *lxra* est activé à la fois par des agonistes synthétiques et naturels des LXRs. Cette induction est dépendante de trois LXRE fonctionnels. Le premier LXRE (-4135/-4119) est « de type I » : il est en effet activable à la fois par LXR $\alpha$  et par LXR $\beta$  (Li *et al.*, 2002). Les deux autres LXRE (-3286/-3270 ; -2914/2898) sont « de type II » : ils sont activables uniquement par LXR $\alpha$ . Au contraire, aucune augmentation de l'expression de LXR $\beta$  humain n'est observée en présence des ligands agonistes. Par ailleurs, le gène *lxra* murin ne possède qu'un seul LXRE non fonctionnel car muté.

La vitamine B3 (niacine) est impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides et potentiellement dans la régression de la lésion athérosclérotique. *In vivo*, un apport nutritionnel de vitamine B3 à des lapins permet une augmentation des transcrits LXR $\alpha$  dans le tissu adipeux, associée à une augmentation de l'efflux de cholestérol (Zhao, *et al.*, 2007). Cependant, le mécanisme moléculaire de cette régulation positive n'est pas connu.

La vitamine C (acide ascorbique) est connue pour ses propriétés antioxydantes. Combinée à la vitamine E, une supplémentation alimentaire en vitamine C permet un ralentissement conséquent de la progression de la lésion athérosclérotique chez des patients en hypercholestérolémie (Salonen, *et al.*, 2003). Le traitement de cellules monoclonales humaines de sang périphérique par de la vitamine C provoque une augmentation de l'expression de *lxra* (Kaul et Baba, 2005). Cet effet est observé sur des cellules issues à la fois de patients sains et de patients cardiaques. Même si les mécanismes conduisant à cette augmentation de l'expression de LXR $\alpha$  sont encore inconnus, on peut supposer de ces travaux que l'effet protecteur contre la progression de l'athérosclérose de la vitamine C dépendrait au moins en partie de LXR $\alpha$ .



c) Régulation du gène *lxrβ*

L'expression de LXRβ étant ubiquiste, les régulations hormonales du promoteur ont été peu étudiées.

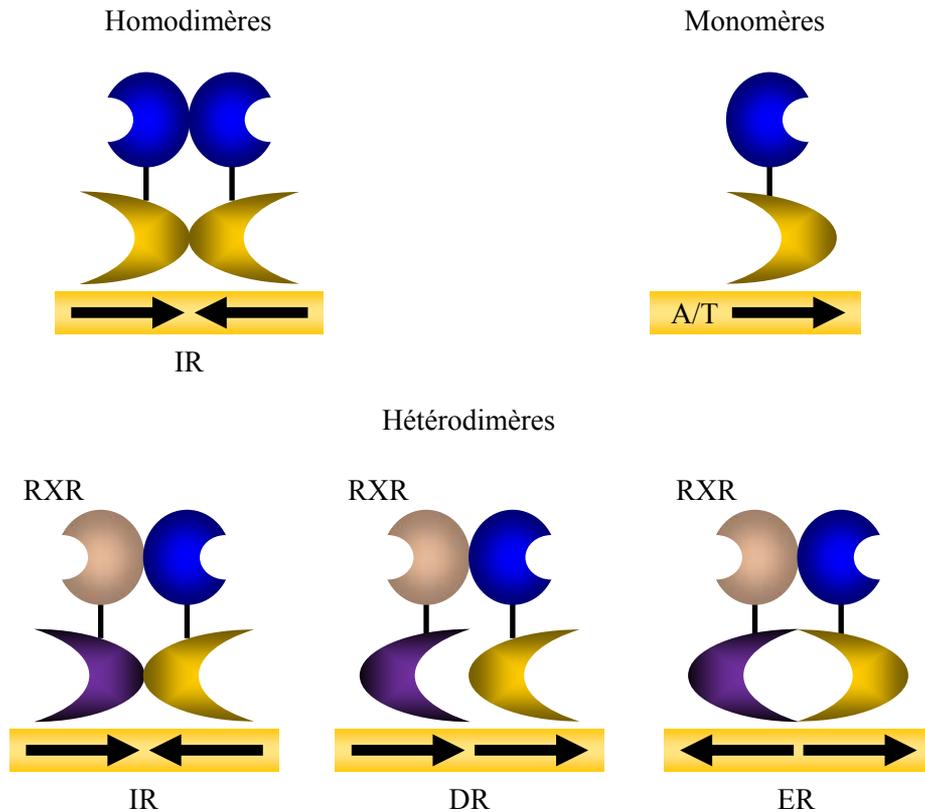
Elk1 (*Ets-Like transcription factor*) est un facteur de transcription appartenant à la famille ETS (*E Twenty Six*). Habituellement, les facteurs ETS s'associent avec des dimères de facteurs SRF (*Serum Response Factor*) ; ce complexe ternaire se fixe sur des éléments de réponse SRE (*Serum Response Element* ; Buchwalter, *et al.*, 2004). L'activité d'Elk1 est régulée positivement par phosphorylation induite par la voie des MAP Kinases. Deux éléments de réponse fonctionnels ont été identifiés dans le promoteur de *lxrβ* humain : un site ETS en 5' et un site Elk1 en 3' (Nilsson, *et al.*, 2007). Le facteur Elk-1 a la capacité de fixer les deux sites tandis que SRF ne peut se lier qu'au site 3'-Elk1. Le glucose permet d'activer la transcription du gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *lxrβ*. La mutation des sites Elk1 et ETS diminue à la fois la transcription basale du gène mais aussi l'effet activateur du glucose, montrant que cet effet stimulateur dépend en partie de l'intégrité de ces sites. De manière surprenante, le gène endogène *lxrβ* ne répond pas au glucose, à la fois dans le modèle cellulaire utilisé (cellules bêta pancréatiques de rat INS-1), ni dans des cultures primaires de cellules bêta pancréatiques de rat, suggérant une spécificité d'espèce dans la réponse au glucose. Toutefois, les séquences des éléments de réponse ETS et Elk-1 sont particulièrement conservées entre les deux espèces, laissant supposer que l'absence de réponse des gènes endogènes de rat est plus due à des mécanismes complexes impliquant d'autres facteurs de transcription plutôt qu'à la structure des éléments de réponse. Même si les mécanismes mis en jeu dans cette réponse méritent d'être approfondis, il apparaît que les interactions entre les LXRs et le métabolisme du glucose en font des cibles de choix dans l'étude du déclenchement de pathologies telles que le diabète.

3. Mode d'action des LXRs

a) Les éléments de réponse des LXRs

(1) Les éléments de réponse des NRs

Les éléments de réponse sont des éléments bipartites composés de deux séquences hexamériques appelées demi-sites. Ces séquences nucléotidiques forment des répétitions directes



**Figure 11 : Les différents éléments de réponse**

Les NRs des hormones stéroïdiennes 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 (*Everted Repeat*). Adapté d'après Aranda et Pascual, 2001.

(DR), indirectes (IR, ou palindromes) ou inversées (ER) qui sont deux demi-sites séparés par une courte séquence nucléotidique variable. 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 récepteurs des hormones stéroïdes se fixent généralement en homodimères sur des éléments de type IR3 (deux demi-sites organisés en palindromes et séparés par trois nucléotides). La séquence consensus du demi-site est AGAACA, à l'exception de ER (AGGTCA). La cristallisation de GR (*Glucocorticoid Receptor*) et ER a montré une orientation tête à tête (Luisi, *et al.*, 1991 ; Schwabe, *et al.*, 1993) de l'homodimère. La modélisation de AR (*Androgen Receptor*) a montré une orientation identique (Lobaccaro, *et al.*, 1996)
- Les récepteurs qui forment des hétérodimères avec RXR contactent généralement des éléments 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 (pour une revue, voir Germain, *et al.*, 2006)
- Enfin, les récepteurs nucléaires qui agissent sous forme de monomères contactent des éléments de réponse dont la séquence consensus est AGGTCA précédée d'une séquence riche en A/T en 5'.

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 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, Fig 11)

## (2) Les éléments de réponse aux LXR

Plusieurs éléments de réponse aux LXR ont été décrits :

Le DR4 : cet élément de réponse a été le premier décrit. Willy *et al.* (Willy, *et al.*, 1995) ont identifié une séquence dans la région régulatrice du  $\Delta$ MTV, un promoteur dérivé du LTR du *mouse mammary tumor virus*, duquel les éléments de réponse aux glucocorticoïdes avaient été supprimés



(Hollenberg et Evans, 1988). Des mutants de délétion leur ont permis d'identifier une région de 30 paires de bases sensible à RXR/LXR. Des expériences de retardement sur gel associées à des mutants de cette région régulatrice leur ont permis d'identifier le premier LXRE : GGTTTAAATAAGTTCA. Willy et Mangelsdorf (Willy et Mangelsdorf, 1997) ont comparé les facteurs d'induction de différentes séquences mutées du LXRE clonées en amont d'un gène rapporteur TK-LUC. La transformation du demi-site 5' en un consensus AGGTCA résulte en une activation de la transcription. A l'inverse, la transformation des deux demi-sites en ce même consensus conduit à une diminution forte de l'activation transcriptionnelle. Cependant, la diminution de la capacité transactivatrice de ce LXRE consensus ne résulte pas d'une diminution de la fixation de l'hétérodimère RXR/LXR sur l'ADN. Comme attendu, la transformation du DR4 en un DR3 ou un DR5 abolit complètement l'initiation de la transcription. Cependant, des substitutions dans les quatre nucléotides entre les demi-sites peuvent augmenter ou diminuer fortement l'activation de la transcription. De la même manière, des mutations des nucléotides flanquant le DR4 diminuent la capacité à induire la transcription de RXR/LXR, voire abolissent complètement son activité. Prises ensemble, ces données suggèrent que le LXRE à lui seul n'est pas suffisant pour expliquer les interactions complexes entre l'hétérodimère RXR/LXR et son élément de réponse sur l'ADN. Cette étude a par ailleurs été la première à montrer une polarité de fixation de l'hétérodimère RXR/LXR sur le LXRE : RXR occupe le demi-site en 5' tandis que LXR occupe le demi-site en 3'. L'alignement des LXRE connus a permis de définir un LXRE consensuel : DGGTYAaynnVGKKCA (Volle, *et al.*, 2004) où D = A, G ou T ; K = G ou T ; V = A, C ou G ; et Y = C ou T, selon la nomenclature IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Depuis quelques années, le séquençage systématique des génomes et l'apparition de nouveaux algorithmes de recherche de sites de fixation de facteurs de transcription (Cartharius, *et al.*, 2005) permettent une recherche *in silico* rapide de LXRE dans des séquences promotrices de gènes préalablement au clonage des régions régulatrices, permettant l'identification de nouveaux gènes cibles des LXRs (Henry-Berger *et al.*, soumis, annexe 2).

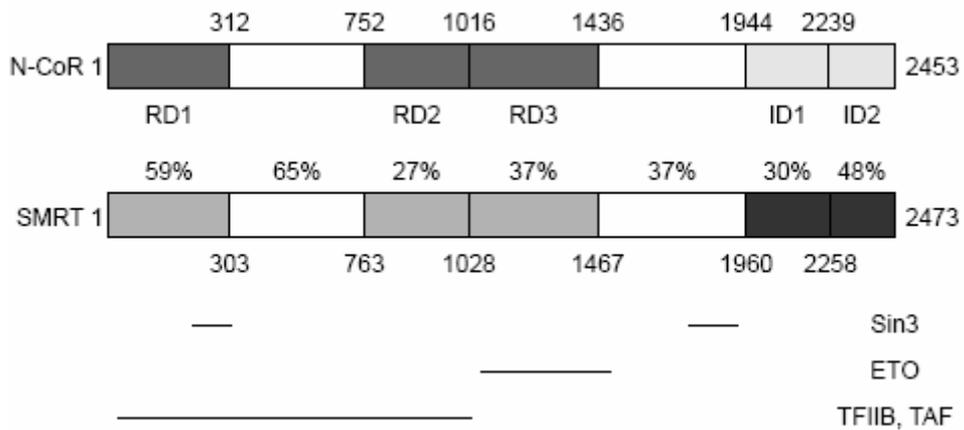
Le DR1 : Feltkamp *et al.* (Feltkamp, *et al.*, 1999) ont montré que LXR $\beta$  a la capacité de fixer une séquence DR1 dont le consensus est : AGGTCAaAGGTCA. Les auteurs ont montré que LXR $\beta$  est capable de contacter cet élément de réponse comme hétérodimère avec RXR, la fixation comme homodimère ou monomère étant impossible. Contrairement à l'orientation classique où RXR occupe la position 5' d'un DR4 et LXR la position 3', LXR $\beta$  peut occuper les deux positions sur le DR1, avec une affinité plus forte pour la position 3'. Par ailleurs, en l'absence de LXR $\beta$ , un homodimère de RXRs peut se former sur ce DR1, tandis que la présence de LXR $\beta$  inhibe la formation de cet homodimère. Par une recherche dans les bases de données, les auteurs ont trouvé un DR1 dans le promoteur du gène codant le récepteur de la cholecystokinine de type A de rat et dans celui du gène



spécifiant la protéine S14 de rat. Ces éléments synthétisés *in vitro* peuvent entrer en compétition avec le DR1 consensus. De manière surprenante, LXR $\alpha$  n'a pas la possibilité de contacter le DR1. Les auteurs suggèrent que cette différence pourrait être due à des différences d'hétérodimérisation entre les deux isoformes des LXRs avec leur partenaire RXR.

L'IR1 : Des données récentes ont impliqué l'hétérodimère RXR/LXR dans la régulation directe du gène codant l'I-BABP (*Ileal Bile Acid-Binding Protein*). Ce gène était connu pour être une cible indirecte des LXRs via un mécanisme impliquant SREBP1c (Zaghini, *et al.*, 2002). Il a été montré que le promoteur du gène codant l'I-BABP muté et privé de l'élément de réponse de SREBP1c (SRE : *Sterol Response Element*) possède la capacité d'être activé par LXR $\alpha$ . Les auteurs ont identifié un élément de réponse à l'hétérodimère RXR/LXR de type IR-1, préalablement connu pour être un élément de réponse pour l'hétérodimère FXR/RXR (*Farnesoid X Receptor* ; Landrier, *et al.*, 2003). De tels éléments de type IR-1 capables de fixer à la fois LXR et FXR ont été décrits dans le promoteur du gène codant la protéine de transfert des phospholipides (PLTP : *Phospholipids transfert protein* ; Mak, *et al.*, 2002a) et des deux gènes codant OST (*Organic solute transporter  $\alpha$  et  $\beta$*  ; Okuwaki, *et al.*, 2007). L'identification d'un nombre croissant d'éléments de réponse communs à LXR et FXR suggère l'existence d'interactions transcriptionnelles entre les deux voies.

Le CNRE : Le CNRE est une séquence d'ADN de 13 paires de bases qui confère la capacité de répondre à l'AMPC. Il s'agit là d'un mode d'action original de LXR $\alpha$ . Le récepteur est capable de fixer une séquence de type CNRE (*an overlapping cAMP response element and a negative response element*) sous forme de monomère (Tamura, *et al.*, 2000). Cette étude montre que la fixation de LXR $\alpha$  au CNRE permet la réponse à l'AMPC des gènes codant la rénine ainsi que c-myc. La même équipe a par la suite démontré l'implication physiologique de cette interaction dans le contrôle de l'expression du gène codant la rénine dans les cellules juxtaglomérulaires humaines, site majeur de production de la rénine (Tamura, *et al.*, 2004). Une étude à grande échelle comparant des lignées cellulaires rénales murines transfectées ou non par LXR $\alpha$  et traitées ou non par du 8-bromo-AMPC a permis d'identifier une liste de gènes ayant le même profil de régulation que la rénine. En utilisant un algorithme de recherche des CNRE et en validant les résultats par retardement sur gel, les auteurs ont défini 15 nouveaux gènes régulés par LXR $\alpha$  sous forme de monomère (Anderson, *et al.*, 2003).



**Figure 12 : Structure schématique des co-répresseurs N-CoR 1 et SMRT 1**

Les niveaux d'identité entre les deux protéines sont indiqués. Noter la présence des fonctions de répression en position N-terminale (RD : *Repression domain*) et des domaines d'interaction avec les NRs en position C-terminale (ID : *Interaction domain*). Les régions de contact avec les facteurs répresseurs de la transcription Sin3 et ETO (*Eight twenty one*) ainsi qu'avec la machinerie transcriptionnelle sont également indiquées. D'après Hu et Lazar, 2000.

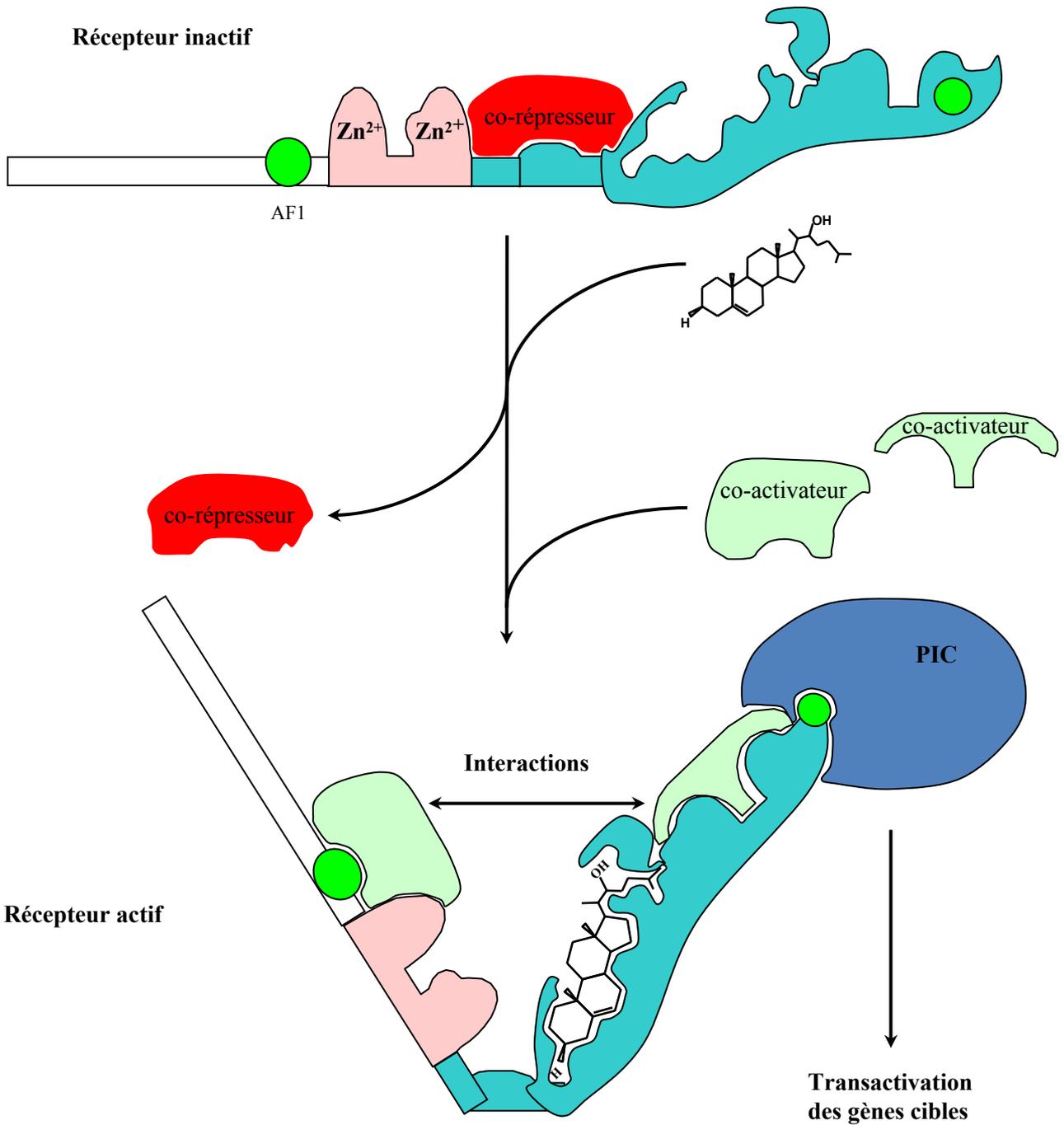
b) *En l'absence de ligand : les co-répresseurs*

Dans le mode d'action canonique des LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , lorsqu'aucun ligand n'est présent au niveau du LBD, l'hétérodimère est constitutivement fixé sur les DR4. Ainsi, à l'état inactif ces NRs agissent-ils comme des répresseurs de la transcription génique par le recrutement de co-répresseurs (Pour une revue, voir Lobaccaro, *et al.*, 2001). Les co-répresseurs les plus documentés sont N-CoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) et SMRT (*Silencing Mediator for RAR and TR*). Ces deux protéines partagent 43 % d'identité en acides aminés (Fig 12). L'interaction de ces co-répresseurs avec les NRs se fait au niveau de motifs « CoRNR » ou ID (*Interacting Domain*) situés en position C-terminale du co-répresseur, dont la séquence consensus est : I/LXXI/VI (Hu, *et al.*, 2001). Par des motifs situés en position N-terminale (Fig 12), le co-répresseur contacte à la fois directement et indirectement des histones déacétylases (HDAC) *via* des protéines de type Sin3 (Hu et Lazar, 2000 ; Lazar, 2003). LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  ont la capacité de fixer N-CoR et SMRT (Hu, *et al.*, 2003). Les activités HDAC maintiennent la chromatine dans un état de condensation non permissif pour la transcription génique. Cependant, l'interaction de LXR $\alpha$  avec les co-répresseurs est beaucoup plus forte que LXR $\beta$ . De plus, les LXR $\alpha$  ont une affinité plus importante pour N-CoR que pour SMRT. Des mutations du LBD de LXR $\alpha$  en positions 269 et 287 abolissent la capacité de fixation à N-CoR, montrant que ces régions, situées dans les hélices 3 et 5 ont un rôle primordial dans le dialogue entre les LXR $\alpha$  et les co-régulateurs.

Lorsqu'il n'y a pas de ligand, la présence constitutive sur les LXRE des complexes RXR/LXR-Co-répresseur-HDAC agit comme un répresseur basal de l'expression génique. Pour plusieurs gènes cibles, chez les souris pour lesquelles les gènes codant les LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  ont été invalidés (*lrx $\alpha$ ;lrx $\beta$* <sup>-/-</sup>), on assiste à une levée de la répression basale de ces gènes cibles comme pour *akr1b7* (*aldo-keto-reductase 1b7* ; Volle, *et al.*, 2004) ou *star* (*steroidogenic acute regulatory protein* ; Cummins, *et al.*, 2006). Par ailleurs, cette levée de répression semble spécifique du type cellulaire. Ainsi, l'invalidation des gènes *lrx $\alpha$*  et *lrx $\beta$*  chez la souris conduit-elle à une augmentation de SREBP1c au niveau du tissu adipeux blanc mais pas au niveau intestinal ou hépatique (Repa, *et al.*, 2000a).

c) *En présence de ligand*

De manière schématique, la fixation d'un agoniste de LXR ou de RXR dans la poche de liaison du ligand provoque le départ des co-répresseurs et la fixation de co-activateurs, qui créent un environnement chromatinien permissif pour la transcription. Au final, le recrutement du complexe de



**Figure 13 : Le mécanisme d'action des LXRs**

La présence d'un ligand dans le LBD des LXRs induit un changement de conformation du récepteur, responsable du départ des co-répresseurs. Noter sur le schéma le démasquage du domaine AF-2 entraînant le recrutement de co-activateurs et du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC : pre-initiation complex). Le ligand utilisé dans ce schéma est le 22(R)-hydroxy-cholestérol (D'après Volle et al., 2005, annexe 3).

pré-initiation de la transcription entraîne l'activation de l'expression des gènes cibles (Fig 13 ; Volle, *et al.*, 2005, annexe 3).

(1) Les co-activateurs

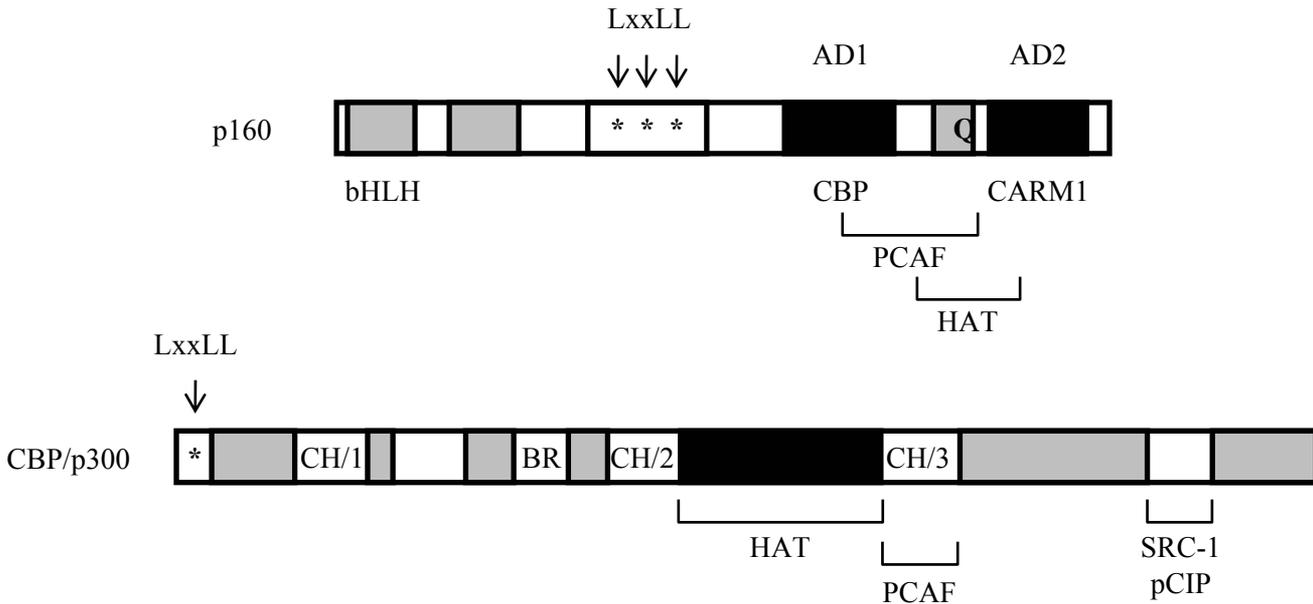
Il existe un grand nombre de co-activateurs connus à ce jour. D'une manière générale, il est admis que la fixation du ligand au niveau du LBD place le domaine AF-2 dans un état d'affinité forte pour un motif pour les co-activateurs (Shiau, *et al.*, 1998). Le contact entre les deux partenaires passe par un motif du co-activateur appelé NR Box, dont la séquence est LXXLL (où L = Leucine et X = n'importe quel acide aminé ; Heery, *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que la séquence protéique de la NR Box est très proche de celle de la CoRNR des co-répresseurs (Hu, *et al.*, 2001).

Nous aborderons dans cette revue principalement les co-activateurs capables de moduler l'activité transcriptionnelle des LXR. Schématiquement, il est possible de classer les co-activateurs en trois catégories selon leur fonction (McKenna et O'Malley, 2002) :

(a) Les facteurs remodelant la chromatine

Cette catégorie de co-activateurs est peu documentée. 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, facilitant l'accès à l'ADN par les facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, la famille la plus connue est la famille SWI/SNF (*mating type switching/sucrose nonfermenting*). Ces facteurs agissent en complexe dont la sous-unité catalytique est toujours soit BRG-1 (*Brahma-Related Gene 1* ; hSNF2 $\beta$ ) soit BRM (*Brahma* ; hSNF2 $\alpha$ ), agissant avec une dizaine de protéines associées (BAFs).

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.*, 2005). *Ex vivo*, la surexpression de BRG-1 potentialise l'activation de la transcription du gène cible des LXR *abca1* par le 22(R)-hydroxy-cholestérol. Cette potentialisation n'est pas retrouvée lorsque le domaine ATPasique de BRG-1 est muté. Comme l'agoniste utilisé sans cofacteur transfecté est capable d'induire la transcription d'*abca1*, et que l'effet potentialisateur est également retrouvé pour un autre cofacteur connu des LXR, SRC-1, les auteurs suggèrent que BRG-1 n'est pas indispensable à lui seul pour transduire la signalisation par les oxystérols. Ils proposent un modèle selon lequel l'activation de



**Figure 14 : Structure schématique des co-activateurs de type p160 et CBP/p300**

Les co-activateurs p160 possèdent un motif bHLH (*basic helix-loop-helix*) et une région *Per-Arnt-Sim* (PAS) en position N-terminale. Les boîtes *NR-boxes* des domaines d'interaction avec les NRs sont indiquées pas des astérisques. Les deux domaines d'activation (AD) et une région riche en glutamines (Q) sont en position C-terminale. Les domaines d'interaction avec des *histones acetyl-transferases* (HAT), CBP/p300, l'HAT PCAF et l'*arginine methyltransferase* CARM1 sont indiqués. Les co-activateurs CBP/p300 comportent également un domaine d'interaction avec CREB (KIX), SRC-1 ou des composants du cycle cellulaire (pCIP). Ils possèdent de plus un bromodomaine (BR) et trois doigts de zinc (CH/1, 2 et 3) capables d'interagir avec divers facteurs de transcription et des composants de la machinerie transcriptionnelle. D'après Aranda et Pascual, 2001.

l'hétérodimère RXR/LXR permettrait un recrutement d'un complexe protéique incluant BRM-1, SRC-1 et p300.

(b) *Les facteurs modifiant les histones*

(i) *Les Histone acétyl-transférases (HAT)*

Cette catégorie de co-activateurs est probablement la plus étudiée actuellement. Ces facteurs sont des protéines multi-modulaires et possèdent plusieurs activités. Il est de plus à noter que ces facteurs agissent en complexes protéiques importants. Il est donc difficile d'assimiler le mode d'action des NRs au simple fait que la fixation d'un ligand permet le recrutement d'un coactivateur et entraîne uniquement une acétylation des histones. Ainsi, l'activation d'un NRs par son ligand entraîne-t-elle le plus souvent de multiples effets au niveau de la chromatine.

SRC-1 (ou NCOA1 : *Nuclear Receptor Coactivator 1*) : Ce facteur appartient à la famille p160. Les trois membres de cette famille (SRC-1, 2 et 3) se caractérisent par la présence de multiples NR boxes en région centrale (Fig 14 ; McKenna et O'Malley, 2002) et possèdent une forte homologie de séquence (Xu et Li, 2003). *In vitro*, l'hétérodimérisation de RXR $\alpha$  et LXR $\beta$  permet le recrutement de SRC-1, de manière dépendante de la fonction AF2 de LXR $\beta$ . Cette interaction stimule la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un DR4. De plus, l'ajout d'un ligand de LXR $\beta$  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). De plus, l'ajout de 22(R)-hydroxy-cholestérol permet la liaison de SRC-1 à LXR $\alpha$  au niveau d'un élément DR4. La mutation de cet élément de réponse abolit l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur en présence de SRC-1.

GRIP-1 (*Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1* ou TIF-2 : *Transcriptional Intermediary Factor 2* ; NCOA2 ; SRC-2) : Bien que GRIP-1 ne possède pas de domaine HAT (Xu et Li, 2003), ce co-facteur est capable de lier à la fois les NRs par ses domaines NR boxes, mais aussi d'autres co-facteurs qui possèdent eux-mêmes une activité HAT, notamment p300 (Hong, *et al.*, 2004). Quelques études ont montré le recrutement de GRIP-1 par l'hétérodimère RXR/LXR en présence d'un agoniste de LXR (Song et Liao, 2000 ; Song, *et al.*, 2001). Une étude cristallographique a par ailleurs montré une interaction directe de GRIP-1 avec à la fois LXR $\alpha$  et RXR $\beta$  (Svensson, *et al.*, 2003).



CBP/p300 : CBP (*CREB-binding protein*) et p300 sont des coactivateurs homologues capables de fixer le domaine AD1 des coactivateurs de la famille p160. Ils peuvent toutefois lier directement certains récepteurs nucléaires par un motif NR box en position N-terminale (Fig14 ; Aranda et Pascual, 2001). CBP et p300 sont considérés comme des co-intégrateurs des signaux extra-cellulaires et intracellulaires. En effet, CBP a été identifié sur la base de son association avec CREB (*c-AMP Response Element Binding Protein*) phosphorylé par la protéine kinase A en réponse aux élévations intra-cellulaires d'AMPc (Kwok, *et al.*, 1994). Huuskonen *et al.* (Huuskonen, *et al.*, 2004) ont montré, comme pour SRC-1, la capacité de p300 à lier LXR $\alpha$  et à stimuler l'expression du gène *abca1*. Toutefois, une mutation au niveau de l'élément DR4 n'abolit pas complètement la capacité de p300 à stimuler la transcription d'un gène rapporteur, suggérant que ce coactivateur est capable d'agir dans des complexes impliquant d'autres facteurs de transcription que LXR $\alpha$ .

PGC1 $\alpha$  (ou PPARGC1A : *PPAR-Gamma, Coactivator-1*) : Le rôle principal de ce facteur est le recrutement de protéines à activité HAT, notamment CBP/p300 (Puigserver et Spiegelman, 2003). Un modèle intéressant selon lequel PGC-1 $\alpha$  serait couplé aux machineries cellulaires d'élongation, d'épissage, de clivage et de polyadénylation de la transcription est discuté. PGC1 $\alpha$  a été décrit comme un co-activateur de LXR $\alpha$ . Cette activité est dépendante à la fois du motif LXXLL de PGC1 $\alpha$  et d'un LXRE intègre (Oberkofler, *et al.*, 2003).

TRRAP (*Transformation/Transcription Domain-Associated Protein*) : Ce facteur a été initialement identifié sur la base de son interaction avec c-Myc et le facteur de transcription E2F dans les processus de transformation tumorale (McMahon, *et al.*, 1998). Il apparaît que E2F et c-Myc peuvent stimuler la transcription par le recrutement TRRAP qui, à son tour, recrute le co-facteur GCN5 qui porte l'activité HAT (McMahon, *et al.*, 2000 ; Lang, *et al.*, 2001). Il a été montré que TRRAP est un cofacteur de LXR $\alpha$  dans des cellules hépatiques HepG2. De plus, l'inactivation de TRRAP par une stratégie antisens diminue l'expression basale de gènes cibles de LXR $\alpha$  et abolit leur inductibilité par le 22(R)-hydroxy-cholestérol, montrant le rôle clé de TRRAP dans le métabolisme lipidique hépatique (Unno, *et al.*, 2005).



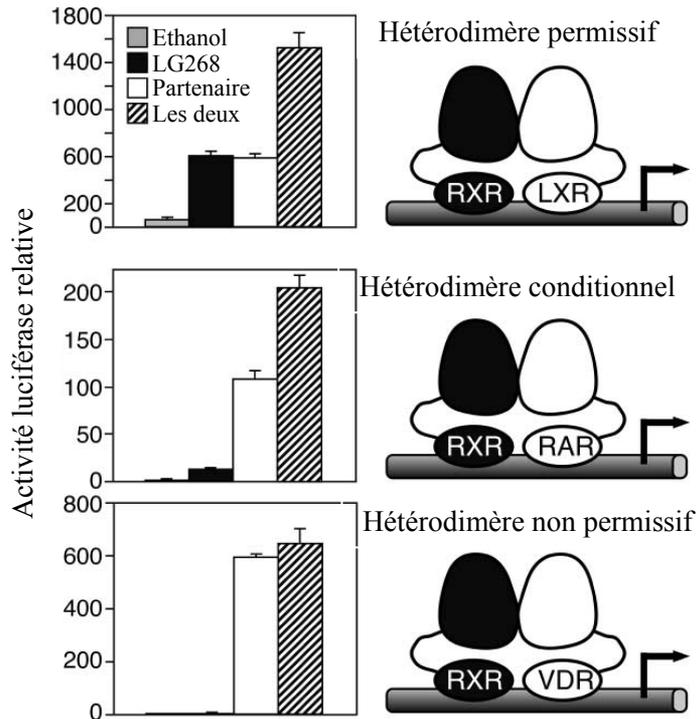
(ii) *Les facteurs affectant la méthylation des histones*

Rap250 (*Nuclear Receptor-Activating Protein* ou NCOA6 ; ASC-2 : *Activating signal cointegrator 2*) : Caira *et al.* (Caira, *et al.*, 2000) ont identifié un facteur capable d'interagir avec de nombreux récepteurs nucléaires. Récemment, il a été montré que Rap250 est recruté par l'activation de RAR $\beta$ . Cette interaction permet le contact d'histones méthyltransférases, permettant la méthylation de l'histone H3 en position Lysine 4 (Lee, *et al.*, 2006). Cette méthylation est connue pour créer un environnement chromatinien permissif pour l'initiation de la transcription (Shilatifard, 2006). Rap250 a été identifié comme un co-activateur interagissant directement avec LXR $\alpha$  au niveau d'un LXRE (Kim, *et al.*, 2003). Les auteurs ont par ailleurs exploité un modèle de souris transgénique qui surexprime un fragment de Rap250 qui contient le second motif LXXLL. Ce fragment agit *in vitro* comme un dominant négatif sur l'activité de LXR $\alpha$  en bloquant le recrutement endogène de Rap250. Lorsque les souris transgéniques sont nourries avec un régime contenant 2% de cholestérol pendant 90 jours, elles développent une stéatose hépatique, semblable au phénotype décrit pour les souris dont le gène codant LXR $\alpha$  a été invalidé (Peet, *et al.*, 1998). Cette étude montre que le contact entre LXR $\alpha$  et Rap250 est primordial pour l'activité de LXR $\alpha$ .

(c) *Les facteurs qui s'associent aux facteurs de transcription généraux*

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 (Malik et Roeder, 2005). Les deux facteurs TRAP220 et DRIP205 ont été décrits comme des co-facteurs de plusieurs récepteurs nucléaires, initialement TR et VDR respectivement, de manière dépendante de la présence du ligand (Aranda et Pascual, 2001). Bien qu'aucune interaction directe entre les LXRs et un membre de ce complexe n'ait à ce jour été décrite, un modèle d'action est à retenir. L'interaction fonctionnelle entre PGC-1 $\alpha$  stimulé par PPAR $\gamma$  et TRAP220 ouvre un rôle potentiel indirect de PGC-1 $\alpha$  dans l'assemblage du complexe de pré-initiation de la transcription (Wallberg, *et al.*, 2003). PGC-1 $\alpha$  étant un coactivateur connu pour les LXRs, un contact indirect avec la machinerie de transcription n'est pas à exclure.

Au total, il apparaît que les LXRs sont capables d'interagir avec un nombre grandissant de coactivateurs, tous capables d'exercer différentes fonctions dans l'initiation de la transcription. De



### Figure 15 : Les différents types d'hétérodimères avec RXR

L'utilisation de ligands spécifiques de RXR (LG268) ou de son partenaire LXR (T0901317), RAR (TTNPB, Kurokawa et al., 1994) ou de VDR (1,25-dihydroxy-vitamine D3) permet de définir trois types d'hétérodimères. Lorsque RXR est silencieux, l'hétérodimère est non permissif (RXR/VDR). L'hétérodimère RXR/RAR est un cas particulier : la fixation du ligand de RXR n'est possible qu'après la liaison du ligand de RAR. L'hétérodimère est dit conditionnel. Enfin, lorsqu'un ligand peut activer RXR quel que soit le statut de son partenaire, l'hétérodimère est dit permissif. Adapté d'après Shulman et al., 2004.

plus en plus, la connaissance du réseau d'interactions fonctionnelles entre les co-facteurs des récepteurs nucléaires se complète et permettra d'associer les récepteurs nucléaires à de nouvelles fonctions physiologiques.

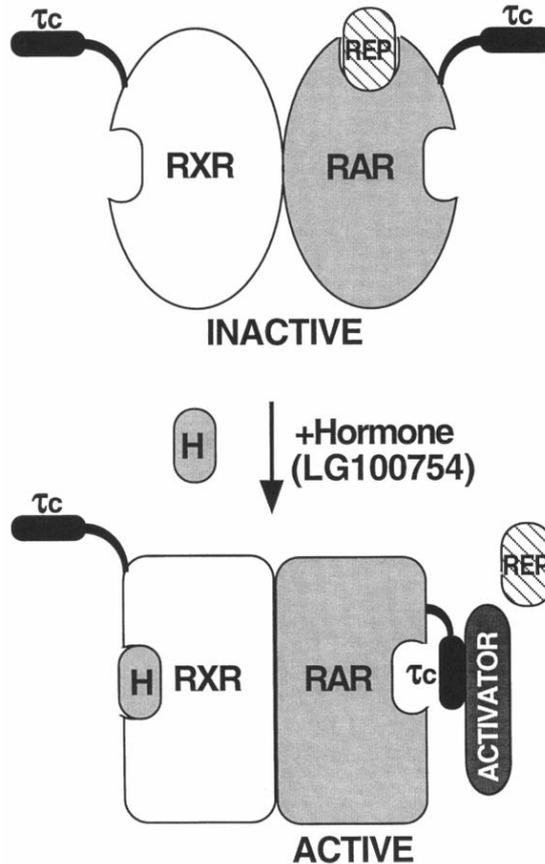
## (2) L'activation transcriptionnelle des gènes cibles

Parmi les récepteurs nucléaires qui forment des hétérodimères avec RXR, on rencontre deux types d'hétérodimères (Fig 15 ; Aranda et Pascual, 2001) :

Les hétérodimères non permissifs : ce type de complexe ne peut pas être activé par le ligand de RXR. Seule la liaison d'un ligand au LBD du partenaire de RXR permet une transactivation des gènes cibles. Dans ce cas, RXR est qualifié de « partenaire silencieux ». Pour ce type d'hétérodimère, l'orientation est toujours identique : RXR occupe la position 5' sur l'élément de réponse tandis que son partenaire occupe la position 3'. On rencontre notamment dans cette catégorie les hétérodimères RXR/TR, RXR/VDR et RXR/RAR. Ce dernier couple présente toutefois une particularité. Alors que le ligand de RXR seul n'est pas capable d'activer l'hétérodimère, la liaison de l'acide rétinoïque *trans* au LBD de RAR autorise la fixation d'un ligand de RXR ce qui augmente la transactivation d'un gène placé sous le contrôle d'un élément de réponse à RAR (RARE ; Minucci, *et al.*, 1997). Shulman *et al.* (Shulman, *et al.*, 2004) qualifient ce dernier d'hétérodimère conditionnel. Un ligand de RXR particulier a été identifié. Le LG10074 agit comme un antagoniste de RXR dans un homodimère RXR/RXR et comme un agoniste dans un hétérodimère RAR/RXR (Lala, *et al.*, 1996). Ce ligand est également capable d'activer un hétérodimère PPAR $\alpha$ /RXR.

Les hétérodimères permissifs : A l'inverse, ce type de récepteurs nucléaires peut être activé à la fois par un ligand de RXR seul ou de son partenaire. L'orientation sur l'ADN de ces hétérodimères est différente : RXR occupe la position 3' et son partenaire la position 5'. On rencontre notamment parmi ces hétérodimères PPAR/RXR et FXR/RXR. Il existe toutefois une exception à cette orientation. Dans le complexe RXR/LXR, RXR est en 5' du LXRE et LXR en 3' (Willy et Mangelsdorf, 1997). Cependant, en dépit de cette orientation inhabituelle, la fixation d'un ligand de RXR ou de LXR active le complexe. En présence des deux ligands, l'activation est additive voire synergique selon le gène cible considéré. Les auteurs soulèvent ainsi l'hypothèse que la permissivité d'un hétérodimère ne dépend pas de sa polarité sur l'élément de réponse mais du type de partenaires protéiques recrutés ainsi que de la séquence de l'élément de réponse.

Le mode d'action des LXRs est particulier. En effet, la mutation de la fonction AF2 de RXR ne perturbe pas l'activation de l'hétérodimère RXR/LXR par un ligand de RXR. En revanche, la mutation de l'AF2 de LXR abolit l'induction de gènes placés sous le contrôle d'un LXRE. Ces



**Figure 16 : L'effet « *phantom ligand* »**

Représentation schématique de l'effet « *phantom ligand* » de l'hétérodimère RXR/RAR en présence de LG100754. Cet effet est identique dans le cas de l'hétérodimère RXR/LXR. La fixation du ligand de RXR provoque un changement de conformation de son partenaire RAR, avec le démasquage de la fonction AF2 (ou fonction  $\tau$ c), induisant le départ des co-répresseurs (REP) et le recrutement des co-activateurs au niveau de l'AF2 de RAR. D'après Schulman et al., 1997.

données montrent que la liaison d'un ligand de RXR à son LBD induit un changement de conformation allostérique de son partenaire LXR, impliquant la fonction AF2 de LXR et induisant l'expression génique. Cet effet est qualifié d'effet « *phantom ligand* ». En effet, la liaison d'un ligand de RXR à son LBD mime la fixation d'un ligand de LXR, qui se comporte comme un récepteur avec son ligand (Fig 16 ; Willy et Mangelsdorf, 1997). Un effet similaire a été observé pour l'hétérodimère RXR/RAR (Schulman, *et al.*, 1997). Noter qu'un effet « *phantom ligand* » existe pour RXR/VDR (Bettoun, *et al.*, 2003). Dans ce cas, la fixation d'un ligand de VDR induit l'activation de RXR, qui acquiert la capacité à recruter plusieurs co-activateurs. Alors que l'hétérodimère RXR/VDR n'est pas capable d'initier la transcription d'un gène cible en réponse à un ligand de RXR, les auteurs complètent le mode d'action de RXR/VDR et montrent que RXR n'est pas silencieux mais est un acteur majeur de la transcription dépendante de la vitamine D3.

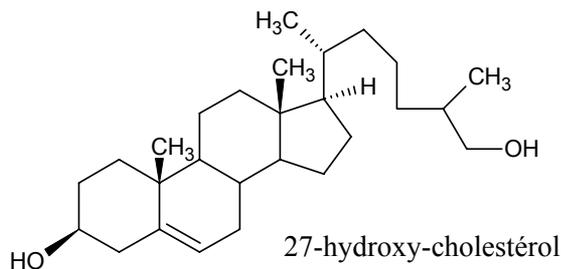
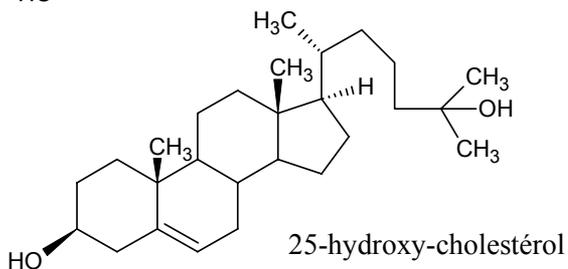
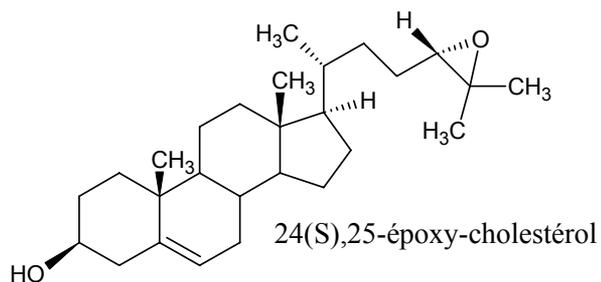
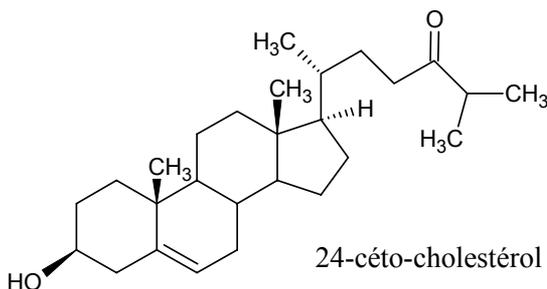
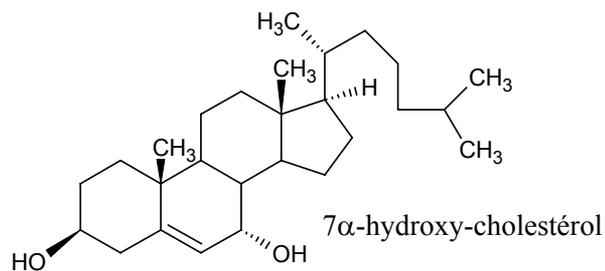
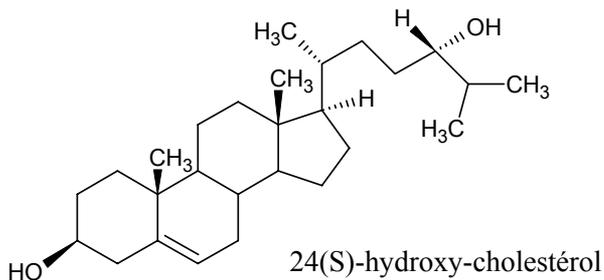
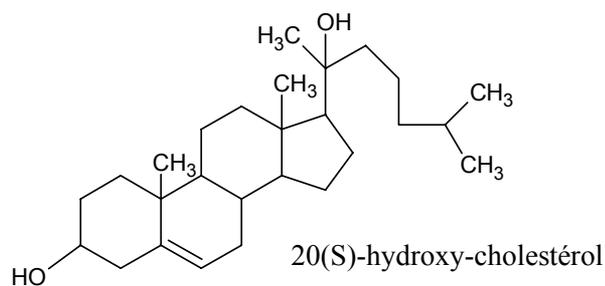
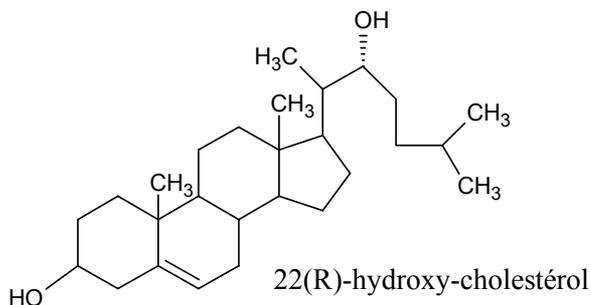
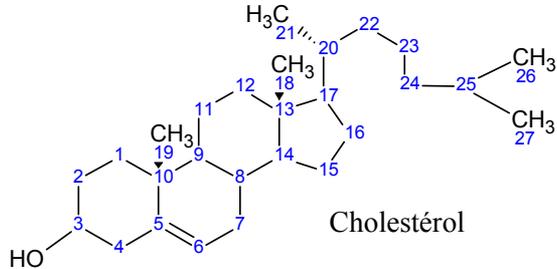
## C. Régulation de l'activité transcriptionnelle des LXRs

### 1. Les ligands agonistes naturels

#### a) *Les dérivés du cholestérol*

##### (1) Les oxystérols

Les oxystérols sont des molécules dérivées du cholestérol produites par oxydation ou hydroxylation (Pour une revue, voir Schroepfer, 2000). Ces molécules peuvent dans l'organisme avoir deux origines : une origine endogène, par une synthèse chimique et enzymatique, et une origine exogène, par un apport alimentaire. On peut schématiquement considérer les oxystérols comme des précurseurs des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes. Les LXRs ayant été découverts sur la base de leur homologie de séquence avec d'autres récepteurs nucléaires, la nature de leurs ligands naturels était initialement inconnue. Les premiers cribles d'un ligand des LXRs ont été effectués en utilisant un récepteur chimérique comprenant le LBD de LXR $\alpha$  couplé au DBD du facteur de transcription de levure GAL4 (Janowski, *et al.*, 1996). Par la mesure des taux d'induction d'un gène rapporteur sensible à GAL4, les auteurs ont testé les capacités transactivatrices de plus de 70 composés. Parmi ceux-ci, une série d'oxystérols capables d'activer les LXRs ont été identifiés (Fig 17). L'analyse structurale de ces derniers a révélé l'importance du groupement hydroxyl (OH) en position 3 et d'un autre groupement OH, dont la position peut être variable sur la chaîne latérale de la

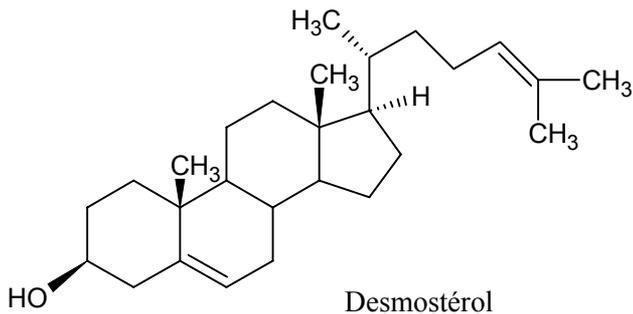
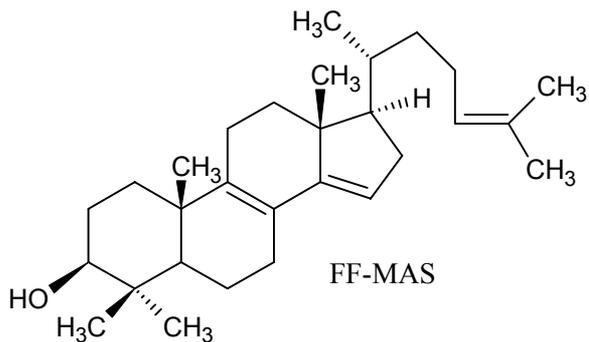


**Figure 17: Les ligands agonistes naturels dérivés du cholestérol : les oxystérols**

Structure chimique des oxystérols connus pour être ligands des LXR. La formule du cholestérol est représentée et ses atomes de carbones numérotés. La position du groupement hydroxyl de l'oxystérol lui confère son nom.

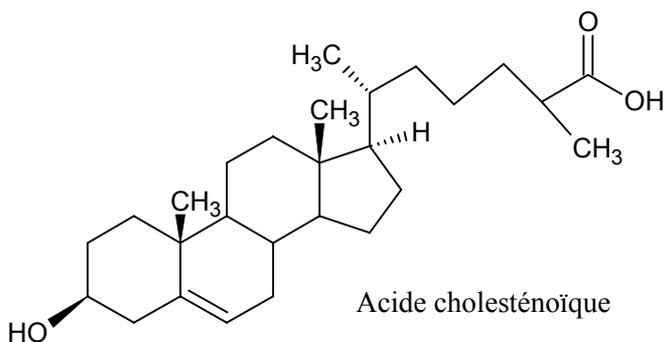
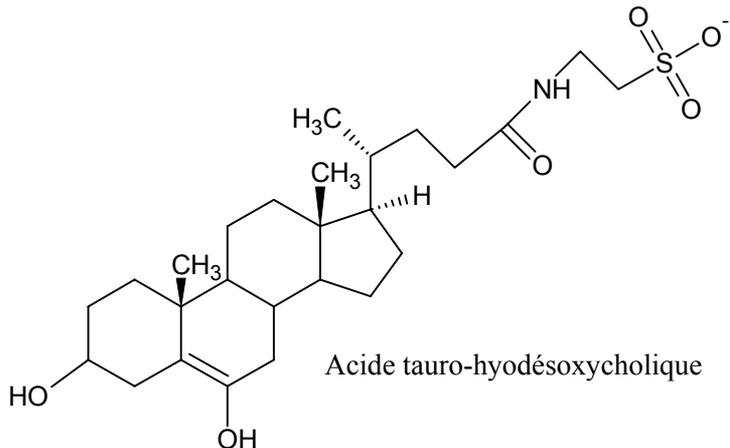
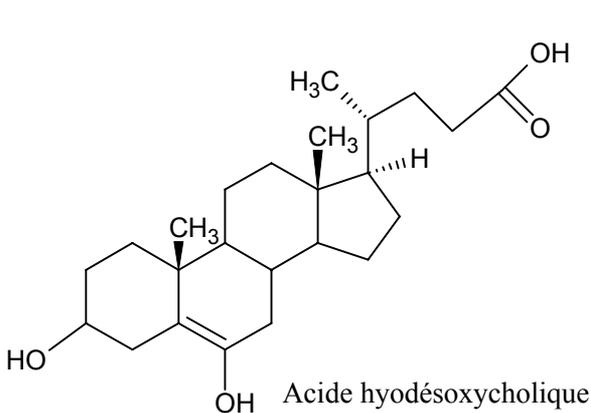
molécule. Les oxystérols ayant révélé les meilleurs facteurs d'induction dans cette étude sont : le 22(R)-hydroxy-cholestérol, le 20(S)-hydroxy-cholestérol, le 24-hydroxy-cholestérol et le 7 $\alpha$ -hydroxy-cholestérol. Par une étude similaire, une autre équipe a pu identifier d'autres oxystérols comme étant de forts inducteurs de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , notamment le 24-céto-cholestérol et le 24(S),25-époxy-cholestérol (Lehmann, *et al.*, 1997). Le développement de techniques de scintillation de proximité (SPA : *Scintillation Proximity Assay*) a permis de contourner les problèmes associés à la nature très hydrophobe des oxystérols. Il a ainsi été montré une liaison directe de ces derniers avec le LBD de LXR $\alpha$  et de LXR $\beta$  (Janowski, *et al.*, 1999). Cette étude a par ailleurs révélé que des oxystérols synthétiques portant plus d'un groupement OH sur la chaîne latérale ont une capacité de liaison bien moindre que leurs homologues mono-oxydés. Il est intéressant de remarquer que les lieux de synthèse des oxystérols peuvent varier selon leur nature (Pour une revue, lire Souidi, *et al.*, 2004). Le 22(R)-hydroxy-cholestérol est produit majoritairement au niveau des organes stéroïdogènes ; le 24(S)-hydroxy-cholestérol (ou cérébrostérol) est trouvé en fortes concentrations dans le cerveau et le plasma ; le 27-hydroxy-cholestérol est rencontré principalement dans le plasma et les macrophages. Le 24(S),25-époxy-cholestérol présent essentiellement dans le foie, contrairement aux autres oxystérols, provient d'une voie dérivée de la voie du mévalonate en amont de la synthèse du cholestérol. Le 27-hydroxy-cholestérol, qui avait déjà été identifié comme un ligand de LXR $\alpha$  (Janowski, *et al.*, 1996), est produit par voie enzymatique par la 27-hydroxylase. La sur-expression de cette enzyme dans des cultures cellulaires induit des gènes cibles des LXRs (Fu, *et al.*, 2001). Tandis que dans des fibroblastes humains cultivés en présence de cholestérol, une induction du gène cible des LXRs *abca1* est observée, cette réponse est complètement abolie dans des fibroblastes humains déficients pour la 27-hydroxylase. A l'inverse, une activation de la transcription d'*abca1* est provoquée par un apport exogène de 24(S),25-époxy-cholestérol. Ces travaux montrent que l'activation des LXRs par le cholestérol se fait par l'intermédiaire du 27-hydroxy-cholestérol, suggérant ainsi que cet oxystérol est un ligand endogène des LXRs.

Récemment, Wong *et al.* (Wong, *et al.*, 2007) ont montré une corrélation entre la synthèse du 24(S),25-époxy-cholestérol et celle du cholestérol. Cette étude montre également que cet oxystérol permet à la fois de réguler négativement la synthèse de cholestérol endogène ainsi que sa propre synthèse, mais aussi de stimuler l'efflux de cholestérol par l'augmentation transcriptionnelle d'*abca1* dépendante de LXR. Les auteurs proposent un modèle selon lequel le 24(S),25-époxy-cholestérol sert de « soupape de sécurité » pour protéger des élévations de cholestérol intracellulaire. La preuve définitive du rôle physiologique des oxystérols comme ligands des LXRs a été apportée par Chen *et al.* (Chen, *et al.*, 2007). La sur-expression de la *cholesterol sulfotransferase* SULT2B1b bloque à la fois la capacité des oxystérols à activer les LXRs et la signalisation endogène par ces récepteurs dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat, alors que leur capacité à répondre à un ligand synthétique exogène est complètement conservée. Cette enzyme, présente majoritairement au niveau de la peau,



**Figure 18 : Les ligands agonistes naturels, autres stérols dérivés du cholestérol**

Structure chimique du FF-MAS et du desmostérol. Ces deux molécules sont situées en amont de la synthèse du cholestérol. FF-MAS : *Follicular Fluid Meiosis Activating Sterol*.



**Figure 19 : Les ligands agonistes naturels, autres stérols dérivés de la voie des acides biliaries**

Structure chimique de certains acides biliaries connus pour activer les LXRs.

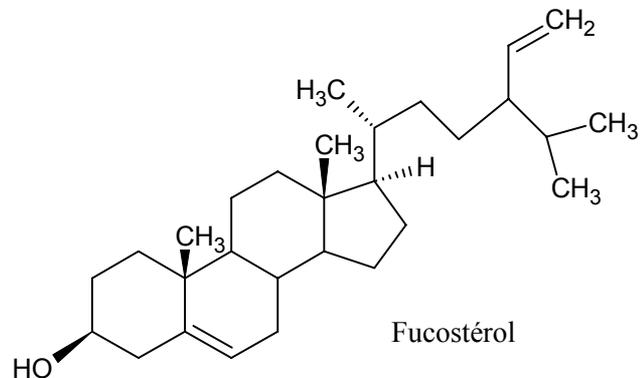
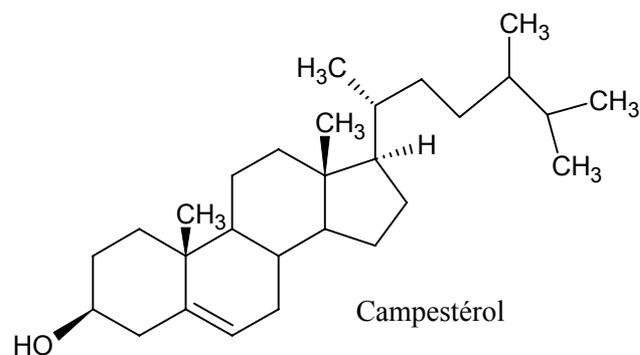
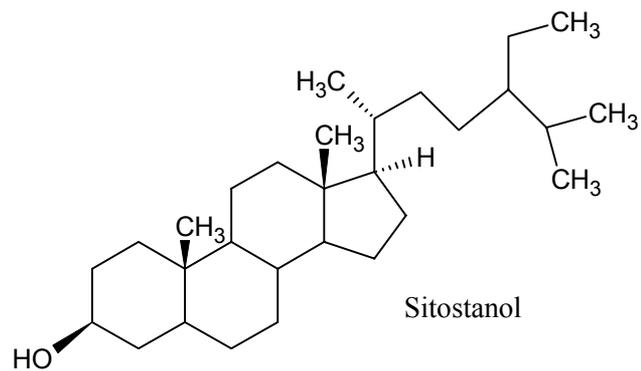
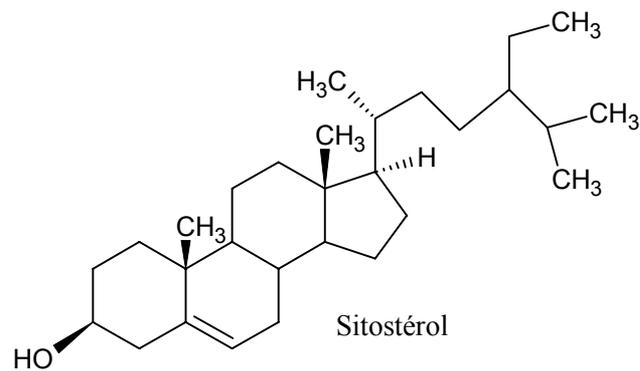
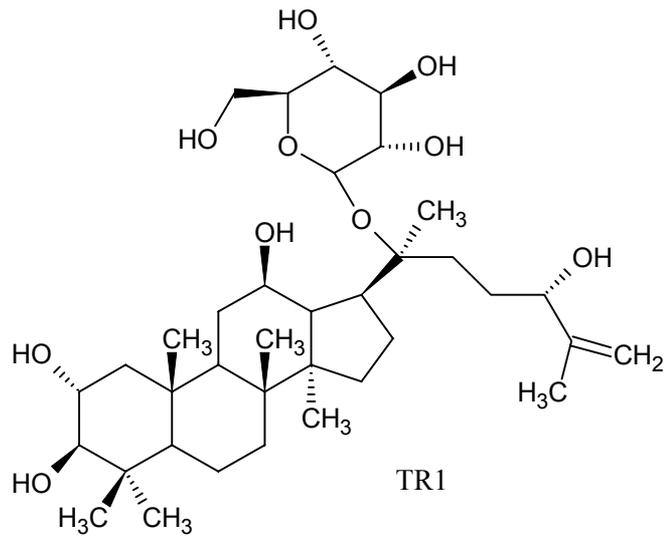
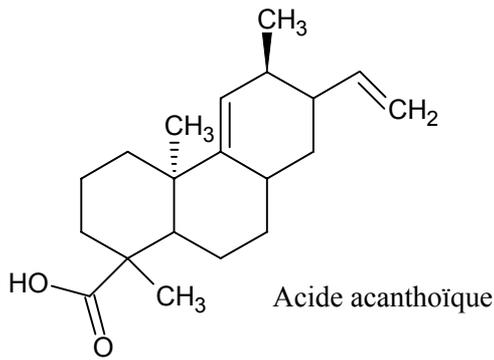
catalyse la sulfonation (transfert d'un groupement  $\text{SO}_3^{-1}$ ) des stérols et des oxystérols (pour une revue, voir Strott, 2002). Ces données montrent que la métabolisation des oxystérols conduit à un blocage de la signalisation par les LXRs. Des souris dont les trois gènes codant les enzymes catalysant la biosynthèse de 24(S)-hydroxycholestérol, 25-hydroxy-cholestérol et 27-hydroxy-cholestérol ont été invalidés perdent la capacité à induire plusieurs gènes cibles des LXRs par le cholestérol alimentaire, tandis qu'un agoniste synthétique non métabolisable conserve cette propriété. Cette étude est la première montrant que les oxystérols sont non seulement des ligands activateurs *in vitro* mais aussi endogènes des LXRs. Le  $K_i$  de ces oxystérols ligands des LXRs est de l'ordre de 10 à 40  $\mu\text{M}$  (Janowski, *et al.*, 1999), concentrations similaires à celles trouvées dans les cellules (pour une revue, voir Schroeffer, 2000). Au total, ces récepteurs nucléaires peuvent être qualifiés de « senseurs » du cholestérol intracellulaire et ont donc définitivement perdu leur statut de récepteur nucléaire orphelin.

## (2) Les autres stérols

### (a) Dérivés du cholestérol

Parallèlement aux oxystérols, qui sont des métabolites actifs du cholestérol, d'autres ligands de la même famille ont été identifiés (Fig 18). La première recherche d'extraits activateurs a conduit à un extrait de lipides de testicule de taureau (Janowski, *et al.*, 1996). L'analyse de cet extrait par chromatographie HPLC (*High-Pressure Liquid Chromatography*) a permis l'identification d'un composé apparenté aux stérols activateurs de la méiose (MAS : *Meiosis Activating Sterol*). Un de ces composés, le FF-MAS (*Follicular Fluid-MAS*) est un puissant activateur de  $\text{LXR}\alpha$ .

Le desmostérol est un précurseur du cholestérol dans la voie de biosynthèse issue du zymostérol. Yang *et al.* (Yang, *et al.*, 2006) ont montré que le desmostérol est un ligand activateur de  $\text{LXR}\alpha$  et  $\text{LXR}\beta$ , capable de déplacer la liaison du 24(S),25-époxy-cholestérol, de recruter SRC-1 et d'activer la transcription d'*abca1*. Il est important de noter que les propriétés activatrices de ce composé sur les LXRs sont préservées en l'absence de 24-, 25- et 27-hydroxylases, suggérant que cette molécule agit directement sans passer par un intermédiaire oxystérol.



**Figure 20 : Les ligands agonistes naturels, autres stérols d'origine microbienne et végétale**  
 Formule chimique de plusieurs composés isolés d'extraits végétaux ou microbiens connus pour être ligands des LXRs. L'acide acanthoïque ne possède pas de noyau stérol mais une structure de type diterpénoïde.

(b) *Dérivés de la voie des acides biliaires*

La voie de synthèse des acides biliaires permet la prise en charge de près de 50% du cholestérol de l'organisme (pour une revue, voir Lobaccaro, *et al.*, 2001). Les acides biliaires sont des catabolites du cholestérol produits par deux voies distinctes : la voie « classique » ou neutre et la voie « alterne » ou acide. La voie classique est initiée par la *cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase* (Cyp7A1) et permet la production d'acide cholique et chénodésoxycholique (CDCA ; *Chenodeoxycholic Acid*). La voie alterne débute par une activité 27-hydroxylase et mène à la formation de CDCA (Vlahcevic, *et al.*, 1997). Dans ce cas, la 27-hydroxylase catalyse la production de 27-hydroxy-cholestérol et la réaction suivante, aboutissant à la formation d'acide cholesténoïque. Les acides biliaires sont connus pour activer le récepteur nucléaire FXR, responsable notamment de leur réabsorption intestinale. Cependant, l'acide cholesténoïque, précurseur du CDCA est capable d'induire la transcription par LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un LXRE et de recruter Grip1 (Fig 19 ; Song et Liao, 2000). Une autre voie alternative de la synthèse des acides biliaires implique une hydroxylation en position 6 $\alpha$  des acides biliaires déjà formés (Araya et Wikvall, 1999). Cette réaction peut être catalysée par le cytochrome P450 CYP3A4. La même équipe a montré que plusieurs 6 $\alpha$ -hydroxy-acides biliaires étaient des agonistes des LXRs, notamment l'acide hyodésoxycholique et son conjugué à la taurine, l'acide tauro-hyodésoxycholique (Song, *et al.*, 2000). Ces ligands sont aussi capables d'activer LXR $\beta$  mais à des concentrations beaucoup plus importantes. Prises ensemble, ces deux études ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'étude des LXRs dans le contrôle des mécanismes par lesquels les acides biliaires peuvent moduler le métabolisme du cholestérol.

(c) *D'origines microbiennes et végétales*

Actuellement, certaines études sont basées sur des cribles à large spectre de substances activatrices des LXRs par SPA. L'utilisation de cette technique a permis l'identification de molécules présentes dans des extraits fongiques microbiens (Fig 20) ; les propriétés transactivatrices de ces molécules ont par la suite été validées par la mesure du recrutement de SRC-1 (Ondeyka, *et al.*, 2005). Ainsi, la fixation de l'ergostan4,6,8,22-tetraen-3-one à LXR $\alpha$  est-elle capable de recruter SRC-1, tandis qu'aucune liaison à LXR $\beta$  n'a été observée. Une molécule similaire dans laquelle le groupement méthyl a migré du carbone 10 au carbone 6 du groupement aromatique stéroïde permet la fixation au LBD de LXR $\beta$ , sans possibilité de recruter SRC-1. Toutefois, l'association de LXR $\alpha$  et du coactivateur est diminuée, avec une stimulation maximale de 36%. Le peroxyde d'ergostérol montre

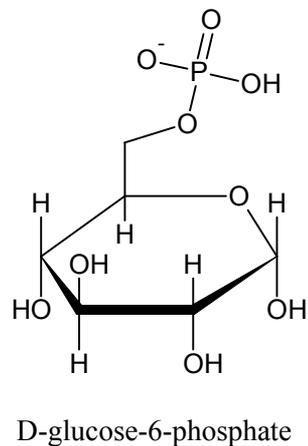
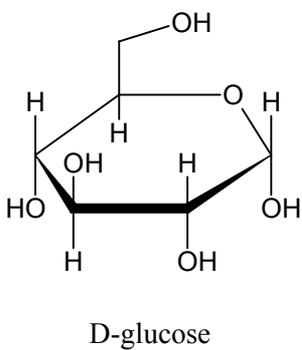
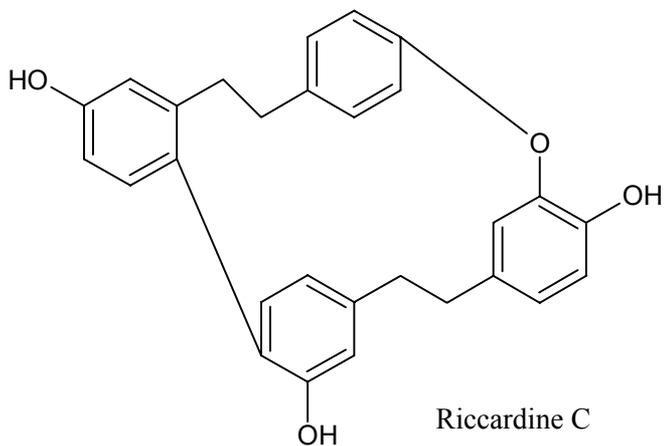
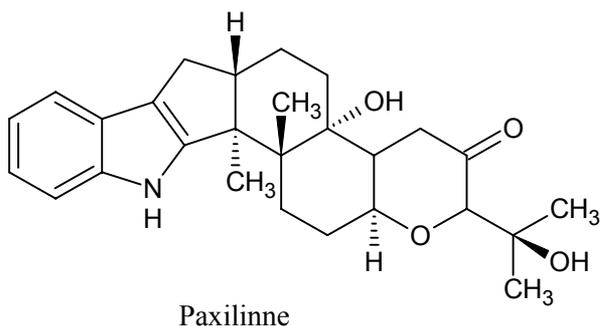


également une activité agoniste spécifique de LXR $\alpha$ . Toutefois, aucune des molécules identifiées lors de cette étude n'a été capable d'induire la transcription d'un gène rapporteur par LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$ .

Par le même type de crible à large spectre, la même équipe a identifié plusieurs composés d'origine végétale ou marine capables de fixer les LXRs (Jayasuriya, *et al.*, 2005). Parmi ces composés, seuls quatre sont capables de contacter SRC-1 et d'initier la transactivation induite par les LXRs. L'acide acanthoïque, extrait de racines d'arbres tropicaux du genre *Rollinia*, ne possède pas de noyau stérol. Toutefois, il possède une structure de type diterpénoïde. Ce composé est capable d'activer la transcription induite par LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , mais à des concentrations importantes (100  $\mu$ M). Ce crible a également conduit à l'identification de polycarpol et de deux gorgostérols, issus de récifs coralliens. Par ailleurs, ces trois dernières molécules, bien que capables de lier LXR $\beta$  en SPA, sont incapables de recruter un coactivateur ni de permettre l'initiation de la transcription.

La plante de la famille des Cucurbitacées *Gynostemma pentaphyllum*, connue sous le nom de Jiagulan en phytothérapie chinoise possède de multiples vertus thérapeutiques. Les principes actifs supposés extraits de ces plantes sont des saponines du type du dammarane, appelées gypenosides ou gynosaponines. Basés sur l'homologie structurale avec les oxystérols, Huang *et al.* (Huang, *et al.*, 2005) ont recherché d'éventuelles propriétés agonistes des LXRs. Les auteurs ont ainsi identifié une molécule (le (20S)-2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 12 $\beta$ , 24(S)-pentahydroxydammar-25ène 20-O-b-D-glucopyranoside, ou gynosaponine TR1) capable d'activer l'expression du gène luciférase placé sous le contrôle de LXREs ; cet effet est toutefois spécifique de LXR $\alpha$ . L'ajout de TR-1 à des macrophages en culture permet une accumulation des ARNm de *lxra* et *abca1*, cibles des LXRs. La qualité de ligand ainsi que la spécificité pour LXR $\alpha$  de TR1 ont été montrées par l'obtention de modélisation de la structure tridimensionnelle obtenue par cristallographie.

Une alimentation riche en stérols et stanols végétaux permet une diminution des concentrations circulantes des LDL, réduisant le risque athérosclérotique (pour une revue, de Jong, *et al.*, 2003). Plat *et al.* (Plat, *et al.*, 2005) ont étudié les propriétés agonistes de ces composés végétaux sur les deux isoformes des LXRs. Les molécules de type 4-desméthylstérols (sitostérol, sitostanol, campestérol, campestanol et fucostérol) sont capables d'induire l'association de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  avec un peptide dérivé de SRC-1. Bien que cette étude n'apporte pas d'éléments indiquant une liaison directe de ces composés avec les LXRs, il est montré qu'ils sont capables, à l'exception du campestanol, d'induire la transcription du gène *abca1* dans des cultures de cellules Caco2. A l'inverse, lors d'une autre étude, un récepteur chimérique formé par le LBD de LXR $\alpha$  couplé au DBD de GAL4 n'est pas capable d'induire la transcription du gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'éléments de réponse à GAL4 en présence de sitostérol dans des cellules CHO-7, suggérant l'importance du contexte cellulaire dans cette activation (Yang, *et al.*, 2004). En revanche, le stigmastérol se comporte



**Figure 21 : Les ligands agonistes naturels, non stérols**

Structure chimique des ligands des LXR $\alpha$  ne possédant pas de noyau stérol. Noter que la riccardine C est un agoniste partiel de LXR $\alpha$  et un antagoniste de LXR $\beta$ . Le D-glucose et le D-glucose-6-phosphate sont les seuls ligands hydrophiles des LXR $\alpha$  connus à ce jour.

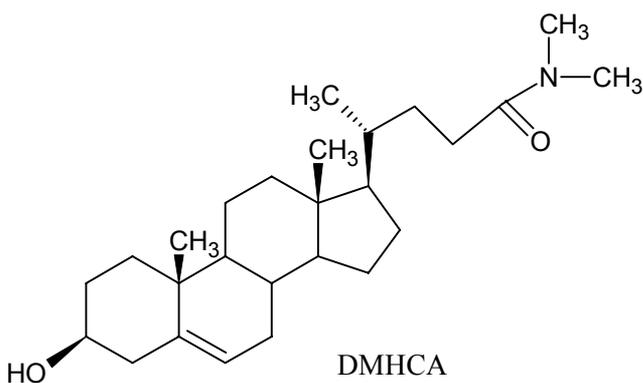
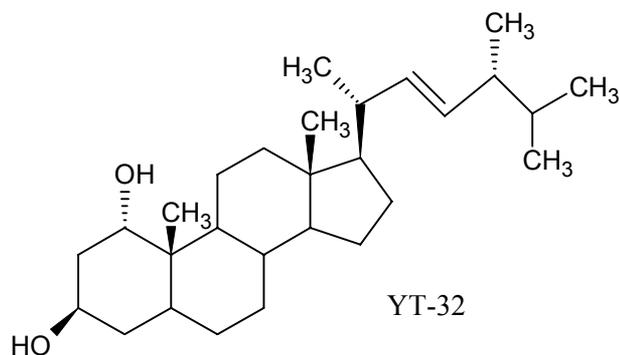
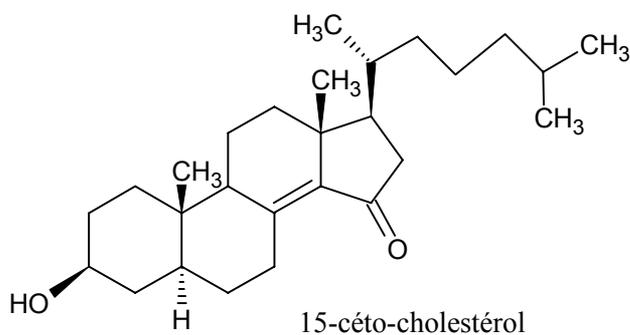
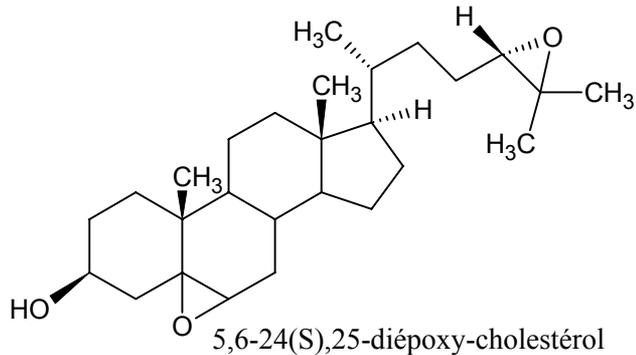
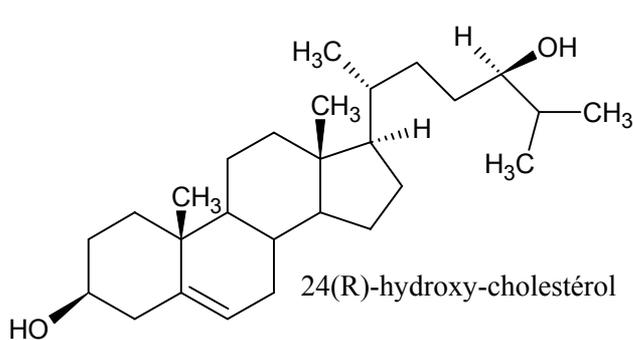
dans ce cas comme un activateur de la transcription ; cette activation est de plus abolie par l'ajout d'arachidonate, un antagoniste connu des LXRs, suggérant que le stigmastérol pourrait être un ligand activateur.

b) *Les ligands naturels non oxystérols*

Le premier ligand nature non oxystérol, identifié lors d'un crible de composés capables de moduler l'activité des LXRs, est un métabolite de type alcaloïde indole, la paxilline, issu du champignon *Penicillium paxilli* (Fig 21 ; Bramlett, *et al.*, 2003). La paxilline a la propriété de lier LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  avec un Ki de 660 nM et 1100 nM respectivement et de provoquer le recrutement de SRC-1 et TIF-2. L'ajout de cette molécule en culture de cellules permet l'activation d'un gène rapporteur sous le contrôle de LXREs avec la même efficacité que le 22(R)-hydroxy-cholestérol et de gènes cibles naturels des LXRs : *abca1* et *srebplc*. Cependant, la paxilline est une mycotoxine qui provoque de graves troubles neurologiques. Cet effet toxique est dû à une inhibition de canaux potassiques (Knaus, *et al.*, 1994), à des concentrations de l'ordre de 100  $\mu$ M, rendant son utilisation potentielle délicate en thérapeutique.

La riccardine C et la riccardine F sont des molécules dimériques macrocycliques bis(bibenzyle) extraites de l'hépatique *Blasia pusilla*. La riccardine C permet le contact entre LXR $\alpha$  et SRC-1, l'activation du gène luciférase en aval d'un promoteur contenant des LXREs et une augmentation de l'accumulation des ARNm des gènes cibles des LXRs : *abca1*, *abcg1* et *srebpl-c* (Tamehiro, *et al.*, 2005). Ce pouvoir activateur n'est cependant observé qu'en présence de LXR $\alpha$  et pas de LXR $\beta$ . De plus, l'augmentation des messagers des gènes *abcg1* et *srebpl-c* ne se produit que dans des cultures de cellules THP-1 et pas HepG2, montrant l'importance du contexte cellulaire dans le rôle de la riccardine C. Il est intéressant de remarquer que la riccardine C et la riccardine F sont capables d'entrer en compétition avec un ligand naturel ou synthétique des LXRs, suggérant que : (1) la riccardine C est un agoniste partiel de LXR $\alpha$ , (2) un antagoniste de LXR $\beta$  et (3) la riccardine F est un antagoniste des deux isoformes. Cette étude est la première à mettre en évidence une molécule possédant des propriétés inverses sur les deux isoformes des LXRs et ouvre de nouvelles perspectives quant à l'étude *in vivo* du mode d'action de ces deux récepteurs nucléaires et à l'identification de nouveaux gènes cibles.

Récemment, le D-glucose et le D-glucose-6-phosphate (G6P) ont été décrits comme des activateurs des deux isoformes des LXRs (Mitro, *et al.*, 2007a). Cette étude a apporté au glucose et au G6P la plupart des critères admis pour les qualifier de ligands agonistes. Ils permettent l'activation d'un gène rapporteur sensible à GAL4 par un récepteur chimérique [Gal4 DBD-LXR $\alpha/\beta$  LBD],



**Figure 22 : Les ligands agonistes oxystérols synthétiques**

Structure chimique des oxystérols synthétiques activateurs des LXR. Notons le mode d'action particulier du YT-32, qui ne provoque pas d'hypertriglycéridémie et du DMHCA qui a un pouvoir très limité d'induction des gènes de la lipogenèse.

l'induction du gène luciférase en aval de LXREs et le recrutement de SRC-1. Des études de Scatchard et de SPA montrent à la fois leur capacité à se fixer directement aux LXRs et à déplacer un agoniste synthétique connu (le T0901317). Toutefois, le fait que des ligands hydrophobes avérés soient incapables de déplacer complètement la liaison du glucose aux LXRs et que le glucose soit capable de potentialiser l'effet agoniste du T0901317 ont fait émettre aux auteurs l'hypothèse qu'il existe plusieurs sites de liaison au glucose sur ces récepteurs nucléaires. *Ex vivo*, le glucose stimule l'expression de plusieurs gènes cibles connus et potentialise la stimulation induite par des ligands connus. *In vivo*, des souris à jeun réalimentées par un régime riche en glucose présentent une augmentation d'ARNm de gènes cibles des LXRs au niveau hépatique. Cette étude est la première à reporter une activation de ces récepteurs nucléaires par un ligand hydrophile. Toutefois, ces travaux sont controversés. Lazar et Willson (Lazar et Willson, 2007) doutent de la réalité physiologique de l'interaction entre le D-glucose, le L-glucose, le G6P et les LXRs. En effet, les auteurs sont surpris par le fait que le G6P, qui est incapable d'entrer efficacement dans les cellules, soit capable d'activer les LXRs au sein des noyaux. De plus, le L-glucose est absent chez les mammifères, inactif dans la plupart des réactions biologiques et n'est pas reconnu par la glucokinase, qui contrôle la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas. Par ailleurs, le D-glucose est actif à des concentrations de l'ordre du millimolaire, bien supérieures à toutes les concentrations décrites pour les ligands des récepteurs nucléaires connus. Enfin, à ce jour, seuls des ligands lipophiles ont été décrits comme activateurs des NRs.

## 2. Les ligands agonistes synthétiques

### a) *Les oxystérols synthétiques*

Lors des premiers travaux visant à découvrir les ligands des LXRs, les oxystérols ont été les premiers candidats. Parmi eux, certains oxystérols synthétiques ont un pouvoir d'activation (Fig 22). Ainsi, le 24(R)-hydroxy-cholestérol est-il capable d'activer un récepteur chimérique Gal4 DBD-LXR $\beta$  LBD et de permettre l'initiation d'un gène rapporteur sensible à Gal4 (Lehmann, *et al.*, 1997). Toutefois, le facteur d'induction est faible par rapport aux autres ligands potentiels testés. Ce pouvoir activateur a été confirmé par une autre étude (Janowski, *et al.*, 1999) pour LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , mais cet oxystérol se révèle être un faible activateur par rapport au stéréoisomère naturel : le 24(S)-hydroxy-cholestérol.

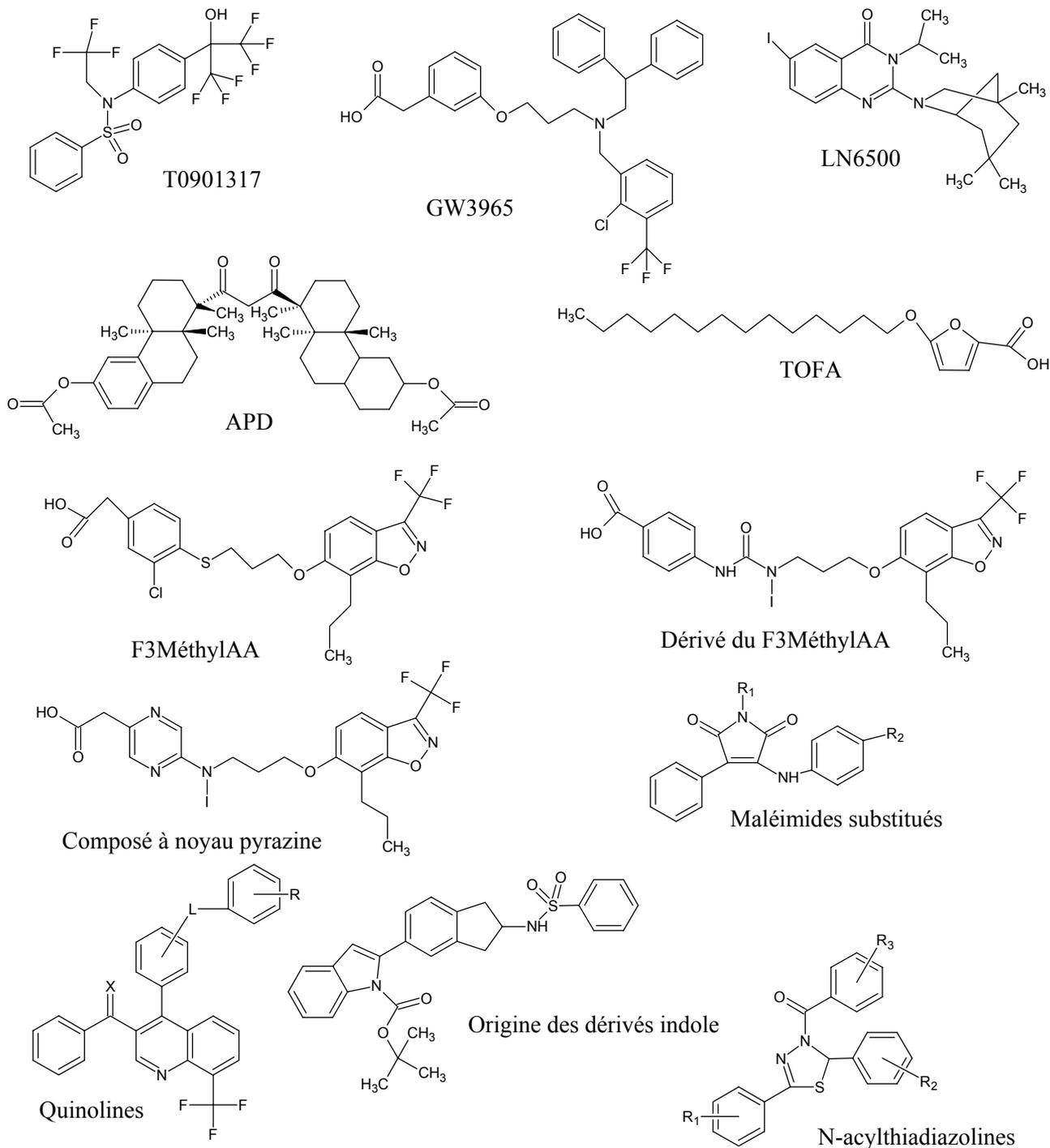
De même, dans leur recherche de ligands, Janowski *et al.* (Janowski, *et al.*, 1999) ont introduit une seconde fonction époxy en position 5,6 au 24(S),25-époxy-cholestérol. L'oxystérol synthétique



créé, le 5,6-24(S),25-diépoxy-cholestérol conserve la même affinité pour LXR $\alpha$  et la même efficacité que le 24(S),25-époxy-cholestérol, mais son affinité pour LXR $\beta$  et son pouvoir agoniste sur cette isoforme diminuent fortement.

La 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholest-8(14)-en-15-one (15-cétostérol) est un oxystérol synthétique connu pour avoir un effet hypocholestérolémiant chez les rongeurs (Schroepfer, *et al.*, 1977a), capable d'inhiber l'activité *HMG-CoA reductase* en culture de cellules (Schroepfer, *et al.*, 1977b). Ce composé est un ligand agoniste des deux isoformes des LXRs capable de recruter SRC-1 et d'induire l'expression du gène *abca1* dans des cultures de cellules THP1 (Schmidt, *et al.*, 2006). Cet effet est toutefois modeste comparé à celui du T0901317. Il est à noter que ce composé est capable d'inhiber le clivage protéolytique de SREBP2, bloquant ainsi son activation et l'expression de son gène cible codant l'enzyme HMG-CoA Reductase.

Parmi les fonctions physiologiques attribuées aux LXRs, leur rôle hypocholestérolémiant crée un challenge thérapeutique dans la découverte de molécules à destinée anti-athérosclérotique (voir chapitre D). Toutefois, par l'activation de gènes impliqués dans la synthèse de triglycérides, les LXRs ont un rôle hypertriglycéridémiant, rendant l'utilisation des ligands agonistes actuellement disponibles impossible en thérapeutique humaine (Volle, *et al.*, 2005, annexe 3). C'est pourquoi le développement de molécules activatrices des LXRs pouvant exercer un rôle hypocholestérolémiant sans effet sur le métabolisme des triglycérides est actuellement un domaine d'intérêt. Les phytostérols sont des molécules connues pour diminuer le taux de cholestérol sanguin et pour activer l'expression d'*abca1* (Plat et Mensink, 2002), menant les auteurs à l'hypothèse selon laquelle les phytostérols sont des activateurs des LXRs. Ainsi plusieurs stérols d'origine végétales ont été testés (Kaneko, *et al.*, 2003). Aucun phytostérol naturel n'a été capable d'activer LXR $\alpha$ . Cependant, le (22E)-ergost-22-ène-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diol (YT-32), un dérivé de l'ergostérol, présente un fort pouvoir agoniste, capable de recruter différents coactivateurs. L'administration d'YT-32 par voie orale à des souris provoque une accumulation des messagers codant *abca1*, *abcg5* et *abcg8* au niveau intestinal ; aucun effet n'est observé sur ces gènes au niveau hépatique. De plus, ce composé inhibe l'absorption intestinale de cholestérol et n'a aucun effet sur la triglycéridémie. Cette étude montre pour la première fois une spécificité tissulaire pour un ligand des LXRs. Deux hypothèses sont avancées par les auteurs pour expliquer cet effet. La structure stéroïde du YT-32 peut en faire un substrat des transporteurs intestinaux du cholestérol, favorisant son efflux intestinal. Les faibles quantités de YT-32 qui atteindraient la circulation sanguine pourraient avoir des propriétés anti-athérosclérotiques. Au niveau hépatique, le YT-32 serait exporté vers la bile avant d'avoir eu le temps de stimuler la synthèse de triglycérides. La seconde hypothèse évoquée est basée sur une spécificité tissulaire de recrutement de coactivateurs. En effet, le YT-32 permet un recrutement plus important de DRIP205 et ACTR que les autres ligands testés.



**Figure 23 : Les ligands agonistes synthétiques non stéroïds**

Structure chimique de la plupart des ligands synthétiques activateurs des LXRs. Le T0901317 et le GW3965 sont actuellement les ligands les plus utilisés dans l'étude des LXRs. Les maléimides substitués, quinolines et N-acylthiadiazolines montrés ici sont une représentation du squelette commun à plusieurs molécules activatrices. Le ligand des LXRs intégré à une stratégie SAR à l'origine des dérivés indole est indiqué. Les dérivés de l'APD ne sont pas représentés. APD : dimère acétyl-podocarpique ; TOFA : acide 5-tétradécyloxy-2-furancarboxylique ; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> : radicaux 1, 2 et 3 ; L : « linker » : X : O ou H,H.

Basés sur le fait que la présence d'un atome d'oxygène nucléophile sur le carbone 24 semble être une configuration favorable pour être un activateur efficace, Janowski *et al.* (Janowski, *et al.*, 1999) ont introduit une fonction ester (méthyl-3 $\beta$ -hydroxy-cholénate) ou diméthylamide carbonyle (*N,N*-Diméthyl-3 $\beta$ -hydroxycholénamide ou DMHCA) à cette position. Ces deux composés sont de bons activateurs de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ . En revanche, un groupe imino, faible accepteur de liaisons hydrogène à cette position diminue les capacités agonistes de la molécule, suggérant que la présence de liaisons hydrogène dans la chaîne latérale joue un rôle important dans l'affinité des ligands. Il est intéressant de constater qu'à la manière du YT-32, le DMHCA se comporte comme un bon agoniste des LXRs capable de provoquer l'efflux de cholestérol par l'induction hépatique et au niveau des macrophages du gène *abcal* (Quinet, *et al.*, 2004). Contrairement aux autres ligands testés, le DMHCA ne possède qu'un pouvoir d'induction des gènes *srebp1c* et *fatty acid synthase (fas)* très faible. *In vivo*, l'administration de DMHCA ne provoque pas de forte augmentation de la triglycéridémie comme les autres ligands. Le traitement de macrophages en culture par des doses croissantes de DMHCA en présence d'un ligand agoniste synthétique connu (le GW3965) permet (1) une potentialisation de l'effet agoniste du GW3965 sur l'activation du gène *abcal* et (2) une inhibition de l'accumulation des ARNm du gène codant *srebp1c*. A l'inverse, au niveau intestinal, cette sélectivité est perdue, le DMHCA devenant capable d'activer l'expression d'*abcal* et *srebp1c* à des niveaux comparables à ceux du GW3965. Les auteurs proposent deux hypothèses à cette spécificité tissulaire : (1) l'équipement cellulaire en cofacteurs des LXRs peut varier d'un tissu à l'autre et expliquer la modulation de l'expression de *srebp1c* et (2) le DMHCA pourrait également activer un autre récepteur nucléaire que les LXRs.

#### b) Les ligands synthétiques non oxystérols

Le rôle hypocholestérolémiant des LXRs conduit depuis quelques années les compagnies pharmaceutiques à développer des agonistes synthétiques pour le traitement de l'athérosclérose. De nombreuses banques de molécules sont ainsi criblées et le nombre de molécules activatrices est aujourd'hui en augmentation constante (Fig 23). A l'inverse des ligands naturels, beaucoup de ces molécules synthétiques sont peu ou pas métabolisables par les cellules, en faisant des modèles de choix dans les études fondamentales du rôle des LXRs.

La première recherche de ligands agonistes synthétiques des LXRs a été réalisée par un crible basé sur la capacité de LXR $\alpha$  à recruter un peptide fluorescent contenant la séquence LXXLL en présence d'un ligand (Schultz, *et al.*, 2000). Par cette technique, plus de 300 000 molécules ont été testées, menant à l'identification du T0314407 (*N*-méthyl-*N*-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-



trifluorométhyl-éthyl)-phényl]-benzènesulfonamide). Un autre composé a été développé sur la base de l'étude *in silico* des relations entre structure et activité, suivie d'une optimisation des propriétés agonistes par une série de synthèses chimiques (SAR, *Structure Activity Relationship*) : le T0901317 (*N*-(2,2,2-trifluoroéthyl)-*N*-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluorométhyl-éthyl)-phényl]-benzènesulfonamide). Le T0901317 est le ligand synthétique le plus utilisé actuellement dans les études fondamentales des LXR $\alpha$  ; cependant, leur effet hypertrigycéridémiant par l'activation de gènes impliqués dans le lipogénèse rend leur utilisation impossible pour des applications en thérapeutique humaine. Il est par ailleurs à noter que ce composé présente toutes les caractéristiques d'un ligand agoniste du récepteur nucléaire PXR (*Pregnane X Receptor* ; Mitro, *et al.*, 2007b).

Par une technique de la même nature, Albers *et al.* (Albers, *et al.*, 2006) ont identifié une molécule activatrice du groupe des quinazolinones, le LN6500. Par l'étude de ses capacités à permettre le recrutement de coactivateurs et à déplacer les co-répresseurs, les auteurs déduisent que ce composé est un « activateur compétitif partiel ». En effet, il permet un recrutement partiel de coactivateurs et déplace partiellement les co-répresseurs.

Un criblage à grande échelle des composés de GlaxoSmithKline basé sur le recrutement d'un fragment de SRC-1 par LXR $\alpha$  a permis l'identification d'une amine tertiaire (Collins, *et al.*, 2002). Néanmoins, ce composé ne s'est révélé qu'être un faible activateur. Par une série de synthèses chimiques, les auteurs ont réussi à créer une amine tertiaire possédant un fort pouvoir agoniste de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  : le GW3965. Contrairement au T0901317, le GW3965 est complètement inactif sur le récepteur nucléaire PXR (Mitro, *et al.*, 2007b).

Le TOFA (acide 5-tétradécycloxy-2-furancarboxylique) est connu pour être un inhibiteur de l'acétyl CoA carboxylase (ACC). Cette molécule est un agoniste de LXR $\beta$ , mais aussi de PPAR $\alpha$  et  $\delta$  (Schmidt, *et al.*, 1999). Cependant, les auteurs n'ont pas été en mesure d'observer de liaison spécifique du TOFA à LXR $\beta$  et suggèrent que ce composé pourrait indirectement activer ce récepteur nucléaire par une augmentation intracellulaire de métabolites ligands de LXR $\beta$ .

Le F3MéthylAA (l'acide 3-chloro-4-(3-(7-propyl-3-trifluorométhyl-6-(4,5)-isoxazolyl)propylthio)-phényl acétique), identifié par un crible de type SPA, est un puissant agoniste des deux isoformes des LXR $\alpha$  (Menke, *et al.*, 2002).

Lors de ce crible, le même laboratoire a identifié le dimère acétyl-podocarpique (APD ; *Acetyl-Podocarpic Dimer*) comme un activateur efficace de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  *in vitro* et en cultures cellulaires (Sparrow, *et al.*, 2002). L'APD dérive de l'acide podocarpique, découvert chez des végétaux résineux en 1873 puis chez plusieurs espèces du conifère *podocarpus* en 1938. Ce laboratoire a identifié et caractérisé le pouvoir agoniste de l'APD et de l'anhydride d'acide podocarpique et montré l'importance de la nature de la connexion covalente entre les deux molécules



d'acide podocarpique (Singh, *et al.*, 2005). En effet seuls les anhydrides testés et un imide (dans lequel l'atome d'oxygène de l'anhydride est remplacé par un atome d'azote) sont des molécules agonistes. Par la suite, cette équipe a synthétisé une série d'amides podocarpiques ayant un fort pouvoir agoniste (Liu, *et al.*, 2005).

Lors d'un criblage des composés Merck visant à identifier des ligands des PPARs, un agoniste LXR/PPAR a été identifié (Szewczyk, *et al.*, 2006). Les auteurs ont tenté par des études de type SAR de supprimer l'activité agoniste de PPAR et de créer un agoniste sélectif des LXRs. Trois composés hétérocycliques ont ainsi été synthétisés, montrant la puissance des techniques de type SAR dans la recherche de nouveaux agonistes synthétiques spécifiques des LXRs. Parmi ces composés, les auteurs en ont sélectionné un possédant un noyau aromatique de type pyrazine pour l'étude de ses propriétés *in vivo* (Lund, *et al.*, 2006). Lors de cette étude, les auteurs ont comparé le rôle de cette molécule et d'un dérivé du F3méthylAA, spécifique de LXR $\alpha$ . Par l'étude de ces composés chez les souris déficientes en LXR $\alpha$ , LXR $\beta$  ou pour les deux isoformes, les auteurs concluent que les effets hypertriglycéridémiantes des LXRs dépendraient essentiellement de LXR $\beta$ , soulignant ainsi l'intérêt de développer des agonistes spécifiques de cette isoforme.

Par un crible basé sur l'utilisation de monocytes humains THP-1 dans lesquels le gène rapporteur luciférase en aval du promoteur proximal d'*abca1* a été transfecté de manière stable, Jaye *et al.* (Jaye, *et al.*, 2005) ont identifié neuf composés de type 3-(phenylamino)-1*H*-pyrrole-2,5-diones substitués (ou maléimides substitués). Ces molécules étaient déjà connues pour leur rôle inhibiteur de la glycogène synthase kinase-3. L'étude cristallographique d'un de ces composés lié à LXR $\alpha$  révèle une conformation particulière de l'hétérodimère RXR/LXR. Dans ce cas, l'hélice AF-2 de RXR $\alpha$  vient se fixer au site de reconnaissance des coactivateurs de LXR $\alpha$ . La séquence LXXML présente dans l'AF-2 de RXR $\alpha$  pourrait ici mimer une séquence *NR Box* classique (LXXLL). Bien que les auteurs n'aient pas observé de différence dans le profil d'expression des gènes cibles en réponse à ce composé ou au GW3965, l'étude de ce composé pourrait permettre d'étendre nos connaissances sur le mode d'action des LXRs.

Par des études de SAR couplées à l'utilisation de cellules CHO exprimant de manière stable LXR $\beta$  et un gène rapporteur, une série de composés de la classe des quinolines ont été identifiés, avec un candidat intéressant (Hu, *et al.*, 2006). Administrée par voie orale, cette molécule permet la régression de la lésion athérosclérotique de souris invalidées pour le gène codant le récepteur des LDL (Low Density Lipoprotein Receptor ; LDLR). L'optimisation de cette classe de quinoline par une étude SAR a conduit à l'identification de deux autres composés potentiellement utilisables *in vivo* (Hu, *et al.*, 2007). Il est toutefois à noter que ces deux molécules sont des agonistes des trois isoformes des PPARs.



Une nouvelle technique de recherche de ligands agonistes a été proposée. Les études SAR ont été précédées d'une recherche virtuelle de molécules ayant une structure potentiellement capable de se lier à la poche hydrophobe du LBD de LXR $\beta$ . Parmi les 135 000 composés testés *in silico*, 1 290 molécules ont été sélectionnées et leur profil activateur de l'expression de 12 gènes cibles des LXRs a été évalué. Le meilleur candidat ainsi sélectionné a été intégré à une stratégie SAR et a conduit à l'identification de deux classes de molécules agonistes de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  : une série de dérivés indole (Bakir, *et al.*, 2007) et une série de dérivés 2-Aryl-N-acyl indole (Kher, *et al.*, 2007).

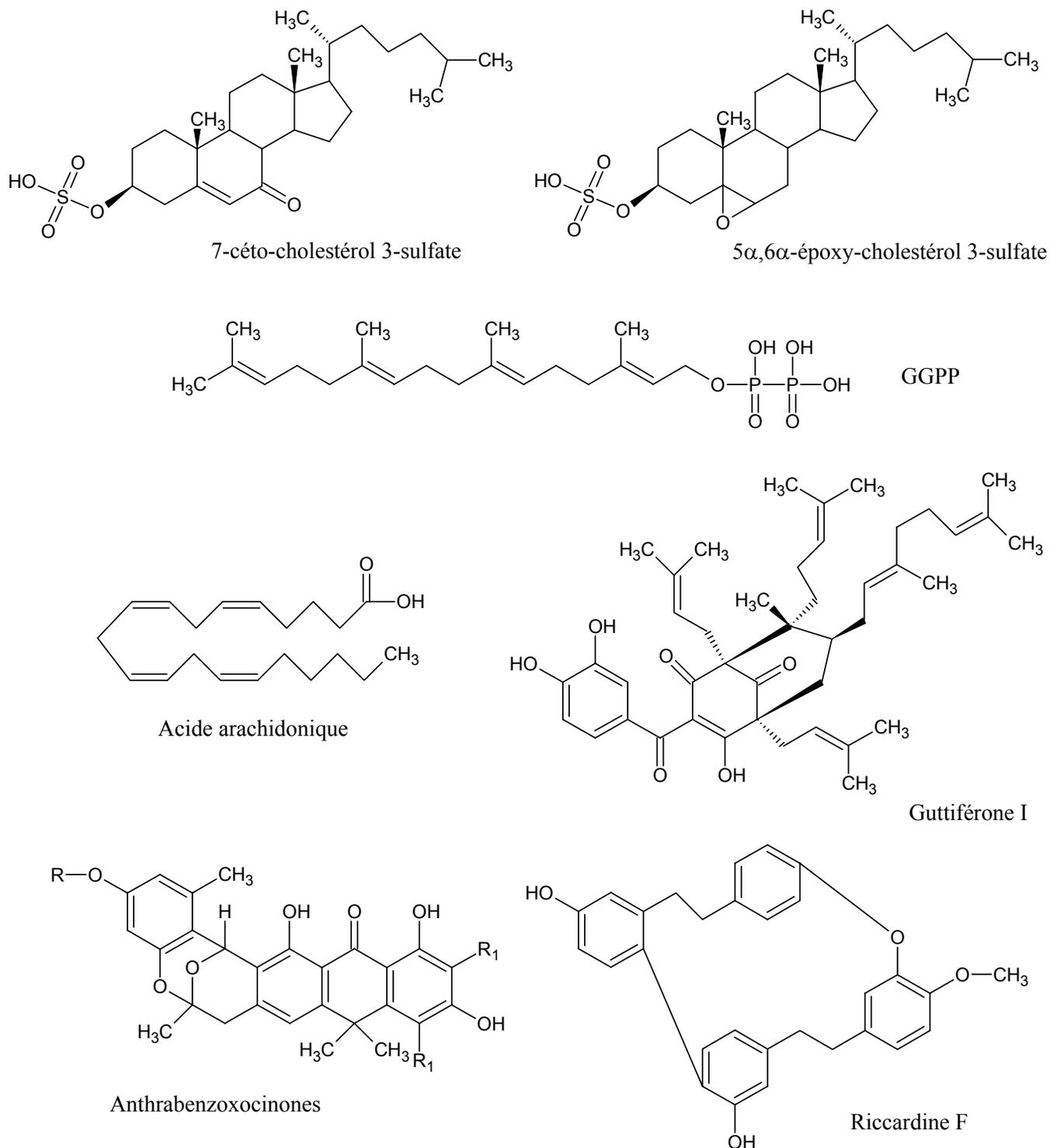
Par un crible basé sur l'utilisation d'un récepteur chimérique GAL-hLXR $\beta$  LBD, un composé s'est révélé être un candidat intéressant pour une intégration à une étude SAR (Molteni, *et al.*, 2007). Une série de N-Acylthiadiazolines capables d'activer les LXRs a été synthétisée. Parmi ces molécules, un composé présente un pouvoir agoniste beaucoup plus important pour LXR $\beta$  que pour LXR $\alpha$ . Les études cristallographiques du complexe T0901317-LXR $\alpha$  avaient suggéré que la liaison adoptait la même conformation quelle que soit l'isoforme (Svensson, *et al.*, 2003). Les auteurs suggéraient que le développement d'agonistes synthétiques sélectifs d'une isoforme serait un challenge particulièrement difficile. Bien que la N-Acylthiadiazoline produite ait un pouvoir agoniste faible sur LXR $\alpha$ , cette molécule est le premier ligand synthétique sélectif de l'isoforme bêta des LXRs à avoir été produit et ouvre de nouvelles perspectives dans la production de nouveaux agonistes.

### 3. Les ligands inhibiteurs et antagonistes

Les LXRs ayant un fort pouvoir hypocholestérolémiant, les efforts des compagnies pharmaceutiques sont plutôt centrés sur le développement de ligands synthétiques activateurs plutôt qu'inhibiteurs. Cependant, au cours de cribles de composés pouvant se fixer théoriquement dans la poche hydrophobe de LBD et potentiellement capables d'activer les LXRs, certaines molécules synthétiques antagonistes ont été identifiées.

#### a) *Les antagonistes naturels*

La transformation des macrophages en cellules spumeuses est une étape essentielle dans le développement des lésions athérosclérotiques. Cette transformation se caractérise par une surcharge en cholestérol, initiée notamment par une endocytose massive de LDLs oxydés (Collot-Teixeira, *et al.*, 2007). Plusieurs formes oxydées du cholestérol, notamment le 7-cétocholestérol et le 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxy-cholestérol sont des composants des LDLs oxydés et sont présentes en grandes quantités dans les



**Figure 24 : Les ligands antagonistes naturels**

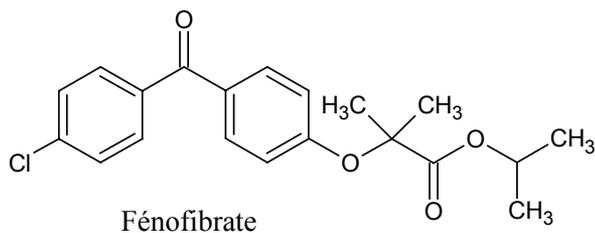
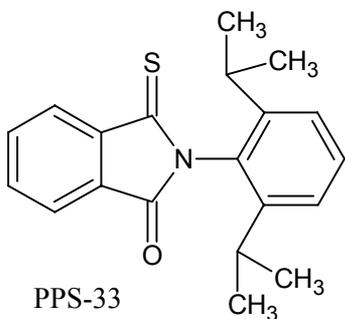
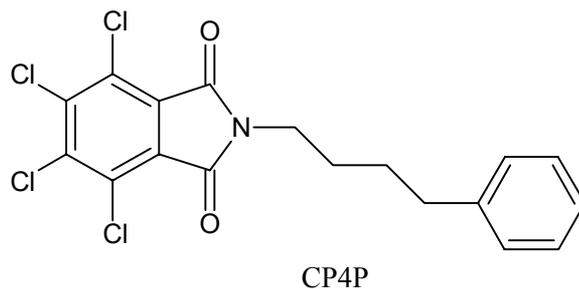
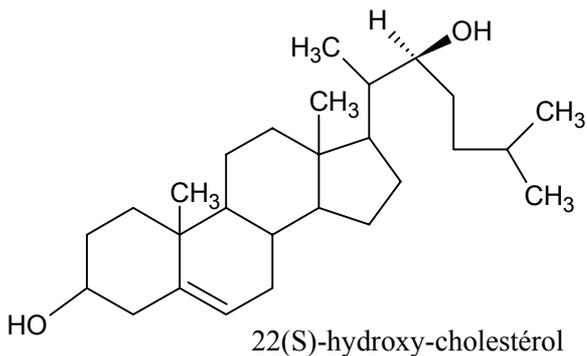
Structure chimique des antagonistes naturels connus des LXRs. L'acide arachidonique est représenté comme un exemple des acides gras poly-insaturés inhibiteurs de ces NRs. GGPP : Géranylgéranyl pyrophosphate ; R et R1 : radical et radical 1.

lésions athérosclérotiques (Brown et Jessup, 1999). Sous leur forme 3-sulfatée, ces deux composés naturels sont des inhibiteurs des LXR $\alpha$  (Fig 24 ; Song, *et al.*, 2001). Cette inhibition, qui est associée à un défaut de recrutement du coactivateur GRIP-1, est dépendante du LBD des LXR $\alpha$  et peut être contrée par des doses croissantes d'un ligand agoniste. Il est ainsi possible que les sulfates oxydés de cholestérol contribuent au développement de la plaque d'athérome par l'inhibition des LXR $\alpha$ .

L'utilisation de lovastatine et de mévastatine, deux inhibiteurs de la voie du mévalonate, inhibe l'activité transcriptionnelle de LXR $\alpha$ , montrant l'importance de l'intégrité de cette voie dans la signalisation par les LXR $\alpha$  (Forman, *et al.*, 1997). Cette voie biochimique conduit à la formation de plusieurs métabolites, notamment les oxystérols agonistes des LXR $\alpha$ . Un de ces métabolites, le géranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) inhibe l'activité transcriptionnelle de LXR $\alpha$  et bloque la fixation de RXR/LXR sur un DR4. Les auteurs émettent à partir de ces résultats l'hypothèse selon laquelle le GGPP inhiberait la formation de l'hétérodimère RXR/LXR et/ou sa liaison à l'ADN. Des travaux plus récents sur l'expression du gène *abca1* confirment l'effet inhibiteur du GGPP (Gan, *et al.*, 2001). Lors de cette étude, le GGPP inhibe l'interaction entre LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$  et leur coactivateur SRC-1, suggérant une inhibition directe des LXR $\alpha$ . Il est à noter que le GGPP n'a qu'un effet inhibiteur partiel de l'activation transcriptionnelle induite par le 22(R)-hydroxy-cholestérol, suggérant que les sites de liaison du GGPP et du 22(R)-hydroxy-cholestérol sont différents. Des études préliminaires, bien que non montrées par les auteurs, suggèrent que le GGPP est incapable de déplacer un ligand synthétique du LBD de LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$ , confirmant cette hypothèse.

Les acides gras poly-insaturés (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) sont connus pour être des ligands agonistes de PPAR $\alpha$  et PPAR $\delta$  (Forman, *et al.*, 1997 ; Kliewer, *et al.*, 1997). Plusieurs PUFAs, notamment l'acide arachidonique, sont capables d'exercer un effet antagoniste sur LXR $\alpha$  (Ou, *et al.*, 2001) et sur LXR $\beta$  (Yoshikawa, *et al.*, 2002). Bien qu'aucune liaison directe des PUFAs à la poche de liaison hydrophobe du ligand n'ait été observée, l'inhibition est dépendante du LBD des LXR $\alpha$ . De plus, des expériences de retardement sur gel montrent que l'acide arachidonique inhibe la liaison de l'hétérodimère RXR/LXR aux LXREs du promoteur du gène *srebp1c*. Cependant, selon le type cellulaire considéré, la métabolisation des PUFAs est plus ou moins rapide, modulant ainsi leur effet inhibiteur sur LXR $\alpha$ , suggérant que l'assimilation des acides gras joue un rôle important dans la régulation de LXR $\alpha$  et de PPAR $\alpha$  (Pawar, *et al.*, 2002). A ce jour, l'action inhibitrice des PUFAs sur l'activité transactivatrice des LXR $\alpha$  n'a jamais été démontrée *in vivo*.

Au cours de leur crible de recherche de molécules activatrices des LXR $\alpha$ , l'équipe de S.B. Singh a identifié plusieurs molécules antagonistes des LXR $\alpha$  d'origine naturelle ne possédant pas de noyau stérol. La guttiférone I est un composé de type benzophénone polyprénylée, extrait de l'abricotier bâtard *Garcinia humilis*. Cette molécule est capable de se fixer à LXR $\alpha$  et avec une



**Figure 25 : Les ligands antagonistes synthétiques**

Formule chimique des ligands antagonistes synthétiques des LXR<sub>s</sub>. Leur faible nombre s'explique par le rôle hypocholestérolémiant des LXR<sub>s</sub>, qui incite les compagnies pharmaceutiques à développer des molécules agonistes plutôt qu'antagonistes des LXR<sub>s</sub>.

affinité moindre à LXR $\beta$  (Herath, *et al.*, 2005a) mais n'est pas un agoniste, étant incapable de provoquer le contact de co-activateurs. Par le même type d'étude, ce laboratoire a réussi à identifier deux molécules capables de se lier aux deux isoformes des LXRs mais sans pouvoir agoniste : l'antrabenzoxocinone hexacyclique et la bischloroantrabenzoxocinone (Herath, *et al.*, 2005b). Pour ces trois molécules, les auteurs déduisent la qualité de ligand inhibiteur de leur capacité à déplacer un ligand synthétique du LBD des LXRs en SPA.

Enfin, rappelons que la riccardine C est un antagoniste naturel de LXR $\beta$  et la riccardine F un antagoniste naturel des deux isoformes (Tamehiro, *et al.*, 2005).

### b) *Les antagonistes synthétiques*

Dans la recherche de ligands capables d'activer les LXRs, des énantiomères d'oxystérols naturels ont été synthétisés. Le 22(S)-hydroxy-cholestérol est capable de déplacer un ligand connu du LBD des LXRs, suggérant une liaison directe de la molécule (Janowski, *et al.*, 1999) mais n'est pas capable d'induire une activation (Fig 25 ; Lehmann, *et al.*, 1997). Une étude récente a montré comme attendu que le T0901317 induit une lipogenèse dans des myotubes issus de patients diabétiques de type 2 et de patients sains (Kase, *et al.*, 2007). Le 22(S)-hydroxy-cholestérol est capable de contrer les effets lipogéniques du T0901317, sans toutefois perturber la réponse de l'expression d'*abca1*. De plus, le 22(S)-hydroxy-cholestérol est capable de stimuler le métabolisme glucidique dans ces cellules, par un mécanisme encore inconnu. Bien qu'aucune validation *in vivo* de ces résultats n'ait actuellement été réalisée, l'utilisation d'antagonistes bloquant la lipogenèse sans perturber l'hypocholestérolémie seuls ou conjointement avec une autre molécule agoniste peut être envisagée pour des applications cliniques.

La thalidomide est un composé développé initialement pour ses propriétés sédatives, mais son utilisation clinique a été rapidement arrêtée en raison d'une importante tératogénicité. Plusieurs molécules ont été dérivées de la thalidomide, disposant de propriétés inhibitrices de l' $\alpha$ -glucosidase. Certaines inhibitions étant compétitives il est légitime de supposer que ces molécules pourraient mimer le glucose. Basés sur les propriétés agonistes du glucose vis-à-vis des LXRs (Mitro, *et al.*, 2007a), Noguchi-Yachide *et al.* (Noguchi-Yachide, *et al.*, 2007) ont étudié le rôle de certains de ces composés sur les LXRs. Parmi ces dérivés de la thalidomide, deux molécules, le CP4P et le PPS-33 inhibent l'effet activateur du T0901317. Deux composés supplémentaires ont été dérivés, tous les deux possédant un noyau phenylphtalimide : le PP60 et le PP2P. Bien que ces deux molécules soient des inhibiteurs moins efficaces que le CP4P et le PPS-33, elles s'avèrent être plus facilement utilisables comme antagonistes en raison d'une cytotoxicité moins importante. Toutefois, ces composés ne sont



pas *stricto sensu* des ligands, cette étude ne montrant pas de liaison directe de ces antagonistes au LBD des LXRs.

Enfin, les fibrates sont une classe de molécules utilisées cliniquement pour leur pouvoir hypolipémiants. Ils ont été identifiés comme des ligands de PPAR $\alpha$ , provoquant une diminution des triglycérides circulant et une augmentation des taux de HDL-cholestérol (Lipoprotéines de forte densité ; *High Density Lipoprotein* ; Duran-Sandoval, *et al.*, 2003). Les formes estérifiées des fibrates, dont le fénofibrate exercent un effet antagoniste des LXRs par une liaison directe au LBD de LXR $\alpha$  (Thomas, *et al.*, 2003). A l'inverse, les formes acide carboxylique correspondantes n'exercent pas d'effet antagoniste des LXRs mais sont agonistes de PPAR $\alpha$ . Cependant, de manière surprenante, le fénofibrate n'est pas capable d'exercer d'effet antagoniste sur le promoteur d'*abca1*, suggérant que cet effet dépend du contexte cellulaire. L'ester de fénofibrate, utilisé en thérapeutique humaine est rapidement converti au niveau plasmatique et hépatique en acide carboxylique. Toutefois, la forme estérifiée peut être détectée au niveau hépatique 24 heures après administration, menant les auteurs à imaginer que l'effet hypolipidémiant de cette molécule pourrait être dû en partie à une inhibition de LXR $\alpha$ . Au total, ces études montrent des interactions entre les voies de signalisation impliquant les LXRs et les PPARs.

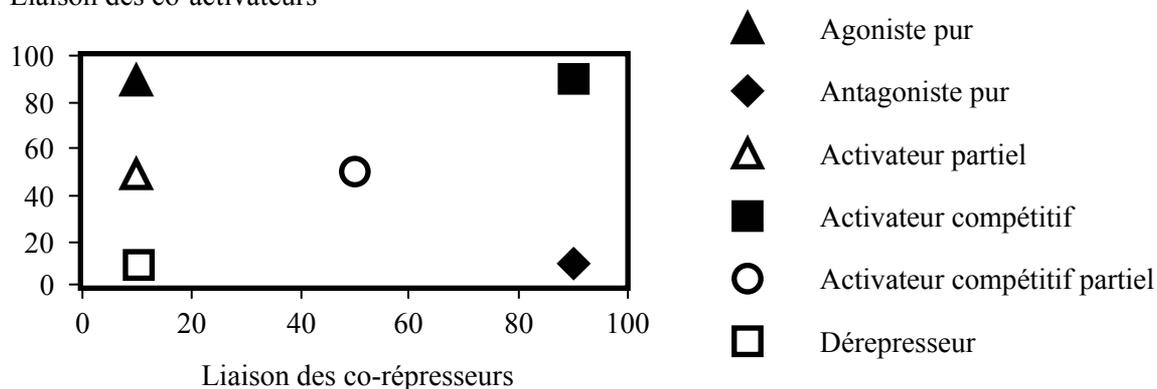
#### 4. Les LXRs : vers le développement de SLIMs (*Selective Liver x receptor Modulators*) ?

L'étude des LXRs conduit à l'identification d'un nombre toujours grandissant de molécules ligands des LXRs et capables de moduler leur activité. De ce répertoire, il ressort que les capacités activatrices et inhibitrices des ligands varient selon plusieurs facteurs.

- (1) Malgré une homologie de séquence forte entre LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ , les rôles de chaque ligand sur chacune des isoformes sont variables, pouvant même être opposés (exemple de la riccardine C).
- (2) La séquence du LXRE module l'effet des ligands.
- (3) Le contexte cellulaire a une influence forte sur les activités modulatrices des ligands.

Au total, il apparaît essentiel que l'équipement cellulaire en cofacteurs permet une modulation de la signalisation par les LXRs, chaque ligand semblant se comporter différemment selon la présence de ces cofacteurs. Un tel comportement de ligand vis-à-vis de son récepteur nucléaire a déjà été décrit concernant les récepteurs des œstrogènes (ERs). Les efforts visant à développer des antagonistes de ER ont conduit à la synthèse de molécules qui possèdent à la fois des activités agonistes et

Liaison des co-activateurs



### Figure 26 : Les six catégories de ligands des LXRs

Proposition de classification des ligands selon Albers et al. 2006. Chaque ligand peut ainsi être classé selon ses capacités à permettre le contact entre l'hétérodimère RXR/LXR et des co-activateurs ou des co-répresseurs. La liaison est exprimée comme l'inverse de l' $EC_{50}$ , signifiant que les affinités les plus faibles tendent vers les origines du graphique.

antagonistes, selon le type cellulaire considéré. Le mécanisme par lequel ces molécules agissent est maintenant connu ; il est attribué à la capacité d'induire une conformation du récepteur différente de celle prise lorsqu'un agoniste ou un antagoniste pur est fixé (Sadovsky et Adler, 1998). Ces configurations particulières ont des effets différents sur chaque cofacteur et expliquent les variations d'action en fonction du type cellulaire. Ces molécules, dont font partie le raloxifène et le tamoxifène, sont appelées des modulateurs sélectifs du récepteur des œstrogènes (SERM : *Selective Estrogen Receptor Modulator*). Les études cristallographiques montrent que le T0901317 et le GW3965 sont tous les deux capables de stabiliser l'hélice H12 de LXR $\beta$  et de le maintenir en configuration active (Farnegardh, *et al.*, 2003). Dans les deux cas, les positions de cette hélice sont similaires mais pas identiques. Le reste du LBD adopte une conformation différente selon le ligand montrant sa plasticité. Par ailleurs, une étude basée sur des technologies de transfert de fluorescence (FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), mesurant les liaisons entre LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$  et différents coactivateurs et corépresseurs en réponse à plusieurs ligands différents a permis de définir plusieurs catégories de ligands (Albers, *et al.*, 2006). Ainsi les auteurs proposent-ils une classification des ligands en fonction de leur capacité à recruter des cofacteurs et décrivent 6 catégories (Fig 26) :

- (1) Les agonistes purs
- (2) Les antagonistes purs
- (3) Les ligands permettant une induction complète simultanée du recrutement de coactivateurs et de corépresseurs : les « activateurs compétitifs »
- (4) Les ligands permettant une induction partielle du recrutement de coactivateurs sans liaison à un corépresseur : les « activateurs partiels »
- (5) Les ligands permettant une induction partielle du recrutement à la fois de coactivateurs et de corépresseurs : les « activateurs compétitifs partiels »
- (6) Les ligands inhibant toute liaison avec un cofacteur : « les dérépresseurs »

Il est intéressant de constater que selon le couple co-activateur / co-répresseur considéré, un même ligand peut avoir différents comportements. Par exemple, considérant le couple TRAP220/NCoR1, le LN6500 et le 22(R)-hydroxy-cholestérol se comportent comme des dérépresseurs vis-à-vis de LXR $\alpha$  et considérant le couple de cofacteurs SRC1/NCoR1, ils deviennent des activateurs compétitifs partiels. Par ailleurs, LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  ont un comportement différent vis-à-vis des ligands et des cofacteurs. Les auteurs évoquent ainsi un spectre linéaire de conformations de LXR $\beta$  dans lequel il existe une relation inverse entre la capacité de liaison aux coactivateurs et aux corépresseurs. Pour LXR $\alpha$ , en revanche, le GW3965 n'entre pas dans cette relation et se comporte comme un activateur compétitif.

Au total, les études concernant les ligands des LXRs et leur mode d'action tendent à penser que beaucoup de ces molécules se comportent comme des « modulateurs sélectifs des LXRs ». Cela



ouvre de nouvelles perspectives quant au développement de nouvelles molécules capables de moduler les LXR $\alpha$  dans un but thérapeutique et pour l'identification de nouveaux gènes cibles.

## 5. Régulations de l'activité indépendantes du ligand

### a) *Les phosphorylations*

Huang *et al.* (Huang, *et al.*, 1998) ont établi des lignées de cellules exprimant de manière stable un récepteur chimérique comportant le LBD de LXR $\alpha$  et le DBD de GR, ainsi qu'un gène rapporteur sous le contrôle d'éléments de réponse à GR. Comme attendu, le 22(R)-hydroxy-cholestérol permet l'activation du gène rapporteur. Alors que leur utilisation seule n'a aucun effet, le traitement des cellules par du TPA (un ester de phorbol qui active la protéine kinase C), de la forskoline (un activateur d'adénylate cyclase) ou du 8-bromo-AMPc (un analogue d'AMP cyclique), potentialise fortement l'effet de l'agoniste. Cette activation est abolie par l'utilisation d'inhibiteurs de protéine kinases. Ces données suggèrent que l'activité transactivatrice de LXR $\alpha$  pourrait être régulée par des cascades de phosphorylations.

La première étude ayant montré que les LXR $\alpha$  sont des protéines phosphorylées a mis en évidence la présence d'un résidu sérine phosphorylé en position 198 (Chen, *et al.*, 2006). Cet acide aminé, situé dans la région charnière, correspond à un site de phosphorylation putatif par les MAP Kinases. Cependant, un récepteur mutant LXR $\alpha$  S198A est complètement fonctionnel. L'implication physiologique de cette phosphorylation reste encore à démontrer.

Récemment, Yamamoto *et al.* (Yamamoto, *et al.*, 2007) ont montré que LXR $\alpha$  est une cible de la Protéine Kinase A (PKA). L'utilisation d'activateurs de la PKA entraîne une inhibition *in vitro* et *in vivo* de la transcription de *srebp1c* en réponse au T0901317. La PKA phosphoryle LXR $\alpha$  au niveau des sites sérines 195,196 et sérines 290,291. Cette modification post-traductionnelle de LXR $\alpha$  entraîne une diminution de la liaison RXR/LXR, une baisse du recrutement de co-activateurs et un recrutement accru de co-répresseurs. Prises ensemble, ces données montrent qu'au-delà de leur mode d'action « classique », les LXR $\alpha$  font partie d'un réseau complexe de signalisation cellulaire.

Comme nous l'avons déjà vu, *ex vivo*, le traitement de cellules CV-1 pourvues d'un récepteur chimérique LXR $\beta$ -LBD/GR-DBD par du TOFA stimule l'activité d'un gène rapporteur sous le contrôle d'éléments de réponse à GR. Lorsqu'elles expriment le récepteur D1 de la dopamine, le traitement de ces cellules par la dopamine inhibe cette activation transcriptionnelle (Schmidt, *et al.*, 2005). A l'inverse, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur D1 de la dopamine (SCH 23390) abolit

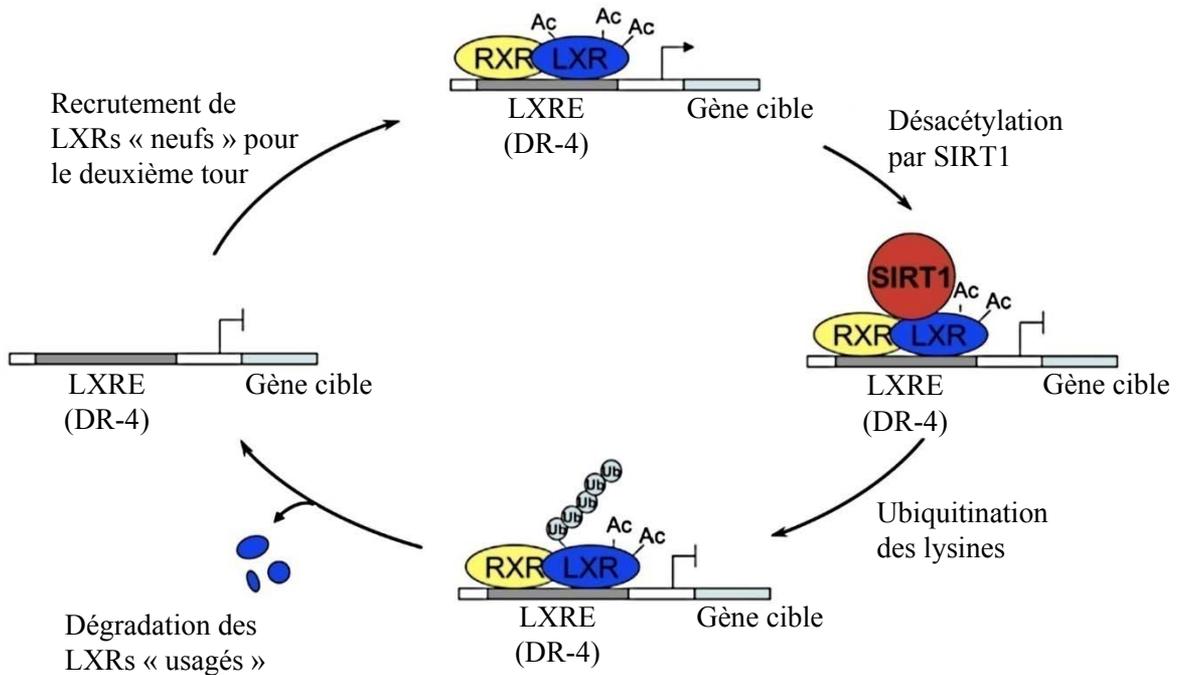


cette répression et potentialise l'activation de LXR $\beta$  par le TOFA. Même si on ne peut pas écarter l'hypothèse peu probable selon laquelle la dopamine et le SCH23390 seraient des ligands antagonistes et agonistes respectivement des LXRs, les auteurs suggèrent que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de LXR $\beta$  dépend du récepteur D1 de la dopamine. Ce récepteur est connu pour être un récepteur couplé à des protéines G, stimulant l'activité d'une adénylyl cyclase (Dearry, *et al.*, 1990 ; Zhou, *et al.*, 1990 ; Sunahara, *et al.*, 1990). Il semblerait donc que l'activité des LXRs puisse être modulée par des voies de transduction des signaux faisant intervenir des mécanismes de phosphorylation.

Alk-1 est un récepteur membranaire du TGF $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) impliqué dans l'angiogenèse. Une étude montre qu'Alk-1 et LXR $\beta$  interagissent *in vitro* et *in vivo* (Mo, *et al.*, 2002). Cette interaction provoque une relocalisation de LXR $\beta$  vers le compartiment cytoplasmique et une phosphorylation de LXR $\beta$  sur des résidus sérine / thréonine. En retour, LXR $\beta$  inhibe la signalisation des deux récepteurs Alk-1 et Alk-2 mais il n'est pas montré que cette inhibition résulte de la phosphorylation de LXR $\beta$ . Cet effet n'est pas observé pour LXR $\alpha$ .

#### b) La SUMOylation

La SUMOylation consiste en la liaison covalente et réversible d'une séquence peptidique appelée SUMO (*Small Ubiquitin-Related Modified*) sur des protéines cibles (pour une revue, voir Hay, 2005). Lorsque cette modification post-traductionnelle concerne un facteur de transcription, l'effet sur la transcription génique peut être activateur, mais est le plus souvent répresseur. Une étude récente a montré une SUMOylation de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  (Ghisletti, *et al.*, 2007) et décrit un mode d'action original pour ces récepteurs nucléaires. Les LXRs possèdent une activité anti-inflammatoire par l'inhibition transcriptionnelle de gènes pro-inflammatoires tels que *inos* (*inducible nitric oxide synthase* ; Joseph, *et al.*, 2003 ; voir paragraphe 4d). Cependant, le mécanisme moléculaire de cette répression n'a pas été complètement élucidé. Ghisletti *et al.* montrent que les LXRs sont recrutés au niveau du promoteur du gène *inos* de manière dépendante du co-répresseur NCoR. L'activation des LXRs par le GW3965 induit une SUMOylation par SUMO2 et SUMO3 des récepteurs. Cette modification provoque une répression de la transcription du gène *inos*, par un blocage du déplacement de NCoR requis normalement pour l'activation transcriptionnelle. Un mécanisme de répression identique est également présent au niveau du promoteur du gène *il-1 $\beta$* . Bien que les auteurs ne montrent pas d'absence de liaison directe à l'ADN des LXRs, la dépendance de la présence de NCoR au niveau du promoteur suggère que les LXRs ne se fixent pas directement à l'ADN, mais contactent des complexes NCoR qui modulent l'activité d'autres facteurs de transcription. Pour la première fois,



**Figure 27 : Modèle d'action de SIRT1 dans la « mise à zéro » et l'activation des promoteurs des gènes cibles des LXRs**

Après l'activation par le ligand, SIRT1 induit une désacétylation des LXRs, ce qui provoque leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome. Cet effet libérerait le promoteur, permettant le recrutement de LXRs « neufs » pour le deuxième « tour » de transcription. Adapté d'après Li et al., 2007.

ces travaux mettent en évidence un mécanisme de répression direct par les LXR $\alpha$  au niveau du promoteur de gènes cibles. De plus, cette étude est la première rapportant une inhibition transcriptionnelle induite par un ligand et ouvre de nouvelles perspectives dans la compréhension du mode d'action de ces NRs. Par ailleurs, on peut imaginer que l'utilisation de systèmes de blocage de la SUMOylation pourra constituer un nouveau type de crible *in vitro* dans la recherche de gènes cibles réprimés par les LXR $\alpha$ . Enfin, il est important de noter que tous les ligands ne sont pas capables de provoquer la SUMOylation des LXR $\alpha$  au niveau du promoteur de *inos*, indiquant que les différents ligands provoquent des changements de conformation de l'hétérodimère RXR/LXR distincts d'un point de vue fonctionnel. Au total, cette étude ouvrira de nouvelles perspectives thérapeutiques, notamment par des efforts de synthèse de molécules capables d'initier sélectivement une activation ou une répression transcriptionnelle selon le promoteur étudié.

### c) La déacétylation

Les sirtuines sont des désacétylases utilisant le NADP $^+$ , initialement découvertes pour leur capacité à maintenir le « *gene silencing* » des télomères et du locus « mating-type » chez la levure (pour une revue, voir Michan et Sinclair, 2007). La sur-expression des sirtuines prolonge la durée de vie de plusieurs espèces, notamment *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster*. Chez les mammifères, la restriction calorique prolonge l'espérance-vie et les sirtuines sembleraient être un des médiateurs de cet effet. Une étude récente a montré que SIRT1, une sirtuine de mammifères, est capable d'interagir avec LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  au niveau des LXREs (Li, *et al.*, 2007). Les auteurs montrent que les LXR $\alpha$  sont des protéines acétylées et que leur activation par le 22(R)-hydroxy-cholestérol réduit l'acétylation. Chez des souris invalidées pour SIRT1, la réponse des LXR $\alpha$  au T0901317 est diminuée. De plus, chez ces souris, le transport inverse du cholestérol est perturbé. Ainsi, SIRT1 est-il un facteur important dans l'activation transcriptionnelle par les LXR $\alpha$ . Comme attendu, la liaison de SIRT1 à LXR $\alpha$  provoque sa déacétylation. Cette dernière induit l'ubiquitination du récepteur et sa dégradation consécutive par le protéasome, expliquant le résultat surprenant montrant que l'activation de LXR $\alpha$  diminue sa stabilité protéique. Les auteurs émettent l'hypothèse que la liaison de SIRT1 est initiée après l'activation des LXR $\alpha$ . Ils proposent un modèle intéressant selon lequel l'activation des LXR $\alpha$  par un ligand permet le contact avec SIRT1, qui désacétyle le NR. Ce dernier est dégradé par le protéasome, libérant le promoteur et permettant le recrutement de récepteur « neuf » facilitant alors le deuxième « tour » de transcription (Fig 27).



## d) Les PPARs

Outre l'activation directe de l'expression du gène *lxrα* par PPAR $\gamma$ , les PPARs peuvent moduler l'activité transcriptionnelle des LXRs. La surexpression de PPAR $\alpha$  ou  $\gamma$  inhibe l'induction de l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle du promoteur du gène *srebp1c* (Yoshikawa, *et al.*, 2003). Cet effet, confirmé dans des hépatocytes de rat en culture primaire, est augmenté par l'utilisation d'un agoniste de PPAR $\alpha$ . L'utilisation de cycloheximide n'abolit pas cet effet inhibiteur, montrant que cet effet est indépendant d'une synthèse protéique *de novo*. L'inhibition de l'activité de LXR $\alpha$  est dépendante de la présence d'un LXRE fonctionnel et diminue la formation d'hétérodimères RXR/LXR. Curieusement, une supplémentation en RXR inverse cet effet, suggérant que la diminution de liaison de LXR $\alpha$  à RXR pourrait résulter d'une compétition avec PPAR $\alpha$  pour la dimérisation avec RXR.

Le même laboratoire a montré une régulation complémentaire des LXRs sur PPAR $\alpha$  (Ide, *et al.*, 2003) : la surexpression de LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$  inhibe l'activité transactivatrice de PPAR $\alpha$  au niveau d'un PPRE, d'autant plus que les ligands des LXRs sont présents. Par ailleurs, l'activation des LXRs diminue le recrutement d'hétérodimères PPAR $\alpha$ /RXR au niveau des PPRE. L'ajout d'un excès de RXR restaure la fixation du complexe au PPRE. Il est surprenant de constater qu'outre la formation attendue de complexes RXR/LXR, l'activation de LXR permet une hétérodimérisation PPAR $\alpha$ /LXR, diminuant la formation de dimères PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$  inactifs transcriptionnellement. Cette donnée montre la possibilité du contact PPAR/LXR et permet d'imaginer que l'inhibition de l'activité de LXR $\alpha$  induite par l'activation de PPAR $\alpha$  pourrait résulter de la formation de ces complexes PPAR $\alpha$ /LXR.

Une interaction directe a été confirmée *in vitro* (Yue, *et al.*, 2005). Les deux isoformes des LXRs sont capables de fixer les trois isoformes des PPARs. Cette étude montre par ailleurs que la fixation du 22(R)-hydroxy-cholestérol potentialise cette interaction. Ce travail, purement *in vitro*, ne montre cependant pas d'implication physiologique sous-jacente à cette hétérodimérisation.

Le gène *angptl3* (*angiopoietin-like protein 3*) est un gène cible direct des LXRs impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides (Inaba, *et al.*, 2003 ; Kaplan, *et al.*, 2003). Ainsi, la surexpression de ce gène chez la souris ou une injection intraveineuse d'ANGPL3 provoquent-elles une hyperlipidémie (Koishi, *et al.*, 2002). La surexpression de PPAR $\delta$  réprime l'expression de ce gène. L'activation de PPAR $\delta$  par un ligand agoniste potentialise cette inhibition. La mutation du LXRE de ce promoteur abolit l'effet de PPAR $\delta$ . De même, un mutant de PPAR $\delta$  incapable de s'hétérodimériser avec RXR perd son effet inhibiteur. Les auteurs montrent en système cellulaire et par retardement sur gel que l'activation de PPAR $\delta$  inhibe à la fois l'hétérodimérisation de LXR $\alpha$  et



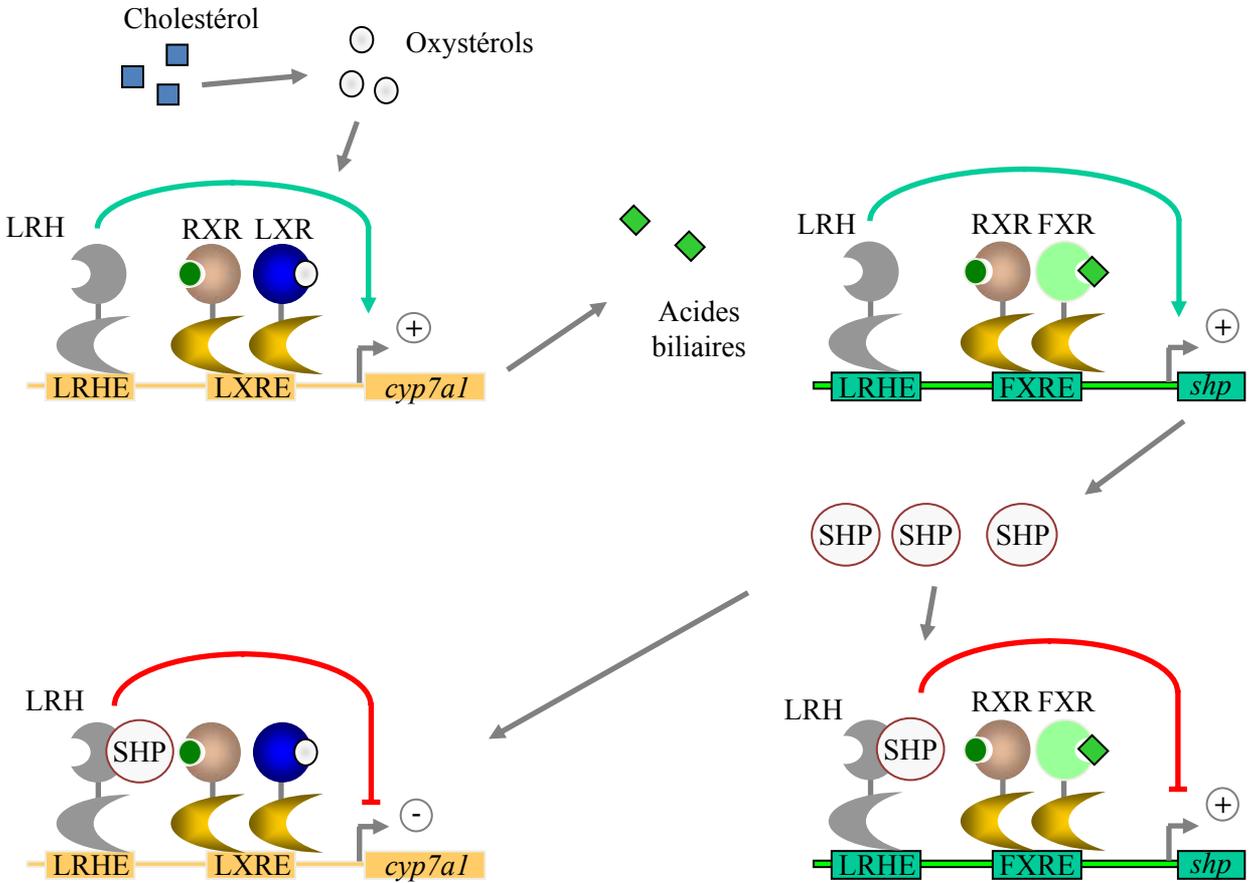
RXR et la fixation des complexes RXR/LXR sur les éléments DR4 du promoteur de ce gène. Ces données suggèrent donc que l'activation de PPAR $\delta$  diminue la transcription d'*angptl3* en entrant en compétition avec LXR pour la dimérisation avec leur partenaire RXR.

e) *Les récepteur Toll-like (TLRs)*

Les récepteurs de la famille *Toll-like* sont impliqués dans la réponse immunitaire. Ils confèrent aux macrophages la capacité de reconnaître les molécules antigéniques. L'activation de ces récepteurs permet une réponse anti-microbienne par l'activation de voies pro-inflammatoires (Janeway et Medzhitov, 2002). Les récepteurs TLR (*Toll-Like Receptor*) sont notamment activés par les LPS. L'activation des récepteurs TLR3 et TLR4 par leurs ligands respectifs provoque une diminution de l'expression de plusieurs gènes cibles des LXRs (Castrillo, *et al.*, 2003b). L'utilisation du promoteur muté ou non d'*abca1* cloné en amont du gène luciférase montre que cette diminution dépend du LXRE. Cet effet n'est pas dû à une diminution de l'expression des LXRs et dépend d'IRF3, un facteur de transcription activé spécifiquement par TLR3 et 4. Les auteurs montrent que l'inhibition du rôle activateur des LXRs dépend au moins partiellement d'une compétition pour des coactivateurs comme CBP/p300. Ces travaux complètent la compréhension des mécanismes par lesquels les LXRs sont sensibles au statut inflammatoire.

f) *TR*

Les récepteurs TRs et LXRs sont capables de fixer les mêmes éléments de réponse DR4 (Kawai, *et al.*, 2004). Ces mêmes auteurs montrent que le récepteur TR $\beta$  en l'absence de ligand réprime la transactivation induite par un ligand de LXR $\alpha$  au niveau de LXREs du promoteur de *srebplc*. Les hétérodimères TR $\beta$ /RXR entrent en compétition avec les complexes LXR/RXR au niveau des LXREs. Les auteurs montrent que TR $\beta$  recrute le co-répresseur NCoR avec une affinité plus forte que LXR $\alpha$ . Il est à noter que cette inhibition est levée par l'activation de TR $\beta$  par la T<sub>3</sub>, ligand de TR. A l'inverse, en l'absence d'un ligand, LXR $\alpha$  ne réprime par la transactivation induite par TR $\beta$ .



### Figure 28 : Régulation de l'homéostasie des acides biliaries par les récepteurs nucléaires

Lors d'un excès de cholestérol, les LXRs exercent un effet hypocholestérolémiant en stimulant la production d'acides biliaries via l'induction de *cyp7a1*, en coopération avec LRH-1. Les acides biliaries peuvent réguler leur propre synthèse en activant FXR, qui stimule l'expression de *shp*. SHP interagit avec LRH-1, inhibant l'action activatrice de l'hétérodimère RXR/LXR. SHP peut également contrôler sa propre synthèse par le même mécanisme. Adapté d'après Lu et al., 2000.

g) *Coup-TFs*

Les facteurs de transcription Coup-TFs (*Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors*) sont des récepteurs nucléaires orphelins impliqués dans l'organogenèse, l'embryogenèse et le développement du système nerveux. Ils sont de plus capables de réguler plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, notamment du cholestérol. La déplétion de Coup-TF1 par l'utilisation d'interférence ARN abolit l'effet inducteur du T0901317 sur l'expression de plusieurs gènes cibles des LXRs dans des myoblastes murins en culture, montrant l'importance de Coup-TF1 dans la réponse à l'agoniste des LXRs (Myers, *et al.*, 2006). Même si aucun mécanisme moléculaire expliquant l'origine de cet effet régulateur n'est détaillé, cette étude suggère que l'implication des Coup-TFs dans la régulation du métabolisme du cholestérol dépend en partie des LXRs.

h) *LRH-1*

LRH-1 (*Liver Receptor Homolog-1*) est un récepteur nucléaire orphelin qui se fixe sous forme de monomère dans les séquences promotrices de ses gènes cibles. La fixation de ce facteur dans le promoteur du gène *cyp7a1* ne permet pas à elle seule de stimuler la transcription du gène mais est indispensable pour son activation transcriptionnelle par LXR $\alpha$  (Lu, *et al.*, 2000). Par ailleurs, son recrutement au niveau du promoteur du gène *cetp* (*cholesteryl ester transfert protein*) permet de potentialiser l'initiation de la transcription initiée par l'activation des LXRs (Luo, *et al.*, 2001). En revanche, la mutation de l'élément de réponse à LRH-1 du promoteur de *cetp* diminue cet effet potentialisateur mais n'abolit pas l'effet activateur de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ . Un effet similaire a été observé au niveau du promoteur du gène *pla2* (*phospholipase A2*; Antonio, *et al.*, 2003). Il est à noter qu'aucune interaction directe entre LRH-1 et les LXRs n'a actuellement été décrite, suggérant que le dialogue entre les deux récepteurs nucléaires fait intervenir des mécanismes moléculaires complexes, faisant intervenir par exemple des co-facteurs communs.

i) *SHP*

SHP (*Small Heterodimer Partner*) est un récepteur nucléaire orphelin atypique qui ne possède pas de DBD et qui possède une activité répressive. Une interaction directe de SHP avec LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  a été démontrée (Brendel, *et al.*, 2002). Cette interaction réprime l'activité transcriptionnelle de LXR $\alpha$  au niveau d'un promoteur, artificiel ou naturel. Le domaine C-terminal et le domaine central de



SHP sont capables d'interagir avec le LBD de LXR $\alpha$ . Au niveau C-terminal, SHP possède des séquences de type LXXLL. La mutation de ces séquences diminue mais n'abolit pas la liaison protéique. Par ailleurs, la délétion de l'hélice H12 de LXR $\alpha$  abolit l'interaction, montrant le rôle primordial du domaine AF-2 de LXR $\alpha$ . Cette étude montre une interaction entre SHP et l'ARN polymérase de type II. Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que ce contact pourrait être une des causes de l'effet répresseur de SHP.

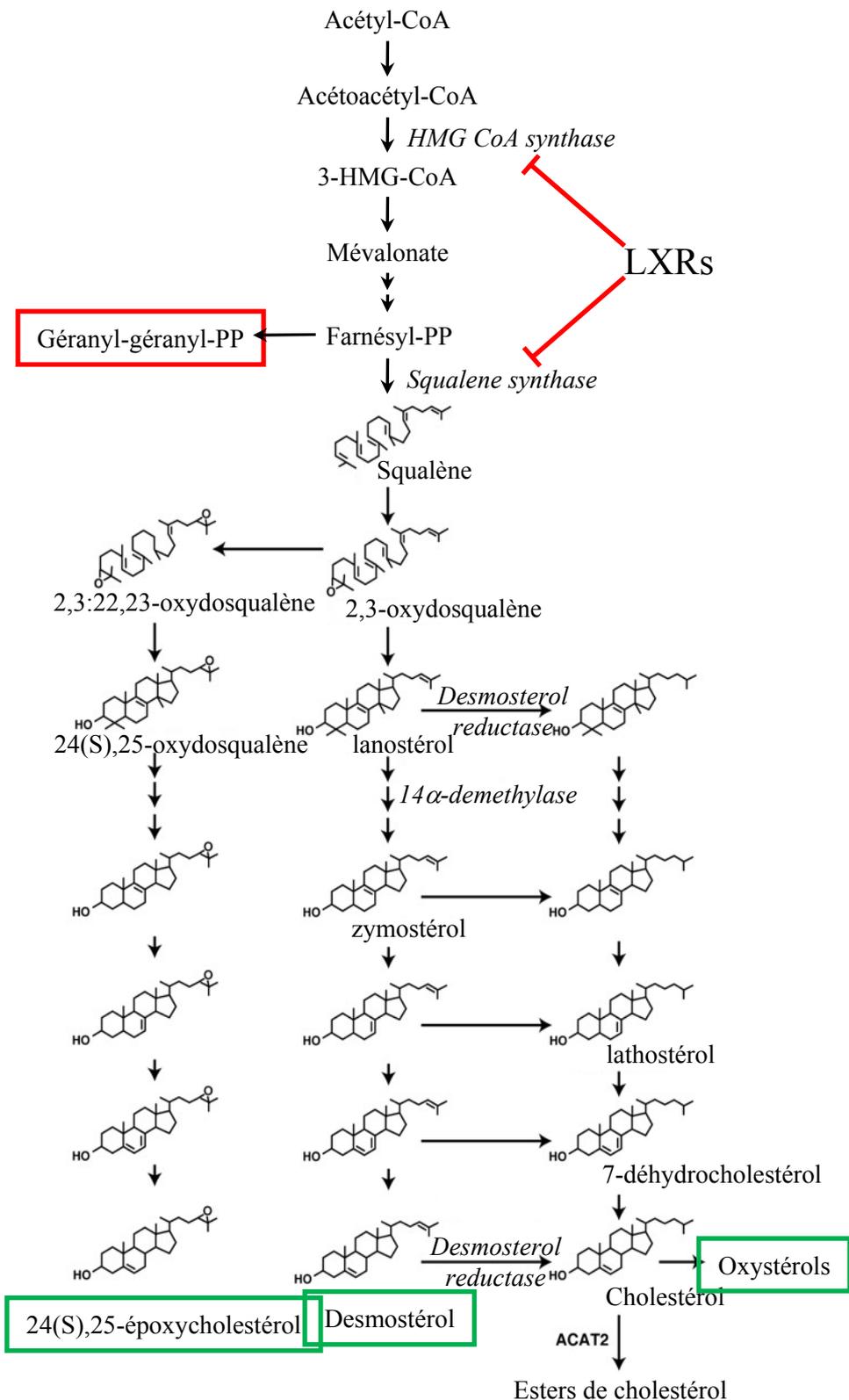
## D. Fonctions physiologiques régulées par les LXRs

Ces dernières années, la recherche des gènes cibles des LXRs a permis de les associer à de nombreuses fonctions physiologiques. Le nombre de gènes cibles directs ainsi que de régulations au niveau post-transcriptionnel est actuellement en augmentation constante. C'est pourquoi, plutôt que d'établir une liste exhaustive des cibles régulées par les LXRs, nous aborderons, par l'exemple de régulations à la fois directes et indirectes de quelques protéines cibles, les grandes fonctions physiologiques connues actuellement pour être contrôlées par ces récepteurs nucléaires.

### 1. Le métabolisme du cholestérol

#### a) *La synthèse des acides biliaires*

Initialement, la découverte des oxystérols comme ligands potentiels des LXRs a laissé supposer que ces récepteurs pourraient contrôler le métabolisme du cholestérol. Ainsi, un LXRE fonctionnel a-t-il été découvert dans le promoteur du gène *cyp7a1* (Lehmann, *et al.*, 1997). C'est par l'invalidation du gène *lxr $\alpha$*  chez la souris que Peet *et al.* (Peet, *et al.*, 1998) ont pu établir un lien fonctionnel *in vivo* entre LXR $\alpha$  et CYP7A1. Les souris transgéniques, nourries avec un régime contenant 2 % de cholestérol pendant 90 jours développent une stéatose hépatique (« foie gras »). Cette hépatomégalie résulte d'une accumulation d'esters de cholestérol dans le cytoplasme des hépatocytes. Les auteurs ont montré que le phénotype est causé par l'absence de régulation du gène *cyp7a1*. L'excès de cholestérol n'est ainsi plus catabolisé en acides biliaires et s'accumule dans les cellules hépatiques des souris *lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>*. Il est à noter que la présence de LXR $\beta$  au niveau hépatique n'est pas capable de compenser la perte de l'isoforme  $\alpha$ . Noter qu'une variation dans la séquence du



**Figure 29 : Relations entre les LXR et le métabolisme du cholestérol**

Les LXR ont un rôle hypocholestérolémiant *via* une diminution des ARNm *HMG CoA synthase* et *squalene synthase*. La voie biochimique conduisant à la production du 24(S),25-époxycholestérol est indiquée. Les agonistes connus sont encadrés en vert. Le géranyl-géranyl pyrophosphate, inhibiteur des LXR, est encadré en rouge. Adapté d'après Yang et al., 2006.

promoteur du gène humain abolit cette régulation transcriptionnelle directe (Chen, *et al.*, 1999). Outre la régulation directe de *cyp7a1* par LXR $\alpha$ , une boucle de rétrocontrôle a été mise en évidence directement au niveau de son promoteur (Lu, *et al.*, 2000). Lorsque la concentration en acides biliaires augmente, l'activation de FXR stimule l'expression du gène codant SHP. Ce récepteur nucléaire, en venant se fixer à LRH-1 au niveau du LHRE du promoteur de *cyp7a1*, bloque la transcription induite par LXR $\alpha$  (Fig 28). Ainsi, LXR $\alpha$  permet-il une diminution des taux de cholestérol intracellulaire en stimulant son catabolisme hépatique.

b) *La synthèse de novo*

L'invalidation du récepteur LXR $\alpha$  (*lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>*), modifie l'expression basale de plusieurs gènes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol (Peet, *et al.*, 1998). Les auteurs ont ainsi identifié une augmentation basale des transcrits *HMG CoA synthase*, *HMG CoA Reductase*, *farnesyl diphosphate synthase* et *squalene synthase* (Fig 29). On peut également noter une augmentation d'ARNm SREBP-2, un facteur de transcription régulateur des gènes codant ces enzymes. L'augmentation des transcrits *HMG CoA synthase*, *diphosphate synthase* et *squalene synthase* est également présente chez les souris *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* (Alberti, *et al.*, 2001). *In vivo*, l'administration de T0901317 à des souris témoins provoque une diminution des transcrits *HMG CoA Synthase* et *squalene synthase* au niveau hépatique (Schultz, *et al.*, 2000). Au total, les deux isoformes des LXRs inhibent la synthèse endogène du cholestérol.

c) *Le transport inverse*

Le transport inverse du cholestérol désigne sa prise en charge des organes périphériques et son retour au foie où il est métabolisé. Le contrôle du transport inverse du cholestérol par les LXRs s'effectue à deux niveaux.

Les transporteurs de type ABC (*ATP Binding Cassette*) sont des protéines transmembranaires capables de multimériser et de former une structure de type « canal ». Par l'hydrolyse de l'ATP, ces transporteurs permettent le transport actif unidirectionnel d'un substrat spécifique au travers des membranes. Dans cette vaste famille, ABCA1 exerce un rôle clé dans le métabolisme lipidique. La découverte de mutations dans le gène *abca1* chez des familles de patients atteints de la maladie de Tangier a permis d'identifier son rôle prédominant dans le métabolisme du cholestérol (Brooks-Wilson, *et al.*, 1999). Cette pathologie est caractérisée par une hypercholestérolémie associée à des taux d'HDL cholestérol anormalement faibles et un risque athérosclérotique élevé. Chez les patients



atteints, l'efflux de cholestérol intracellulaire n'est plus provoqué par le transporteur, menant à une séquestration au niveau de nombreux organes. L'identification de mutations dans les gènes *abcg5* et *abcg8* chez des patients atteints de  $\beta$ -sitostérolémie a permis d'identifier le rôle crucial des deux protéines codées par ces gènes dans l'efflux intestinal de cholestérol (Berge, *et al.*, 2000). Chez des sujets sains, moins de 1 % des stérols d'origine végétale sont absorbés au niveau intestinal. Chez les patients, l'excès de stérols végétaux n'est plus exporté et peut ainsi être absorbé. En l'absence de régime adapté, l'évolution de cette pathologie peut mener à une mort infantile par accident vasculaire. Le traitement de macrophages humains par du 22(R)-hydroxy-cholestérol ou de l'acide rétinoïque 9-*cis* active l'expression d'*abca1* (Costet, *et al.*, 2000). Les auteurs ont montré une activation directe par les deux isoformes des LXRs au niveau d'un LXRE fonctionnel dans le promoteur du gène *abca1*. *In vivo*, cette régulation, présente au niveau des macrophages et de l'intestin grêle chez les souris sauvages, est abolie chez les souris *lxra*; $\beta^{-/-}$  (Repa, *et al.*, 2000b). De plus, alors que chez des souris sauvages le T0901317 inhibe l'absorption intestinale de cholestérol et son accumulation au niveau hépatique, il n'a aucun effet chez les souris *lxra*; $\beta^{-/-}$ . Un régime riche en cholestérol ainsi qu'un traitement par du T0901317 provoquent *in vivo* une augmentation de l'expression des gènes *abcg5* et *abcg8* (Repa, *et al.*, 2002). Cet effet n'est pas retrouvé chez les souris *lxra*; $\beta^{-/-}$ . Par la suite, d'autres transporteurs de type ABC dont le gène est contrôlé par les LXRs ont été associés au transport inverse du cholestérol, notamment *abcg1* (Kennedy, *et al.*, 2001) et *abcg4* (Engel, *et al.*, 2001).

Les apolipoprotéines sont des protéines permettant la prise en charge des lipides dans la circulation sanguine. La nature hydrophobe des lipides ne permet pas leur solubilisation dans le plasma, d'où la nécessité d'être complexés sous forme de lipoprotéines. Les apolipoprotéines sont la fraction protéique des lipoprotéines. Il existe plusieurs types de lipoprotéines, différant par leur nature et leur fonction. Schématiquement, les lipides d'origine alimentaire sont absorbés au niveau intestinal. Au niveau des entérocytes, les lipides sont hydrolysés puis réestérifiés avant d'être complexés aux chylomicrons. Ces derniers gagnent les muscles et le tissu adipeux, où les triglycérides y sont hydrolysés par la *lipoprotein lipase* (LPL). Les résidus de particules, ou « *remnants* » de chylomicrons, sont donc enrichis en cholestérol et vont gagner le foie. Quelques heures après un repas, les lipoprotéines de très faible densité (*Very Low Density Lipoprotein* ; VLDL) assurent les besoins en triglycérides des organes périphériques. Après hydrolyse des triglycérides, les résidus de VLDL, ou lipoprotéines de densité intermédiaire (*Intermediary Density Lipoprotein* ; IDL) sont transformés au niveau plasmatique en lipoprotéines de faible densité (*Low Density Lipoprotein* ; LDL). Les LDL servant de source de cholestérol majoritaire aux organes périphériques sont à l'origine du risque athérosclérotique. Lorsque les LDL sont en excès, elles sont prises en charge par les macrophages. Le cholestérol est relargué dans le plasma, puis pris en charge par les HDL, qui regagnent le foie où le cholestérol est transformé en acides biliaires. Les gènes codant les apolipoprotéines APOE/CI/CII/CIV sont directement régulés par les LXRs via une régulation transcriptionnelle directe passant par des



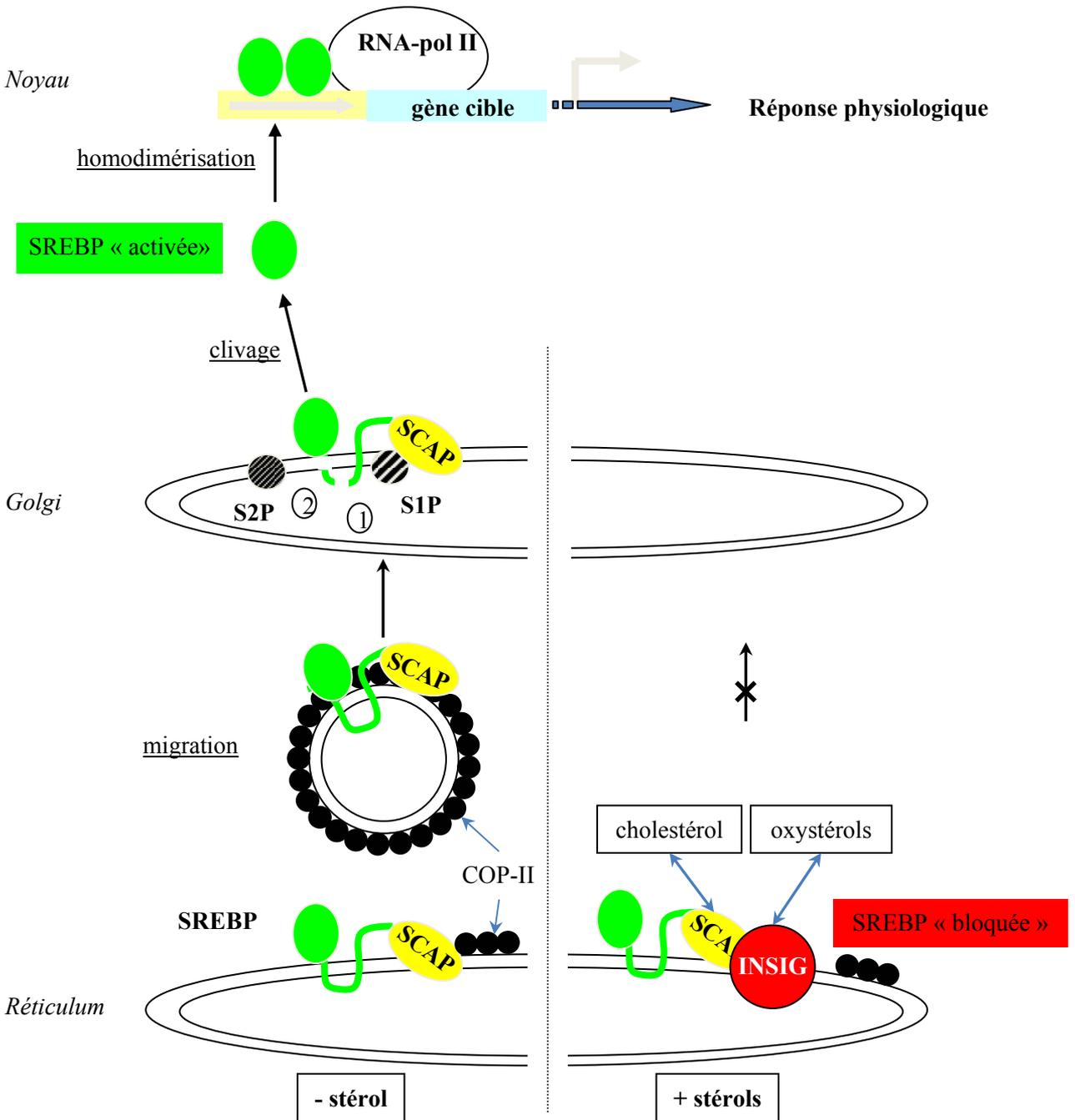
LXREs ; cette régulation est abolie chez les souris *lxra;β<sup>-</sup>* (Laffitte, *et al.*, 2001b ; Mak, *et al.*, 2002b). Les LXRs stimulent donc le retour hépatique du cholestérol via une induction de ces apolipoprotéines (pour une revue, voir Tontonoz et Mangelsdorf, 2003).

Au total, par la stimulation à la fois de l'export cellulaire du cholestérol intracellulaire, de son retour hépatique et de l'inhibition de sa synthèse endogène, les LXRs exercent une fonction hypocholestérolémiant. Ce rôle est le plus étudié et tous les efforts des compagnies pharmaceutiques visent à activer cette fonction.

## 2. Le métabolisme des acides gras

### a) Les cibles directes

L'acétyl-CoA-carboxylase (ACC) est une enzyme qui catalyse en présence d'ATP la synthèse du malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA, de CO<sub>2</sub> et de biotine. Le malonyl-CoA va ensuite servir de substrat pour la synthétase des acides gras (*fatty acid synthase* ; FAS). Cette dernière est une longue chaîne polypeptidique qui est responsable de l'élongation des acides gras. Schématiquement, la première étape consiste en une condensation d'une molécule d'acétyl-CoA et d'une molécule de malonyl-CoA. Par la suite, six réactions apportant successivement six molécules de malonyl-CoA conduisent à la production de palmitate (acide gras en C16). Une étape importante dans la biochimie lipidique consiste en une désaturation de la chaîne aliphatique. Les *Stearoyl-CoA Desaturases* (SCD) sont des enzymes qui catalysent une désaturation en Δ9-*cis* des acides gras saturés. Ses substrats majeurs sont le palmitoyl- et le stéaroyl-CoA qui sont respectivement convertis en palmitoléoyl- et oléoyl-CoA. L'administration de T0901317 à des souris provoque une augmentation des ARNm des gènes *acc*, *fas* et *scd-1* (Schultz, *et al.*, 2000). Cette augmentation, qui n'est pas induite chez les souris *lxra;β<sup>-</sup>*, s'accompagne d'une hypertriglycémie marquée. Par la suite, plusieurs études ont montré une activation directe des trois gènes *acc* (Talukdar et Hillgartner, 2006), *fas* (Joseph, *et al.*, 2002a) et *scd-1* (Chu, *et al.*, 2006) *via* un élément de réponse fonctionnel dans leur promoteur. Les LXRs, activés par le T0901317, ont au total un effet hypertriglycémiant. Si le T0901317, notamment par sa grande disponibilité commerciale, a aujourd'hui une place prépondérante dans les études fondamentales des rôles et modes d'action de ces récepteurs nucléaires, son utilisation clinique est impossible.



**Figure 30 : Le mécanisme d'action des SREBP**

En l'absence de stérol, dès sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, SREBP s'associe aux protéines SCAP. Ces dernières contactent des protéines COP-II, permettant au complexe SREBP/SCAP de migrer vers l'appareil de Golgi dans des vésicules bordées de COP-II. A ce niveau, SREBP est clivée en deux temps par les protéases S1P puis S2P, libérant le domaine N-terminal de la protéine. Ce dernier transloque dans le noyau et dimérise. Les dimères formés se fixent sur les SRE et activent la transcription des gènes cibles. Lorsque la concentration en stérols intracellulaires augmente, la fixation du cholestérol à SCAP ou des oxystérols à INSIG empêche la formation des complexes SCAP/COP-II, séquestrant SREBP dans le réticulum endoplasmique. Adapté d'après Souidi et al., 2004.

b) *SREBP-1c*

Les facteurs de transcription *sterol response element binding protein* (SREBP) sont des régulateurs clés du métabolisme des lipides. Trois SREBPs sont actuellement connus : SREBP-1a et 1c sont issus de promoteurs alternatifs d'un même gène et SREBP2 provient d'un gène distinct (Pour une revue, voir Brown et Goldstein, 1999 ; Goldstein, *et al.*, 2006). Les stéroïdes peuvent contrôler les SREBP à deux niveaux. La protéine SREBP est synthétisée sous forme d'un précurseur associé à la membrane du réticulum endoplasmique. Dans des cellules où la concentration en cholestérol est faible, immédiatement après sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, SREBP s'associe aux protéines SCAP (*Srebp Cleavage Activating Protein*). Cette association permet la migration du complexe SCAP/SREBP vers l'appareil de Golgi, dans des vésicules bordées de protéines COP-II. La protéine SREBP y est clivée par la protéase S1P (*Site 1 protease* ; Fig 30). Un second clivage par la protéase S2P permet la libération du domaine N-terminal de SREBP de la membrane. Ce domaine, de type bHLH-Zip, est le facteur de transcription *stricto sensu*. Il traverse la membrane nucléaire et stimule la transcription de ses gènes cibles en se fixant sur les SRE situés dans les régions promotrices. Lorsque la concentration en cholestérol augmente, le cholestérol membranaire contacte SCAP, qui recrute une protéine INISG (*Insulin Induced Gene*). Cette association bloque la liaison entre SCAP et COP-II (*Coat Protein complex-II* ; Sun, *et al.*, 2007), séquestrant SREBP dans le réticulum endoplasmique. Des travaux récents du groupe de Brown et Goldstein ont montré que les oxystéroïdes ligands des LXRs sont capables de se lier aux protéines INSIGs, permettant la formation du complexe SCAP/INSIG (Radhakrishnan, *et al.*, 2007).

Le second niveau du contrôle des SREBPs par les stéroïdes est dépendant des LXRs. En effet, les deux isoformes des LXRs peuvent activer l'expression du gène *srebp1c* par leur fixation à un LXRE (Repa, *et al.*, 2000a). Cette activation transcriptionnelle, confirmée *in vivo*, n'est pas retrouvée chez les souris déficientes en LXRs. Ainsi, les ligands des LXRs peuvent-ils stimuler indirectement les gènes cibles de SREBP1c, notamment *acc*, *fas*, *sdc-1* et le gène codant la *glycerol-3-phosphate acyltransferase*, responsable de l'étape initiale de la synthèse des glycérolipides.

ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*) est un facteur de transcription récemment identifié activé par un régime riche en glucides (Yamashita, *et al.*, 2001). En condition de concentration en glucose faible, ChREBP est localisé dans le cytoplasme (Dentin, *et al.*, 2006). Lorsque la concentration en glucose augmente, ChREBP est déphosphorylé, permettant son entrée dans le noyau et l'activation de ses gènes cibles par fixation à des séquences ChRE dans les régions promotrices. Ce facteur de transcription peut activer directement l'expression des gènes *fas* et *acc* par fixation dans leur promoteur, stimulant ainsi la lipogenèse hépatique *in vivo* (Ishii, *et al.*, 2004). Des travaux récents montrent que ChREBP est une cible transcriptionnelle directe de LXR $\alpha$  (Cha et Repa,



2007). Les auteurs ont identifié deux LXREs fonctionnels dans le promoteur du gène codant ChREBP. *In vivo*, le T0901317 stimule son expression hépatique chez des souris sauvages et l'induction est perdue chez les souris déficientes en LXRs. Le traitement par ce ligand active l'expression de gènes cibles communs à ChREBP, SREBP1c et LXR. Toutefois, chez des souris déficientes en ChREBP, l'activation de *fas*, *acc* et *scd-1* est plus faible, montrant le rôle important de ce facteur dans la régulation de la lipogenèse hépatique.

Il est ainsi difficile *in vivo* de dissocier les effets directs des LXRs de ceux dépendant de SREBP1c et ChREBP dans la régulation du métabolisme des acides gras. De même, il est difficile *in vivo* d'estimer la part relative de l'effet hypotriglycéridémiant des oxystérols par leur action sur les INSIGs de leur effet hypertriglycéridémiant par leur activation des LXRs. Cependant, les travaux récents montrant la liaison des oxystérols aux INSIGs (Radhakrishnan, *et al.*, 2007) pourraient permettre d'expliquer pourquoi l'agoniste DMHCA est capable d'activer fortement l'expression d'*abca1* et seulement modestement celle de *fas* (Quinet, *et al.*, 2004). D'une manière générale, cette découverte pourra représenter une piste dans le développement de nouvelles molécules agonistes des LXRs qui bloquent INSIG, stimulant ainsi l'efflux de cholestérol avec un pouvoir hypertriglycéridémiant limité.

### 3. Le métabolisme du glucose

Le contrôle de l'activité des LXRs par l'insuline ainsi que leur rôle dans la régulation du métabolisme des acides gras suggérait un lien entre les LXRs et le métabolisme du glucose. Le traitement de souris et de rats diabétiques par des ligands agonistes des LXRs induit une meilleure tolérance au glucose (Laffitte, *et al.*, 2003 ; Cao, *et al.*, 2003). Cet effet dépend de plusieurs mécanismes. En premier lieu, les LXRs diminuent la néoglucogenèse en diminuant les ARNm des gènes codant les enzymes clés PEPCK (*Phospho-enolpyruvate-carboxykinase*), *Fructose-1,6-bisphosphatase* et G6P. De plus, au niveau du tissu adipeux blanc, le GW3965 stimule l'expression du gène codant Glut4, un transporteur du glucose sensible à l'insuline (Laffitte, *et al.*, 2003). Les auteurs ont montré que les gènes *glut4* murin et humain sont des cibles directes des LXRs qui possèdent un LXRE fonctionnel dans leur promoteur.

Le traitement de cellules pancréatiques bêta par du T0901317 provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline provoquée par le glucose (Efanov, *et al.*, 2004). De manière surprenante, l'acide rétinoïque 9-*cis* ne potentialise pas l'effet du T0901317 et a même tendance à inhiber son action. Il semble que le contrôle de l'insulinémie dépende *in vivo* essentiellement de LXR $\beta$ . En effet, les souris déficientes en LXR $\beta$  mais pas LXR $\alpha$  ont une intolérance au glucose, sans toutefois perdre la



sensibilité à l'insuline (Gerin, *et al.*, 2005). Cette spécificité d'isoforme s'explique par le fait que LXR $\alpha$  n'est pas exprimé dans les cellules bêta pancréatiques (Zitzer, *et al.*, 2006). Le traitement de cellules INS-1 par le T0901317 provoque une augmentation de l'expression des gènes *ins2* (*insulin gene 2*), *pdx-1* (*pancreatic duodenal homeobox 1*), *glucokinase* (impliqué dans la glycolyse) et *Glut2*. La diminution des taux d'ARNm SREBP1c par interférence ARN abolit l'activation de ces gènes par le T0901317, suggérant un mécanisme indirect *via* SREBP1c.

Enfin, en plus de son rôle prépondérant dans la lipogenèse hépatique, ChREBP est capable de stimuler directement l'expression du gène codant la pyruvate kinase hépatique, une enzyme impliquée dans une des dernières étapes de la glycolyse (Ishii, *et al.*, 2004). L'augmentation de l'expression de ce gène en réponse au T0901317 est complètement abolie chez les souris *chrebp*<sup>-/-</sup> (Cha et Repa, 2007).

Il apparaît donc que les LXRs sont des régulateurs clés du métabolisme du glucose. D'une part, ils sont activables directement par le glucose *in vitro* et modulent les réponses cellulaires au glucose via ChREBP. D'autre part, ils stimulent directement et indirectement les voies de la néoglucogenèse, de la glycolyse, l'entrée du glucose au niveau périphérique et augmentent l'insulinémie. Au total, les LXRs sont hypoglycémiants.

#### 4. L'immunité et la vascularisation

Il est aujourd'hui clair que les LXRs jouent un rôle important dans la physiologie du macrophage. Ces cellules prenant une place clé dans les processus immunologiques, l'implication de ces récepteurs dans l'immunité était envisageable. Par ailleurs, il est admis que la lésion athérosclérotique est fortement immunogène et qu'un statut inflammatoire élevé est un facteur de risque dans l'apparition de la pathologie (pour une revue, voir Lusis, 2000 ; Glass et Witztum, 2001). Enfin, la régulation de l'expression du gène *lxr $\alpha$*  par le statut inflammatoire évoque leur implication potentielle dans la régulation de ce processus.

Le traitement de macrophages par du GW3965 diminue la production de nitrites induite par une infection bactérienne ou des LPS (Joseph, *et al.*, 2003). L'activation des LXRs par un ligand diminue l'expression des gènes codant les facteurs pro-inflammatoires COX-2 (*Cyclooxygenase-2*), iNOS, IL-1 $\beta$  et IL-6. Les auteurs montrent que l'inhibition transcriptionnelle des gènes codant iNOS et Cox-2 dépend des sites de fixation pour NF- $\kappa$ B. De plus, les agonistes des LXRs réduisent la réponse inflammatoire d'une dermatite de contact induite chez la souris, confirmant le rôle anti-inflammatoire des LXRs *in vivo*.



Une inhibition transcriptionnelle du gène codant MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase-9*) a également été montrée (Castrillo, *et al.*, 2003a). Cette endopeptidase permet la dégradation des matrices extracellulaires et est impliquée dans le remodelage tissulaire, notamment lors de blessures vasculaires. Une dérégulation de l'expression de cette enzyme peut être responsable de situations pathologiques, notamment l'athérosclérose. L'activation des LXRs bloque l'expression de ce gène induite par des LPS dans des macrophages en culture. Comme attendu, cette inhibition de la transcription est perdue chez des souris déficientes en LXRs. Les auteurs montrent également que cet effet inhibiteur dépend au moins en partie de la présence de sites de fixation pour NF- $\kappa$ B dans les régions promotrices du gène.

Une inhibition transcriptionnelle du facteur tissulaire a également été montrée (Terasaka, *et al.*, 2005). Ce facteur joue un rôle clé dans l'initiation des cascades de protéolyse du processus de coagulation. Une dérégulation de ce facteur peut avoir des conséquences dramatiques et peut être à l'origine de nombreuses pathologies, comme le cancer ou l'athérosclérose. Dans des cultures de macrophage, l'utilisation de T0901317 diminue l'expression du gène codant le facteur tissulaire. Son usage inhibe également l'induction de l'expression induite par les LPS. Comme pour de nombreux gènes de l'immunité, l'effet inhibiteur des LXRs dépend au moins en partie de l'inhibition des voies de signalisation par NF- $\kappa$ B.

L'ostéopontine est une cytokine pro-inflammatoire qui possède plusieurs fonctions, dont la principale est de promouvoir l'attraction chimique des macrophages. A la fois dans des cultures de macrophages et *in vivo* chez la souris, l'administration de T0901317 prévient l'activation du gène codant l'ostéopontine induite par de nombreuses cytokines (Ogawa, *et al.*, 2005).

De manière surprenante, une des premières études associant les LXRs aux processus inflammatoires a montré que les LXRs étaient capables de stimuler directement l'expression du gène codant la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  via un LXRE fonctionnel situé dans son promoteur (Landis, *et al.*, 2002). Cependant, comme l'agoniste utilisé dans cette étude, le 22(R)-hydroxy-cholestérol, n'avait pas d'effet stimulateur sur les autres cytokines étudiées, les auteurs en ont conclu que les LXRs n'agissaient pas en provoquant une réponse pro-inflammatoire généralisée. A l'inverse, ils ont évoqué l'hypothèse selon laquelle l'induction de l'expression du gène *tnf- $\alpha$*  par les LXRs pourrait provoquer une apoptose des cellules musculaires, cellules spumeuses et/ou lymphocytes T, diminuant ainsi la lésion athérosclérotique.

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* ; ou VPF : *Vascular Permeability Factor*) est un facteur angiogénique connu pour être dérégulé dans de nombreux cancers. Cette protéine est également impliquée dans les processus d'angiogenèse et de perméabilité vasculaire qui se produisent lors de la cicatrisation (Brown, *et al.*, 1992). De plus, un état inflammatoire provoqué par les LPS



induit une augmentation de l'ARNm et de la protéine VEGF (Itaya, *et al.*, 2001). Walczak *et al.* (Walczak, *et al.*, 2004) ont montré que le gène *vegf* est une cible directe de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ . Le gène humain et le gène murin possèdent tous deux un LXRE fonctionnel dans leur promoteur. Comme attendu, l'induction de l'expression du gène par du T0901317 ou du GW3965 est abolie chez les souris déficientes en LXRs, mais n'est pas perdue en réponse aux LPS. Comme les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* ne présentent pas de défaut majeur de vascularisation, les auteurs suggèrent que l'activation du gène *vegf* par les LXRs pourrait exercer un rôle dans la régulation des processus immunitaires. Ces travaux pourraient laisser supposer que la régulation de l'expression de *vegf* serait pro-athérogénique. Cependant, il est admis que l'activation des LXRs est anti-athérogénique. En effet, Joseph *et al.* (Joseph, *et al.*, 2002b) ont étudié les effets de ligands des LXRs chez des souris transgéniques invalidées pour le gène codant le récepteur des LDL (*ldlr<sup>-/-</sup>*) qui développent des lésions athérosclérotiques lorsqu'elles sont nourries avec un régime hyperlipidique ou pour ApoE (*apoE<sup>-/-</sup>*) développant spontanément une athérosclérose. L'ajout de GW3965 dans la nourriture permet une régression des lésions athérosclérotiques de ces deux modèles animaux. Le rôle physiologique de l'activation du gène *vegf* par les LXRs reste encore à étudier.

Même si l'implication physiologique des LXRs dans la régulation des processus immunologiques n'est pas encore actuellement élucidée, la majorité des études semble montrer que les LXRs possèderaient des propriétés anti-inflammatoires. Au total, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude des relations entre le métabolisme lipidique et la sphère immunitaire.

## 5. La maladie d'Alzheimer

Schématiquement, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par des troubles neurologiques progressifs, notamment une perte de la mémoire et des troubles du comportement. C'est une maladie neurodégénérative associée à l'apparition d'enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires et de plaques  $\beta$ -amyloïdes extracellulaires. Le constituant majeur de ces plaques est un peptide appelé A $\beta$ . Ce peptide provient de clivage d'un précurseur (APP : *Amyloid Precursor Protein*) par une  $\beta$ -sécrétase. Le fragment carboxy-terminal ( $\beta$ -CTF) généré est ensuite clivé par une  $\gamma$ -sécrétase pour donner l'A $\beta$ . Le lien entre le cholestérol et la maladie est clairement apparu lorsque deux équipes ont traité des patients avec des statines (inhibiteurs de l'*HMG-CoA reductase* ; Jick, *et al.*, 2000 ; Wolozin, *et al.*, 2000). Le peptide A $\beta$  de souris a moins tendance à agréger que le peptide humain ; sur cette base, des modèles murins de la maladie d'Alzheimer surexprimant le précurseur APP humain muté ont été créés (pour une revue, voir Patel et Forman, 2004). Une étude a montré que des fibroblastes humains issus de patients atteints de la maladie de Tangier déficients en ABCA1 sécrètent plus de A $\beta$



que des fibroblastes témoins (Koldamova, *et al.*, 2005). *In vivo*, l'administration de T0901317 à des souris modèles de la maladie permet une diminution des taux d'A $\beta$  soluble dans le cerveau et une augmentation des taux d'ABCA1. Ces résultats suggèrent qu'ABCA1 a un rôle protecteur dans l'évolution de la maladie et que son induction par les LXRs pourrait être bénéfique. De plus, le croisement de souris surexprimant un APP muté (Souris Tg) avec des souris déficientes en LXR $\alpha$  ou LXR $\beta$  a permis de préciser le rôle de ces récepteurs. Les souris *lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>/Tg* et *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>/Tg* développent des dépôts d'Ab plus importants que les souris Tg (Zelcer, *et al.*, 2007). De plus, les auteurs montrent que l'activation des LXRs permet une diminution d'une réponse inflammatoire potentiellement génératrice de la pathologie.

Il apparaît donc que les LXRs permettent de freiner les symptômes de la maladie d'Alzheimer *in vivo* chez des modèles murins. Les LXRs pourraient donc à terme devenir des cibles thérapeutiques dans la prévention et/ou le traitement de la maladie d'Alzheimer.

## 6. Les organes stéroïdogènes et la stéroïdogenèse

### a) *La détoxification des produits secondaires de la stéroïdogenèse*

Le gène *akr1b7* code une aldose réductase impliquée dans la détoxification des produits secondaires de la stéroïdogenèse (Taragnat, *et al.*, 1988). Cette enzyme catalyse la réduction de l'isocaproaldéhyde produit après le clivage de la chaîne latérale du cholestérol au cours de la première étape de la stéroïdogenèse (Lefrancois-Martinez, *et al.*, 1999). Notre laboratoire a montré que le gène *akr1b7* est une cible directe de LXR $\alpha$  au niveau du duodénum (Volle, *et al.*, 2004). Trois LXREs ont été identifiés dans le promoteur du gène. Ces trois éléments de réponse sont sensibles à LXR $\alpha$ , tandis que seul le LXRE3 permet une réponse à LXR $\beta$  *ex vivo*. Cependant, *in vivo*, les souris *lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>* perdent la capacité de réguler le gène. De même, le traitement de souris sauvages par du T0901317 permet une diminution des concentrations duodénales de malondialdéhyde, un produit secondaire de la peroxydation des acides gras. Cette régulation est abolie chez les souris *lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mais pas chez les animaux *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>*, montrant que seul LXR $\alpha$  protège contre la peroxydation lipidique *in vivo*.



b) *La surrénale*

Des travaux de notre laboratoire ont montré un rôle prépondérant de LXR $\alpha$  dans le contrôle de la fonction surrénalienne (Cummins, *et al.*, 2006). Les souris déficientes en LXR $\alpha$  présentent un phénotype surrénalien entraînant un syndrome « cushingoïde » associé à des déséquilibres dans le métabolisme lipidique de l'organe. Les souris développent une adrénomégalie induite par une accumulation d'esters de cholestérol dans la zone corticale. Par ailleurs, les taux de corticostérone sont anormalement élevés chez ces animaux. La dissection moléculaire des voies de la stéroïdogénèse a permis de montrer que l'activation de LXR $\alpha$  provoque une augmentation de l'expression des gènes *star cyp11a1* (ou cytochrome P450 $_{sc}$  : *side chain cleavage*) et *3 $\beta$ hsd1* (*3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase*). L'analyse moléculaire a révélé que le gène *star* est une cible directe de LXR $\alpha$ . *In vivo*, l'administration de T0901317 active l'expression de ces gènes et stimule la production de corticostérone chez des souris sauvages. La dérégulation des gènes de la stéroïdogénèse causée par l'absence de LXR $\alpha$  pourrait être due à une levée de la répression basale induite par le contact de co-répresseurs au niveau de leur promoteur, comme il a déjà été montré pour d'autres gènes cibles (Repa, *et al.*, 2000a). Cette étude montre donc que LXR $\alpha$  stimule la stéroïdogénèse surrénalienne.

c) *Le testicule*

Deux études récentes ont associé les LXRs à la physiologie de la reproduction testiculaire (Robertson, *et al.*, 2005 ; Volle, *et al.*, 2007, annexe 1). L'observation morphologique et histologique des testicules des souris invalidées pour les LXRs a révélé un phénotype intéressant. Schématiquement, chez les souris *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>*, des vacuoles d'esters de cholestérol se forment dans les cellules de Sertoli. Par ailleurs, les analyses de Ki67 montrent une perturbation de la prolifération cellulaire. Chez les souris *lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>*, une hypotestostéronémie est associée à une augmentation de l'apoptose testiculaire. L'hypotestostéronémie résulte à la fois d'une diminution des enzymes de la stéroïdogénèse testiculaire, mais aussi d'une diminution de la production de LH (hormone lutéinisante ; *Luteinizing Hormone*) hypophysaire. Pris séparément, ces phénotypes distincts ne perturbent pas la fertilité des souris. En revanche, chez les souris invalidées pour les deux isoformes, une destructuration testiculaire intervient dès l'âge de 5,5 mois et la fertilité est réduite. Les mâles de plus de 7 mois sont stériles. Il est à noter que les cellules de Sertoli expriment préférentiellement LXR $\beta$  et les cellules de Leydig LXR $\alpha$ , alors que les cellules germinales expriment les deux isoformes. Pris ensemble, ces résultats montrent une coopération étroite de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  dans le maintien de la structure et de la fonction testiculaire.

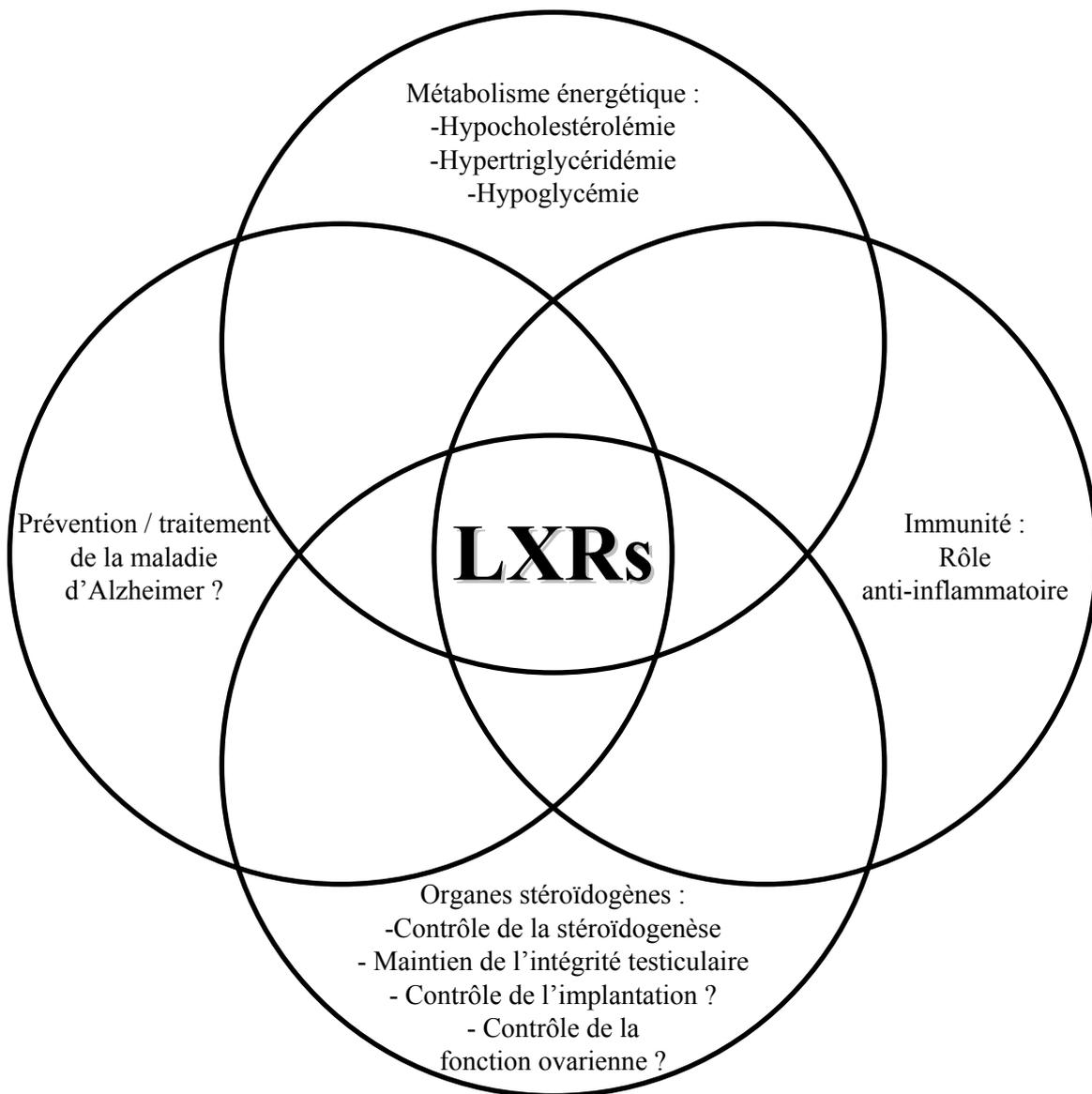


d) *Le placenta*

Le placenta est un organe essentiel dans le contrôle et le maintien des échanges entre la mère et le fœtus (pour une revue, voir Sapin, *et al.*, 2001). Sachant que le cholestérol est un élément essentiel pour le développement intra-utérin et que les deux isoformes des LXRs sont exprimées dans le placenta humain et murin (Marceau, *et al.*, 2005), on peut supposer que les LXRs pourraient jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme placentaire du cholestérol (Plosch, *et al.*, 2007). Le traitement de cellules cytotrophoblastiques humaines isolées des villosités chorioniques par du T0901317 ou du 7-cétocholestérol inhibe le pouvoir invasif de ces cellules *in vitro* (Pavan, *et al.*, 2004). Récemment, notre laboratoire a montré que le gène *eng* qui code l'endogline, une protéine impliquée dans l'inhibition de l'invasion trophoblastique, est un gène cible direct de LXR $\alpha$  et possède un LXRE fonctionnel dans son promoteur (Henry-Berger *et al.*, soumis, annexe 2). De plus, le traitement de lignées cellulaires BeWo provenant de choriocarcinomes humains par du T0901317 provoque une diminution de la production d'hCG (gonadotrophine chorionique humaine ; *human Chorionic Gonadotropin* ; Weedon-Fekjaer, *et al.*, 2005). Cependant, aucune étude concernant le rôle des LXRs dans le contrôle de la stéroïdogénèse placentaire n'est actuellement disponible.

e) *L'ovaire*

Steffensen *et al.* (Steffensen, *et al.*, 2006) montrent que les femelles déficientes en LXRs présentent dès l'âge de six semaines des troubles de la fertilité : une diminution du nombre de naissances associée à une réduction du nombre de petits par portée. Les auteurs ne détectent pas de perturbation histologique à l'origine de ce trouble. Cependant, cette étude montre un rôle des LXRs dans le contrôle de la reprise de la méiose ovocytaire. Le traitement d'ovocytes par du GW3965 provoque une reprise de la méiose. De plus, les ovocytes prélevés chez les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* sont incapables de reprendre leur méiose en réponse à une stimulation par de la FSH (Hormone folliculo-stimulante ; *Follicle Stimulating Hormone*). Enfin, le traitement d'ovocytes issus de souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* par du zymostérol, un stérol de type MAS, provoque la reprise de la méiose moins efficacement que les ovocytes sauvages. Ces résultats sont toutefois discutables. En effet, une étude précédente a montré que le FF-MAS est capable d'initier la reprise de la méiose ovocytaire et d'activer LXR $\alpha$  (Grondahl, *et al.*, 1998). En revanche, les 22(R)-, 25-, 27- et 16-hydroxy-cholestérol activent un gène rapporteur sous le contrôle de LXREs mais n'ont aucun effet sur la reprise de la méiose des ovocytes. Les auteurs



**Figure 31 : Synthèse du rôle des LXR's dans la physiologie**

Le rôle des LXR's dans le contrôle des métabolismes lipidique et glucidique a été le plus étudié depuis leur découverte. Cependant, de plus en plus d'études récentes tendent à associer ces NRs à d'autres fonctions physiologiques. La compréhension des mécanismes d'action et du rôle précis des LXR's dans la physiologie générale de l'organisme aidera à terme à développer des molécules modulatrices de ces NRs dans la prévention et le traitement de nombreuses pathologies.

avaient déduit de ces résultats que la reprise de la méiose induite par le FF-MAS ne dépendait pas de LXR $\alpha$ .

Récemment, une étude a montré que l'activation des LXRs par un agoniste sur des cultures de cellules humaines de la granulosa lutéinisées provoque une diminution de la sécrétion de progestérone (Drouineaud, *et al.*, 2007). Cette diminution semble résulter de deux mécanismes distincts : (1) un efflux du cholestérol intracellulaire diminuant sa disponibilité pour la production de stéroïdes et (2) une diminution des taux de transcrits des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse *star*, *p450scc* et *3 $\beta$ hsd*. Sachant que *star* est un gène cible direct de LXR $\alpha$  et que ce récepteur nucléaire stimule la stéroïdogénèse surrénalienne et testiculaire, ces résultats paradoxaux sont à confirmer *in vivo*.

Au total, l'étude des gènes cibles des LXRs a permis de montrer que ces NRs sont des régulateurs clés des métabolismes lipidique et glucidique. Cependant, la découverte de nouvelles cibles a permis d'établir leur rôle crucial dans le contrôle de diverses fonctions physiologiques. Les LXRs pourront à terme être une cible thérapeutique centrale dans la prévention et/ou le traitement de nombreuses pathologies (Fig 31).

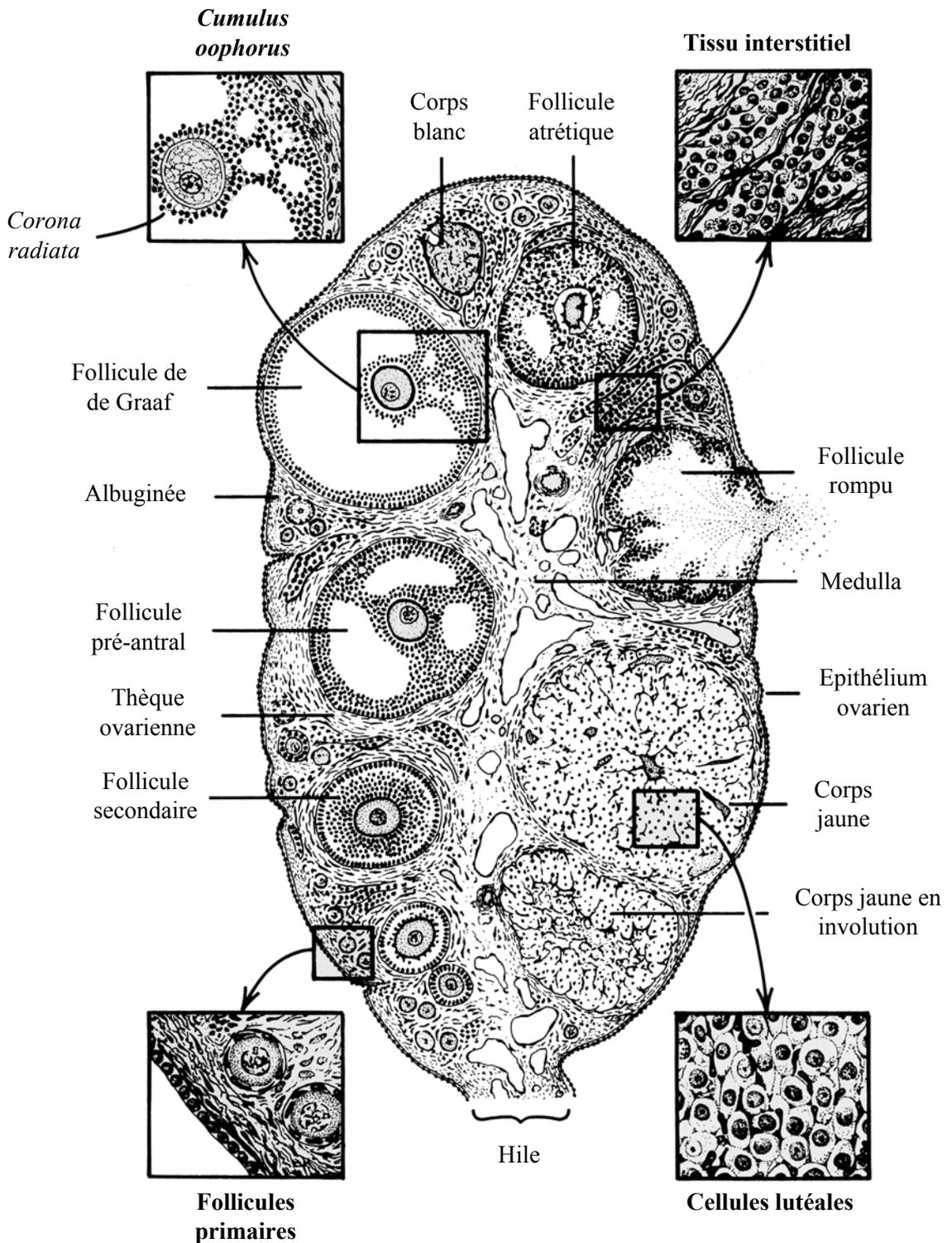
## II. La fonction de reproduction chez la femelle

La fonction de la reproduction chez la femelle fait appel à des régulations complexes à la fois nerveuses et endocriniennes. Nous détaillerons ici le fonctionnement de deux organes clés dans la physiologie de la reproduction : l'ovaire et l'utérus.

### A. L'ovaire

#### 1. Structure de l'ovaire

Les ovaires sont des organes doubles situés dans la partie supérieure de la cavité pelvienne. Chez la femme, ils sont maintenus par différents ligaments : ils sont attachés à l'utérus par le ligament utéro-ovarien et à la paroi pelvienne par le ligament suspenseur (pour une revue, Tortora et Grabowski, 1993). D'un point de vue histologique, c'est un organe hétérogène revêtu d'un épithélium simple appelé épithélium germinatif (qui n'est toutefois pas à l'origine des cellules germinales), qui constitue la continuité du mésothélium, l'enveloppe du mésovarium, au niveau du hile de l'ovaire.



**Figure 32 : Représentation schématique d'un ovaire de rate**

Les follicules engagent une folliculogénèse basale ; certains entrent en folliculogénèse terminale, ovulent et se différencient en corps jaune. Les corps jaunes non maintenus involuent en corps blancs. Noter la présence d'un follicule en atrophie. D'après Freeman, 1994

Directement sous l'épithélium germinatif, on trouve une capsule de tissu conjonctif, la tunique albuginée. Sous l'albuginée, le stroma est composé d'une médulla, zone de pénétration de l'innervation et de la vascularisation sanguine et lymphatique en provenance du hile et d'un cortex, tissu conjonctif à l'intérieur duquel sont présents les follicules à tous les stades de leur maturation (Fig 32 ; Tortora et Grabowski, 1993 ; Driancourt, *et al.*, 1991a ; Freeman, 1994).

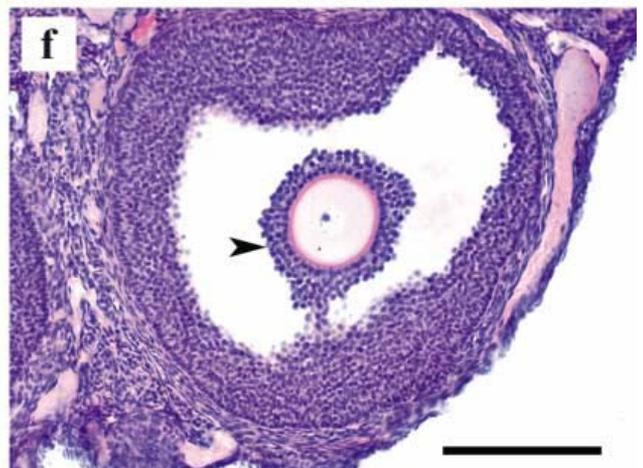
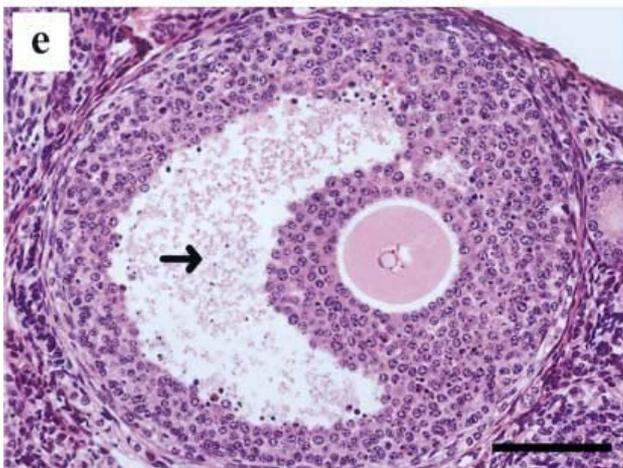
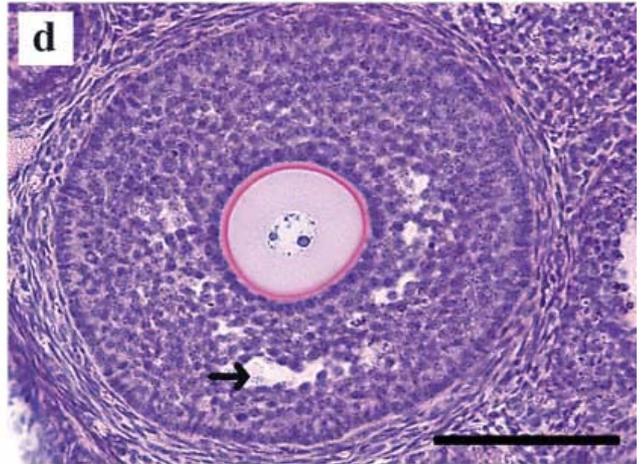
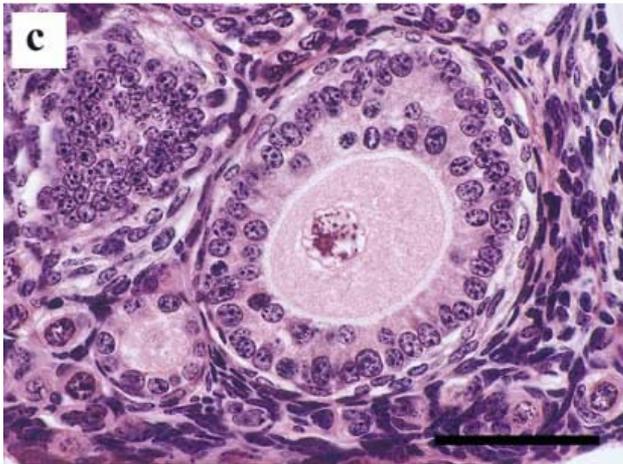
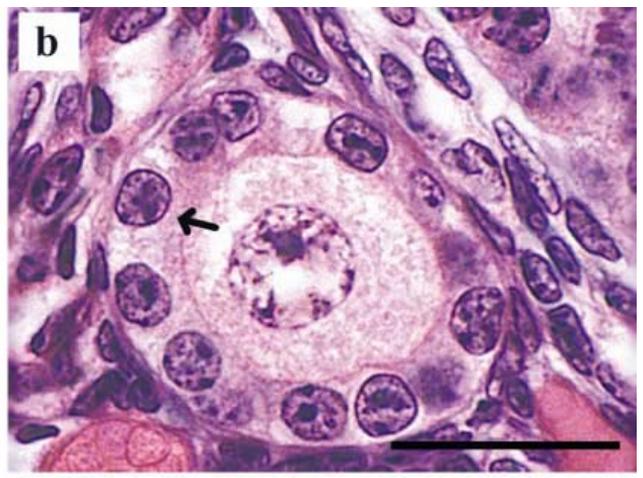
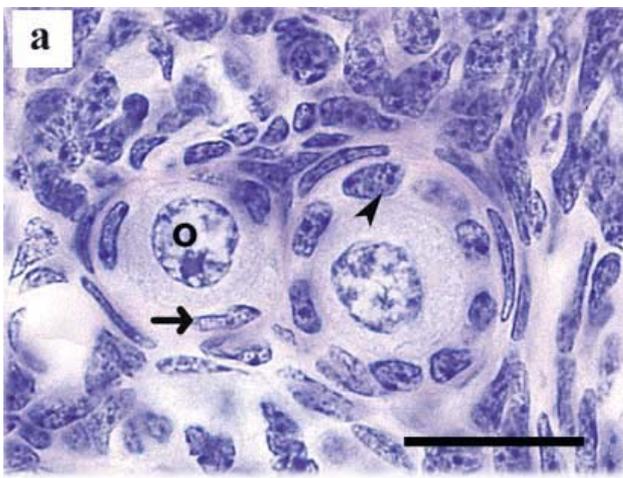
## 2. Le fonctionnement de l'ovaire

### a) *Le cycle ovarien*

L'ovaire possède à la fois une fonction exocrine (maturation des follicules, ovulation et involution des structures folliculaires) et une fonction endocrine (production cyclique des hormones sexuelles). Chez les femelles mammifères, l'ovaire fonctionne de manière cyclique. Cependant, il existe une très grande diversité dans le mode de fonctionnement des différents cycles en fonction des espèces. Nous ne détaillerons ici que les données concernant le cycle de la rate et de la souris, très proches sur un plan fonctionnel, car nos travaux ont été centrés sur l'animal *in vivo*.

#### (1) L'ovaire exocrine

Au cours de la vie fœtale, les ovocytes s'engagent dans le processus de division méiotique jusqu'à la prophase de première division (Freeman, 1994). C'est pendant cette période de la vie que les ovocytes s'arrangent en follicules. Le follicule est défini par l'ovocyte, entouré de cellules épithéliales dites cellules folliculaires ou cellules péri-ovocytaires arrangées en une ou plusieurs couches définissant une structure de type capsule uniforme. Ces cellules proviennent du stroma ovarien embryonnaire. Lorsque la méiose a atteint le stade de prophase I, le processus se bloque jusqu'à la phase de recrutement lors de la vie adulte. On assiste lors de cette phase à l'étape dite de « reprise de la méiose ».



**Figure 33 : Histologie des follicules ovariens**

a : Le follicule primordial est composé d'un ovocyte (o) entouré de cellules épithéliales aplaties (flèche). Le follicule entouré majoritairement de cellules de la granulosa cuboïdales (pointe de flèche) est considéré comme primaire. Barre : 20 $\mu$ m. b : le follicule primaire possède une couche unique de cellules péri-ovocytaires cuboïdales (flèche). Barre : 20  $\mu$ m. c : dès que le follicule possède plus d'une couche de cellules de la granulosa, il est considéré comme secondaire. Barre : 50  $\mu$ m. d : follicule à début d'antrum (flèche). Barre : 100  $\mu$ m. e : follicule antral. Flèche : antrum. Barre : 100  $\mu$ m. f : follicule pré-ovulatoire. Pointe de flèche : *cumulus oophorus*. Barre : 200  $\mu$ m. Adapté d'après Myers et al., 2004.

(a) *La maturation des follicules*

La folliculogénèse, qui englobe la maturation de l'ovocyte et des cellules péri-ovocytaires, débute à la différenciation des follicules primordiaux jusqu'à l'ovulation ou l'involution des follicules. On peut distinguer deux périodes dans la maturation de ces structures.

(i) *La folliculogénèse basale*

Cette étape débute dès de quatrième jour après la naissance chez la souris. A ce moment, la réserve de follicules qui sera utilisée durant la vie adulte est complètement formée. Chez la rate hypophysectomisée, les follicules se développent jusqu'à la formation de l'antrum, montrant que cette phase est indépendante des contrôles hormonaux (Driancourt, *et al.*, 1991a). Cette étape se produit de manière continue tout au long de la vie, jusqu'à épuisement du stock de follicules. Le follicule le plus petit est le follicule primordial (Fig 33). Il est constitué d'un ovocyte entouré d'une seule couche de cellules épithéliales folliculaires. Certains follicules primordiaux entrent en maturation et s'engagent dans une différenciation basale. Ils deviennent follicules intermédiaires puis primaires lorsqu'ils possèdent une couche de cellules péri-ovocytaires cuboïdales. Les mécanismes moléculaires contrôlant cette étape de « sortie de la réserve », qui détermine les follicules qui s'engagent dans la folliculogénèse basale sont peu connus. L'évènement initiateur conduisant au départ de la croissance ovocytaire n'est pas connu à ce jour. Il semble toutefois que cette étape soit sous le contrôle de signaux paracrines intra-ovariens en provenance de l'ovocyte lui-même ou des cellules péri-ovocytaires (pour une revue, lire Smitz et Cortvrindt, 2002). Plusieurs facteurs de la superfamille du TGF- $\beta$  semblent impliqués (pour une revue, lire Knight et Glister, 2006). En effet, le ligand Kit, ou le facteur LIF (*leukemia inhibitory factor*) produits par les cellules péri-ovocytaires peuvent initier *in vitro* la transition follicule primordial / follicule primaire. Des protéines de la famille des BMP (*bone morphogenic protein*) produites par les cellules folliculaires et/ou les cellules stromales ovariennes seraient également impliquées. L'administration *in vivo* de BMP-4 ou de BMP-7 provoque une diminution du nombre de follicules primordiaux et une augmentation du nombre de follicules primaires en développement. Le même type de traitement par GDF-9 (*growth differentiation factor-9*), BMP-15 et BMP-6 d'origine ovocytaire semblent également avoir un effet similaire. A l'inverse, l'AMH (*Anti-Müllerian hormone*) exerce un effet inhibiteur sur le recrutement (pour une revue, voir Durlinger, *et al.*, 2002).

Les cellules folliculaires se multiplient pour former un épithélium double, puis stratifié. A ce stade, les follicules sont qualifiés de secondaires et les cellules épithéliales correspondent aux cellules



de la granulosa. Puis, dans les follicules pré-antraux, on observe une ébauche de thèque interne, composée de cellules endocriniennes, tandis que l'ovocyte commence à sécréter les protéines constituant la zone pellucide qui l'enferme. Plusieurs espaces remplis de fluides se différencient, puis fusionnent en une large cavité unique, l'antrum. La formation de l'antrum définit chez la souris la fin de la folliculogenèse basale.

(ii) *La folliculogenèse terminale*

Plusieurs étapes caractérisent la folliculogenèse terminale (Fig 33).

Le recrutement. La folliculogenèse terminale débute dès la puberté (entre la 5<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine *post partum* chez la souris) ; elle est dépendante de la production cyclique des hormones sexuelles. Tandis que la plupart des follicules basaux dégèrent par atrophie, certains follicules à antrum s'engagent, sous le contrôle de la FSH, en maturation terminale. Cette étape est appelée la phase de recrutement. Chez la rate, le recrutement se produit quatre jours avant l'ovulation.

La sélection. Alors que tous les follicules recrutés sont potentiellement aptes à ovuler, seulement une proportion comprise entre le tiers et moitié d'entre eux termineront la folliculogenèse. En effet, leur croissance s'accompagne d'une élévation des taux plasmatiques d'œstradiol et d'inhibines (hormones peptidiques appartenant à la superfamille du TGF- $\beta$  produites par les cellules de la granulosa), induisant une diminution de la FSH plasmatique. A ce stade, seuls les follicules capables de croître malgré la diminution de FSH plasmatique peuvent poursuivre leur développement jusqu'au follicule de de Graaf. Cette étape est la phase dite de sélection. Le follicule de de Graaf, également appelé follicule pré-ovulatoire, est le plus gros follicule de l'ovaire. Il est composé de l'ovocyte, entouré de la zone pellucide, rattaché aux cellules de la granulosa dites « murales » par un massif de cellules, le *cumulus oophorus* (Fig 33). Bien qu'étant proches sur un plan histologique, les deux types de cellules de la granulosa (murales et du cumulus) sont à distinguer d'un point de vue moléculaire et fonctionnel. Puis, derrière une lame basale, on trouve la thèque interne et la thèque externe, couche conjonctive fibreuse élastique. Ce follicule est caractérisé par un large antrum. Il est à noter que la maturation de l'ovocyte est conjointe à celle du follicule. Chez la rate, la sélection se produit vers la fin du diœstrus. Tandis que chez la femme un seul follicule est sélectionné à chaque cycle en conditions normales, chez la rate et la souris, 8 à 10 follicules sont sélectionnés par cycle.



La dominance. La phase de sélection est immédiatement suivie du phénomène de dominance, caractérisée par la régression des follicules recrutés non sélectionnés et le blocage du recrutement de nouveaux follicules. Les follicules non sélectionnés dégèneront par atresie. Les mécanismes moléculaires contrôlant la dominance folliculaire ne sont pas encore complètement compris. Il semble que les mécanismes conduisant à la dominance soient contrôlés à deux niveaux : endocrinien et *via* des régulations intra-ovariennes. Au niveau endocrinien, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la persistance des follicules dominants malgré une diminution en FSH plasmatique. (1) Les follicules dominants seraient capables de compenser la diminution de la FSH par une réceptivité accrue à la LH, induite par l'augmentation de son récepteur. (2) Au niveau des follicules dominants, on assiste à une augmentation de la vascularisation. Cette augmentation pourrait permettre d'augmenter la quantité de gonadotrophines arrivant aux follicules. (3) Une étude récente a montré que la production d'œstradiol par les follicules dominants permet une augmentation des récepteurs de la FSH au niveau des cellules de la granulosa, amplifiant ainsi le signal gonadotrophique diminuant (Otsuka, *et al.*, 2005). Les auteurs montrent que la présence de l'ovocyte est indispensable pour l'amplification du signal, suggérant l'existence de coopérations primordiales entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa qui l'entoure pour le maintien de la dominance. Par ailleurs, d'autres types de régulations intra-ovariennes sont envisageables. Ainsi, les follicules dominants pourraient sécréter des facteurs qui bloqueraient la croissance des autres follicules (pour une revue, voir Baker et Spears, 1999). Ainsi, en conditions de restriction en FSH, la co-culture de follicules de taille différente montre que la présence du follicule le plus grand provoque une apoptose des cellules de la granulosa du follicule le plus petit, suggérant l'existence de facteurs paracrines entre les deux structures (Baker, *et al.*, 2001).

L'ovulation. A la fin de sa croissance, le follicule de de Graaf devient sensible à une élévation brutale de LH et de FSH. Cette élévation provoque une série de réactions locales nombreuses dans ces follicules. Nous ne détaillerons pas ici la totalité des facteurs exprimés en réponse à la décharge ovulante de gonadotrophines, déjà exposés par ailleurs (pour une revue, voir Russell et Robker, 2007). Schématiquement, La liaison de la FSH sur les cellules murales de la granulosa et de la LH sur les cellules de la thèque provoque une augmentation d'AMPC intracellulaire responsable de l'initiation de la transcription de nombreux gènes codant des facteurs pro-inflammatoires. Ces facteurs sont libérés dans le fluide folliculaire et viennent agir sur les cellules du cumulus. Il est à noter que la FSH agit également directement sur les cellules du cumulus. Ces cellules répondent par l'expression de plusieurs gènes responsables de la production de matrices extra-cellulaires qui enveloppent le complexe cumulus-ovocyte. Cette étape est connue sous le nom de mucification ou d'expansion du cumulus. Au niveau des cellules du cumulus, l'expression du gène *Cox-2*, responsable de la



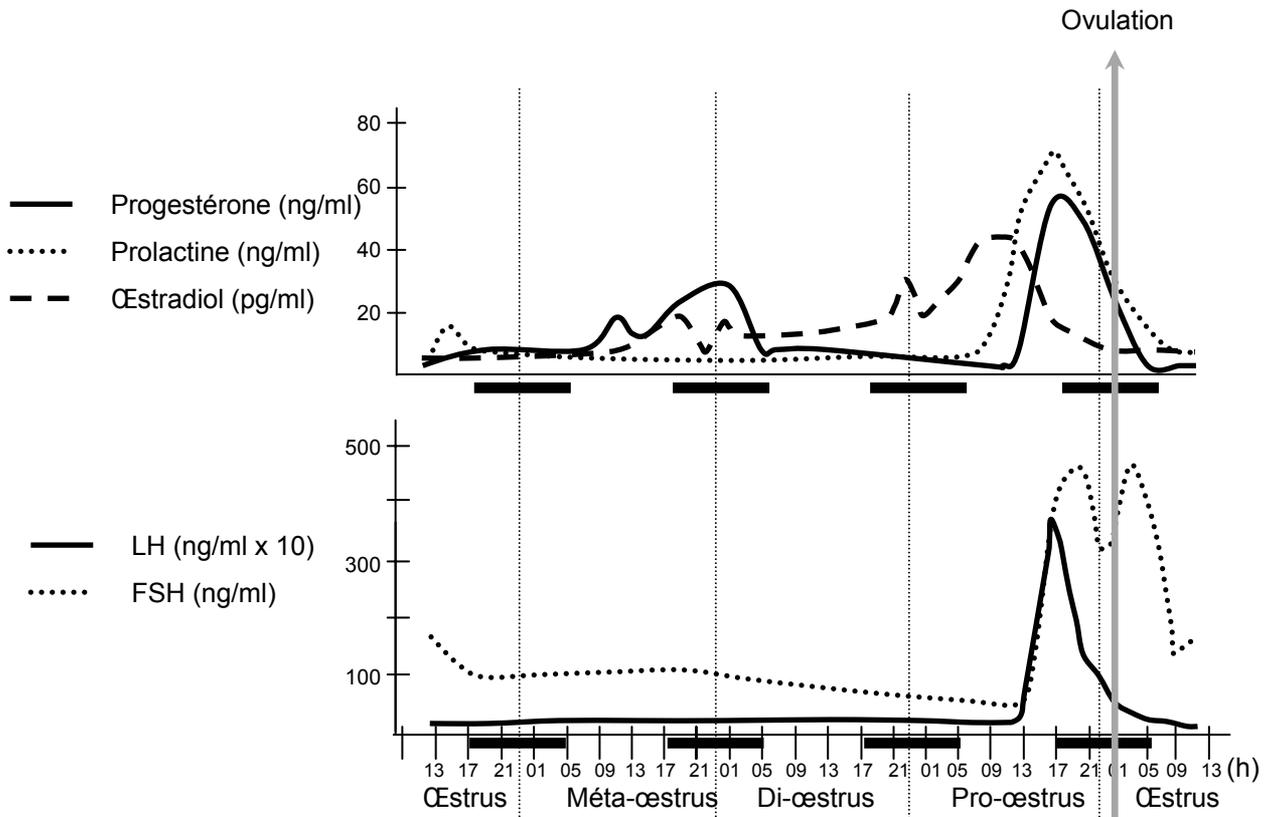
production de prostaglandine  $PGE_2$  est stimulée. Au total, la production de facteurs pro-inflammatoires va entraîner d'importants remaniements au niveau du follicule :

- Une hyperhémie provoquée par l'élévation de  $PGE_2$ .
- Un œdème de la thèque externe provoqué par une diffusion du plasma sanguin. Ce flux liquidien est provoqué par une augmentation du facteur VEGF au moment de l'ovulation (Kamat, *et al.*, 1995 ; Koos, 1995).
- L'apparition d'activités protéolytiques dissociant les matrices extracellulaires.

Le complexe cumulus-ovocyte se détache alors de la granulosa, le follicule se rompt suite à la désintégration de l'apex du follicule et de l'épithélium ovarien et l'ovocyte, entouré d'une couronne de cellules du cumulus formant la *corona radiata* est expulsé hors du follicule et de l'ovaire sous l'effet d'une chute de la pression hydrostatique, responsable de la contraction du follicule. C'est également au moment de l'ovulation que se produit la reprise temporaire de la méiose par l'ovocyte qui s'interrompt à nouveau en métaphase II (Szöllösi, 1991). Au total, il est maintenant clair que plusieurs médiateurs de l'inflammation sont des acteurs clés du processus d'ovulation (Barnett, *et al.*, 2006). Ainsi peut-on assimiler le processus d'ovulation à une réaction inflammatoire localisée.

La formation du corps jaune. Immédiatement après l'ovulation, d'importants remaniements morphologiques se produisent dans le follicule (Leymarie et Martal, 1991 ; Freeman, 1994). Les cellules de la thèque interne et de la granulosa se différencient puis se redifférencient en petites et grandes cellules lutéales respectivement, formant le corps jaune (*corpus luteum* ; pour une revue, voir Stocco, *et al.*, 2007). Cet organe ovarien est un tissu d'aspect histologique homogène. La formation du corps jaune, ou lutéinisation, est chez la souris sous le contrôle de la LH et de la prolactine qui présentent un pic de concentration plasmatique important au moment de l'ovulation. Cette dernière hormone, produite par les cellules lactotropes (cellules L) de l'adénohypophyse, est le facteur lutéotrope murin principal. Pendant cette période, on assiste à une importante augmentation de l'expression du gène *vegf*, responsable d'une néovascularisation essentielle à la fonction endocrine du corps jaune (Dissen, *et al.*, 1994). En parallèle, le caillot sanguin formé lors de l'ovulation régresse.

La lutéolyse. En l'absence d'accouplement, le corps jaune cyclique, qui n'est pas fonctionnel, commence à involuer en corps blanc (*corpus albicans*) 24 heures après sa mise en place. Chez les rongeurs, cette phase se produit en deux temps : (1) la régression fonctionnelle est associée à une diminution de la production de progestérone et (2) la régression structurale est caractérisée par la mort programmée des cellules lutéales (Stocco, *et al.*, 2007). Il est aujourd'hui clair que le facteur lutéolytique principal est la prostaglandine  $PGF2\alpha$  (McCracken, *et al.*, 1999). Cependant, le contrôle



**Figure 34 : Profils hormonaux au cours d'un cycle œstrien de 4 jours chez la souris**

Noter les augmentations de progestérone et de prolactine en fin de pro-œstrus et le caractère biphasique du pic préovulatoire de FSH. Le corps jaune cyclique n'étant pas totalement fonctionnel, l'élévation de progestérone en fin de méta-œstrus et début de di-œstrus est modérée, de l'ordre de 20 à 25 ng/ml. D'après Freeman, 1994.

de l'augmentation des taux de  $\text{PGF2}\alpha$  qui atteint l'ovaire au cours du cycle n'est pas totalement élucidé. Cette prostaglandine possède une origine utérine majoritaire. Un modèle du contrôle central de sa production a été proposé (McCracken, *et al.*, 1999) : la production neurohypophysaire d'ocytocine provoquerait une élévation de la synthèse de  $\text{PGF2}\alpha$  au niveau endométrial. Il est intéressant de constater que chez la rate, le processus de lutéolyse est relativement long, permettant au corps jaune de persister pendant 12 à 14 jours. Ainsi l'analyse histologique des ovaires montre-t-elle la présence de corps jaunes des cycles précédents.

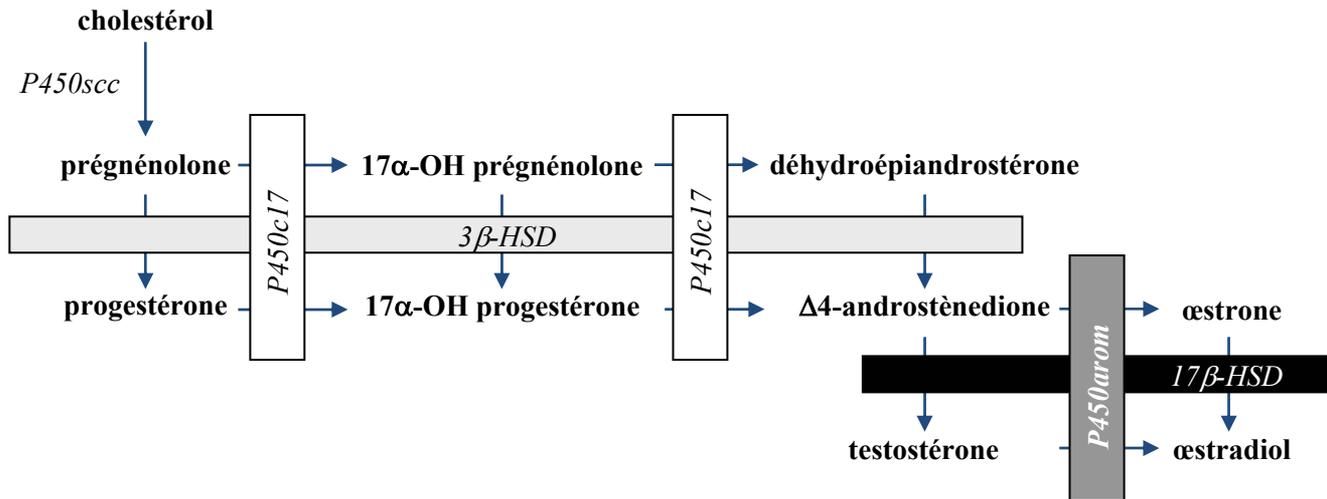
L'atrésie folliculaire. L'involution folliculaire ou atrésie représente l'issue de la majorité des follicules ovariens (Driancourt, *et al.*, 1991a). A partir du stade de follicule primaire, l'atrésie se manifeste par une pycnose des cellules de la granulosa, puis leur mort par apoptose (Hussein, 2005). Cette dégénérescence concerne toutes les étapes du développement des follicules et touche les follicules non recrutés, non sélectionnés et qui subissent l'influence des follicules dominants.

## (2) L'ovaire endocrine

### (a) Le cycle œstrien

Le cycle ovarien chez les mammifères est défini par rapport à des observations simples. Ainsi, chez la femme, le premier jour des règles définit-il le cycle menstruel. En revanche, chez la souris, c'est le comportement sexuel qui définit le cycle œstrien (Driancourt, *et al.*, 1991b ; Freeman, 1994). Il dure de 4 à 5 jours chez la rate et la souris et quatre phases successives le composent (Fig 34) :

- L'œstrus marque le début du cycle. Il est défini par le comportement d'acceptation du mâle, indiqué par un réflexe de lordose de la femelle en présence du mâle. De manière logique, il suit l'ovulation.
- Le méta-œstrus est marqué par les changements post-ovulatoires des voies génitales. Il correspond à la phase lutéale.
- Le di-œstrus est une phase pendant laquelle les sécrétions hormonales ovariennes préparent l'utérus à l'implantation.
- Le pro-œstrus est une période marquée par des élévations plasmatiques d'œstradiol, de gonadotrophines et de prolactine qui déclenchent les processus ovulatoires.



**Figure 35 : Voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans les ovaires**

*P450scc* : cytochrome *P450 side-chain cleavage* ; *P450c17* : *17α-hydroxylase* ; *3β-HSD* : *3β-hydroxysteroid dehydrogenase* ; *P450arom* : *aromatase* ; *17β-HSD* : *17β-hydroxysteroid dehydrogenase*. D'après Parker et Schimmer, 1997.

Il est important de noter que l'ensemble des événements de ces quatre phases est sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

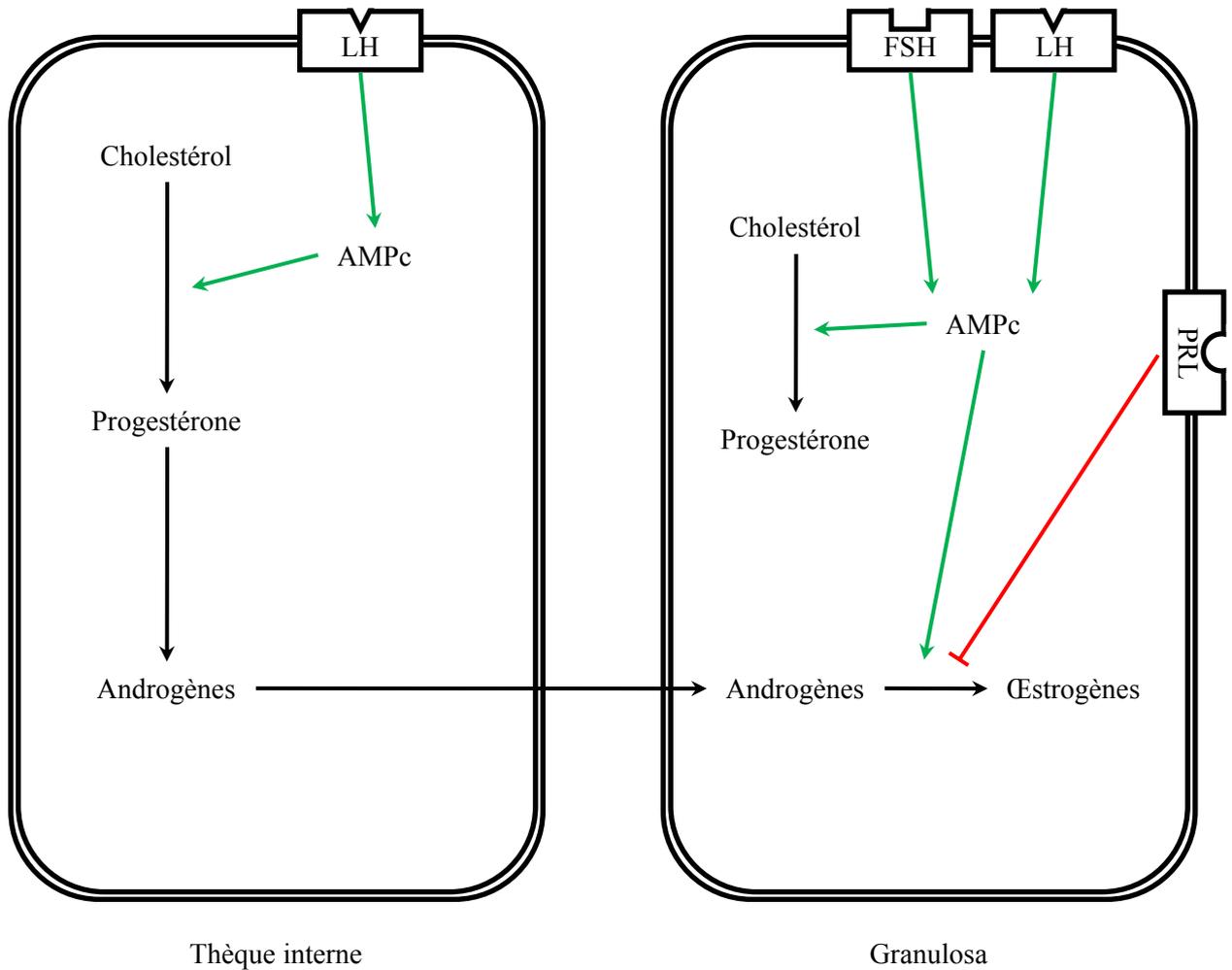
(b) *Les hormones ovariennes*

En parallèle de sa fonction exocrine de production des cellules sexuelles, l'ovaire a un rôle endocrine primordial. Deux types d'hormones sont produites dans l'ovaire : les hormones stéroïdes et les hormones peptidiques. Les hormones stéroïdes ont un rôle double : elles contrôlent la structure et le fonctionnement des organes cibles de l'ovaire et elles régulent le cycle œstrien par un rétrocontrôle au niveau central. Les hormones peptidiques ont principalement une fonction de régulation du cycle par action au niveau hypothalamo-hypophysaire.

(i) *Les hormones stéroïdiennes*

Ce sont les hormones majoritairement produites et sécrétées par les ovaires. Elles sont synthétisées à partir du cholestérol libre intracellulaire (Fig 35). Ce dernier peut provenir d'une synthèse *de novo* à partir de l'acétate, d'une hydrolyse des esters de cholestérol qui constituent la forme de stockage du cholestérol intracellulaire ou avoir une origine extra-cellulaire, étant internalisé par les récepteurs du LDL (Robel, 2001 ; Gore-Langton et Armstrong, 1994). La stéroïdogénèse débute au niveau de la face interne de la membrane mitochondriale. La première étape de la stéroïdogénèse est donc l'internalisation du cholestérol par les protéines StAR et PBR (*Peripheral Benzodiazepine Receptor*). Plusieurs des réactions suivantes de la biosynthèse des hormones stéroïdes sont portées par des complexes enzymatiques comportant un cytochrome P450. Les cytochromes P450 sont des protéines membranaires, situées dans la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique (pour une revue, voir Gueguen, *et al.*, 2006, annexe 5). Elles catalysent généralement des réactions d'oxydoréduction et utilisent le NADPH comme source d'électrons. Dès son entrée dans la mitochondrie, la première réaction de transformation du cholestérol est catalysée par le cytochrome P450<sub>scc</sub>, qui clive la chaîne latérale du cholestérol et conduit à la formation de la pregnénolone. Dès lors que la pregnénolone est synthétisée, elle est dirigée au réticulum endoplasmique où se produiront toutes les étapes restantes de la stéroïdogénèse.

La **progestérone** est produite après conversion de la pregnénolone par la 3 $\beta$ -HSD  $\Delta$ 4-5 isomérase de type I. La biosynthèse des **androgènes** est assurée par le cytochrome P450<sub>c17</sub> (*17 $\alpha$ -hydroxylase*) qui réalise la production d'androstènedione et de DHEA (déhydroépiandrostérone). Puis,



### Figure 36 : La production des hormones stéroïdiennes dans le follicule

Lorsque le follicule est immature, les cellules de la thèque interne produisent les androgènes sous le contrôle de la LH et les cellules de la granulosa importent les androgènes de la thèque et les convertissent en œstrogènes. Au cours de la maturation folliculaire, les cellules de la granulosa acquièrent les récepteurs de la LH et de la prolactine (PRL) sous l'influence de la FSH. La prolactine inhibe l'activité aromatasase et contribue à la différenciation des cellules. La LH stimule la production de progéstérone, qui ne devient importante qu'après lutéinisation.

Adapté d'après Robel, 1991 ; Gore-Langton et Armstrong, 1994.

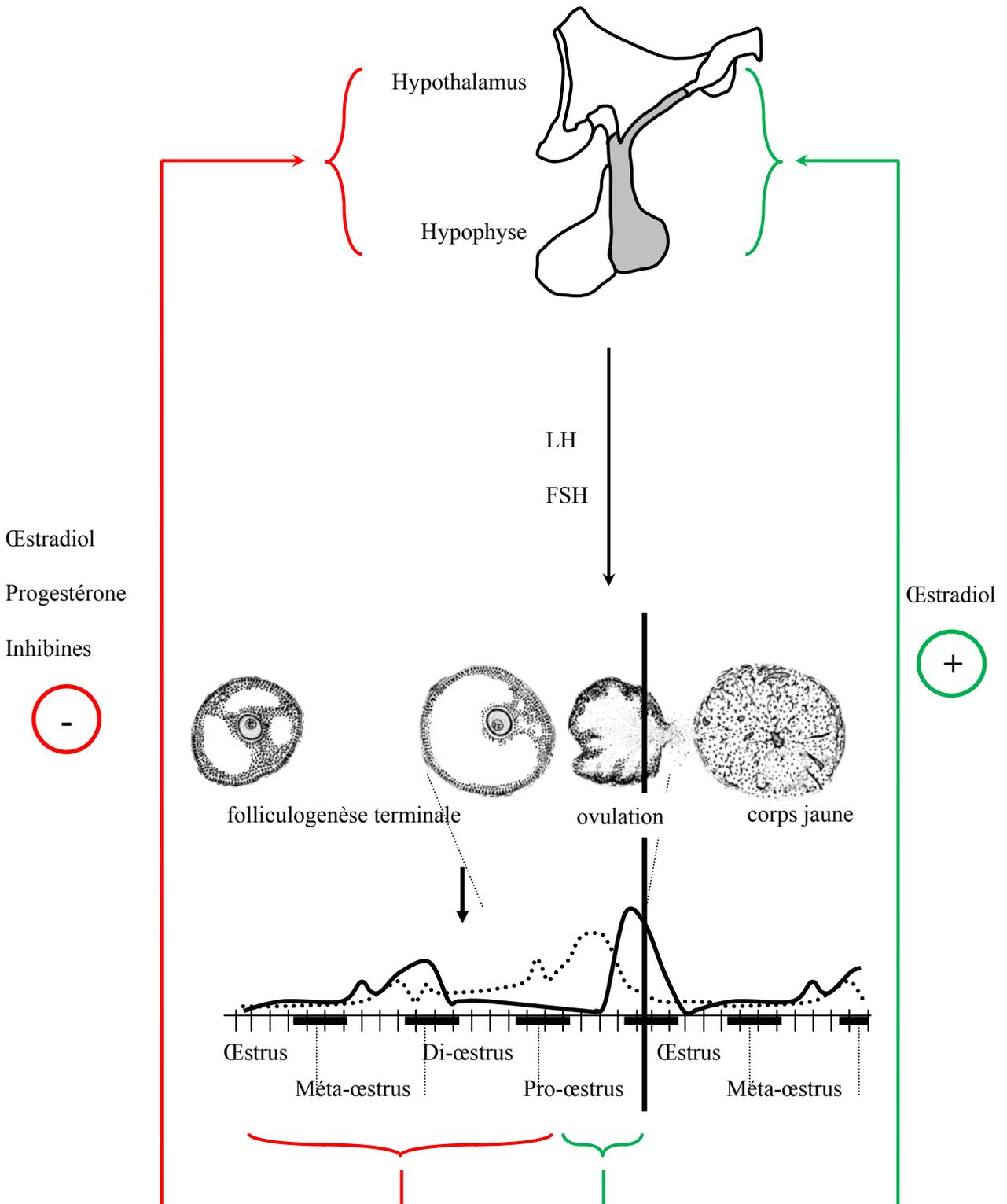
la 17 $\beta$ -hsd (*17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase*) produit la testostérone à partir de l'androstènedione. Enfin, les **œstrogènes** sont synthétisés par l'aromatase qui réalise l'aromatation du cycle A de l'androstènedione et de la testostérone pour donner respectivement l'œstrone et l'œstradiol.

La production des stéroïdes ovariens est assurée par une coopération des différents types cellulaires du follicule (Fig 36). Dans le follicule immature, les cellules de la thèque interne ne possèdent pas la 17 $\alpha$ -hydroxylase et produisent des androgènes sous le contrôle de la LH. Les cellules de la granulosa synthétisent la progestérone et convertissent les androgènes de la thèque en œstrogènes (Gore-Langton et Armstrong, 1994) sous le contrôle exclusif de la FSH. Au cours de la maturation du follicule, les cellules de la granulosa acquièrent les récepteurs de la LH et de la prolactine, qui contribuent à leur différenciation. Après le pic pré-ovulatoire de gonadotrophines, les cellules de la thèque interne et de la granulosa perdent leur réceptivité aux gonadotrophines, causant un blocage temporaire de la production des stéroïdes. La production de progestérone est restaurée au cours de la lutéinisation des cellules.

Les travaux du laboratoire ont montré une implication de LXR $\alpha$  dans la régulation de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse aux niveaux surrénalien (Cummins, *et al.*, 2006) et testiculaire (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1 ; voir chapitre I paragraphe B-6).

## (ii) *Les hormones peptidiques*

Les activines et les inhibines. Ce sont des glycoprotéines dimériques appartenant à la super-famille du TGF- $\beta$  et stabilisées par des ponts disulfures (Pour une revue, voir Vale, *et al.*, 1994). Il existe trois sous-unités pouvant former ces hormones :  $\alpha$ ,  $\beta$ A et  $\beta$ B. Les inhibines (A et B) sont formées d'une sous-unité  $\alpha$  et une  $\beta$  alors que les activines (A, B ou AB) sont formées par la dimérisation de deux sous-unités  $\beta$ . Ces protéines sont produites par les cellules de la granulosa et les cellules lutéales (pour une revue, voir de Kretser, *et al.*, 2002). Les activines sont exprimées constitutivement par le follicule au cours du cycle (Lerch, *et al.*, 2007) avec de faibles variations de sécrétions au cours du cycle. Elles agissent à deux niveaux. Au niveau ovarien, elles contrôlent la croissance des follicules par la stimulation des cellules de la granulosa et elles augmentent la production du récepteur de la FSH et de l'aromatase. Au niveau hypophysaire, elles stimulent la production de FSH. La production des inhibines est cyclique et corrèle avec l'état de croissance folliculaire. Leur rôle principal est une inhibition de la synthèse de FSH au niveau hypophysaire. Il est à noter que la sécrétion cyclique des inhibines ovariennes est un point clé de contrôle du cycle ovarien.



**Figure 37 : Le contrôle du cycle œstrien par les hormones ovariennes**

Pendant le cycle, les faibles quantités d'hormones stéroïdiennes exercent un rétro-contrôle négatif sur la production de LH et FSH hypophysaires. En fin de pro-œstrus, l'élévation exerce un contrôle positif sur la sécrétion de gonadotrophines hypophysaires, déclenchant la décharge ovulante. Le profil de sécrétion des inhibines, qui participent au rétro-contrôle négatif, n'est pas représenté sur le schéma, il corrèle avec l'état de croissance folliculaire. .... : Œstradiol (pg/ml) ; — : Progestérone (ng/ml).

La follistatine est une glycoprotéine monomérique produite également par les cellules de la granulosa et les cellules lutéales (de Kretser, *et al.*, 2002). Cette hormone ne subit pas de variation cyclique majeure dans son profil de sécrétion. Son rôle dans le contrôle du cycle est l'inhibition de la sécrétion hypophysaire de la FSH par une fixation aux inhibines, bloquant ainsi leur action.

L'AMH est également une hormone de la famille du TGF- $\beta$ . C'est une glycoprotéine homodimérique stabilisée par des ponts disulfure. Elle est initialement connue pour son action dans la régression des canaux de Müller au cours du développement, inhibant ainsi la formation des voies génitales femelles chez le mâle en développement. Elle exerce toutefois un rôle important dans la physiologie reproductive chez la femelle. L'AMH est produite par les cellules de la granulosa des follicules et ses concentrations plasmatiques sont très stables au cours du cycle. Comme nous l'avons déjà vu, elle intervient dans le blocage du recrutement initial des follicules primordiaux. Par ailleurs, l'AMH exerce un effet répressur sur la croissance des follicules pré-antraux (Durlinger, *et al.*, 2001). Enfin, il est à noter que chez l'adulte, les taux plasmatiques d'AMH diminuent progressivement au cours du vieillissement. Il existe une corrélation étroite entre ses concentrations et le stock de follicules primordiaux, ainsi que le nombre de petits follicules et de follicules préantraux. Ainsi, l'AMH est-elle un marqueur du fonctionnement ovarien (pour une revue, voir Visser, 2006 ; Visser, *et al.*, 2006).

La relaxine est une hormone dimérique de la famille de l'insuline (Sherwood, 1994). C'est un facteur protéique dimérique comportant deux chaînes polypeptidiques (A et B) stabilisées par des ponts disulfure. Elle est synthétisée par le corps jaune pendant la gestation sous l'influence essentiellement de facteurs lutéotrophiques placentaires. Chez la rate, peu de relaxine est produite par le corps jaune pendant la première moitié de la gestation ; ses concentrations plasmatiques n'augmentent que dans la seconde moitié de la gestation. Bien qu'elle possède des effets pléiotropes sur l'organisme, un de ses rôles principaux dans la physiologie de la reproduction chez la femelle semble être l'inhibition des contractions utérines, à la fois en fréquence et en amplitude, contrôlant ainsi la durée de la gestation.

### (c) *Contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire*

Pendant la durée du cycle œstrien, de faibles quantités d'œstrogènes et de progestérone (de l'ordre de 10 pg/ml et 5-10 ng/ml respectivement), associés aux inhibines, exercent un rétro-contrôle négatif au niveau hypothalamo-hypophysaire, maintenant le taux de gonadotrophines circulantes à un niveau basal (Fig 37 ; Freeman, 1994). En fin de pro-œstrus, les quantités croissantes d'œstrogènes (s'élevant à 40-45 pg/ml) produits par les follicules sélectionnés exercent un rétro-contrôle positif sur



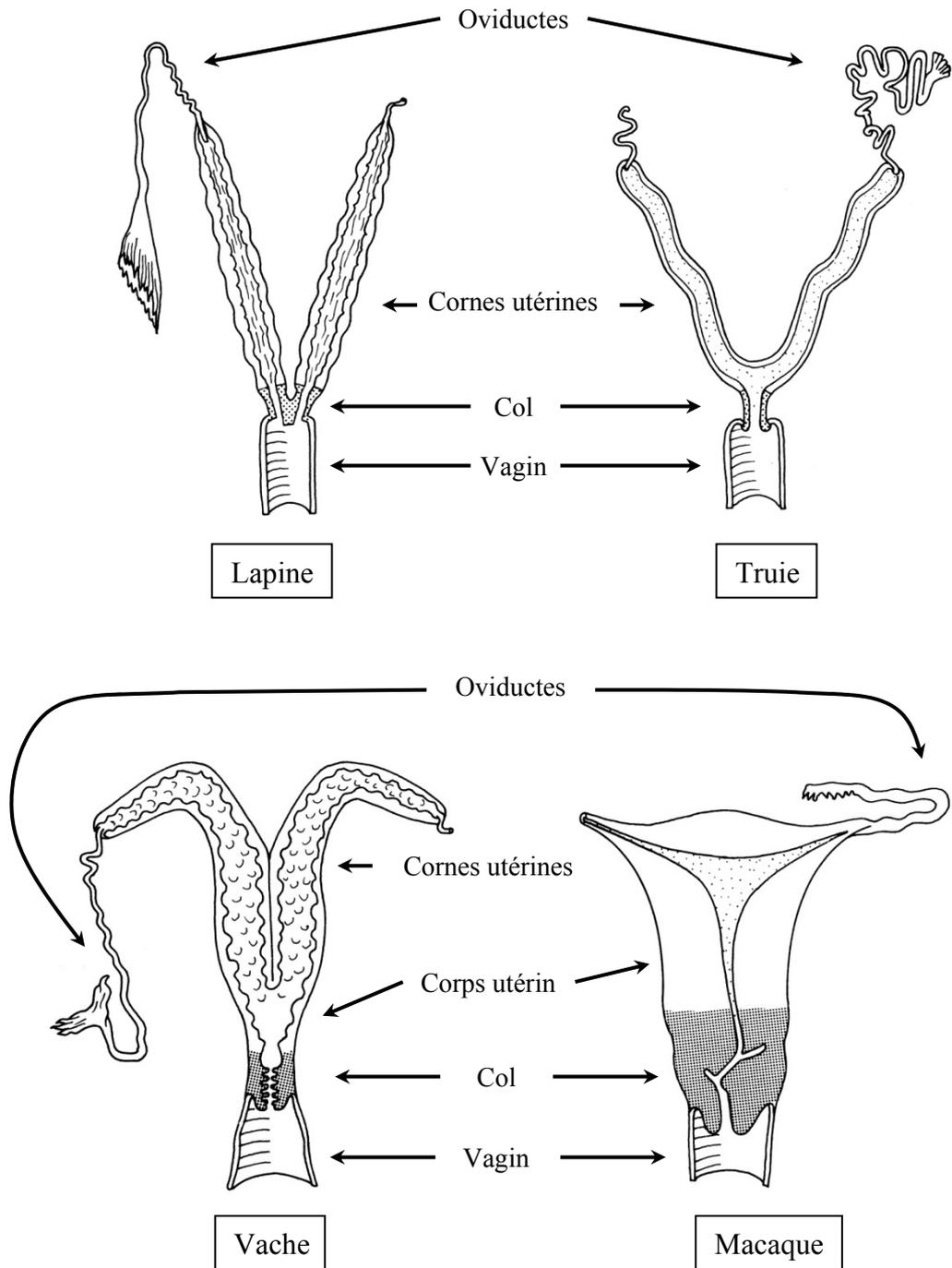
la production de gonadotrophines menant à la décharge ovulante de LH et de FSH. Chez la souris, le pic de FSH est biphasique et on assiste à une seconde augmentation des teneurs plasmatiques en FSH après l'ovulation, en début d'œstrus. Le contrôle de ce second pic de sécrétion, indépendant de l'axe hypothalamo-hypophysaire, reste mal connu. Il stimulerait la formation de l'antrum des follicules ovulant au cycle suivant, dont le développement provoque l'élévation d'œstradiol en début de pro-œstrus. En parallèle, ces mêmes follicules sécrètent des quantités importantes de progestérone (s'élevant à 50-55 ng/ml), responsable du contrôle de la fenêtre de sécrétion de LH. L'élévation d'œstrogènes induit également une production élevée de prolactine, dont le profil de sécrétion suit celui de la LH. Cette augmentation serait une réponse à une diminution de dopamine associée à une augmentation de TRH (*Thyroid-Releasing Hormone*) dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Après l'ovulation, le corps jaune cyclique, en fin de méta-œstrus et en début de di-œstrus, partiellement fonctionnel, synthétise des quantités de progestérone de l'ordre de 20 à 25 ng/ml.

*(d) Rôle des stéroïdes ovariens sur les organes périphériques*

Les stéroïdes ovariens possèdent des rôles multiples dans l'organisme, par exemple dans le maintien de la structure de l'os. Ainsi, la chute d'œstrogènes ovariens lors de la ménopause est-elle responsable chez certaines femmes d'une ostéoporose. Nous n'évoquerons ici que brièvement le rôle des stéroïdes dans la fonction de reproduction.

Les œstrogènes produits en fin de pro-œstrus exercent une action sur les organes cibles périphériques. Ils stimulent la prolifération des canaux galactophores au niveau de la glande mammaire et provoquent une hyperplasie des cellules épithéliales des voies génitales (oviductes, endomètre, col utérin et vagin). On peut ainsi assimiler les œstrogènes à des hormones responsables de la prolifération cellulaire au niveau des organes sexuels.

La progestérone, produite en fin de méta-œstrus et début de di-œstrus, provoque l'apparition des alvéoles mammaires et une hypertrophie des cellules épithéliales vaginales. Au niveau de l'endomètre, elle provoque l'apparition de la phase sécrétoire : elle s'oppose aux effets hyperplasiques des œstrogènes sur les cellules épithéliales et induit leur différenciation. On peut ainsi assimiler la progestérone à une hormone ayant un rôle différenciateur sur les cellules ayant proliféré sous l'influence des œstrogènes. On comprend ainsi la nécessité de réguler strictement leurs concentrations dans une fenêtre temporelle étroite.



**Figure 38 : Les différents types d'utérus**

Selon le degré de fusion des canaux de Müller au cours du développement, l'utérus mature peut être double (lapine et truie), bicornué (vache) ou simple (macaque). Noter que l'utérus de souris, non représenté sur ce schéma est double avec un seul canal cervical. Adapté d'après Maltier et al., 1991.

### 3. La gestation

Lors de l'accouplement, la stimulation du col de l'utérus induit l'activation d'un arc-réflexe responsable du maintien de fortes teneurs plasmatiques en prolactine (Leymarie et Martal, 1991). Ce réflexe neuro-endocrinien est particulier : la stimulation du col de l'utérus ne déclenche pas une production hormonale directe, mais permet la production de deux vagues de sécrétion de prolactine par jour (Freeman, 1994). Ces deux pics de prolactine sont maintenus jusqu'au 12<sup>ème</sup> ou 13<sup>ème</sup> jour de gestation et permettent le maintien (ou « sauvetage ») du corps jaune, qui produit de fortes quantités de progestérone (50 à 55 ng/ml) pendant 12 à 14 jours. Si l'accouplement est stérile, cette phase est appelée la pseudo-gestation. Le corps jaune va régresser sous l'influence de la prostaglandine PGF2 $\alpha$  produite par l'utérus. En revanche, si l'accouplement est fertile, l'implantation du blastocyste dans l'endomètre provoque la transformation des fibroblastes du stroma utérin en cellules déciduales de type épithélial. Ces dernières sécrètent la prostaglandine PGE2 en quantité plus importante que PGF2 $\alpha$ , conduisant à la persistance du corps jaune pendant toute la gestation et à une forte synthèse de progestérone. Cette hormone est responsable du maintien de la gestation jusqu'à la parturition, particulièrement par la quiescence du myomètre utérin. La gestation de la souris dure 19,2 jours.

## B. L'utérus

### 1. Données anatomiques

Les voies génitales femelles sont impliquées dans l'implantation des blastocystes, le développement des embryons puis des fœtus et la mise bas. Elles sont composées anatomiquement de quatre régions : le vagin, le col de l'utérus, l'utérus et l'oviducte ou trompe de Fallope. Le tractus génital chez la femelle résulte du développement embryonnaire des canaux de Müller. Chez les mammifères, il existe schématiquement trois formes anatomiques de l'utérus selon les espèces, dépendant du degré de fusion des canaux de Müller (Fig 38 ; Maltier, *et al.*, 1991 ; Rousseau et Ménézo, 1991).

- L'utérus simple, retrouvé chez les primates, est constitué d'une cavité utérine unique reliée au vagin par un col unique.
- L'utérus à deux cornes ou bicornué possède deux cornes utérines soudées sur 5 % de leur longueur chez la truie ou la chienne à 50 % chez les ruminants.



- L'utérus double est composé de deux cornes fusionnant en un seul canal au niveau cervical (chez la souris ou le cobaye) ou au niveau du vagin (chez la rate et la lapine).

Il est à noter que les situations d'utérus bicornués semblent adaptées aux mammifères ayant des portés d'un grand nombre de petits. Chez la femme, une situation pathologique résultant d'un défaut de soudure des canaux de Müller au cours du développement entraîne la formation d'un utérus dit bifide. Cette situation, bien que fertile, entraîne plusieurs troubles, notamment de l'implantation et de l'accouchement, beaucoup de naissances devant se produire par césarienne (Rudigoz, *et al.*, 1989)

D'un point de vue histologique, l'utérus de la souris comprend trois régions.

La région la plus interne, l'endomètre (ou décidue), est formée d'une couche basale, d'un chorion conjonctif richement vascularisé ou stroma et d'un épithélium cubique monostratifié. Cet épithélium, qui délimite la lumière de l'utérus, forme de multiples involutions, donnant l'impression de glandes lors d'une observation histologique. C'est la partie superficielle de l'endomètre, notamment l'épithélium, qui subit les variations cycliques sous l'influence des hormones ovariennes. Il joue un rôle majeur dans l'implantation du blastocyste.

Autour de l'endomètre, le myomètre est la portion la plus importante de l'utérus : il représente plus de 60 % de l'organe (McCormack et Glasser, 1980). C'est un muscle lisse possédant chez la souris deux couches musculaires : une couche externe composée de fibres longitudinales et une couche interne de fibres circulaires (Challis et J., 1994). Il joue son rôle principal lors de la parturition par l'expulsion des petits, mais aussi lors de la montée des spermatozoïdes, où ses contractions majoritairement descendantes permettent une sélection des spermatozoïdes les plus vigoureux. Enfin, la contractilité du muscle utérin semble avoir un rôle chez la rate dans la distribution correcte des blastocystes lors de l'implantation.

La région la plus externe est un épithélium séreux dont le double rôle est de protéger l'utérus et de servir de support sur lequel les fibres musculaires peuvent se contracter.

## 2. La parturition

### a) *Le signal déclencheur de la parturition*

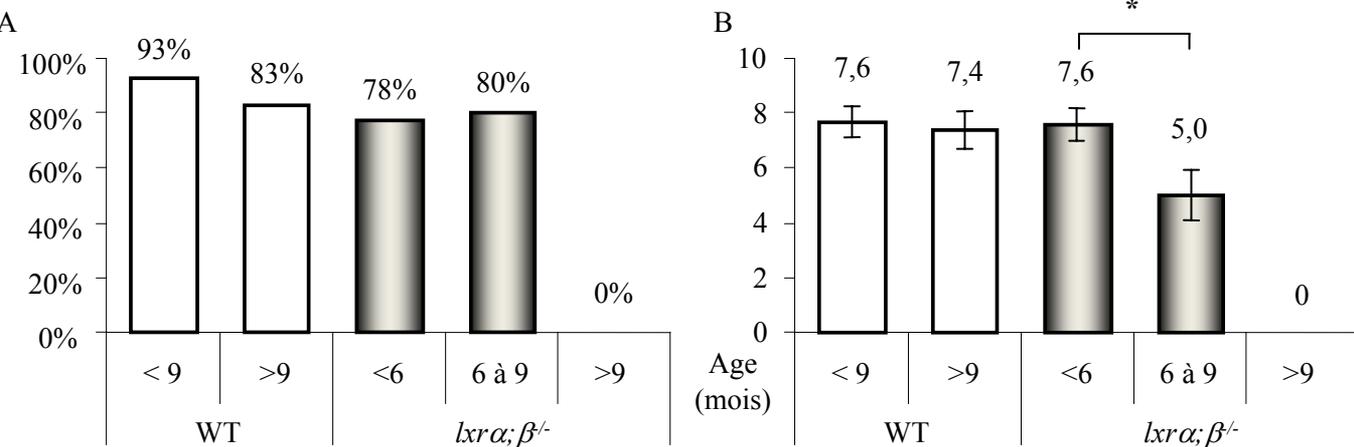
L'élément initiateur de la parturition reste encore aujourd'hui mal connu. Plusieurs études ont montré qu'à l'approche de la parturition, le fœtus synthétise de grandes quantités de glucocorticoïdes, de manière dépendante de l'hypophyse fœtale (pour une revue, voir Challis et J., 1994). Cependant,



chez les rongeurs, la durée de la gestation n'est pas altérée par l'administration de glucocorticoïdes de synthèse à la mère, suggérant que ces hormones ne seraient pas le *primum movens* de la mise bas. Cependant, il est intéressant de constater que le terme de la gestation s'accompagne d'une infiltration de leucocytes dans le myomètre, suggérant que des réactions inflammatoires se produisent au moment de la parturition (Thomson, *et al.*, 1999). Une étude récente a montré chez la souris que lorsque le poumon du fœtus est mature, il sécrète la protéine du surfactant A (SP-A ; *Surfactant Protein-A*). Le SP-A est capable de stimuler la production d'IL-1 $\beta$  et de NF- $\kappa$ B dans les macrophages du fluide amniotique et de promouvoir l'invasion des macrophages d'origine fœtale dans l'utérus maternel (Condon, *et al.*, 2004). La même équipe a récemment montré que l'activation du facteur NF- $\kappa$ B par IL-1 $\beta$  permet l'activation transcriptionnelle directe de l'isoforme PR-C du récepteur de la progestérone. Ce dernier ne possède pas de DBD et agit comme inhibiteur des gènes cibles de la progestérone par fixation du ligand (Condon, *et al.*, 2006). En parallèle, l'interleukine-1 est capable d'augmenter la production de prostaglandines utérines par activation de l'expression du gène *cox-2* (Rauk et Chiao, 2000, *Am J Reprod Immunol*). Prises ensemble, ces données suggèrent que le fœtus est capable d'informer sa mère de sa maturité par une sécrétion de SP-A pulmonaire. Ce dernier provoque une réaction inflammatoire maternelle, initiant le déclenchement de la mise bas.

#### b) *La physiologie de la parturition*

Au terme de la gestation, une forte chute de la teneur plasmatique maternelle de progestérone est associée à une élévation brutale d'œstrogènes (Maltier, *et al.*, 1991). Cette inversion du rapport progestérone / œstradiol (P4/E2) est le premier élément maternel de la parturition, responsable d'une augmentation de prostaglandines PGF2 $\alpha$  et PGE2 d'origine endométriale, qui ont toutes deux un rôle contracturant sur le myomètre. De plus, la chute du rapport P4/E2 associée à l'augmentation de prostaglandines est responsable de l'apparition du récepteur de l'ocytocine dans les myocytes. Cette hormone peptidique neurohypophysaire stimule les contractions du muscle utérin au moment de la parturition. Dès lors que le travail a débuté, la dilatation du col de l'utérus entraîne un réflexe neuro-endocrinien (réflexe de Ferguson) responsable d'une décharge d'ocytocine par la neurohypophyse. Par ailleurs, une perte des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, et une élévation des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques, initiées par la chute du rapport plasmatique P4/E2, entraînent une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire dans les myocytes et ainsi des contractions.



**Figure 39 : Evolution de la fertilité des femelles *lcrα;β<sup>-</sup>***

Des femelles *lcrα;β<sup>-</sup>* ont été croisées avec des mâles sauvages. A : Les mâles et les femelles ont été séparés lorsqu'un bouchon vaginal était présent, attestant de leur accouplement. Le pourcentage de naissances par rapport au nombre de séparations a été estimé. B : Lorsqu'il y a eu naissance, les petits ont été comptés dans chaque portée. \* : les femelles *lcrα;β<sup>-</sup>* présentent une diminution significative du nombre de petits par portée (P<0,05 vs WT).

WT (*wild-type*) : souris sauvages.

### III. Conclusions et projet de recherche

Ces dernières années ont confirmé le fait que les LXRs sont des régulateurs du métabolisme du cholestérol. Ils agissent ainsi comme « senseurs » du cholestérol intracellulaire, et agissent comme « soupape de sécurité » en exerçant une action hypocholestérolémiant. Leur étude révèle cependant plusieurs points intéressants. Bien que les oxystérols soient aujourd'hui identifiés comme ligands physiologiques endogènes des LXRs, il semble que d'autres molécules, notamment le glucose puissent les activer également (Mitro, *et al.*, 2007a). 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 LXRs et leur activité transcriptionnelle. Enfin, l'analyse des gènes et protéines cibles révèle que ces NRs, au-delà du simple contrôle de l'homéostasie lipidique et en particulier du cholestérol, sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, comme la régulation de la glycémie, la modulation de l'inflammation et le contrôle de la stéroïdogénèse.

Dans ce cadre, le projet de cette étude a porté sur l'analyse *in vivo* du rôle des LXRs dans la physiologie de la reproduction chez la femelle. Ce projet reposait sur plusieurs observations :

(1) Les femelles *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* présentent une diminution drastique de la fertilité associant une baisse du nombre de petits par portée à celle du nombre de mise bas après séparation sur bouchon vaginal (Fig 39). Bien que ce trouble puisse être en partie associé aux mâles (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1), l'implication des femelles n'est pas à exclure (Cette étude ; Steffensen, *et al.*, 2006).

(2) Les LXRs régulent la fonction exocrine testiculaire *in vivo* (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1) et ovarienne *ex vivo* (Steffensen, *et al.*, 2006). Par ailleurs, les LXRs sont des régulateurs clés de la stéroïdogénèse. En effet, l'isoforme LXR $\alpha$  permet au niveau intestinal la détoxification des produits secondaires de la stéroïdogénèse (Volle, *et al.*, 2004) et stimule la production des hormones stéroïdes surrénaliennes (Cummins, *et al.*, 2006) et testiculaires (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1) *via* l'activation transcriptionnelle de gènes codant des enzymes clés de ces voies de biosynthèse. En parallèle, l'administration d'agonistes de LXRs semble bloquer *ex vivo* la production de progestérone dans les cellules de la granulosa (Drouineaud, *et al.*, 2007). L'implication de ces NRs dans le contrôle *in vivo* de la fonction ovarienne est donc fortement envisageable.



(3) Plusieurs ligands endogènes des LXR, notamment le FF-MAS qui possède un rôle important dans le contrôle de la fonction exocrine de l'ovaire, sont présents au niveau ovarien à des doses physiologiquement actives. De plus, la régulation des flux de cholestérol nécessaire au maintien de la stéroïdogénèse ovarienne doit être strictement contrôlée.

(4) Aux niveaux ovarien et utérin, les récepteurs LXR $\alpha$  (Cette étude ; Bookout et Mangelsdorf, 2003) et LXR $\beta$  (Cette étude ; Fig 3) sont exprimés.

(5) Au cours de la grossesse, en conditions normales, les concentrations circulantes de cholestérol augmentent jusqu'à la date du terme (Knopp, *et al.*, 1986). Cependant, une hypercholestérolémie maternelle non contrôlée au cours de la grossesse a des effets délétères sur le fœtus, notamment un risque athérosclérotique élevé (pour une revue, voir Palinski et Napoli, 2002). Ces données montrent que les taux de cholestérol doivent être strictement régulés au cours de la grossesse.

(6) Il est aujourd'hui clair que les LXRs sont des régulateurs clés de l'inflammation. Or, les processus inflammatoires sont primordiaux dans la fonction de reproduction chez la femelle. Au niveau ovarien, l'ovulation est assimilable à une réaction inflammatoire contrôlée. Des dérégulations du statut inflammatoire lors d'ovulations spontanées ou contrôlées sont associées à une situation pathologique, connue sous le nom de syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS ; *Ovarian hyperstimulation Syndrome* ; pour une revue, voir Elchalal et Schenker, 1997). Ce syndrome est la complication la plus fréquente lors des inductions de l'ovulation préalables aux techniques de procréation médicalement assistée (PMA ou FIV : Fécondation *in vitro* ; Navot, *et al.*, 1987). En outre, au niveau utérin, l'accouchement est associé à une production de médiateurs de l'inflammation et de plus en plus d'études suggèrent que l'accouchement serait consécutif à un processus inflammatoire (pour une revue, voir Norman, *et al.*, 2007). Un statut inflammatoire dérégulé peut être une des causes d'accouchements prématurés et on estime que 25 à 40 % des naissances prématurées sont dues à des infections microbiennes (pour une revue, voir Romero, *et al.*, 2006)

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'identifier le rôle physiologique *in vivo* de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  dans la fonction de reproduction femelle par la caractérisation du phénotype des souris femelles *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*. Nous avons ainsi montré que (1) au niveau ovarien, les souris déficientes en LXRs présentent une hypofertilité marquée associée à des signes d'insuffisance ovarienne prématurée. Par ailleurs, l'induction de l'ovulation par une stimulation hormonale exogène provoque chez ces animaux des signes de réponse ovarienne accrue, suggérant l'existence d'un syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS). De plus, (2) au niveau utérin, nous avons montré que l'isoforme LXR $\beta$  régule spécifiquement l'homéostasie des lipides, en particulier du cholestérol dans le muscle utérin et contrôle l'activité contractile musculaire.



# *Résultats*



Chapitre I : Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR<sub>s</sub> dans  
la physiologie ovarienne



### Présentation du contexte scientifique :

Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS) est la complication la plus fréquente des inductions de l'ovulation utilisées lors de traitement des stérilités (Navot, *et al.*, 1987). Les formes modérées et sévères se produisent dans 3,1 à 6 % et 0,25 à 1,8 % des inductions de l'ovulation respectivement (Homburg et Insler, 2002). Cette pathologie est caractérisée par une augmentation bilatérale et kystique du volume ovarien associée à une concentration de fluides extravasculaires. Cette sortie liquidienne est responsable d'ascites qui sont en partie la cause du symptôme le plus courant de l'OHSS : les douleurs abdominales. Dans les cas les plus sévères, la diminution de la volémie sanguine provoque une tachycardie, une diminution de la fonction rénale et une hémococoncentration. En outre, les patientes peuvent présenter des troubles artériels et thromboemboliques. Les cas les plus graves se manifestent par une élévation de diaphragme, une accumulation de fluides au niveau de la plèvre et des œdèmes interstitiels responsables de détresses respiratoires. En l'absence de traitement adapté, l'OHSS peut être mortel (Vlahos et Gregoriou, 2006). Le syndrome peut aussi être associé à des kystes ovariens hémorragiques (Kurioka, *et al.*, 2005).

Bien que l'étiologie complète de cette pathologie soit actuellement inconnue, plusieurs facteurs de risque ont été identifiés (Delvigne et Rozenberg, 2002), notamment un jeune âge, un terrain allergique, des taux d'œstradiol sériques élevés, le syndrome des ovaires polykystiques (*Polycystic Ovary Syndrome* ; PCOS) et un fort indice de masse corporelle. Les symptômes de l'OHSS sont très proches d'une réponse inflammatoire aiguë et plusieurs facteurs sont liés à sa progression, comme VEGF, IL-6 et les prostaglandines (Budev, *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les patientes obèses incluses dans des protocoles de fécondation *in vitro* (FIV) ont des chances de succès moindres (Maheshwari, *et al.*, 2007) et il existe une corrélation entre l'indice de masse corporelle et le taux d'échecs des FIV (Ferlitsch, *et al.*, 2004), ce qui suggère que le statut nutritionnel, en particulier en lipides, pourrait être un facteur de risque lors des inductions de l'ovulation.

Parmi les nombreuses fonctions physiologiques attribuées aux LXRs, la régulation du système immunitaire est particulièrement étudiée (pour une revue voir Volle et Lobaccaro, 2007 ; Tontonoz et Mangelsdorf, 2003). Ainsi, l'activation des LXRs inhibe-t-elle l'expression des gènes codant la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et la cyclo-oxygénase 2, l'enzyme limitante de la biosynthèse de la prostaglandine F2 $\alpha$  (Joseph, *et al.*, 2003). De plus, les agonistes des LXRs stimulant l'expression du gène codant le TNF- $\alpha$  et le VEGF (Landis, *et al.*, 2002 ; Walczak, *et al.*, 2004). Les LXRs sont donc des modulateurs essentiels dans la modulation de l'inflammation.



Sachant que (1) l'ovulation peut être assimilée à une réaction inflammatoire localisée et que (2) l'OHSS est associé à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, nous avons provoqué une super-ovulation chez des souris sauvages et *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*. Nous montrons au cours de cette étude que les souris déficientes en LXRs présentent plusieurs signes évocateurs d'un OHSS. Le protocole d'induction de l'ovulation employé induit des augmentations de la masse ovarienne, associées à une perturbation de la perméabilité vasculaire. La stimulation hormonale exogène provoque également des hémorragies ovariennes et les ovaires présentent des signes de réponse accrue aux gonadotrophines.



**Article 1** : Absence of the nuclear receptors for oxysterols LXRs induces ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in mice.

Article en cours de préparation

Kevin Mouzat, Silvère Baron, David H. Volle, Geoffroy Marceau, Fanny Volat, Françoise Caira, Pierre Déchelotte et Jean-Marc A. Lobaccaro.

Résumé :

Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne (OHSS) est une complication fréquente des protocoles de fécondation *in vitro*. Il est caractérisé par une augmentation massive du volume ovarien associée à une accumulation de fluide extravasculaire. Nous montrons dans cette étude que les souris déficientes en LXRs présentent plusieurs symptômes cliniques de l'OHSS : augmentation du volume ovarien, corps jaunes hémorragiques et augmentation de la perméabilité vasculaire ovarienne. L'induction de l'ovulation résulte en une réponse ovarienne excessive aux gonadotrophines exogènes. En effet, le nombre de follicules ovulés et la production d'œstradiol sont plus importants chez les souris transgéniques. Le traitement de souris sauvages par l'agoniste synthétique des LXRs T0901317 provoque une augmentation de la production d'œstradiol et de l'expression des gènes *star* et *cyp11a1*, montrant le rôle clé des LXRs dans la régulation de la stéroïdogenèse ovarienne. Ces résultats suggèrent que les LXRs contrôlent le processus ovulatoire et des études complémentaires apporteront des informations importantes quant aux relations entre le statut nutritionnel et le suivi des techniques de procréation médicalement assistée.



## Absence of the nuclear receptors for oxysterols LXRs induces ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in mice\*.

Short title: **Lack of LXR induces an OHSS in mouse.**

Mouzat K.<sup>1,2,3</sup>, Baron S.<sup>1,2,3</sup>, Volat F.<sup>1,2,3</sup>, Volle D.H.<sup>1,2,3,¶</sup>, Marceau G.<sup>4</sup>, Dechelotte P.<sup>5</sup>, Caira F.<sup>1,2,3</sup> and Lobaccaro J.M.A.<sup>1,2,3,6</sup>

- (1). Clermont Université, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire;
- (2). CNRS; UMR 6547;
- (3). Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne; 24 avenue des Landais, 63177 Aubière, France;
- (4). INSERM; U 384, Place Henri Dunan, 63000 Clermont-Ferrand, France;
- (5). CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomie Pathologique, Hôtel Dieu, Boulevard Léon Malfreyt, 63058 Clermont-Ferrand, France.

¶ Present address: INSERM; U 895, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Hôpital L'ARCHET 2, 06200 Nice, France.

(6) Professor of the Université Blaise Pascal. To whom correspondence should be addressed: UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547 et Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. Tel.: 33-473-40-74-16; Fax: 33-473-40-70-42; E-mail: [j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr](mailto:j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr)

\* This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Blaise Pascal, Fondation pour la Recherche Médicale Grant INE2000-407031/1, and the Fondation BNP-Paribas.

### Abstract

**Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is a frequent complication occurring during *in vitro* fertilization cycles. It is characterized by a massive ovarian enlargement associated with accumulation of extravascular fluid. Here we show that LXRs deficient mice present many clinical symptoms of OHSS: ovarian enlargement, hemorrhagic corpora lutea and increased ovarian vascular permeability. Ovulation stimulation resulted in excessive ovarian response to exogenous gonadotropins as follicle number and estradiol production were higher in transgenic mice. Upon treatment with the synthetic LXR agonist T09101317, serum estradiol and expression of *star* and *cyp11a1* genes were markedly increased, showing that LXRs are key regulators of ovarian steroidogenesis. These results suggest that LXRs control the process of ovulation by regulating endocrine and vascular processes.**

### Introduction

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)<sup>1</sup> is the most common important complication of induced ovulation for the treatment of fertility (1). Moderate and severe forms can occur in 3.1 to 6 % and from 0.25 to 1.8 % of the induced cycles respectively (2). This pathology is characterized by a bilateral massive cystic enlargement of the ovaries

associated with an extravascular fluid concentration. This fluid shift is responsible for the development of ascites, which cause in part abdominal discomfort, the most common symptom of OHSS. In the most severe cases, the loss of intravascular volume leads to tachycardia, decrease in renal perfusion and hemoconcentration. Indeed, patients with OHSS can present arterial and venous thrombotic disorders. Moreover, elevation of the diaphragm, accumulation of fluid in the pleura and interstitial edema are responsible in most severe cases of adult respiratory distress. These symptoms cause severe morbidity and even mortality (3). This syndrome can be sometimes associated with hemorrhagic ovarian cysts (4).

Although complete etiology of OHSS is still unknown, many risk factors are known (5, 6), including young age, history of allergies, high serum estradiol, polycystic ovary syndrome and body mass index. Symptoms of OHSS resemble closely to acute inflammatory response and many factors are linked to the progression of the symptom, *e.g.* vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>1</sup>, interleukin 6 (IL-6)<sup>1</sup> and prostaglandins (6).

Besides, it is clear that obese patients undergoing *in vitro* fertilization (IVF)<sup>1</sup> have lower rates of pregnancy (7) and that body mass index is tightly linked to failure in IVF (8), suggesting that



nutritional status, particularly in lipids can be a risk factor for ovulation induction.

Among the various regulators of lipid balance, Liver X Receptor alpha (LXR<sup>1</sup>  $\alpha$ , NR1H3) and beta (LXR<sup>1</sup>  $\beta$ , NR1H2) play a central role in cholesterol homeostasis (for a review see (9)). They belong to a subclass of nuclear receptors that form obligate heterodimers with 9-*cis* retinoic acid receptors (RXR)<sup>1</sup> and are bound to and activated by a class of naturally occurring oxysterols (10, 11). Besides, inactivation of oxysterols by sulfonation results in a LXR signaling blockade in primary hepatocyte culture, and the use of transgenic mice deficient in the three enzymes responsible of 24(S)-OH-, 25-OH and 27-OH cholesterol, which do not respond to alimentary cholesterol definitively showed that oxysterols are endogenous physiologic ligands for LXRs (12), which can thus be considered as cholesterol sensors. In absence of any ligand, the RXR/LXR heterodimer is constitutively linked to specific DNA target sequences and interacts with corepressors, thus blocking transcription initiation (13, 14). The development of LXR-deficient mice (*lxr*<sup>-/-</sup>)<sup>1</sup> has also helped to elucidate the role of these nuclear receptors in various physiologic functions (9) and many target genes have been described such as the ATP-binding cassette transporter (ABC)<sup>1</sup> A1 (15, 16, 17), responsible for the cholesterol cellular efflux, and the sterol response element binding protein 1c (SREBP1c)<sup>1</sup> involved in lipid metabolism (18). It is now admitted that these nuclear receptors act as hypocholesterolemic factors, thus providing a “safety valve” protecting against cholesterol accumulation. Nevertheless, the interest regarding the role of these nuclear receptors in inflammatory response has been recently increasing (For a review, see 19). Thus, activation of LXRs is known *in vitro* to inhibit accumulation of the pro-inflammatory cytokin IL-6 and of Cyclooxygenase-2, the rate limiting enzyme in prostaglandin F2 $\alpha$  synthesis (20). In parallel, LXRs agonists can stimulate the expression of tumor necrosis alpha (tnf $\alpha$ ; 21) and vascular endothelial growth factor (vegf; 22). Taken together, these data show that LXRs have a central role in inflammation modulation.

In this paper, we show that LXRs act as a barrier to prevent from ovarian hyperstimulation syndrome in mouse. Hence, mice lacking LXRs undergoing ovulation induction present clinical signs of OHSS. Ovaries from these animals are enlarged and have reduced vascular permeability. Super-ovulation protocol can also provoke ovarian hemorrhages and led to increased number of retrieved oocytes in LXRs knockout mice.

### Experimental procedures

**Animals** - *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* -knockout mice (*lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup>) and their wild-type controls were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and

housed in a temperature-controlled room with a 12 hrs light/dark cycle (23,24). All experiments were performed on age-matched female mice. For all studies shown, mice were fed *ad libitum* with water and Global-diet® 2016S from Harlan (Gannat, France) containing 16% protein, 4% fat, 60% carbohydrates. For all experiments, except for estradiol synchronization, animals were treated with a superovulation protocol: intraperitoneally injection of 7 IU pregnant mare's serum gonadotropin on day 1, 5 IU human chorionic gonadotropin on day 3 and sacrificed on day 5 at the end of meta-estrus. For real-time PCR (qPCR)<sup>1</sup> experiments, mice were gavaged with 45 mg/kg T0901317 (T1317)<sup>1</sup> (Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux, France) or vehicle (methylcellulose) as previously described (25). For estradiol synchronization, estrus was induced with a single injection of 10  $\mu$ g estradiol benzoate (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) 18 hrs before sacrifice. For oocyte counting, mice were sacrificed on day 4, short time after ovulation and oocytes were collected in oviduct. They were then allowed to dissociate gently from follicular cells in hyaluronidase (Sigma-Aldrich) and counted. To reduce the effect of stress, the elapsed time between the capture of a mouse and its sacrifice was under 30s. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethics Committee (authorization CE1-04).

**Anatomy and pathology analyses** - Ovaries from 6 to 12 month-old mice were collected, fixed and embedded in paraffin, and 5  $\mu$ m-thick sections were prepared and stained with Haematoxylin/Eosin/Safran and analysed with Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Le Pecq, France) as described before (26).

**Real-time PCR** - Total RNA was isolated using the Trizol method (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to manufacturer's recommendations. The real-time PCR was performed on an iCycler (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) as described before (26). Briefly, 4  $\mu$ l of 1/50 diluted cDNA template were amplified by 0.75 U of HotMaster Taq DNA Polymerase (5Prime, Brumath, France) using SYBR Green dye (Biorad) to measure duplex DNA formation. Primers are given on Table I.

**Evaluation of Evans blue Leakage** - Before sacrifice, mice from both groups were anesthetized with a single intraperitoneal injection of chloral (3.75 mg / 10 g). Mice were then injected *via* intracardiac injection with 100  $\mu$ l of 25 mg/ml of Evans blue. Ovaries were collected and incubated in 1 ml of formamide for 24 hours at 60°C. To evaluate ovarian capillary permeability, Evans blue concentration in the formamide extract was



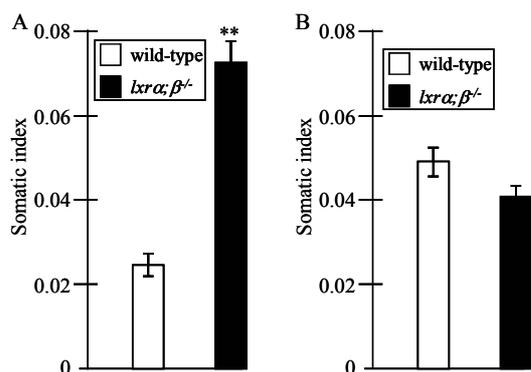
measured by light absorption at 620 nm using a spectrophotometer as described before (27 ; 28). The ovarian Evans blue content was expressed as nanograms per milligram tissue wet weight.

**Steroids Measurements** - Following decapitation, serums were collected and steroid hormones concentrations were assessed by electrochemiluminescence (Elecys Progesterone II and Estradiol II, Roche Diagnostics, Meylan, France).

## Results

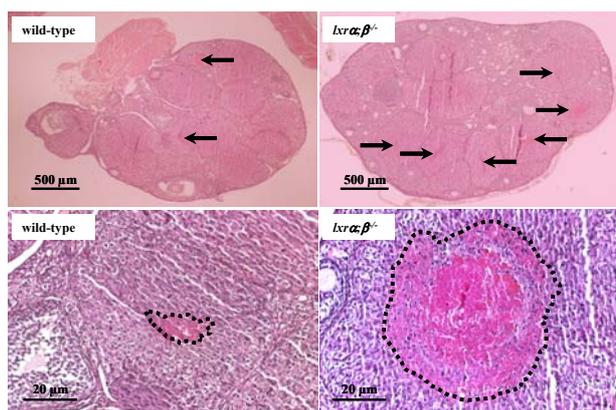
### Ovulation induction induces ovarian enlargement and hemorrhagic corpora lutea

Morphological examination of superovulated ovaries showed an increased size of the ovaries in the *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice compared to the wild-type mice (Fig. 1A) and the presence of multiple hemorrhagic cysts (data not shown). Somatic indexes of *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice ovaries (0.0725 +/- 0.010) were significantly greater compared to wild-type mice (0.025 +/- 0.005;  $p < 0.01$ ). In contrast, estradiol treatment alone in order to synchronize female cycles did not result in ovary size differences in LXR deficient mice (Fig. 1B), showing that only super-ovulation protocol led to an ovarian enlargement.



**Figure 1: Superovulation induces an ovarian enlargement in LXR deficient mice.** A) After super-ovulation protocol, ovaries were collected and weighted. N=12 per group. B) Estradiol treatment does not influence ovarian weight in *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice. N=8 per group. Somatic index represents ovarian weight expressed as percentage of total body weight. Results are indicated as mean +/- SEM. \*\*:  $p < 0.01$ .

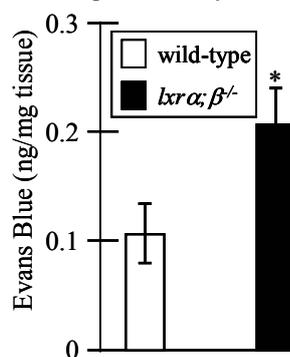
Gross examination of ovary sections from *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice revealed the presence of follicles at all stages. Besides, some hemorrhagic lesions could be found in ovaries of wild-type mice, but they were more numerous in LXR deficient ovaries (Fig 2A). Higher magnification pointed out that these lesions were present in the *corpus luteum*, as revealed by the presence of surrounding luteal cell.



**Figure 2: Superovulation results in hemorrhages in corpora lutea of LXR deficient mice.** Histological examination at two magnifications of ovaries from wild-type of LXR deficient mice. Organs were stained with hematoxylin/eosin/safran. Higher magnification is focused in corpus luteum. Hemorrhagic lesions are shown with arrows (low magnification) or dash line (high magnification).

### LXRs null mice have increased vascular permeability and increased ovarian response

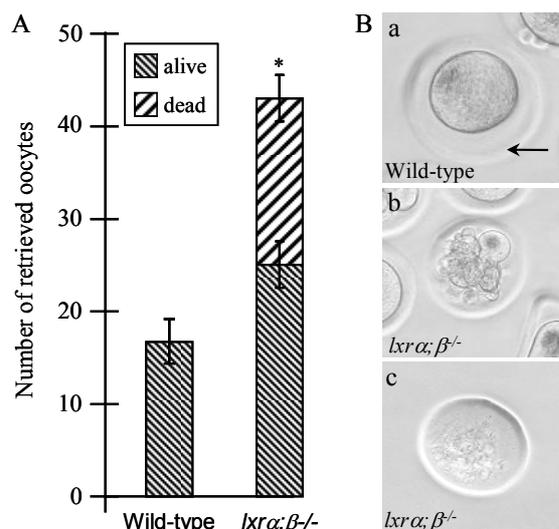
One of the main causes of OHSS is the presence of a space fluid shift. We thus managed to measure ovarian vascular permeability in ovaries from wild-type and *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice, using Evans blue measurement, as previously described in the rat model of OHSS (27; 28). As shown in figure 3, Evans blue dye content in the ovaries from LXR deficient mice (0.21 +/- 0.06 ng/mg tissue) was significantly greater (1.9-fold,  $p < 0.05$ ) than in control group (0.11 +/- 0.05 ng/mg tissue). LXRs prevent thus the risk of an increased ovarian vascular permeability.



**Figure 3: LXR-deficiency is responsible for increased vascular permeability.** Evans blue dye content in ovaries of wild-type and *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice. The ovarian Evans blue content is expressed as ng/mg tissue wet weight. Values are the mean +/- SEM (N=9 per group). \*:  $p < 0.05$ .

Because ovarian hyperstimulation syndrome is caused by an abnormal ovarian response, we performed to measure the ovary response by the follicle retrieval after an IVF protocol. Expelled follicle number was significantly greater in *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* females compared to wild-type mice (Fig. 4A; 2.2 fold,  $p < 0.02$ ), pointing out the crucial role of LXRs in the control of the ovarian response. However, it is interesting to note that among the expelled oocytes, 45 percent were dead or abnormal as shown in figure 4B.



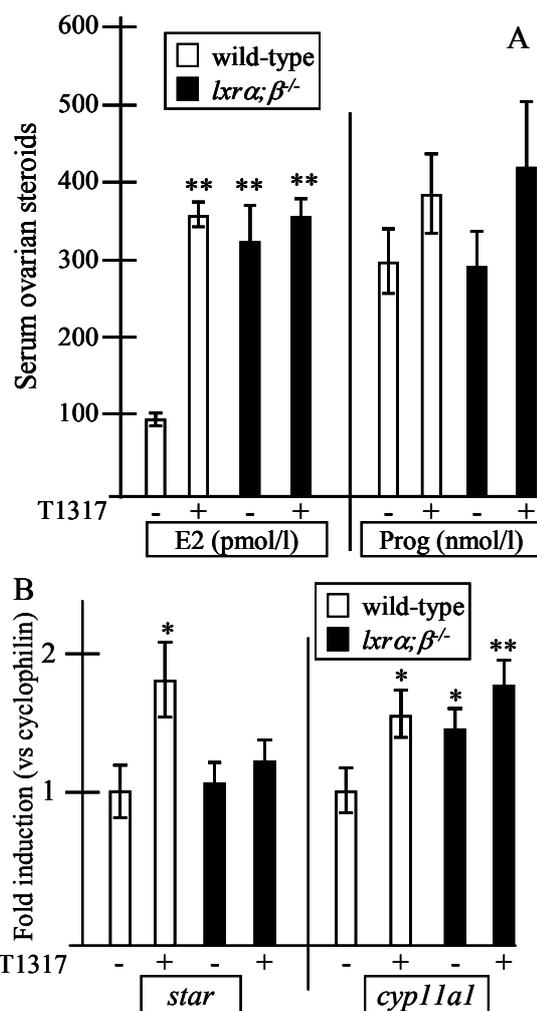


**Figure 4: LXR deficient females show increased response to gonadotropin stimulation.** Mice were sacrificed the day after the hCG injection. Oocytes were collected in oviduct and counted under dissection microscope examination. A) Number of retrieved oocytes. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (N=4 per group). B) Dissection microscope photograph. All wild-type (a) oocytes seemed normal with an intact zona pellucida (arrow). Caption of *lxrα;β<sup>-/-</sup>* oocytes shows a representative example of dead oocyte (b) or empty zona pellucida (c).

#### Ovarian hyperstimulation is linked to increased estradiol production in LXR-deficient mice

As estradiol concentration is one of the major factors involved in the progression of the syndrome (6), we measured ovarian steroids in the sera of a super-ovulation. While no difference in progesterone concentration was observed among all groups, estradiol was shown to be increased in LXR deficient mice groups compared to wild-type females. Interestingly, T1317, a synthetic LXR agonist administration to wild type mice induced an increase of E2 production, while it had no effect in *lxrα;β<sup>-/-</sup>* mice (Fig 5A).

As it had already been shown that LXRs can stimulate steroidogenesis in testis (29) and in adrenal (23) by the transcriptional regulation of genes coding key enzymes of steroidogenesis, such as *star* (steroidogenic acute regulatory protein) and *cyp11a1* (cytochrome P450 side chain cleavage), we measured the levels of their transcripts by real-time qPCR. Both mRNA were up-regulated in T1317-treated wild-type mice (1.8- and 1.5-fold induction for *star* and *cyp11a1*, respectively;  $p < 0.05$ ) suggesting these two genes were *bona fide* targets, while no regulation in *lxrα;β<sup>-/-</sup>* was observed as expected (Fig 5B). Induction levels in the wild-type mice were in the same range as those already described in the adrenals. Besides, basal level of *cyp11a1* was increased in *lxrα;β<sup>-/-</sup>* mice (1.4-fold,  $p < 0.05$ ) compared to wild-type mice, which was supposed to be partially responsible for the higher basal level of E2 in this group.



**Figure 5: LXRs control estradiol synthesis.** A) Mice were sacrificed by decapitation and steroids were measured in serum. B) Measurement of gene levels involved in steroidogenesis. Transcripts were quantified by qPCR analysis. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; E2: estradiol; Prog: progesterone; T1317: T0901317, a LXR synthetic agonist. N=8 to 12.

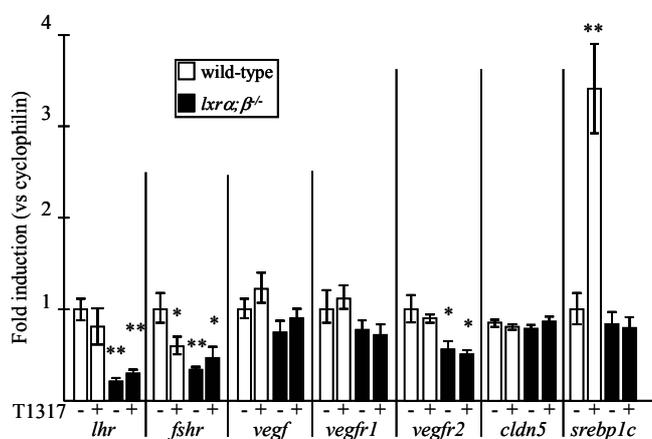
#### LXRs do not directly regulate VEGF and gonadotropin signaling in mouse ovary

To explore the molecular mechanisms responsible for the increase in vascular permeability, we performed real-time qPCR of current immunity markers and candidate genes involved in the progression of the symptoms (Fig 6). Gene expression was examined from whole ovaries of wild-type and *lxrα;β<sup>-/-</sup>* animals gavaged with the potent synthetic LXR agonist T1317 or vehicle.

*Srebplc*, a known LXR-target gene, presented a 3.4-fold induction after treatment with T1317, which assessed the treatment efficiency of the mice. Surprisingly, genes encoding LH, FSH, and VEGF receptor 2 basally showed significant lower levels in *lxrα;β<sup>-/-</sup>* group (from 25 to 55%). Besides, T1317-treatment induced a 60% decrease of *fshr* in wild-type females. Unexpectedly, *cldn5*, encoding claudin 5 a tight junction constitutive protein known to be down-regulated in OHSS developing



rats (28), did not show any variation. These results suggest that symptoms developed by *lxrα;β<sup>-/-</sup>* females do not follow the classical molecular mechanisms involved in OHSS initiating.



**Figure 6: OHSS in LXR deficient mice does not result from an upregulation of VEGF nor gonadotropin signaling.** Transcripts were quantified by qPCR analysis. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . T1317: T0901317 LXR synthetic agonist; lhr: LH receptor; fshr: FSH receptor; vegf: vascular endothelial growth factor; vegfr1 and 2: vegf receptors 1 and 2; cldn5: claudin 5. N=5.

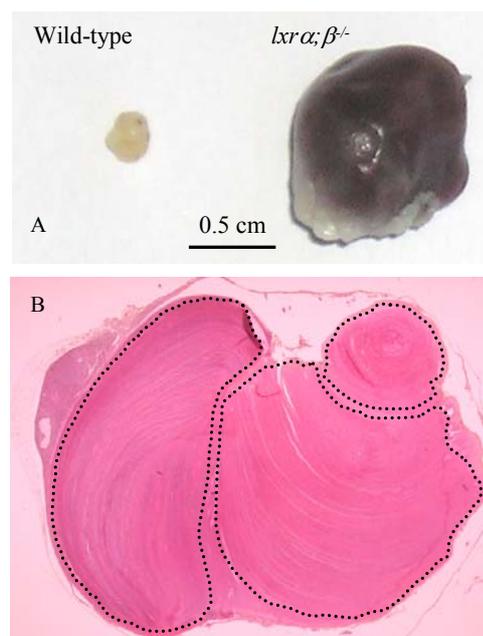
## Discussion

This study shows that the LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ -deficient females could represent a new interesting model for the study of OHSS in human. Indeed these mice present many clinical and biological features of this syndrome: ovarian enlargement, hemorrhages in *corpora lutea* associated with an increased vascular permeability, ovarian hypersensitivity to exogenous gonadotropin stimulation, and a high serum estradiol production. It is interesting to note that ovulation induction led in rare cases to massive ovarian hemorrhages (Fig 7A), focused *corpus luteum* (Fig 7B). Note that somatic indexes of these organs were not included in the data presented in figure 1A.

### LXR deficiency leads to an acute ovarian response

Spontaneous or iatrogenic OHSS has been clearly linked to an ovarian stimulation by gonadotropins. The syndrome occurs after a massive follicle recruitment obligatory followed by a luteinization (30). Some authors reported activating mutations of FSH receptor (31; 32) leading to the syndrome. Here *lxrα;β<sup>-/-</sup>* females show many signs of this abnormal ovarian response to exogenous stimulation. They display marked increase in expelled follicles during ovulation followed by a greater *corpus luteum* formation, paralleled with a higher production of estradiol, compared to the wild-type mice. These results are consistent with the clinical signs of OHSS in women (6). Therefore, it is important to note that ovarian stimulation induced a high rate of poor

quality retrieved oocytes in transgenic mice. However, few is known about factors influencing oocyte quality. Steffensen et al. (33) were the first to report the crucial role for LXRs to maintain a correct female fertility. They showed that meiosis resumption in oocyte induced by zymosterol, a meiosis activating sterol ligand of LXRs, was less effective in *lxrα;β<sup>-/-</sup>* than in wild-type oocytes. Inability to perform a correct meiosis could thus be the origin of the high rate of abnormal oocytes we observed in *lxrα;β<sup>-/-</sup>* superovulated females.



**Figure 7: In rare cases, superovulation protocol led to massive ovarian enlargement.** A) Ovary from *lxrα;β<sup>-/-</sup>* mouse presenting an excessive enlargement (right) compared to wild-type superovulated ovary (left). B) histological examination at low magnification of this enlarged ovary. Slide was stained with hematoxylin/eosin/safran. Dash line: hemorrhagic lesions present in *corpora lutea*.

It is now clear that OHSS progression in women is linked to high expression of cytokines and vascular permeability inducing factors such as VEGF. Although we were not able to detect any variations of the mRNA encoding these factors *lxrα;β<sup>-/-</sup>* ovaries, alterations of their production in different sites of production cannot be excluded. Indeed estrogens can promote VEGF production in endometrium (34) and an *in vivo* study showed that women at risk for OHSS have higher serum and fewer follicular fluid levels of VEGF, concluding that the measurement of VEGF in the serum was more predictive of the syndrome (35). Besides, the interest of the role of LXRs in immunity processes has recently been growing up. These nuclear receptors are currently known to regulate directly *vegf* expression (22) and to down-regulate many other cytokines. The use of LXR deficient mice will thus be very



helpful to elucidate the molecular mechanisms underlying the OHSS and their relations to nutritional status, in particular in lipids.

#### *LXRs regulate ovarian endocrine function*

We (23; 29) and others (36) have already reported that activation of LXR could modulate the production of steroids in adrenal and testis. This activation has been shown to be mediated by increasing expression of steroid synthesis enzymes such as *star*, *cyp11a1* and *3 $\beta$ hsd* (3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase). However, few studies have been available regarding the role of LXRs in the female reproductive physiology. Although Steffensen et al. (33) showed that LXR-deficient females present an important decrease in fertility and inability for oocytes to resume meiosis, no data concerning steroid hormones status were present in the study. More recently, it has been shown *in vitro* that chronic administration of synthetic LXRs agonists to human luteinized granulosa cells led to a decrease in progesterone production (37). The authors concluded that this inhibition could result from two distinct mechanisms: (1) an increase in the cholesterol export, leading to its weak bioavailability to steroid production and (2) a decrease in the expression of *star*, *cyp11a1* and *3 $\beta$ hsd* genes. Our work *in vivo* show for the first time that activation of LXR with a synthetic agonist induces an increased level in estradiol in the serum, which could result from a higher transcriptional regulation of *star* and *cyp11a1*. Besides, the lack of LXR *in vivo* results in a higher level of estradiol in the serum associated to physiologic disorder. This paradoxical increase in the expression of LXR-target genes has already been described for these genes (23) and is consistent with the findings that depletion of LXR may suppress basal repression of some genes (14). However, in contrast to study of Drouineaud et al., no effect of LXR activation or depletion on serum progesterone concentration was observed. Our data point thus the importance of *in vivo* studies since local environment may modulate gene expression and hormone production.

It is important to note that monitoring circulating estradiol concentration in women undergoing controlled ovulation induction is often practiced as estrogens may be an index of ovarian response (5). If serum E2 is elevated, gonadotropin administration during treatment can be interrupted until estradiol concentration reaches an acceptable range, with no side effect on oocyte quality (38). Besides, while estradiol is not the main factor influencing development of the OHSS, it is implicated in the progression of the symptom. It will be important to determine if elevated estradiol could be related to the development of the ovarian phenotype in LXR-deficient females.

Taken together, our data raise the question of the importance of the regulation of nutritional balance in the achievement of a correct assisted reproductive technology. The use of LXR-deficient female is the first engineered mouse model linking OHSS and nutritional status, particularly in lipids and will help in the future for understanding molecular mechanisms by which women with high body mass index are at risk of developing this syndrome.

*Acknowledgments* - We thank J. P. Saru, A. DeHaze, S. Monceau, C. Puchol, and S. Plantade for excellent technical assistance; Drs. D. Gallot (Obstetric and Gynecology Department, CHU Clermont-Ferrand), G. Veyssière, (UMR CNRS 6547) for helpful discussions and critically reading the manuscript; Dr. D. J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing the mice; and members of the Chester laboratory for assistance in animal dissections.

#### References.

1. Navot, D., Margalioth, E. J., Laufer, N., Birkenfeld, A., Relou, A., Rosler, A., and Schenker, J. G. (1987) *Fertil Steril* **48**, 57-61
2. Homburg, R., and Insler, V. (2002) *Hum Reprod Update* **8**, 449-462
3. Vlahos, N. F., and Gregoriou, O. (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1092**, 247-264
4. Kurioka, H., Takahashi, K., Kita, N., and Noda, Y. (2005) *Chin Med J (Engl)* **118**, 1577-1581
5. Delvigne, A., and Rozenberg, S. (2002) *Hum Reprod Update* **8**, 291-296
6. Budev, M. M., Arroliga, A. C., and Falcone, T. (2005) *Crit Care Med* **33**, S301-306
7. Maheshwari, A., Stoffberg, L., and Bhattacharya, S. (2007) *Hum Reprod Update* **13**, 433-444
8. Ferlitsch, K., Sator, M. O., Gruber, D. M., Rucklinger, E., Gruber, C. J., and Huber, J. C. (2004) *J Assist Reprod Genet* **21**, 431-436
9. Beaven, S. W., and Tontonoz, P. (2006) *Annu Rev Med* **57**, 313-329
10. Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., and Mangelsdorf, D. J. (1996) *Nature* **383**, 728-731
11. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., and Mangelsdorf, D. J. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 266-271
12. Chen, W., Chen, G., Head, D. L., Mangelsdorf, D. J., and Russell, D. W. (2007) *Cell Metab* **5**, 73-79
13. Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D. S. (2003) *Mol Endocrinol* **17**, 1019-1026
14. Wagner, B. L., Valledor, A. F., Shao, G., Daige, C. L., Bischoff, E. D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S. H., Heyman, R. A., Rosenfeld, M. G., Schulman, I. G., and Glass, C. K. (2003) *Mol Cell Biol* **23**, 5780-5789
15. Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., and Tontonoz, P. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12097-12102.
16. Venkateswaran, A., Repa, J. J., Lobaccaro, J. M., Bronson, A., Mangelsdorf, D. J., and Edwards, P. A. (2000) *J Biol Chem* **275**, 14700-14707
17. Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A. R. (2000) *J Biol Chem* **275**, 28240-28245



18. Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Mangelsdorf, D. J. (2000) *Genes Dev* **14**, 2819-2830
19. Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D. J. (2003) *Mol Endocrinol* **17**, 985-993
20. Joseph, S. B., Castrillo, A., Laffitte, B. A., Mangelsdorf, D. J., and Tontonoz, P. (2003) *Nat Med* **9**, 213-219
21. Landis, M. S., Patel, H. V., and Capone, J. P. (2002) *J Biol Chem* **277**, 4713-4721
22. Walczak, R., Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Castrillo, A., Pei, L., and Tontonoz, P. (2004) *J Biol Chem* **279**, 9905-9911
23. Cummins, C. L., Volle, D. H., Zhang, Y., McDonald, J. G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A. M., Caira, F., Veysiere, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J. M. (2006) *J Clin Invest* **116**, 1902-1912
24. Cummins, C. L., Volle, D. H., Zhang, Y., McDonald, J. G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A. M., Caira, F., Veysiere, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J. M. A. (2006) *J Clin Invest* **116**, 1902-1912
25. Volle, D. H., Repa, J. J., Mazur, A., Cummins, C. L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veysiere, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J. M. (2004) *Mol Endocrinol* **18**, 888-898
26. Mouzat, K., Prod'homme, M., Volle, D. H., Sion, B., Dechelotte, P., Gauthier, K., Vanacker, J. M., and Lobaccaro, J. M. (2007) *J Biol Chem* **282**, 4693-4701
27. Kitajima, Y., Endo, T., Manase, K., Nishikawa, A., Shibuya, M., and Kudo, R. (2004) *Fertil Steril* **81 Suppl 1**, 842-849
28. Kitajima, Y., Endo, T., Nagasawa, K., Manase, K., Honnma, H., Baba, T., Hayashi, T., Chiba, H., Sawada, N., and Saito, T. (2006) *Endocrinology* **147**, 694-699
29. Volle, D. H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Dechelotte, P., Sion, B., Veysiere, G., Benahmed, M., and Lobaccaro, J. M. (2007) *Mol Endocrinol* **21**, 1014-1027
30. Kaiser, U. B. (2003) *N Engl J Med* **349**, 729-732
31. Smits, G., Olatunbosun, O., Delbaere, A., Pierson, R., Vassart, G., and Costagliola, S. (2003) *N Engl J Med* **349**, 760-766
32. Vasseur, C., Rodien, P., Beau, I., Desroches, A., Gerard, C., de Poncheville, L., Chaplot, S., Savagner, F., Croue, A., Mathieu, E., Lahlou, N., Descamps, P., and Misrahi, M. (2003) *N Engl J Med* **349**, 753-759
33. Steffensen, K. R., Robertson, K., Gustafsson, J. A., and Andersen, C. Y. (2006) *Mol Cell Endocrinol* **256**, 9-16
34. Girling, J. E., and Rogers, P. A. (2005) *Angiogenesis* **8**, 89-99
35. Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohi, J., and Simon, C. (1999) *Fertil Steril* **71**, 482-489
36. Robertson, K. M., Schuster, G. U., Steffensen, K. R., Hovatta, O., Meaney, S., Hultenby, K., Johansson, L. C., Svechnikov, K., Soder, O., and Gustafsson, J. A. (2005) *Endocrinology* **146**, 2519-2530
37. Drouineaud, V., Sagot, P., Garrido, C., Logette, E., Deckert, V., Gambert, P., Jimenez, C., Staels, B., Lagrost, L., and Masson, D. (2007) *Mol Hum Reprod* **13**, 373-379
38. Grudzinkas, J. G., and Egbase, P. E. (1998) *Hum Reprod* **13**, 2051-2053
39. Volle, D. H., Duggavathi, R., Magnier, B. C., Houten, S. M., Cummins, C. L., Lobaccaro, J. M., Verhoeven, G., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007) *Genes Dev* **21**, 303-315
40. Shih, S. C., Robinson, G. S., Perruzzi, C. A., Calvo, A., Desai, K., Green, J. E., Ali, I. U., Smith, L. E., and Senger, D. R. (2002) *Am J Pathol* **161**, 35-41
41. Holmes, J. L., Van Itallie, C. M., Rasmussen, J. E., and Anderson, J. M. (2006) *Gene Expr Patterns* **6**, 581-588
42. Lanvin, O., Bianco, S., Kersual, N., Chalbos, D., and Vanacker, J. M. (2007) *J Biol Chem* **282**, 28328-28334



Table I. Sequence primers used for QPCR.

Gene (accession #)	5'->3' sequences	Size of the amplicon	Ref
star (BC082283)	fw TGT CAA GGA GAT CAA GGT CCT G rev CGA TAG GAC CTG GTT GAT GAT	336	(29)
cyp11a1 (BC068264)	fw CTG CCT CCA GAC TTC TTT CG rev TTC TTG AAG GGC AGC TTG TT	194	(29)
lhr (NM_013582)	fw AGC TAA TGC CTT TGA CAA CC rev GAT GGA CTC ATT ATT CAT CC	242	(39)
fshr (NM_013523)	fw GTG CTC ACC AAG CTT CGA GTC AT rev AAG GCC TCA GGG TTG ATG TAC AG	165	(39)
vegf (M95200)	fw GGA GAT CCT TCG AGG AGC ACT T rev GGC GAT TTA GCA GCA GAT ATA AGA A	130	(40)
vegfr1 (NM_010228)	fw CAA TGC TCA GCG TGA TTC TG rev ACT GAC AGA GGC GAT GAA TG	204	This study
vegfr2 (NM_010612)	fw TGG CCA CCA CTC AAG ATT AC rev AGG TTT TGA AGC AGG TGT GG	174	This study
cldn5 (NM013805)	fw GTG GAA CGC TCA GAT TTC AT rev TGG ACA TTA AGG CAG CAT CT	97	(41)
srebp1c (NM_011480)	fw GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT rev GCT TCC AGA GAG GAG GCC AG	189	(26)
36b4 (NM_007475)	fw GTC ACT GTG CCA GCT CAG AA rev TCA ATG GTG CCT CTG GAG AT	78	(42)
cyclophilin (NM_011149)	fw GGA GAT GGC ACA GGA GGA A rev GCC CGT AGT GCT TCA GCT T	75	(26)



Conclusions :

Cette étude met en évidence le rôle des LXR $\alpha$  dans la régulation des processus au cours d'une induction de l'ovulation. Bien que le rôle des LXR $\alpha$  dans le contrôle de la stéroïdogénèse soit aujourd'hui évident (pour une revue voir Volle et Lobaccaro, 2007), très peu de données concernant leur rôle dans la fonction ovarienne chez la femelle sont actuellement disponibles. Drouineaud *et al.* (Drouineaud, *et al.*, 2007) ont montré que l'activation des LXR $\alpha$  par le T0901317 provoque une diminution de la production de progestérone par des cellules humaines de la granulosa en culture. Cette diminution est due à un export du cholestérol intracellulaire et à une diminution de l'expression de gènes de la stéroïdogénèse. A l'inverse, nos travaux *in vivo* montrent que l'activation des LXR $\alpha$  par le T0901317 stimule la production d'œstradiol *via* une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse et n'a aucun effet sur la production d'œstradiol.

En parallèle, Steffensen *et al.* (Steffensen, *et al.*, 2006) ont montré que les souris déficientes en LXR $\alpha$  présentent un défaut dans la fonction exocrine ovarienne. Les ovocytes sont en effet incapables d'engager la reprise de la méiose, qui se produit normalement au moment de l'ovulation. A l'inverse, notre étude met en évidence qu'une stimulation exogène par des gonodotrophines dans le but d'induire une super-ovulation provoque chez les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* un phénotype d'OHSS, avec des signes de réponse ovarienne accrue, suggérant un défaut dans le contrôle des processus ovulatoires.

Au total, ce travail montre que les LXR $\alpha$  interviennent à deux niveaux dans le contrôle de la fonction ovarienne :

- Leur activation stimule la stéroïdogénèse ovarienne
- Leur absence provoque des symptômes d'OHSS (augmentation de la masse ovarienne associée à des hémorragies lutéales, perte de la perméabilité vasculaire ovarienne, augmentation du nombre d'évènements ovulatoires et de l'œstradiolémie), montrant leur rôle dans la régulation de ces processus.

L'utilisation future des souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* permettra d'étendre nos connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de l'OHSS et de comprendre les relations entre le métabolisme des lipides, en particulier en cholestérol, et les complications liées à la procréation médicalement assistée.



Chapitre II : Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXRs dans  
la fonction de l'utérus.



### Présentation du contexte scientifique :

L'utérus est un organe schématiquement divisé en deux zones distinctes : l'endomètre et le myomètre. L'endomètre, la zone la plus interne de l'organe, est le site de l'implantation des blastocystes et son épithélium subit des variations cycliques sous le contrôle des hormones sexuelles stéroïdiennes (Dockery et Rogers, 1989) ; les œstrogènes sont responsables de l'hyperplasie des cellules épithéliales alors que la progestérone bloque la prolifération cellulaire et induit leur différenciation. Le myomètre (Berto, *et al.*, 2003), la zone externe de l'utérus, représente plus de 60 % de l'organe entier (McCormack et Glasser, 1980) et a un rôle primordial dans la fonction utérine.

Au cours de la grossesse, le maintien de la quiescence musculaire, provoqué principalement par la progestérone, est essentiel. A l'inverse, l'activité contractile doit se mettre en place à la fin de la grossesse pour permettre un accouchement correct (pour une revue, voir Huszar et Roberts, 1982). Ce changement fonctionnel résulte d'une modification du rapport des concentrations plasmatiques œstrogènes/progestérone. Cette inversion du rapport des concentrations représente l'évènement primaire de la parturition. Ce changement hormonal induit une augmentation des prostaglandines endométriales, dont le rôle est de générer les contractions au cours du travail, en agissant via des récepteurs membranaires spécifiques au niveau du myomètre (Myatt et Lye, 2004). L'inversion du rapport œstradiol/progestérone induit l'expression du gène codant le récepteur de l'ocytocine. Lorsqu'il est activé par l'ocytocine, ce récepteur permet de provoquer les contractions utérines.

De plus, les concentrations lipidiques au niveau du myomètre sont modifiées au cours de la grossesse chez les femmes. Bien qu'aucune modification des phospholipides ne se produise au cours de la grossesse (Pulkkinen, *et al.*, 1998), des changements de fluidité membranaire apparaissent, associés à une augmentation des concentrations locales et circulantes en cholestérol (Potter et Nestel, 1978). Bien que le rôle de cette augmentation ne soit pas clair, des études suggèrent que le cholestérol module l'activité et la stabilité du récepteur de l'ocytocine. En effet, le cholestérol stabilise le récepteur dans un état de forte affinité pour ses agonistes et le protège de la dénaturation thermique (pour une revue, voir Gimpl et Fahrenholz, 2001). Smith *et al.*, (Smith, *et al.*, 2005) ont de plus montré qu'une augmentation anormale du cholestérol dans les cellules musculaires lisses utérines réduit l'amplitude des contractions induites par l'ocytocine chez la rate. A l'inverse, l'épuisement en cholestérol par la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine permet de restaurer les contractions.

Le cholestérol et ses dérivés sont des nutriments vitaux qui peuvent avoir un impact majeur sur l'expression génique. Ainsi leurs concentrations intracellulaires doivent-elles être strictement régulées. Parmi les facteurs de transcription impliqués dans ces régulations, les LXRs occupent une place centrale (pour une revue, voir Beaven et Tontonoz, 2006). Basés sur le fait que (1) ce sont les



« senseurs » du cholestérol intracellulaire et que (2) ce sont des facteurs hypocholestérolémiants notamment *via* l'induction des gènes codant les transporteurs ABCA1 (Venkateswaran, *et al.*, 2000a ; Venkateswaran, *et al.*, 2000b ; Costet, *et al.*, 2000), ABCG5 et ABCG8 (25), responsables de l'efflux du cholestérol cellulaire, nous avons étudié le métabolisme lipidique et la fonction contractile de l'utérus chez les souris invalidées pour les LXRs.

Dans cet article, nous avons montré que LXR $\beta$  prévient d'une accumulation d'esters de cholestérol dans les myocytes utérins en régulant l'expression des gènes *abca1* et *abcg1*. Les souris déficientes en LXR $\beta$  présentent une accumulation d'esters de cholestérol spécifiquement dans les myocytes utérins, associée à un défaut de l'activité contractile de l'organe.



**Article 2** : Oxysterol Nuclear Receptor LXR $\beta$  Regulates Cholesterol Homeostasis and Contractile Function in Mouse Uterus.

Article publié dans The Journal of Biological Chemistry, Volume 282, N° 7, pages 4693-4701, 16 février 2007.

Kevin Mouzat, Magali Prod'Homme, David H. Volle, Benoît Sion, Pierre Déchelotte, Karine Gauthier, Jean-Marc Vanacker et Jean-Marc A. Lobaccaro.

Résumé :

L'utérus est un organe pour lequel le métabolisme lipidique joue un rôle important dans sa fonction. Nous montrons que le récepteur nucléaire des oxystérols LXR $\beta$  prévient d'une accumulation d'esters de cholestérol dans le myomètre chez la souris en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'efflux de cholestérol et son stockage (*abca1* et *abcg1*). Après traitement par un agoniste synthétique des LXRs qui mime l'activation par les oxystérols, l'expression de ces gènes cibles est augmentée chez les souris sauvages. En conditions basales, les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* présentent une diminution de l'accumulation d'*abcg1*, entraînant un phénotype d'accumulation d'esters de cholestérol. De plus, un défaut de l'activité contractile en réponse à l'ocytocine ou à PGF2 $\alpha$  est observé chez les souris déficientes en LXR $\beta$ . Ces résultats suggèrent que LXR $\beta$  se comporte comme une soupape de sécurité en limitant les niveaux d'esters de cholestérol, protégeant l'utérus contre une accumulation de cholestérol incompatible avec une induction correcte des contractions.



# Oxysterol Nuclear Receptor LXR $\beta$ Regulates Cholesterol Homeostasis and Contractile Function in Mouse Uterus\*

Received for publication, July 14, 2006, and in revised form, December 12, 2006. Published, JBC Papers in Press, December 13, 2006, DOI 10.1074/jbc.M606718200

Kevin Mouzat<sup>‡1</sup>, Magali Prod'Homme<sup>‡</sup>, David H. Volle<sup>‡2</sup>, Benoit Sion<sup>§</sup>, Pierre Déchelotte<sup>¶</sup>, Karine Gauthier<sup>||</sup>, Jean-Marc Vanacker<sup>||</sup>, and Jean-Marc A. Lobaccaro<sup>‡3</sup>

From <sup>‡</sup>UMR CNRS 6547, "LXRs, Oxysterols, and Steroidogenic Tissues," and Research Center for Human Nutrition, 63177 Aubière, France, <sup>§</sup>Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction, Université d'Auvergne, 63058 Clermont-Ferrand, France, <sup>¶</sup>CHU Clermont-Ferrand, Service d'Anatomie Pathologique, Hôtel Dieu, Boulevard Léon Malfreyt, 63058 Clermont-Ferrand, France, and <sup>||</sup>INSERM EMI 0229, 34298 Montpellier, France

The uterus is an organ where lipid distribution plays a critical role for its function. Here we show that nuclear receptor for oxysterols LXR $\beta$  prevents accumulation of cholesteryl esters in mouse myometrium by controlling expression of genes involved in cholesterol efflux and storage (*abca1* and *abcg1*). Upon treatment with an LXR agonist that mimics activation by oxysterols, expression of these target genes was increased in wild-type mice, whereas under basal conditions, *Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice exhibited a marked decrease in *abcg1* accumulation. This change resulted in a phenotype of cholesteryl ester accumulation. Besides, a defect of contractile activity induced by oxytocin or PGF $2\alpha$  was observed in mice lacking LXR $\beta$ . These results imply that LXR $\beta$  provides a safety valve to limit cholesteryl ester levels as a basal protective mechanism in the uterus against cholesterol accumulation and is necessary for a correct induction of contractions.

The uterus is schematically divided into two distinct zones: endometrium and myometrium. The endometrium, located in the inner part of the organ, is the site of blastocyst implantation, and its epithelium undergoes cyclic radical changes under the control of ovarian sex steroid hormones (1); estrogens are responsible for epithelial cell hyperplasia, whereas progesterone blocks cell proliferation and induces differentiation. The myometrium (2), in the outer part of the uterus, accounts for more than 60% of the whole organ (3) and has a primordial role in uterine function. Whereas muscle quiescence due to high progesterone levels is essential during most of the pregnancy (4), efficient myometrium contractility is fundamental for a normal labor (for a review, see Ref. 5). This switch results from a modification in the plasma ratio of estrogens to progesterone

signal that acts as primary event of the parturition. These hormonal changes also induce an increase in the level of endometrial prostaglandins, which play a role in the initiation and maintenance of labor, acting via specific relaxatory or contractile receptors on myometrium initiating contractions (6). Interestingly, it has also been demonstrated that increased production of surfactant protein A by the fetal lung near term causes activation and migration of fetal amniotic fluid macrophages to the maternal uterus, where increased production of interleukin-1 $\beta$  activates NF- $\kappa$ B, leading to labor (7, 8). The inversion of the estradiol/progesterone ratio induces the expression of OXTR (oxytocin receptor). When activated by oxytocin, a neuropeptide produced by the pituitary, this receptor has a primordial contractile activity on the myometrium during labor. Besides, lipid distribution in myometrium is modified during pregnancy in humans. Although no change in total phospholipids occurs during pregnancy (9), modifications in membrane fluidity take place. Hence, transfers of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids, essential for normal fetal growth and development, from the mother to the fetus have been suggested (10). Likewise, an increase in local and circulating cholesterol concentrations is observed (11). Although the role of this plasma cholesterol increase is not clear, apart from the anabolic support for the fetus (12), it has been clearly established that this molecule is essential to modulate membrane receptor activity and stability, especially those of OXTR. Indeed, Gimpl and Fahrenholz (13) observed an enrichment of oxytocin receptors in cholesterol-rich plasma membranes in HEK 293 fibroblast stably expressing the human oxytocin receptor. In addition, cholesterol stabilizes the receptor in a high affinity state for agonists and protects it from thermal denaturation (for a review, see Ref. 14). Smith *et al.* (15) showed that an abnormal increase in the cholesterol content of uterine smooth muscle cells reduces the amplitude of contractions induced by oxytocin in rat. Moreover, cholesterol depletion with methyl- $\beta$ -cyclodextrin could increase the contractions of myometrium strips isolated from rat (15) or guinea pig (16).

Cholesterol and its derivatives are vital nutrients that may also have a major impact on gene expression, and thus their intracellular quantities must be tightly regulated. Among the various transcription factors involved in these regulations, liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ , NR1H3) and  $\beta$  (LXR $\beta$ , NR1H2) play a central role (for a review, see Ref. 17). They belong to a subclass

\* This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Blaise Pascal, Fondation pour la Recherche Médicale Grant INE2000-407031/1, and the Fondation BNP-Paribas. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de Recherche et de la Technologie.

<sup>2</sup> Present address: Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, 67404 Illkirch Cedex, France.

<sup>3</sup> Professor of the Université Blaise Pascal. To whom correspondence should be addressed: UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547 and Research Center for Human Nutrition, 24 Ave. des Landais, 63177 Aubière Cedex, France. Tel.: 33-473-40-74-16; Fax: 33-473-40-70-42; E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr.



## Lack of LXR $\beta$ Alters Uterus Physiology in Mice

of nuclear receptors that form obligate heterodimers with 9-*cis*-retinoic acid receptors and are bound to and activated by a class of naturally occurring oxysterols (18, 19). In the absence of ligand, the retinoid X receptor/LXR heterodimer is constitutively linked to specific DNA target sequences and interacts with corepressors, thus blocking transcription initiation (20, 21). The use of LXR-deficient mice (*lxr*<sup>-/-</sup>) has also helped to elucidate the role of these nuclear receptors in various physiologic functions (17), and many target genes have been described, such as the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) (22–24), ABCG5, and ABCG8 (25), responsible for the cholesterol cellular efflux, and SREBP1c (sterol response element-binding protein 1c) involved in lipid metabolism (26).

In this paper, we demonstrate that LXR $\beta$  functions in the uterus as a sensor to prevent accumulation of cholesteryl esters by coordinately regulating expression of genes encoding proteins involved in cholesterol efflux (ABCA1 and ABCG1). Hence, mice lacking LXR $\beta$  present an abnormal and specific accumulation of cholesteryl esters in uterine myocytes. Besides, these animals show defects in induced contractile activity in uterus.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Animals**—*lxr* knock-out mice (*lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup>, *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup>, and *lxr $\alpha$* ;  *$\beta$* <sup>-/-</sup>) and their wild-type controls were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and housed in a temperature-controlled room with a 12-h light/dark cycle (27). All experiments were performed on age-matched female mice. For all studies shown, mice were fed *ad libitum* with water and Global-diet<sup>®</sup> 2016S from Harlan (Gannat, France) containing 16% protein, 4% fat, and 60% carbohydrates. For all experiments, except for contractile activity assays and the mice used for experiments shown in Fig. 6, animals were treated with a superovulation protocol (intraperitoneal injection of 7 IU of pregnant mare's serum gonadotropin on day 1, 5 IU of human chorionic gonadotropin on day 3) and sacrificed on day 5 at the end of metaestrus. For real time quantitative reverse transcription-PCR (qPCR)<sup>4</sup> experiments, mice were gavaged with 45 mg/kg T0901317 (T1317) (Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux, France) or vehicle (methyl-cellulose) as previously described (28). For contractile activity assays and the mice used for experiments shown in Fig. 6, estrus was induced with a single injection of 10  $\mu$ g of estradiol benzoate (Sigma) 18 h before sacrifice. To reduce the effect of stress, the elapsed time between the capture of a mouse and its sacrifice was under 30 s. In some experiments, uteri were longitudinally cut, and the mucosa were gently scraped, as previously described for the intestine (29). Both mucosa and muscular parts were stored in liquid N<sub>2</sub> for RNA extraction. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethics Committee (authorization CE1-04).

**Anatomy and Pathology Analyses**—Uteri from 3-month-old mice were collected, fixed, and embedded in paraffin, and 5- $\mu$ m-thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin/safran. Lipid staining of each organ collected was performed on 8- $\mu$ m-thick cryosections with 1,2-propanediol

(Sigma) for 1 min and in oil red O (Sigma) for 4 min as described (30). Cross-sectional areas of the various parts of the uteri (circular and longitudinal muscular layers and endometrium) were quantified using Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Le Pecq, France).

For semithin sections, chemicals were from Sigma and Agar Scientific (Saclay, France). Uteri were fixed in 1.2% (v/v) glutaraldehyde buffered in 0.07 M sodium cacodylate at pH 7.4 containing 0.05% (w/v) ruthenium red for 1 h at room temperature. Samples were postfixed with 1% (v/v) osmium tetroxide in the same buffer devoid of ruthenium red for 1 h. Organs were then dehydrated in ethanol baths and propylene oxide (three times for 20 min) and embedded in propylene oxide and epon epikote resin (v/v) overnight and in epon twice for 3 h. Resin polymerization was conducted at 60 °C for 72 h. Semithin sections (0.8  $\mu$ m) were cut with a diamond knife (Leica Ultracut S; Rueil-Malmaison, France), and stained with azure 2 followed by the addition of 1 N NaOH to stop the reaction.

**Analysis of Lipid Content**—Lipids were extracted as described (31) and analyzed on high-performance thin layer chromatography plates. Free cholesterol and cholesteryl esters were identified and quantified against standards by densitometry (Sigma Scan Pro; Sigma) as previously described (27).

**Real-time PCR**—Total RNA was isolated using the Trizol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's recommendations. The real time PCR was performed on an iCycler (Bio-Rad). Four  $\mu$ l of 1:50 diluted cDNA template were amplified by 0.75 units of HotMaster TaqDNA polymerase (Eppendorf, Brumath, France) using SYBR Green dye to measure duplex DNA formation. Primers are given in Table 1.

**Western Blot Analysis**—Protein extracts (30  $\mu$ g) from whole uterus were subjected to SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences). Membranes were incubated overnight at 4 °C with primary polyclonal antibodies raised against either ABCA1 (1:500; Novus Biological, Montluçon, France), ER $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ ) (1:10,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), ERR $\alpha$  (estrogen-related receptor  $\alpha$ ) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), progesterone receptor (1:200; Santa Cruz Biotechnology), noncleaved or cleaved SREBP1c (1:500 and 1:400; Santa Cruz Biotechnology), SCD1 (stearoyl CoA-desaturase 1) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), PGF2R (PGF2 $\alpha$  receptor) (1:500; Cayman Chemical), or  $\beta$ -actin (1:2000; Santa Cruz Biotechnology) followed by a 1-h incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-goat IgG (1:10,000 or 1:5000, respectively; Sigma). Peroxidase activity was detected using the Western Light System (PerkinElmer Life Sciences). Protein fold changes were measured by densitometry of the x-ray films using Quantity One version 4.6.1 software (Bio-Rad).

**Measurement of Uterus Contractions in Vitro**—Uteri were quickly dissected and carefully cleaned of surrounding fat prior to being suspended in organ baths (50 ml) filled with a DeJalon solution (155 mM NaCl, 5.7 mM KCl, 0.55 mM CaCl<sub>2</sub>, 6.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.8 mM glucose, pH 7.4), equilibrated with air, and kept at 37 °C as described (32) for measurement of tension. A

<sup>4</sup> The abbreviations used are: qPCR, real time quantitative reverse transcription-PCR; T1317, LXR agonist T0901317.



**TABLE 1**  
Sequence primers used for qPCR

Gene (accession number)	5'–3' sequences	Size of the amplicon	Source/Reference
		bp	
<i>abca1</i> (NM_013454)	GCT CTG GGA GAG GAT GCT GA (forward) CGT TTC CGG GAA GTG TCC TA (reverse)	106	This study
<i>abcg1</i> (NM_009593)	GCT GTG CGT TTT GTG CTG TT (forward) TGC AGC TCC AAT CAG TAG TCC TAA (reverse)	83	Ref. 51
<i>ER<math>\alpha</math></i> (NM_007956)	TAT GCC TCT GGC TAC CAT TA (forward) ATG GTG CAT TGG TTT GTA GC (reverse)	183	This study
<i>ERR<math>\alpha</math></i> (NM_007953)	CAA ACG CCT CTG CCT GGT CT (forward) ACT CGA TGC TCC CCT GGA TG (reverse)	113	Ref. 52
<i>fas</i> (NM_007988)	CCC CAA CCC TGA GAT CCC A (forward) TTG ATG CCC ACG TTG CC (reverse)	82	This study
<i>ldlr</i> (AF_425607)	AAG ACT CAT GCA GGA GGA AC (forward) GCC TCC ACA GCT GAA TTG AT (reverse)	160	This study
<i>lpl</i> (NM_008509)	AGG ACC CCT GAA GAC ACA GCT (forward) GCC ACC CAA CTC TCA TAC ATT CC (reverse)	148	This study
<i>srebp1c</i> (NM_011480)	GGA GCC ATG GAT TGC ACT TT (forward) GCT TCC AGA GAG GAG GCC AG (reverse)	189	This study
<i>lxra</i> (AJ_132601)	GGG AGG AGT GTG TGC TGT CAG (forward) GAG CGC CTG TTA CAC TGT TGC (reverse)	192	This study
<i>lxr<math>\beta</math></i> (NM_009473)	AAG CAG GTG CCA GGG TTC T (forward) TGC ATT CTG TCT CGT GGT TGT (reverse)	140	Ref. 27
<i>oxtr</i> (D86599.1)	TTC TTC GTG CAG ATG TGG AG (forward) TGT AGA TCC ATG GGT TGC AG (reverse)	114	This study
<i>PR</i> (NM_008829)	GTC AGG CTG GCA TGG TCC TT (forward) AGG GCC TGG CTC TCG TTA GG (reverse)	161	This study
<i>SM22<math>\alpha</math></i> (U36588)	CGA CCA AGC CTT CTC TGC C (forward) TGC CGT AGG ATG GAC CCT T (reverse)	51	This study
Telokin (AF314149)	CCC GGA GAT GAA ATC CCG (forward) GGC ATA GCT GCT TTT GTG GG (reverse)	106	This study
Cyclophilin (NM_011149)	GGA GAT GGC ACA GGA GGA A (forward) GCC CGT AGT GCT TCA GCT T (reverse)	75	Ref. 27
<i>scd1</i> (NM_009127.3)	CCG GAG ACC CCT TAG ATC GA (forward) TAG CCT GTA AAA GAT TTC TGC AAA CC (reverse)	88	This study
<i>scd2</i> (NM_009128.1)	TTC CTC ATC ATT GCC AAC ACC (forward) GGG CCC ATT CAT ACA CGT CA (reverse)	54	This study

resting tension (2 g) was applied to the suspended uteri. Contractions were recorded with a force-displacement transducer (MyographESAO<sup>®</sup> 4, Jeulin, Evreux, France) and analyzed with Sérénis<sup>®</sup> software (Jeulin). Uteri were incubated with increasing concentrations of synthetic oxytocin (Syntocinon<sup>®</sup>, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France) or luproliol, analogous of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (Prosolvin<sup>®</sup>, Intervet, Angers, France). Results are expressed as a dose-response curve showing the uterine tension minus the basal tension.

**Statistical Analysis**—For statistical analysis, Student's *t* test was performed to determine whether there were significant differences between the groups. A *p* value of 0.05 was considered significant.

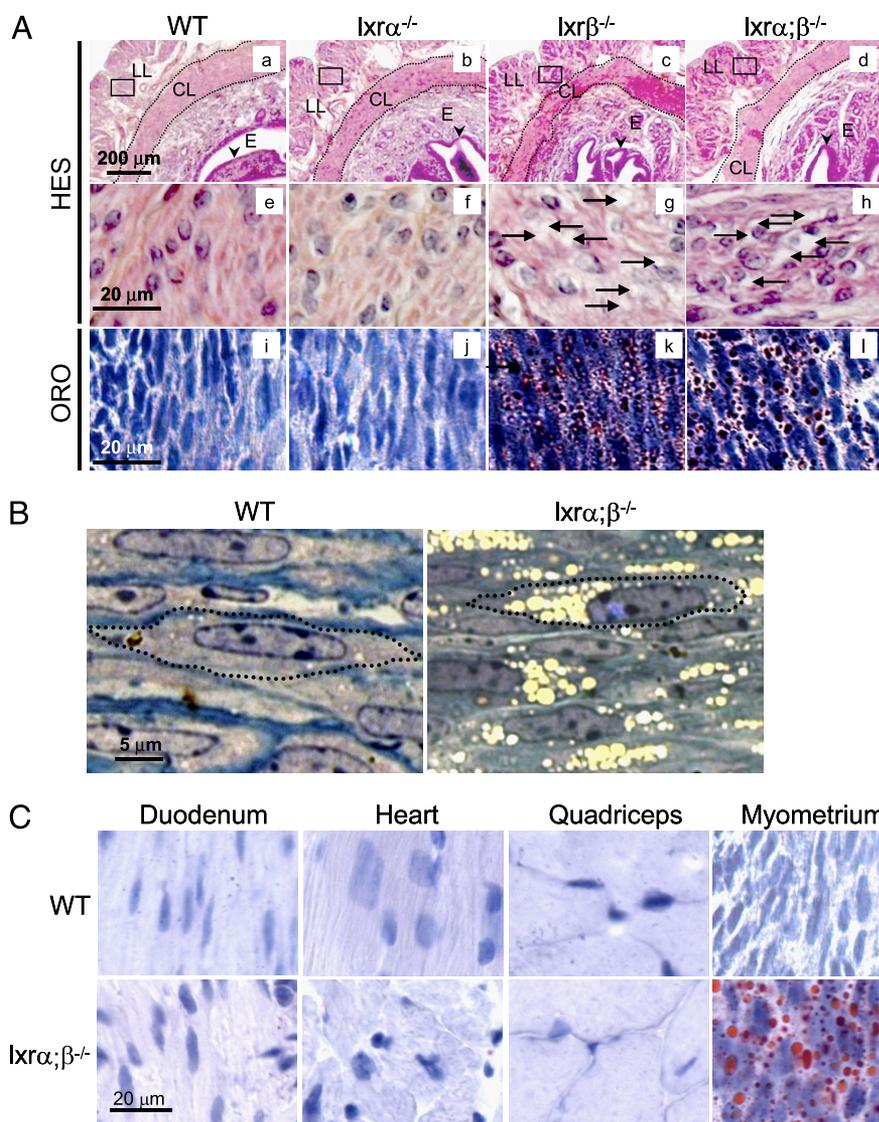
## RESULTS

**Loss of LXR $\beta$  Results in Perturbations of Lipid Content in Uterus**—No significant difference in the somatic indexes of uteri was observed among the genotypes of the wild type (0.38%  $\pm$  0.03, *n* = 5), the *lxra*<sup>-/-</sup> mice (0.37%  $\pm$  0.04, *n* = 4), the *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (0.40%  $\pm$  0.02, *n* = 7), and the *lxra*;*lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (0.41%  $\pm$  0.01, *n* = 5) at 3 months of age. Gross examination of uterus sections from *lxr*-deficient mice did not reveal any perturbation of the structures as assessed by the presence of an apparently normal endometrium, characterized by a monolayer of epithelial cells and a stroma, and the presence of circular and longitudinal layers of smooth muscle in myometrium (Fig. 1A, *a–d*). The uterus structure remains stable even after 12 months of age in all genotypes (data not shown). Determination of the cross-sectional area of the smooth muscle pointed

out no significant variation in the various knock-out mice compared with the wild-type (Table 2). Higher magnification ( $\times$ 400) did not reveal any perturbation of the endometrium structure (data not shown), whereas vacuoles were visible in layers of myometrium from *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> (Fig. 1A, *g*) and *lxra*;*lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (Fig. 1A, *h*), localized in the cytoplasm of myocytes (Fig. 1B). Because LXRs are known to have an important role in the regulation of lipid metabolism in various tissues, we examined whether some differences between wild-type and LXR-deficient mice in uterus lipid content were present. Histological analysis using oil red O staining performed on frozen sections pointed to an abnormal accumulation of neutral lipids in vacuoles observed in myometrium of *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> (Fig. 1A, *k*) and *lxra*;*lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> (Fig. 1A, *l*) mice, whereas no difference among the various genotypes was seen in the endometrium (data not shown). This lipid accumulation was visible in LXR $\beta$ -deficient mice as young as 1 month old (data not shown). Since *lxra*<sup>-/-</sup> mice appeared to have no lipid-rich vacuole (Fig. 1A, *j*), we concluded that the phenotype was due to the absence of LXR $\beta$ .

Semithin sections (0.8  $\mu$ m) of osmium tetroxide-fixed uteri were performed to precisely determine the localization of these vacuoles. Azure 2 dye, which stains lipids in yellow, showed that these vacuoles were localized in the cytoplasm of myocytes (Fig. 1B) and did not result of an infiltration of adipose tissue within the smooth muscle, as also suggested by the absence of any significant increase levels of adipocyte marker mRNA, such as the fatty acid-binding protein (aP2) and PPAR $\alpha$  and - $\gamma$  (peroxisomal proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ ) (see Fig. 4A).





**FIGURE 1. LXR $\beta$ -deficient mice present an abnormal accumulation of neutral lipids in uterine myocytes only.** A, histological examination of uteri from wild-type (WT), *LXRα*<sup>-/-</sup>, and/or  $\beta$ -deficient mice. a–h, hematoxylin/eosine/safran staining at two magnifications. Squared portions indicate the magnified view; i–l, oil red O staining; bars indicate the different sizes (200 or 20  $\mu$ m). Black arrowheads, epithelium. Black arrows, cytoplasmic vacuoles in myocytes. LL, longitudinal muscular layer; CL, circular muscular layer; E, endometrium. B, azure blue 2B staining of semithin sections from the muscular layer. Lipids are stained in yellow. Dashed line, plasma membrane of a myocyte. Bar, 5  $\mu$ m. C, oil red O staining was performed on frozen sections from wild-type and *LXRα;β*<sup>-/-</sup> mice of 3 months of age as described under “Experimental Procedures.” Bar, 20  $\mu$ m.

**TABLE 2**

**Surface analysis of the cross-sectional area of the uteri**

Quantifications (mean  $\pm$  S.E.) represent the relative surface of each part of the uterus: endometrium and circular (CL) and longitudinal (LL) layers. The number of analyzed cross-sections is indicated in parentheses.

Genotype	Endometrium	CL	LL
Wild type (15)	43.5 $\pm$ 1.7	14.6 $\pm$ 0.5	41.9 $\pm$ 2.0
<i>LXRα</i> <sup>-/-</sup> (12)	39.4 $\pm$ 1.2	14.3 $\pm$ 0.8	46.3 $\pm$ 1.7
<i>LXRβ</i> <sup>-/-</sup> (16)	43.0 $\pm$ 3.5	17.1 $\pm$ 1.2	39.9 $\pm$ 2.7
<i>LXRα;β</i> <sup>-/-</sup> (15)	43.4 $\pm$ 1.1	14.0 $\pm$ 0.6	42.6 $\pm$ 1.4

In order to determine whether this lipid accumulation was generalized to various muscles, oil red O staining was performed on frozen slides of three different types of muscle: intestine (duodenum), heart, and rough muscle (quadriceps) of 3-month-old wild-type and *LXRα;β*<sup>-/-</sup> females (Fig. 1C). None

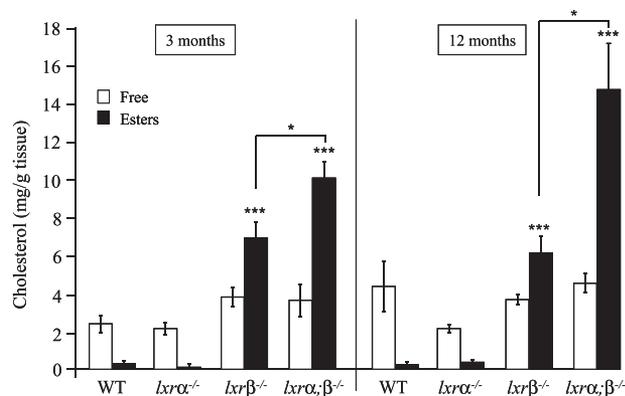
of the tested tissues were stained positively, except uterine smooth muscle, which was used as a control. These data led us to suggest the existence of tissue-specific mechanisms by which LXR $\beta$  regulates lipid homeostasis in uterine smooth muscle.

*LXRβ* Null Mice Have Elevated Uterus Cholesteryl Esters—To determine the nature of lipids accumulated in the uterus, thin layer chromatography analyses were performed on whole lipid extracts from uteri of 3- and 12-month old mice. Although LXR-mediated triacylglycerol accumulation had already been reported in vascular smooth muscle cells (33), biochemical analysis revealed that only the fraction containing cholesteryl esters was significantly increased after normalizing to uterus weight at 3 months (23.5- and 37.2-fold in *LXRβ*<sup>-/-</sup> and *LXRα;β*<sup>-/-</sup> mice, compared with wild-type mice;  $p < 0.0005$ ) and 12 months of age (27.6- and 66.5-fold in *LXRβ*<sup>-/-</sup> and *LXRα;β*<sup>-/-</sup> mice, compared with wild-type mice;  $p < 0.0005$ ) (Fig. 2). *LXRα*<sup>-/-</sup> mice presented the same low amount of cholesteryl esters as the wild-type mice. Together, these data suggest that the increase in the oil red O staining observed in the *LXRβ*<sup>-/-</sup> and *LXRα;β*<sup>-/-</sup> uterus was due to the accumulation of cholesteryl esters. Whatever the age considered, cholesteryl ester concentration was significantly higher in *LXRα;β*<sup>-/-</sup> uterus than in *LXRβ*<sup>-/-</sup>. This could suggest a mechanism of a slight redundancy between the two isoforms, where

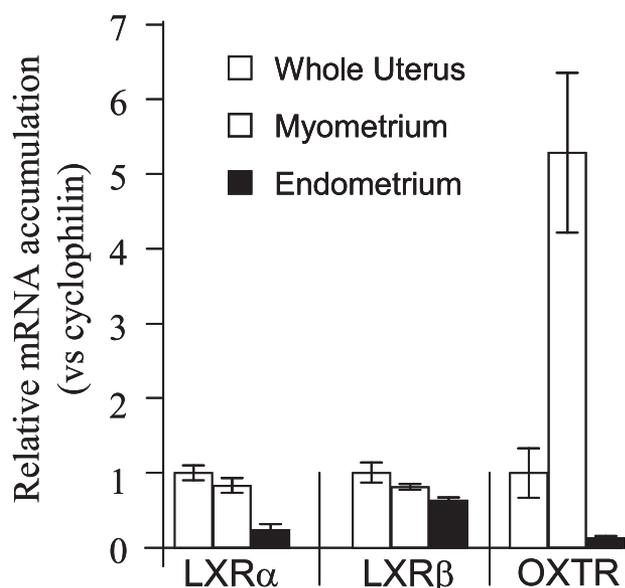
LXR $\alpha$  could partially reverse the drastic phenotype induced by absence of LXR $\beta$ . No significant differences in free cholesterol (Fig. 2, white bars), triacylglycerol, and phospholipid contents (data not shown) were observed among the genotypes.

*Both LXRα and LXRβ Are Expressed in the Various Compartments of the Uterus*—The results described above suggested that the LXR-dependent changes observed in the cholesteryl esters content were primarily due to LXR $\beta$ . We wondered whether this specificity in the LXR isoform was due to the exclusive expression of LXR $\beta$  in the tissue. The presence of LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  mRNA was checked by qPCR on whole uterus as well as mucosa and muscular parts. As shown in Fig. 3, *LXRα* and *LXRβ* were detected in myometrium and endometrium parts of the uterus. In the myometrium, both isoform mRNAs were in a comparable amount compared with





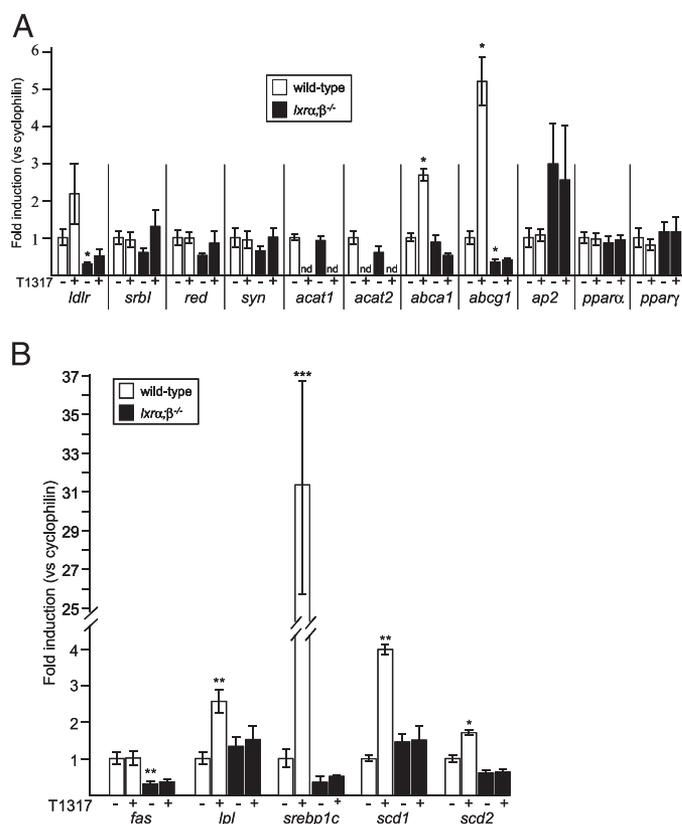
**FIGURE 2. Uteri from LXR-deficient mice accumulate cholesteryl esters at 3 and 12 months of age.** Analysis of free cholesterol (open bars) and cholesteryl ester (black bars) concentrations were determined as described under "Experimental Procedures" from whole uteri. Histograms are indicated as means  $\pm$  S.E. ( $n = 5$ ), except for *LXRα;β*<sup>-/-</sup> at 12 months ( $n = 8$ ). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ . WT, wild type.



**FIGURE 3. LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  are expressed in the myometrium and endometrium.** RNAs were prepared from whole uteri and from epithelial and muscular parts of the uterus as described under "Experimental Procedures" to determine the levels of mRNA expression of LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , and OXTR. Quantification (mean  $\pm$  S.E.) was done by qPCR ( $n = 4-6$ ). Results obtained in the whole uteri are indicated as 1.

whole uterus. In order to confirm that we had an enrichment of the muscular part, OXTR mRNA was amplified, and the highest accumulation was obtained in the myometrium fraction, as expected.

**LXRs Regulate Cholesterol Efflux and Fatty Acid Metabolism in the Uterus in Vivo**—To explore the underlying molecular mechanisms that might account for the cholesteryl ester accumulation in LXR $\beta$ -deficient mice, gene expression was examined by qPCR from whole uteri of wild-type and *LXRα;β*<sup>-/-</sup> animals gavaged with the potent synthetic LXR agonist T1317 (Fig. 4A). In both genotypes, basal and T1317-induced levels of genes encoding SRBI (scavenger receptor BI) involved in cell cholesterol entry, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*red*) and synthase (*syn*), responsible for *de novo* cholesterol synthesis, and ACAT1 and -2 (acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 and 2,



**FIGURE 4. LXRs regulate genes involved in lipid homeostasis in uterus.** A, genes involved in cholesterol entry and efflux and adipocyte markers. B, genes involved in fatty acid synthesis. Transcripts were quantified by qPCR analysis (mean  $\pm$  S.E.).  $n = 5-8$ . \*,  $p < 0.05$  versus vehicle-gavaged wild-type mice; \*\*,  $p < 0.01$  versus vehicle-gavaged wild-type mice; \*\*\*,  $p < 0.005$  versus vehicle-gavaged wild-type mice.

respectively), implicated in cholesterol esterification, were unchanged. In contrast, expression of *abca1* and *abcg1*, encoding two cholesterol efflux transporters, showed an LXR-dependant regulation. T1317 treatment induced an increase of *abca1* and *abcg1* accumulation in uteri from wild-type mice (2.7- and 5.2-fold increase, respectively;  $p < 0.01$ ). No induction of the LXR target genes was seen in *LXR*-deficient mice. As expected, a higher accumulation of ABCA1 was observed in the T1317-treated wild-type mice (5-fold compared with the vehicle-treated animals;  $p < 0.01$ ) (Fig. 6B).

Not surprisingly, transcripts of the low density lipoprotein receptor *ldlr* (low density lipoprotein receptor) was significantly lower in *LXRα;β*<sup>-/-</sup> mice, since this gene is known to be regulated by the intracellular concentration of oxysterols through a negative regulation loop (34). Interestingly, although the basal level of *abca1* was unchanged, basal accumulation of *abcg1* was significantly lower in *LXRα;β*<sup>-/-</sup> females (66% less than the wild-type mice;  $p < 0.05$ ) (Fig. 4A). It is assumed that this decrease could be considered as the *primum movens* of the phenotype, since the intracellular cholesterol increase cannot induce ABCA1 and ABCG1 transporters, leading to its sequestration and accumulation in myocytes. It could thus be suspected that LXRs regulate cholesterol efflux in uterus myocytes.

In addition, RNA accumulation of known target genes of LXRs involved in fatty acid metabolism was studied (Fig. 4B).



## Lack of LXR $\beta$ Alters Uterus Physiology in Mice

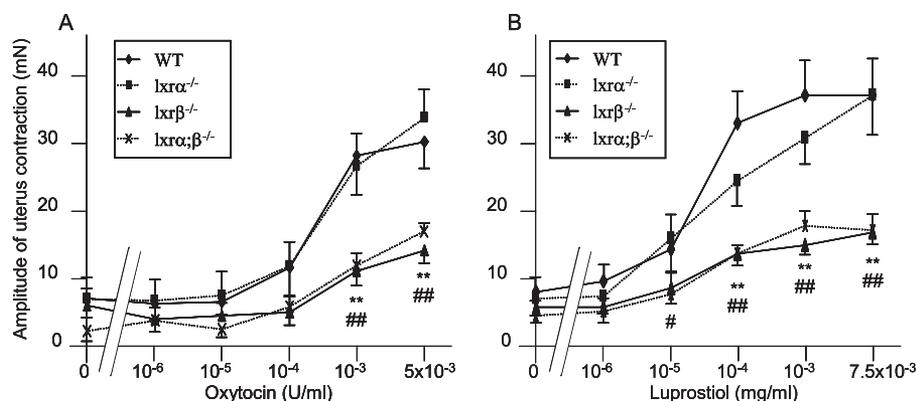


FIGURE 5. Uteri from mice lacking LXR $\beta$  present a defect of induced contractions. Contractile activity was assessed on uteri from estrogen-treated wild-type and *lxr*-deficient mice. Main amplitude contraction was recorded in response to synthetic oxytocin or PGF $2\alpha$  analog luprostiol. \*\*,  $p < 0.01$  versus wild-type mice; #,  $p < 0.05$  versus *lxr* $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice; ##,  $p < 0.01$  versus *lxr* $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.  $n = 6$ –9 animals.

T1317 treatment induced the accumulation of *srebp1c* (31.3-fold,  $p < 0.005$ ) and *lpl* (lipoprotein lipase) (2.6-fold,  $p < 0.01$ ) in wild-type mice, encoding SREBP1c and LPL, respectively. Quite surprisingly, the level of the noncleaved form of SREBP1c did not appear to be different among the genotypes, whatever the treatment (Fig. 6B). Likewise, no variation of the cleaved form was observed in the same samples (Fig. 6B). Interestingly, the gene encoding the fatty acid synthase *fas*, which has been shown to be an LXR target gene, is basally less expressed in *lxr* $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup> females compared with the wild type and not induced by T1317 in the wild-type mice. *scd1* and *scd2*, encoding stearoyl CoA-desaturase 1 and 2, show a higher accumulation in the uteri from T1317-treated wild-type mice (4.0- and 1.7-fold, respectively;  $p < 0.05$ ). A not significant higher protein level of SCD1 (3-fold) was observed only in the wild-type mice after the T1317 treatment (Fig. 6B), whereas SCD2 was undetectable in all of the samples (data not shown). These results suggested that, as already described in other tissues, LXRs might be involved in the regulation of fatty acid homeostasis in the uterus.

*Uteri of LXR $\beta$ -deficient Mice Present Contraction Defects*—Since myometrium is the major actor during labor, we investigated whether the cholesteryl ester accumulation could modify uterine contractile activity. Assays were thus performed on uteri from the various genotypes in order to measure the response of the muscle to either oxytocin or luprostiol, a PGF $2\alpha$  analog. Uterus from wild-type and *lxr* $\alpha$ <sup>-/-</sup> females presented a similar increase of contraction amplitudes when oxytocin (Fig. 5A) or luprostiol (Fig. 5B) were added in increasing concentrations in the media. Although uteri from *lxr* $\beta$ <sup>-/-</sup> and *lxr* $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup> mice presented no difference compared with the wild-type mice in the basal contractions (Fig. 5), the organs were less responsive to higher concentrations of oxytocin and PGF $2\alpha$  analog ( $p < 0.01$  compared with the wild-type and *lxr* $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice,  $n = 6$ –9).

Interestingly, the measured efficient doses of oxytocin and luprostiol to induce the maximal amplitude of contraction were identical in all genotypes ( $5 \times 10^{-3}$  units/ml and  $3 \times 10^{-4}$  mg/ml for oxytocin and luprostiol, respectively). Although these data suggested that the amount of receptors was not

affected, we analyzed by qPCR the levels of OXTR and PGF2R. As shown in Fig. 6A, no basal variation was observed between the wild-type and *lxr* $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup> mice; besides, T1317 gavage had no significant effect on OXTR and PGF2R RNA levels, as well as on PGF2R protein accumulation (Fig. 6B). Likewise, because mice were synchronized by the intraperitoneal injection of E $2$ , we hypothesized that the estradiol-dependent activities, which regulate the expression of various genes, such as OXTR, could have been altered in the engineered mice. qPCR analyses showed that contraction impairment was not due to

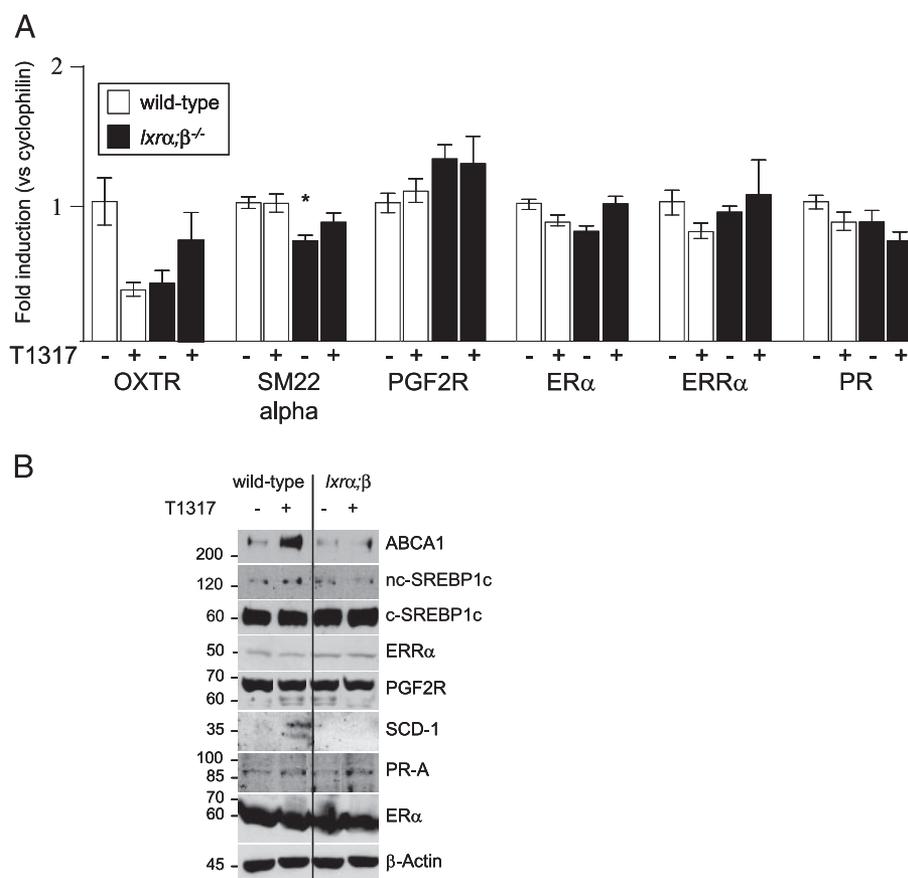
a decrease in mRNA or protein levels of ER $\alpha$  and progesterone receptor and ERR $\alpha$  (Fig. 6, A and B). Altogether, these data suggested that the phenotype observed in mice lacking LXR $\beta$  was probably more due to a muscular defect than to a drastic steroid hormone signaling defect, as pointed out by the significant decrease of *sm22 $\alpha$*  (transgelin-encoding gene) encoding transgelin, a calponin that is expressed exclusively in smooth muscle-containing tissues of adult animals (65% decrease in the *lxr* $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup> mice compared with the wild-type mice;  $p < 0.05$ ). *sm22 $\alpha$*  is one of the earliest markers of differentiated smooth muscle cells.

## DISCUSSION

In this report, we detail the discovery of LXR $\beta$  as an important regulator of cholesterol homeostasis in the uterus through its ability to modulate transcription of genes encoding proteins that regulate cholesterol efflux (ABCA1 and ABCG1) and fatty acid synthesis (LPL, SREBP-1c, and SCD1/2). Besides, the uteri of mice lacking LXR $\beta$  present an abnormal capacity to contract under oxytocin or PGF $2\alpha$  signals. LXR $\beta$  appears thus to provide a cholesterol safety valve that operates as in other tissues as a sterol sensor and thereby maintains the concentration of free cholesterol below toxic levels. In mice lacking LXR $\beta$ , LXR $\alpha$  does not present a totally redundant function.

*LXR $\beta$  Regulates Cholesterol Efflux within the Myocytes*—The ability of LXRs to control muscular lipid metabolism is reaching a high interest state. Studies (35, 36) showed that LXR activation can promote triglyceride accumulation in the presence of high glucose concentration in skeletal muscle cells, via the induction of the expression of lipogenic enzymes, such as SREBP1c (26), FAS (fatty acid synthase) (37), and SCD1 (38). In parallel, LXRs have been described as regulators of cholesterol efflux from the rough muscle by increasing the efflux of intracellular cholesterol to extracellular acceptors, such as high density lipoprotein (39). Despite these data, little was known about the role of these nuclear receptors in smooth muscle. Davies *et al.* (33) pointed out that T1317 could induce triacylglycerol accumulation in human vascular smooth muscle cells by activating FAS, SREBP-1c, and SCD-1. We found that mice lacking LXR $\beta$  presented a high accumulation of cholesteryl esters in





**FIGURE 6. The decrease in the amplitude of contraction is not linked to oxytocin or PGF2 $\alpha$  receptor expression or estrogen signaling pathway defects but to a muscular defect.** *A*, RNAs were extracted from uteri of estrogen-treated wild-type and *lxr*-deficient mice. Transcripts of genes encoding hormone receptors were quantified by real time PCR analysis (mean  $\pm$  S.E.). *n* = 5–8. *B*, representative Western blots of proteins extracted from uteri of estrogen-treated wild-type and *lxr*-deficient mice. *n* = 5. *ER* $\alpha$ , estrogen receptor  $\alpha$ ; *ERR* $\alpha$ , estrogen-related receptor alpha; *PR*, progesterone receptor; *nc*- or *c*-*SREBP*-1c, noncleaved or cleaved sterol regulatory binding protein-1c, respectively.

longitudinal layers as well as circular layers of myometrium. Since *abcg1* is a target gene of LXRs in the uterus, as shown by the induction of the mRNA accumulation after the gavage of wild-type mice with T1317, and because its basal level was significantly lower in mice lacking LXR $\beta$ , we hypothesized that LXR $\beta$  is a central sensor of cholesterol status of the uterine myocytes. Moreover, this role seems to be specific for the uterus, since the other muscles from *lxr* $\beta$ <sup>-/-</sup> mice tested so far (heart, duodenum, and quadriceps) did not show such a profile of oil red O staining. Analysis of the molecular mechanisms leading to such specificity would be of interest in order to screen whether expression of cofactors within these organs could in part explain the phenotype.

Moreover, as in other tissues, lipogenic genes are also regulated by LXRs. Whether *srebp1c*, *lpl*, and *scd1/2* are specific LXR $\beta$  target genes in the uterus has not been determined yet. The status of SCD1 and SCD2 is of particular interest. Indeed, these enzymes are responsible for the  $\Delta$ 9-*cis* desaturation of stearoyl- and palmitoyl-CoA, producing oleoyl- and palmitoleoyl-CoA. Oleoyl-CoA is the substrate for cholesterol acyltransferase and enables more esterification of cholesterol. However, no significant basal change of these enzymes was observed in the *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice. Besides, no clear defect in trig-

lyceride concentration was detected in the uterus although *fas* presented a lower basal level in *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice.

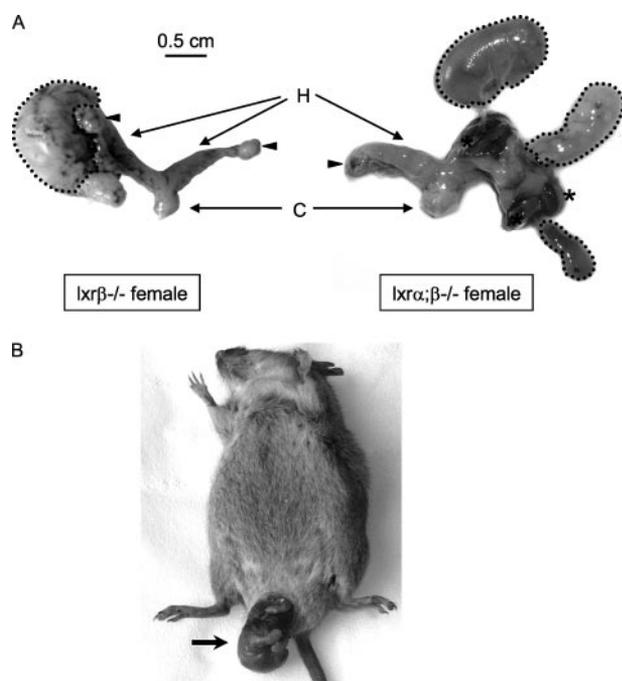
**LXR $\beta$  Deficiency Leads to Uterus Contraction Defect**—The decreased total amplitude of contractions did not seem to be due to a loss of muscle mass, as pointed out by the cross-sectional area analysis in the LXR $\beta$ -deficient mice and the somatic index, but rather to a muscular defect as suggested by the decrease of the *sm22α* transcript. Besides, although a direct role of LXR $\beta$  in the control of the contractile activity of the uterus could not be ruled out, several lines of evidence suggest that cholesterol could modulate contractile activity of various smooth muscles. Pharmacological depletion of cholesterol by methyl- $\beta$ -cyclodextrin abolished induced contractions of ureter and portal vein (40) and arteries (41) in rats. Conversely, Smith *et al.* (15) showed that cholesterol inhibited uterus contraction of pregnant rat by destabilizing caveolae. Altogether, these data prove that cholesterol concentration has dramatic effects on smooth muscle contraction and that in the uterus, the cholesterol amount is negatively correlated to its ability to contract. Consistently,

our results show that LXR $\beta$ -deficient mice, which presented an increased cholesteryl ester concentration, exhibited a lower capacity to contract under stimulation with oxytocin and PGF2 $\alpha$  analog.

It is interesting to note that although *lxrβ*<sup>-/-</sup> and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice apparently deliver successfully pups at term, LXR $\beta$ -deficient females usually show various signs of fetal resorption in the uterine horns. In some cases, 3–9-month-old *lxrβ*<sup>-/-</sup> and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> females develop hind leg paralysis a few days or weeks after delivery. When necropsy of these females is done, nonexpulsed pups could be observed in uterine horns (Fig. 7*A*). In rare cases, the female died giving birth (Fig. 7*B*). Hence, it could be hypothesized that the LXR-signaling pathway is one of the actors responsible for lipid change in plasma membrane of uterus myocytes at the term of pregnancy, thus initiating the ability of uterus to properly deliver the pups. Besides, it has been pointed out that obese and overweight women often have dysfunctional labor. Obesity is related to many complications associated with pregnancy (*e.g.* gestational diabetes mellitus, thromboembolic problems, and hypertensive disorders such as preeclampsia or eclampsia) (42). It has been shown that even with an uncomplicated pregnancy, there was a need for more oxytocin infusion to induce labor in overweight and obese



## Lack of LXR $\beta$ Alters Uterus Physiology in Mice



**FIGURE 7. In rare cases, nondelivered pups are found blocked in the uterus horn or in the vagina of LXR $\beta$ -deficient mice.** *A*, left, necropsy of a 6-month-old *lrx $\beta$ <sup>-/-</sup>* mouse presenting an abdominal distension and suffering of hind leg paralysis 2 weeks after delivery. *Right*, necropsy of a 6-month-old *lrx $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mouse. The right uterine horn was opened. *Dashed line*, nonexpulsed fetus; *asterisk*, placenta; *arrowheads*, ovary; *H*, uterine horn; *C*, cervix; *bar*, 0.5 cm. *B*, *lrx $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* female dead during parturition. Note the pup blocked in the cervix/vagina.

women than in normal weight (42). Moreover, prepregnancy body mass index (43, 44) and increase in its category (45) during pregnancy have been found to be high risk factors for caesarean delivery at term of pregnancy for failure to progress in the labor. However, the molecular mechanisms by which obesity and overweight lead to difficult labor remain unknown so far. Nevertheless, the *lrx $\beta$ <sup>-/-</sup>* females could be considered as the first engineered mice presenting an abnormal contraction of uterus that could be used to understand how disequilibrium in the lipid diet could interfere with a normal parturition in humans. Screening of new specific targets of LXR $\beta$  would thus be helpful to study side effects of the overweight on labor.

**LXR $\alpha$  Does Not Have Redundant Functions in the Uterus**—It has been generally admitted that LXR $\beta$  is ubiquitously expressed, whereas LXR $\alpha$  expression is limited to tissues where lipid metabolism is high. Actually, it looks as if very few tissues do not express LXR $\beta$  (46). So far, few physiologic functions have been associated with LXR $\beta$  *in vivo*, since, conversely to *lrx $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice, *lrx $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice do not present clear cut phenotypes. Until now, only two functions have been reported for LXR $\beta$  in mice. Komuves *et al.* (47) were the first to report an alteration in the LXR $\beta$ -deficient mice, which presented an abnormal differentiation of the epidermis, whereas LXR $\alpha$ -deficient mice appeared normal. The authors showed that only LXR $\beta$  was present in the affected tissue, suggesting that this phenotype could develop because of the lack of LXR $\alpha$  expression and thus the absence of any possible redundancy. In the

testis, we<sup>5</sup> and others (48, 49) described that LXR $\beta$  was important for the regulation of the cholesterol metabolism in Sertoli cells. Conversely to epidermis, LXR $\alpha$  is expressed in the Sertoli cells.<sup>5</sup> The present data point out a combined phenotype of cholesteryl ester accumulation and lower contraction capacity due to the lack of LXR $\beta$  while LXR $\alpha$  is expressed. This fact has to be paralleled with the phenotype observed in the *lrx $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice fed a high amount of cholesterol, where the presence of LXR $\beta$  could not rescue the regulation of *cyp7a1* (50). Hence, although both receptors could bind the same DNA sequence *in vitro* (17), LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  can differentially regulate gene expression, and thus in the uterus they clearly do not have overlapping roles. These data strongly support the existence of specific molecular mechanisms leading to LXR $\beta$  transactivation, such as specific promoter sequences or specific cofactors for each isoform. Such elements remain to be discovered.

**Acknowledgments**—We thank J. P. Saru, S. Monceau, C. Puchol, and S. Plantade for excellent technical assistance; Dr. G. Prensier (UMR CNRS 6023) for help in the semithin section analysis; Dr. D. Gallot (Obstetric and Gynecology Department, CHU Clermont-Ferrand) for obtaining the synthetic hormones and for helpful discussions; Drs. G. Veysière, S. Baron, F. Caira, and J. Henry-Berger (UMR CNRS 6547) for critically reading the manuscript; Dr. D. J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing the mice; and members of the Chester laboratory for assistance in animal dissections.

## REFERENCES

- Dockery, P., and Rogers, A. W. (1989) *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* **3**, 227–248
- Berto, A. G., Sampaio, L. O., Franco, C. R., Cesar, R. M., Jr., and Michelacci, Y. M. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 98–112
- McCormack, S. A., and Glasser, S. R. (1980) *Endocrinology* **106**, 1634–1649
- Di Renzo, G. C., Mattei, A., Gojnic, M., and Gerli, S. (2005) *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **17**, 598–600
- Huszar, G., and Roberts, J. M. (1982) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **142**, 225–237
- Myatt, L., and Lye, S. J. (2004) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **70**, 137–148
- Condon, J. C., Jeyasuria, P., Faust, J. M., and Mendelson, C. R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4978–4983
- Mendelson, C., and Condon, J. (2005) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **93**, 113–119
- Pulkkinen, M. O., Nyman, S., Hamalainen, M. M., and Mattinen, J. (1998) *Gynecol. Obstet. Invest.* **46**, 220–224
- Holman, R. T., Johnson, S. B., and Ogburn, P. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4835–4839
- Potter, J., and Nestel, P. J. (1978) *Clin. Chim. Acta* **87**, 57–61
- Brizzi, P., Tonolo, G., Esposito, F., Puddu, L., Dessole, S., Maioli, M., and Milia, S. (1999) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **181**, 430–434
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 2483–2497
- Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (2001) *Physiol. Rev.* **81**, 629–683
- Smith, R. D., Babiychuk, E. B., Noble, K., Draeger, A., and Wray, S. (2005) *Am. J. Physiol.* **288**, C982–C988
- Buxton, I. L., and Vittori, J. C. (2005) *Proc. West Pharmacol. Soc.* **48**, 126–128
- Beaven, S. W., and Tontonoz, P. (2006) *Annu. Rev. Med.* **57**, 313–329
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., and Mangelsdorf, D. J.

<sup>5</sup> D. H. Volle, K. Mouzat, R. Duggavathi, B. Siddeek, P. Déchelotte, B. Sion, G. Veysière, M. Benahmed, and J. M. A. Lobaccaro, submitted for publication.



- (1996) *Nature* **383**, 728–731
19. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., and Mangelsdorf, D. J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 266–271
  20. Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D. S. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**, 1019–1026
  21. Wagner, B. L., Valledor, A. F., Shao, G., Daige, C. L., Bischoff, E. D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S. H., Heyman, R. A., Rosenfeld, M. G., Schulman, I. G., and Glass, C. K. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5780–5789
  22. Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., and Tontonoz, P. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12097–12102
  23. Venkateswaran, A., Repa, J. J., Lobaccaro, J. M., Bronson, A., Mangelsdorf, D. J., and Edwards, P. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14700–14707
  24. Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 28240–28245
  25. Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18793–18800
  26. Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Mangelsdorf, D. J. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2819–2830
  27. Cummins, C. L., Volle, D. H., Zhang, Y., McDonald, J. G., Sion, B., Lefrancois Martinez, A. M., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J. M. A. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 1902–1912
  28. Volle, D. H., Repa, J. J., Mazur, A., Cummins, C. L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J. M. A. (2004) *Mol. Endocrinol.* **18**, 888–898
  29. Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. M. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., and Mangelsdorf, D. J. (2000) *Science* **289**, 1524–1529
  30. Frenoux, J.-M., Vernet, P., Volle, D. H., Britan, A., Saez, F., Kocer, A., Henry-Berger, J., Mangelsdorf, D. J., Lobaccaro, J. M., and Drevet, J. R. (2004) *J. Mol. Endocrinol.* **33**, 361–375
  31. Grizard, G., Sion, B., Bauchart, D., and Boucher, D. (2000) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **740**, 101–107
  32. Dalle, M., Dauprat-Dalle, P., and Barlet, J. P. (1992) *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **100**, 251–254
  33. Davies, J. D., Carpenter, K. L., Challis, I. R., Figg, N. L., McNair, R., Proudfoot, D., Weissberg, P. L., and Shanahan, C. M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 3911–3919
  34. Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) *Nature* **343**, 425–430
  35. Cozzone, D., Debard, C., Dif, N., Ricard, N., Disse, E., Vouillarmet, J., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Pruneau, D., Rieusset, J., Lefai, E., and Vidal, H. (2006) *Diabetologia* **49**, 990–999
  36. Kase, E. T., Wensaas, A. J., Aas, V., Hojlund, K., Levin, K., Thoresen, G. H., Beck-Nielsen, H., Rustan, A. C., and Gaster, M. (2005) *Diabetes* **54**, 1108–1115
  37. Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., Collins, J. L., Osborne, T. F., and Tontonoz, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 11019–11025
  38. Chu, K., Miyazaki, M., Man, W. C., and Ntambi, J. M. (2006) *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6786–6798
  39. Muscat, G. E., Wagner, B. L., Hou, J., Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Rohde, P., Petrowski, M., Li, J., Shao, G., Macondray, G., and Schulman, I. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40722–40728
  40. Babiychuk, E. B., Smith, R. D., Burdyga, T., Babiychuk, V. S., Wray, S., and Draeger, A. (2004) *J. Membr. Biol.* **198**, 95–101
  41. Dreja, K., Voldstedlund, M., Vinten, J., Tranum-Jensen, J., Hellstrand, P., and Sward, K. (2002) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 1267–1272
  42. Andreasen, K. R., Andersen, M. L., and Schantz, A. L. (2004) *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **83**, 1022–1029
  43. Doherty, D. A., Magann, E. F., Francis, J., Morrison, J. C., and Newnham, J. P. (2006) *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **95**, 242–247
  44. Barau, G., Robillard, P. Y., Hulsey, T. C., Dedecker, F., Laffite, A., Gerardin, P., and Kauffmann, E. (2006) *BJOG* **113**, 1173–1177
  45. Kabiru, W., and Raynor, B. D. (2004) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **191**, 928–932
  46. Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J. (2002) *Nat. Med.* **8**, 1243–1248
  47. Komuves, L. G., Schmuth, M., Fowler, A. J., Elias, P. M., Hanley, K., Man, M. Q., Moser, A. H., Lobaccaro, J. M., Williams, M. L., Mangelsdorf, D. J., and Feingold, K. R. (2002) *J. Invest. Dermatol.* **118**, 25–34
  48. Mascrez, B., Ghyselinck, N. B., Watanabe, M., Annicotte, J. S., Chambon, P., Auwerx, J., and Mark, M. (2004) *EMBO Rep.* **5**, 285–290
  49. Robertson, K. M., Schuster, G. U., Steffensen, K. R., Hovatta, O., Meaney, S., Hultenby, K., Johansson, L. C., Svechnikov, K., Soder, O., and Gustafsson, J. A. (2005) *Endocrinology* **146**, 2519–2530
  50. Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E., and Mangelsdorf, D. J. (1998) *Cell* **93**, 693–704
  51. Barish, G. D., Downes, M., Alaynick, W. A., Yu, R. T., Ocampo, C. B., Bookout, A. L., Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (2005) *Mol. Endocrinol.* **19**, 2466–2477
  52. Horard, B., Rayet, B., Triqueneaux, G., Laudet, V., Delaunay, F., and Vanacker, J. M. (2004) *J. Mol. Endocrinol.* **33**, 87–97



Conclusions :

Cette étude démontre qu'une déficience en récepteur LXR $\beta$  entraîne un phénotype délétère dans la physiologie du myomètre utérin. Ces travaux mettent en évidence pour la première fois un mécanisme spécifique à LXR $\beta$ . Les souris invalidées pour cette isoforme présentent en effet une accumulation d'esters de cholestérol anormale au sein même des myocytes utérins, à la fois dans les cellules de la couche musculaire circulaire et longitudinale. Peu de données concernant le rôle de ces récepteurs nucléaires dans la physiologie des muscles lisses sont disponibles actuellement. Dans des cellules humaines de muscle lisse vasculaire, l'activation des LXRs par du T0901317 provoque une accumulation de triglycérides *via* l'activation des gènes *srebp1c*, *fas* et *scd-1* (Davies, *et al.*, 2005). Nos travaux montrent un mécanisme de régulation du métabolisme du cholestérol spécifique du tissu. En effet, aucun des autres muscles testés (quadriceps, muscle cardiaque et muscle lisse intestinal) ne présente cette accumulation lipidique. Ce phénotype résulte d'une séquestration du cholestérol intracellulaire, provoquée par la diminution basale de l'expression d'*abcg1* et l'absence d'induction des gènes *abca1* et *abcg1*. A cette accumulation anormale est associé un défaut de l'activité contractile des utérus en réponse à une stimulation par l'ocytocine ou la prostaglandine F2 $\alpha$ , pouvant conduire dans de rares cas à un blocage des fœtus en position utérine, voire cervicale, entraînant une paralysie de l'arrière-train de la mère puis sa mort.

Ces travaux apportent de nouveaux éclairages concernant les relations entre le métabolisme du cholestérol et la physiologie de la contraction utérine. A terme, cette étude permettra de mieux préciser les mécanismes moléculaires responsables des troubles de l'accouchement chez les femmes enceintes en surpoids ou obèses.



## *Discussion et perspectives*



Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré pour la première fois le rôle physiologique des récepteurs nucléaires LXRs dans la fonction de reproduction chez la souris femelle *in vivo*. Ainsi, au niveau ovarien, les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* présentent-elles plusieurs signes cliniques du syndrome d'hyperstimulation ovarienne : augmentations ovariennes en masse et en volume, hémorragies au sein des corps jaunes, perturbations de la perméabilité vasculaire et production anormale d'œstradiol. Dans des cas extrêmes, l'induction de l'ovulation entraîne des hémorragies lutéales massives.

Au niveau utérin, nos travaux mettent en évidence le rôle de LXR $\beta$  dans le maintien de l'équilibre lipidique dans le myomètre. Les souris invalidées pour cette isoforme présentent une accumulation anormale d'esters de cholestérol dans les myocytes utérins, due à une diminution basale de l'expression du gène codant le transporteur de cholestérol ABCG1 et à une absence de régulation des gènes codant ABCA1 et ABCG1. Par ailleurs, le muscle utérin de ces animaux possède une activité contractile diminuée en réponse à des signaux hormonaux, pouvant dans de rares cas empêcher l'expulsion des fœtus au terme de la parturition.

## I. Au niveau ovarien

### A. Les LXRs régulent la stéroïdogénèse ovarienne

Il est aujourd'hui connu que les LXRs sont des régulateurs importants de la stéroïdogénèse (pour une revue, voir Volle et Lobaccaro, 2007). Au niveau ovarien, la seule étude disponible montre que l'administration de GW3965 ou de T0901317 à des cellules humaines de la granulosa lutéinisées en culture réduit la production de progestérone, *via* une diminution des ARNm des gènes *star*, *p450scc* et *3 $\beta$ hsd* et *via* un efflux du cholestérol intracellulaire (Drouineaud, *et al.*, 2007). Ces données *ex vivo* sont en totale contradiction avec les travaux de notre laboratoire qui montrent une régulation positive des gènes de la stéroïdogénèse surrénalienne (Cummins, *et al.*, 2006) et testiculaire (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1), entraînant une augmentation de la production des stéroïdes. Nos travaux montrent également une stimulation de la stéroïdogénèse *in vivo* par le T0901317, *via* une augmentation de l'expression des gènes *star* et *p450scc*. Tandis que l'utilisation de l'agoniste n'a aucun effet sur la concentration plasmatique de progestérone, son administration par voie orale aux souris sauvages permet une augmentation de l'œstradiolémie. Il est à noter que les souris déficientes en LXRs présentent également une œstradiolémie accrue et une augmentation de l'expression de *p450scc*. Ces données sont en accord avec plusieurs études suggérant que l'absence des LXRs conduit à une levée de la répression basale de plusieurs gènes cibles (Wagner, *et al.*, 2003 ; Cummins, *et al.*, 2006). Chez



les femmes présentant des symptômes d'OHSS, l'œstradiolémie, indicateur de la réponse ovarienne, est un marqueur de la progression de la pathologie (Delvigne et Rozenberg, 2002). En effet, chez les femmes qui suivent des protocoles d'induction de l'ovulation dans l'objectif d'une procréation médicalement assistée, lorsque l'œstradiolémie est trop élevée, le traitement par les gonadotrophines est temporairement suspendu jusqu'à ce que les valeurs plasmatiques d'œstradiol atteignent des concentrations acceptables (Grudzinskas et Egbase, 1998). Par ailleurs, si l'œstradiol n'est pas le facteur majeur influençant le déclenchement de la pathologie, il est impliqué dans la progression des symptômes. Sachant que les LXR $\alpha$  sont des régulateurs importants de la stéroïdogenèse, il est possible que les forts taux d'œstradiol chez les souris invalidées soient à l'origine des symptômes d'hyperstimulation chez ces souris. Afin de compléter ce travail, nous proposons de **réaliser des expériences d'induction de l'ovulation couplées à l'utilisation d'anti-œstrogènes chez ces souris**. En effet, si l'utilisation d'antagonistes d'ER pouvait annuler le déclenchement des signes d'OHSS, l'œstradiol serait sans doute le *primum movens* du déclenchement des symptômes chez les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*.

## **B. L'intégrité vasculaire des ovaires est-elle à l'origine de l'OHSS ?**

Nos travaux montrent que les protocoles de super-ovulation utilisés chez les souris provoquent des dérèglements de la perméabilité vasculaire ovarienne. Chez la femme, les syndromes d'hyperstimulation ovarienne sont associés à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le facteur responsable de ce trouble est VEGF. Par ailleurs, il est connu que le gène *vegf* est une cible des LXR $\alpha$  (Walczak, *et al.*, 2004). Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence de dérégulations de ce gène dans les ovaires des souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*. Il est à noter que la source de production de VEGF à l'origine des OHSS n'est pas clairement définie. Levin *et al.* (Levin, *et al.*, 1998) ont montré que l'OHSS est lié à une augmentation de VEGF dans le fluide folliculaire, menant à une dérégulation de la perméabilité ovarienne. A l'inverse, une étude récente suggère que VEGF serait un mauvais marqueur prédictif (Kung, *et al.*, 2007). Par ailleurs, une étude montre que les femmes ayant un risque de développer un OHSS possèdent des concentrations de VEGF folliculaires plus faibles et des concentrations sériques plus fortes que les femmes à faible risque (Pellicer, *et al.*, 1999). De plus, il est connu que les œstrogènes peuvent stimuler la production de VEGF au niveau utérin (Girling et Rogers, 2005). Prises ensemble, ces données suggèrent que les signes d'OHSS développés par les souris déficientes en LXR $\alpha$  ne seraient pas uniquement dus à une augmentation de l'expression du gène *vegf* au niveau ovarien. Pour cette raison, il sera important de **doser la protéine VEGF dans le plasma** de ces souris.



Le syndrome d'hyperstimulation ovarienne est également lié à une augmentation massive de l'angiogenèse ovarienne, *via* VEGF, mais aussi *via* d'autres médiateurs, comme l'angiogénine (Aboulghar, *et al.*, 1998). Outre son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique, la protéine ANGPTL3 semble impliquée dans la formation des vaisseaux sanguins (Camenisch, *et al.*, 2002). Par ailleurs, le gène *angptl3* est directement régulé par les LXRs (Kaplan, *et al.*, 2003). Prises avec le fait que le gène *vegf* est une cible directe de ces NRs, le rôle direct des LXRs dans l'angiogenèse ovarienne n'est pas à exclure. Ainsi, on peut supposer que les signes d'OHSS des souris déficientes en LXRs pourraient être dus en partie à des perturbations de la vascularisation. Il sera intéressant de mesurer **la densité vasculaire des ovaires des souris transgéniques** par marquage immunohistologique du facteur VIII de Von Willebrand, marqueur des cellules endothéliales, puis par le comptage des vaisseaux sous microscopie (Weidner, *et al.*, 1991). La dynamique de la vascularisation étant un processus contrôlé et primordial dans la mise en place et la régression du corps jaune (pour une revue, voir Hazzard et Stouffer, 2000), nous proposons **d'étudier l'angiogenèse dans le corps jaune cyclique et gestatif**.

Il sera par ailleurs important d'analyser les causes moléculaires de la perméabilité vasculaire à l'origine des hémorragies des ovaires des souris *lxra;β<sup>-/-</sup>*. Chez la rate hyperstimulée, modèle d'OHSS, la perturbation de la perméabilité vasculaire est associée à une diminution du transcrit et de la protéine Claudine 5 impliquée dans les jonctions serrées (Kitajima, *et al.*, 2006). Schématiquement, l'intégrité des barrières endothéliales est assurée par les jonctions cellulaires. Les cellules endothéliales possèdent trois types de jonctions (pour une revue, voir Orlova et Chavakis, 2007) :

- Les jonctions serrées (*Zonula Occludens*), en position apicale, peuvent être formées d'occludines, de claudines ou de JAM (*junctional adhesion molecules*), reliés au cytosquelette par des molécules de type ZO (*Zona Occludens*)
- Les jonctions adhérentes (*Zonula Adherens*) sont formées par les cadhérines et reliées au cytosquelette par des caténines
- Les jonctions « *gap* » qui forment des canaux par l'assemblage de protéines transmembranaires.

Une étude a par ailleurs montré que l'effet perméabilisant de VEGF sur les vaisseaux est en partie dû à une diminution d'occludine et à une perte de ZO-1 au niveau des jonctions endothéliales (Wang, *et al.*, 2001). Il sera donc important de **repérer d'éventuelles perturbations des jonctions cellulaires endothéliales par microscopie électronique. Les taux des protéines entrant dans la constitution d'éventuelles jonctions perturbées** chez les souris déficientes en LXRs ainsi que **l'analyse de l'expression de leurs gènes pourront être mesurés par western blot et qPCR respectivement**.



Cette approche pourrait sans doute contribuer à expliquer la formation de la plaque d'athérome. En effet, des défauts des jonctions endothéliales contribuent à la progression de la lésion (pour une revue, voir Kolodgie, *et al.*, 2007). Comme nous avons montré au niveau ovarien que la perte des LXRs résultait en une perturbation de la perméabilité vasculaire, nous soulevons l'hypothèse selon laquelle l'effet anti-athérosclérotique de ces NRs pourrait au moins en partie dépendre du maintien de l'intégrité des barrières endothéliales. Pour tester cette hypothèse, nous proposons donc **d'étudier par microscopie électronique l'intégrité des jonctions cellulaires** au niveau de la plaque d'athérome **chez des souris modèles *ldlr*<sup>-/-</sup> ou *apoE*<sup>-/-</sup> en réponse à un agoniste des LXRs.**

### **C. Existe-t-il un lien entre les voies de signalisation par la FSH et les oxystérols ?**

A l'inverse des travaux de Steffensen *et al.* (Steffensen, *et al.*, 2006) qui montrent que des ovocytes prélevés chez des souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> sont incapables de reprendre la méiose en réponse à une stimulation par la FSH, nos travaux suggèrent que la réponse ovarienne à cette gonadotrophine est accentuée chez ces animaux. En effet, l'induction de l'ovulation par l'administration de gonadotrophines exogènes provoque l'ovulation d'un plus grand nombre d'ovocytes que chez les souris sauvages. Cette différence peut dépendre d'un recrutement plus important des follicules, étape sous le contrôle de la FSH. Nos travaux suggèrent donc que le trouble de reprise de la méiose est indépendant de la réponse à la FSH et que l'absence des LXRs perturbe des cibles moléculaires en aval de son récepteur. De même, nous n'avons pas mis en évidence de dérégulation du gène codant le récepteur de la FSH au niveau ovarien chez les souris transgéniques, suggérant que les LXRs pourraient contrôler la réponse à cette gonadotrophine en aval du récepteur. Il sera donc important **d'étudier les relations entre la signalisation par la FSH et par les oxystérols.** En réponse à des agonistes des LXRs sur des cultures de cellules de la granulosa, l'activité du récepteur de la FSH pourra être étudiée par la mesure des taux intracellulaires d'AMPc (pour une revue, voir Richards, 2001). Les effecteurs cellulaires en aval du récepteur, notamment la PKA, pourront également être étudiées par la **mesure de leur niveau de phosphorylation.**

### **D. Le phénotype ovarien est-il un phénotype primaire ?**

A niveau testiculaire, notre laboratoire a montré que les souris invalidées pour *LXR $\alpha$*  présentent une hypotestostéronémie intrinsèque liée à une perte de la régulation des enzymes de la



stéroïdogénèse par les LXRs, mais également à une diminution de la LH plasmatique associée à une diminution de la transcription du gène *βlh* hypophysaire (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1). Les hypophyses des souris *lxrα;β<sup>-</sup>* présentent des altérations de leur structure, avec des vacuolisations intracellulaires associées à une accumulation d'esters de cholestérol (données non publiées). Ainsi l'influence de l'hypophyse dans l'apparition des troubles ovariens n'est pas à exclure. Sachant que (1) les souris *lxrα;β<sup>-</sup>* présentent une production accrue d'œstradiol en réponse au T0901317, que (2) les cellules de la granulosa sont le site majeur de production d'œstrogènes sous le contrôle de la FSH et que (3) le récepteur de la FSH est exprimé spécifiquement dans les cellules de la granulosa chez les femelles (pour une revue, voir Hermann et Heckert, 2007), **la création de souris transgéniques invalidées pour les gènes codant LXRα et LXRβ spécifiquement dans les cellules de la granulosa serait un modèle de choix**. L'ajout de sites de recombinaison spécifique *Lox* dans les gènes *lxrα* et *lxrβ* (*lxrα-flox* et *lxrβ-flox*) est actuellement en cours dans le laboratoire de David J. Mangelsdorf (J-M.A. Lobaccaro, communication personnelle). La création de souris transgéniques exprimant la recombinase Cre spécifiquement dans les cellules de la granulosa sous le contrôle du promoteur du récepteur de la FSH et leur croisement par les souris *lxrs-flox* permettra d'étudier la part relative de l'ovaire et de l'hypophyse dans le déclenchement des symptômes de l'hyperstimulation ovarienne. Par ailleurs, si l'origine du phénotype est ovarienne, ces animaux seront un modèle de choix dans l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'apparition des OHSS.

Comme les symptômes de l'OHSS sont clairement liés à une réponse inflammatoire excessive (pour une revue, voir Elchalal et Schenker, 1997), Enskog *et al.* (Enskog, *et al.*, 1999) ont émis l'hypothèse selon laquelle une sensibilité immunologique excessive pourrait être un facteur de risque dans l'apparition des signes de la pathologie. L'étude conduite a révélé que les femmes qui développent un OHSS ont une prévalence d'allergies plus forte que les femmes témoins. Sachant que les LXRs sont des facteurs ayant un rôle anti-inflammatoire, on peut supposer que l'apparition des symptômes d'hyperstimulation ovarienne peut être due à une dérégulation des facteurs pro-inflammatoires. Ainsi pouvons-nous émettre les deux hypothèses suivantes : (1) les LXRs serviraient à contrôler l'activation des facteurs pro-inflammatoires au moment de l'ovulation et (2) les LXRs maintiendraient un état immunologique contrôlé au niveau de l'organisme et la perte de ce contrôle chez les souris *lxrα;β<sup>-</sup>* serait responsable d'une sensibilité immunologique accrue. Il serait donc important de comparer le statut inflammatoire des souris déficientes en LXRs et des souris sauvages. Par ailleurs, une étude similaire menée sur des souris ovariectomisées permettrait d'établir la part relative du statut inflammatoire ovarien par rapport au statut inflammatoire général. Nous proposons donc de **traiter quatre groupes d'animaux : des femelles sauvages ovariectomisées ou non et des femelles *lxrα;β<sup>-</sup>* ovariectomisées ou non**. Nous préleverions ensuite les macrophages péritonéaux et comparerions l'expression des gènes impliqués dans les processus immunologiques par une **approche transcriptomique à grande échelle**. Ainsi, l'identification des facteurs dérégulés chez les souris non



ovariectomisées par rapport aux souris sauvages nous renseignera précisément sur la cascade d'évènements conduisant aux troubles observés. Par ailleurs, chez des souris ovariectomisées, la découverte de facteurs dérégulés chez les souris déficientes en LXRs, donc d'origine extra-ovarienne, nous indiquera si le statut inflammatoire général est perturbé chez ces souris.

## E. Les LXRs à l'origine de la pathologie humaine ?

Même si l'étiologie complète de l'OHSS n'est pas encore complètement élucidée, plusieurs facteurs de risque ont été identifiés, notamment un âge jeune, une sensibilité immunitaire accentuée, de forts taux d'œstradiol sériques, le syndrome des ovaires polykystiques et l'indice de masse corporelle (IMC ; pour une revue, voir Delvigne et Rozenberg, 2002 ; Budev, *et al.*, 2005). Les femmes obèses qui suivent des protocoles de PMA ont des taux de succès plus faibles que les femmes non obèses (Maheshwari, *et al.*, 2007) et il existe une corrélation entre l'IMC et le taux d'échec en FIV (Ferlitsch, *et al.*, 2004), suggérant que des perturbations dans le métabolisme lipidique pourraient être au moins en partie à l'origine du syndrome. Nous proposons ainsi de **séquencer les gènes *lxra* et *lxrβ* chez des femmes atteintes d'OHSS** à partir de prélèvements sanguins, afin de mettre en évidence un éventuel déséquilibre de liaison avec des polymorphismes particuliers des gènes *lxra* et *lxrβ*. Il sera également important d'établir des **mesures des taux de transcription des gènes cibles des LXRs connus pour être impliqués dans l'OHSS** par des techniques de qPCR sur des biopsies d'ovaires issus de patientes développant le syndrome. **Par la suite, les promoteurs des gènes identifiés comme étant dérégulés pourraient être séquencés.** En effet, si actuellement aucune pathologie humaine n'a jusqu'alors été associée à des mutations dans les gènes codant les LXRs, les séquences de promoteurs de leurs gènes cibles n'ont à notre connaissance jamais été analysées mais l'existence de mutations des LXREs n'est toutefois pas à exclure.

## II. Au niveau utérin

### A. LXR $\beta$ est essentiel pour les contractions musculaires utérines

Au moment de l'accouchement, d'importants changements lipidiques s'opèrent chez la mère. En particulier, chez les femmes, on observe une augmentation des concentrations de cholestérol



circulant et au niveau myométrial (Potter et Nestel, 1978). Le rôle principal de cette augmentation semble être une stabilisation du récepteur de l'ocytocine dans les myocytes (pour une revue, voir Gimpl et Fahrenholz, 2001). A l'inverse, une étude a montré qu'une augmentation anormale de cholestérol dans les myocytes utérins réduit l'amplitude des contractions provoquées par l'ocytocine chez la rate et un épuisement en cholestérol conduit à une augmentation des contractions musculaires (Smith, *et al.*, 2005). Au total, ces données montrent que le cholestérol est un élément essentiel au processus de parturition, mais ses concentrations doivent être impérativement régulées. Nos travaux mettent en évidence que la perte des LXRs conduit à une diminution basale de l'expression du gène *abcg1* et une absence de régulation des gènes *abca1* et *abcg1* en réponse au T0901317. Cette perturbation transcriptionnelle s'accompagne d'une séquestration du cholestérol intracellulaire, qui est stocké dans les myocytes sous forme estérifiée. En parallèle, nous montrons que cette accumulation lipidique est associée à un défaut de contraction des utérus des souris déficientes en LXR $\beta$  en réponse à une simulation hormonale. Afin de poursuivre ce travail, il serait important d'étudier le mécanisme moléculaire sous-jacent au défaut de contraction musculaire. **La réalisation des mesures des contractions d'utérus isolés de souris *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* après un épuisement en cholestérol par de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine**, apporterait la preuve définitive que l'accumulation d'esters de cholestérol est la cause de la perte des propriétés contractiles utérines.

Smith *et al* (Smith, *et al.*, 2005) ont montré par ailleurs que le cholestérol inhibe les contractions utérines en déstabilisant les cavéoles. Ces dernières sont des invaginations de la membrane plasmique enrichies en cholestérol et en cavéolines, protéines de structure (pour une revue, voir Taggart, 2001). La richesse en cholestérol contribue à la faible fluidité membranaire, c'est pourquoi on associe les cavéoles à des « radeaux » lipidiques (*lipidic rafts*), « flottant » dans la membrane. Les cavéolines structurent ces invaginations. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de ces protéines (cavéoline-1, 2 et 3). Ces structures sont importantes dans la transduction des signaux des cellules musculaires lisses. Les souris invalidées pour les Cavéolines 1 et 3 ne possèdent pas de cavéoles (l'absence de Cavéoline 1 déstabilise la cavéoline, les trois isoformes n'étant pas alors fonctionnelles) et développent une cardiomyopathie (Park, *et al.*, 2002). Les cavéoles permettraient un contact entre le réticulum sarcoplasmique et les canaux ioniques de la membrane plasmique (pour une revue, voir Bergdahl et Sward, 2004). A l'exception du muscle utérin, les cavéoles semblent ainsi impliquées dans la promotion des contractions des muscles lisses. A l'inverse, la déstabilisation des cavéoles est associée à une diminution des contractions utérines. Chez la femme, les élévations de cholestérol myométrial sont également associées à une diminution de l'activité contractile (pour une revue, voir Noble, *et al.*, 2006). Nous proposons de **tester si l'élévation de cholestérol dans les myocytes** des souris *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* est **associée à une modification du nombre et de la structure des cavéoles par microscopie électronique**. **En parallèle, la mesure des transcrits des gènes codant les trois cavéolines sera réalisée par qPCR**.



## B. Pourquoi LXR $\alpha$ ne peut-il pas compenser l'absence de LXR $\beta$ ?

Il est aujourd'hui admis que l'expression du gène *lxr $\beta$*  est ubiquiste tandis que celle du gène *lxr $\alpha$*  est fortement activée dans les organes possédant un fort métabolisme lipidique. Ces données sont en accord avec le fait que beaucoup de signaux extracellulaires et de voies cellulaires peuvent moduler l'expression du gène *lxr $\alpha$* , peu de régulation du gène *lxr $\beta$*  étant connues. Les souris déficientes en LXR $\alpha$  présentent plusieurs phénotypes délétères (pour une revue voir Volle et Lobaccaro, 2007). Cependant, dans chacun des organes touchés, l'expression de *lxr $\beta$*  était détectable. Par exemple, l'inactivation du gène *lxr $\alpha$*  conduit à une stéatose hépatique chez les animaux nourris avec un régime riche en cholestérol (Peet, *et al.*, 1998). Ce phénotype est dû à une absence d'induction du gène *cyp7a1* en réponse à l'élévation du cholestérol intracellulaire. Il est intéressant de noter que LXR $\beta$ , pourtant exprimé au niveau hépatique, ne permet pas d'induire l'expression de ce gène. Ce phénotype en particulier et tous les phénotypes associés à l'absence de LXR $\alpha$  alors que LXR $\beta$  est présent montrent l'existence de modes d'action distincts pour ces deux NRs. Très peu de phénotypes liés à l'absence de LXR $\beta$  ont actuellement été décrits. Au niveau de la peau, les souris *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* présentent un défaut de différenciation de l'épiderme (Komuves, *et al.*, 2002). Au niveau testiculaire, l'absence de LXR $\beta$  résulte en un déséquilibre dans le métabolisme lipidique des cellules de Sertoli (Volle, *et al.*, 2007, annexe 1). Cependant, LXR $\alpha$  est absent dans l'épiderme et nous n'en avons détecté que de faibles quantités dans les cellules de Sertoli. Comme de très faibles quantités de transcrits du récepteur de la LH ont été mesurées dans ces cellules, on peut supposer que l'expression de *lxr $\alpha$*  observée pouvait être due à une légère contamination par des cellules de Leydig (exprimant fortement cette isoforme) lors de l'enrichissement en cellules de Sertoli. Dans l'utérus, notre étude est la seule présentant un phénotype lié à l'absence de LXR $\beta$  dans un tissu qui exprime LXR $\alpha$ , mettant pour la première fois en évidence un mécanisme d'action spécifique à l'isoforme bêta. Nous émettons trois hypothèses à l'origine de ce phénomène.

### 1. Existe-il des LXRE spécifiques de LXR $\beta$ ?

A notre connaissance, aucun élément de réponse capable de recruter spécifiquement l'hétérodimère RXR/LXR $\beta$  n'a actuellement été décrit. A l'inverse, plusieurs LXRE spécifiques de LXR $\alpha$  existent. Parmi ces derniers, il convient de distinguer deux types d'éléments :



- Li *et al.* (Li, *et al.*, 2002) ont décrit trois LXRE dans le promoteur du gène *lxr $\alpha$*  : un LXRE de type I et un LXRE de type II. Les deux isoformes des LXRs peuvent se fixer à l'élément de type I et activer la transcription d'un gène rapporteur sous son contrôle tandis que seul LXR $\alpha$  peut se fixer aux LXRE de type II.
- Les travaux de notre laboratoire ont montré l'existence d'un autre type d'élément de réponse. Le gène *akr1b7* possède trois LXRE fonctionnels (Volle, *et al.*, 2004). Les deux isoformes des LXRs peuvent se fixer à chacun de ces trois éléments de réponse. A l'inverse des deux autres, le LXRE le plus en position 5' est le seul à répondre à l'activation de LXR $\beta$  par le 22(R)-hydroxy-cholestérol. Le LXRE identifié dans le gène *Eng* obéit à la même règle : il peut être fixé par les deux isoformes mais seul LXR $\alpha$  peut induire l'expression d'un gène rapporteur sous son contrôle (Henry-Berger *et al.*, soumis, annexe 2).

Les deux gènes codant ABCA1 et ABCG1 possèdent tous deux des LXRE fonctionnels répondant aux deux isoformes des LXRs (Costet, *et al.*, 2000 ; Sabol, *et al.*, 2005). Ces deux gènes ne sont donc pas des candidats idéaux pour tester cette hypothèse. Cependant, l'existence de dérégulations d'autres gènes n'est pas à exclure. Nous proposons donc de **mener une étude transcriptomique comparant des utérus de souris sauvages et *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup>**. **Les promoteurs des éventuels gènes dérégulés identifiés seront par la suite séquencés** dans le but de la recherche d'éléments DR4, **puis analysés d'un point de vue fonctionnel**, par les techniques classiques de retardement sur gel, de *ChIP* (*Chromatin Immunoprecipitation* ; immunoprécipitation de chomatine) et/ou de transfections transitoires.

## 2. Certains ligands sont spécifiques des isoformes des LXRs

A notre connaissance, aucune information concernant les concentrations d'oxystérols dans l'utérus n'est actuellement disponible. On sait maintenant que certains ligands peuvent avoir des comportements différents vis-à-vis des deux isoformes des LXRs. Une N-Acylthiadiazoline synthétique est connue pour être un agoniste sélectif de LXR $\beta$  (Molteni, *et al.*, 2007). De plus, rappelons que la riccardine C, composé d'origine végétale, est un agoniste partiel de LXR $\alpha$  et un antagoniste de LXR $\beta$  (Tamehiro, *et al.*, 2005). L'existence d'un ligand endogène - oxystérol ou non - ayant un pouvoir agoniste sélectif de l'isoforme bêta n'est donc pas à exclure. Il sera donc important d'identifier le ou les ligands physiologiques endogènes des deux isoformes. Nous proposons **d'analyser des extraits lipidiques de muscle utérin par une technique de SPA, couplée à une chromatographie de type HPLC**, pour **identifier les molécules endogènes ligands de LXR $\alpha$  et/ou**



**LXR $\beta$** . Nous étudierons leurs propriétés agonistes par **l'analyse du recrutement des co-facteurs par FRET et l'utilisation de co-transfections transitoires de plasmides d'expression de Lxr $\alpha$  et d'un gène rapporteur sous le contrôle de LXREs**. Selon la ou les molécules identifiées, **la création de souris transgéniques invalidées pour la ou les enzymes impliquées dans la biosynthèse du ligand** apportera la preuve que cette molécule est un agoniste endogène. Cette étude nous permettra d'identifier de nouveaux agonistes endogènes des LXRs potentiellement sélectifs d'une isoforme.

### 3. A la recherche de nouveaux co-facteurs

Bien que les études cristallographiques montrent que LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  adoptent la même conformation en présence de T0901317 et que leur identité au niveau du LBD est relativement forte (77 % ; Svensson, *et al.*, 2003 ; Farnegardh, *et al.*, 2003), l'existence de ligands spécifiques d'une isoforme suggère que les LBD des deux isoformes sont capables d'adopter des conformations différentes pour un même ligand, créant un environnement sélectif pour les co-facteurs. Il est aujourd'hui connu qu'en l'absence de ligand, les LXRs sont associés à des co-répresseurs. Cependant, l'affinité des deux isoformes pour un même co-répresseur est différente (Hu, *et al.*, 2003 ; Albers, *et al.*, 2006). Cette dernière étude a montré que l'activité transcriptionnelle d'un NR ne se mesure pas uniquement en fonction de sa capacité à recruter un co-activateur, mais aussi en fonction de sa capacité à déplacer un co-répresseur en présence d'un ligand. Si les deux isoformes des LXRs ont des différences d'affinité basale avec leurs co-répresseurs, ces différences d'affinité persistent également après fixation d'un ligand. Au total, il est clair que l'activité de transactivation d'un NR est fortement dépendante du contexte cellulaire, notamment de l'expression des co-activateurs et des co-répresseurs. Il sera donc important d'identifier des partenaires protéiques des LXRs qui confèrent à LXR $\beta$  son rôle de régulateur clé de l'homéostasie lipidique dans le muscle lisse utérin. Nous proposons ainsi de **mesurer par qPCR les taux d'expression des gènes codant les co-facteurs connus des LXRs dans le muscle utérin**, et en parallèle de **mesurer leur affinité pour chacune des deux isoformes par FRET**. **D'éventuels co-facteurs inconnus des LXRs seront recherchés par une technique de crible en double hybride**. Schématiquement, nous envisageons de transfecter à la fois : (1) un plasmide d'expression codant une protéine de fusion LXR $\beta$ -LBD/Gal4-DBD (« l'appât »), (2) un plasmide rapporteur sous le contrôle d'éléments de réponse à Gal4 et (3) un plasmide codant une protéine de fusion X-VP16 (« la proie »), où VP16 est une protéine virale activatrice de la transcription de manière forte et X un ADNc cloné au hasard. Si la protéine codée par l'ADNc X est capable d'interagir avec LXR $\beta$ , VP-16 est rapproché du promoteur du gène rapporteur et contacte le complexe de pré-initiation de la transcription. Cette technique engendre cependant des « faux positifs ». Chaque « proie » potentiellement identifiée devra être analysée par FRET.



Au total, il est clair que le myocyte murin utérin est actuellement le seul type cellulaire connu dans lequel il existe une spécificité d'action de LXR $\beta$ . **L'utilisation de cellules musculaires lisses utérine murines immortalisées sera donc à terme un modèle de choix dans l'étude des mécanismes moléculaires propres à LXR $\beta$ .**

### **C. La signalisation par LXR $\beta$ est-elle perturbée chez les femmes enceintes en surpoids ?**

L'obésité au cours de la grossesse est associée à de nombreux désordres, comme l'apparition d'un diabète gestationnel, des troubles d'ordre thromboemboliques, une pré-éclampsie voire une éclampsie (pour une revue, voir Andreasen, *et al.*, 2004). Même en absence de complications, les femmes obèses ou en surpoids ont plus souvent besoin d'injections d'ocytocine lors du travail pour induire des contractions. Par ailleurs, un fort indice de masse corporelle avant une grossesse ou l'augmentation de cet index au cours de la grossesse sont des facteurs de risque de naissance par césarienne (Doherty, *et al.*, 2006 ; Barau, *et al.*, 2006 ; Kabiru et Raynor, 2004). Les mécanismes moléculaires responsables de ces troubles sont cependant inconnus à ce jour. Les souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* sont un modèle de choix dans l'étude des mécanismes par lesquels un déséquilibre nutritionnel engendre des difficultés d'accouchement. **L'analyse des taux d'expression des gènes *lxr $\alpha$*  et *lxr $\beta$*  ainsi que leurs cibles *abca1* et *abcg1* sur des biopsies de muscle utérin réalisées lors de césariennes** renseignera sur leur implication dans les troubles observés. Au final, l'utilisation d'agonistes des LXRs permettant de contrôler le métabolisme lipidique utérin pour permettre des contractions suffisantes lors du travail est envisagée.

Au total, nos travaux apportent de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de pathologies de la reproduction chez les femmes. A long terme, l'utilisation de molécules modulant l'activité transcriptionnelle des LXRs pourrait être envisagée dans la prévention et/ou le traitement de ces troubles.



# *Annexes*



*Articles originaux*



**Article 1** : Multiple Roles of the Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptors to Maintain Male Fertility.

Article publié dans Mol endocrinol. 2007 May;21(5):1014-27.

David H. Volle, Kevin Mouzat, Rajesha Duggavathi, Bénazir Siddeek, Pierre Déchelotte, Benoît Sion, Georges Veysièrre, Mohamed Benahmed, and Jean-Marc A. Lobaccaro.



# Multiple Roles of the Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptor to Maintain Male Fertility

David H. Volle, Kévin Mouzat, Rajesha Duggavathi, Bénazir Siddeek, Pierre Déchelotte, Benoît Sion, Georges Veyssière, Mohamed Benahmed, and Jean-Marc A. Lobaccaro

*Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire (D.H.V., K.M., G.V., J.-M.A.L.) and Research Center for Human Nutrition, Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 6547, 63177 Aubière Cedex, France; Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (D.H.V., R.D.), CNRS/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)/ Université Louis Pasteur, 67400 Illkirch, France; Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand (P.D.), Service d'Anatomie Pathologique, Hôtel Dieu, 63058 Clermont-Ferrand, France; Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction (B.Sio.), Equipe d'Accueil 975 Université d'Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France; and INSERM Unité 407 (B.Sid., M.B.), Faculté de Médecine Lyon-Sud, 69921 Oullins Cedex, France*

Oxysterol nuclear receptors liver X receptor (LXR) $\alpha$  and LXR $\beta$  are known to regulate lipid homeostasis in cells exposed to high amounts of cholesterol and/or fatty acids. In order to elucidate the specific and redundant roles of the LXRs in the testis, we explored the reproductive phenotypes of mice deficient of LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , and both, of which only the *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice are infertile by 5 months of age. We demonstrate that LXR $\alpha$ -deficient mice had lower levels of testicular testosterone that correlated with a higher apoptotic rate of the germ cells. LXR $\beta$ -deficient mice showed increased lipid accumulation in the Sertoli cells and a lower proliferation rate of the germ cells. In *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice, fatty acid metabolism was affected through a decrease

of *sreb1c* and increase in *scd1* mRNA expression. The retinoid acid signaling pathway was also altered in *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice, with a higher accumulation of all-*trans* retinoid receptor  $\alpha$ , all-*trans* retinoid receptor  $\beta$ , and retinoic aldehyde dehydrogenase-2 mRNA. Combination of these alterations might explain the deleterious phenotype of infertility observed only in *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice, even though lipid homeostasis seemed to be first altered. Wild-type mice treated with a specific LXR agonist showed an increase of testosterone production involving both LXR isoforms. Altogether, these data identify new roles of each LXR, collaborating to maintain both integrity and functions of the testis. (*Molecular Endocrinology* 21: 1014–1027, 2007)

THE TWO MAJOR functions of the testis include testosterone production and spermatogenesis. Testosterone is essential for normal development of

the genital tract in males during fetal life and then for the establishment of puberty and maintenance of male sexual characteristics (1), as well as for spermatogenesis (2, 3). The spermatogenesis requires a continuous supply of differentiating spermatogonia involving a delicate balance between mitosis and meiosis (4). Both androgen synthesis and reproductive capacity are also tightly linked and regulated by various hormones including LH and FSH. These gonadotropins act, respectively, on the Leydig cells that secrete testosterone and the Sertoli cells that provide structural and nutritional support for the developing germ cells (4–6). Furthermore, the studies using antiandrogens have shown that androgens from the Leydig cells are involved in the regulation of germ cells apoptosis (7, 8).

The liver X receptors, LXR $\alpha$  (NR1H3) and LXR $\beta$  (NR1H2), belong to a subclass of nuclear receptors that form obligate heterodimers with retinoid X receptors (RXRs) and are activated upon binding, by their ligands, a class of naturally occurring oxysterols (9). In the absence of ligands, the RXR/LXR heterodimer constitutively binds to specific sequences on the promoters of the target genes and interacts with core-

## First Published Online March 6, 2007

Abbreviations: *abca1*, ATP-binding cassette, sub-family A member 1; AMH, anti-Müllerian hormone; AR, androgen receptor; bad, BCL2-antagonist of cell death; bax, Bcl2-associated X protein; CG, chorionic gonadotropin; *cyp11a1*, cytochrome 11A1 cholesterol side-chain cleavage; *cyp17*, cytochrome 17; *dmc1*, meiosis-specific recombinase-1; DR4, direct repeat 4; *fas*, fatty acid synthase; *3 $\beta$ hsdI*, type 1  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase; IKK, inhibitor of  $\kappa$ B kinase; LXR, liver X receptor; *lxr<sup>-/-</sup>*, *lxr*-deficient mouse; qPCR, quantitative PCR; RALDH-2, retinoic aldehyde dehydrogenase 2; RAR, all-*trans* retinoid receptor; RXR, 9-*cis* retinoid receptor; *scd*, encoding the stearoyl coA-desaturase; *scp3*, synaptonemal complex protein 3; *sreb1c*, sterol response element binding protein-1c; *StAR*, steroidogenic acute regulatory protein; T1317, LXR agonist T0901317; TUNEL, terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling.

**Molecular Endocrinology** is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.



pressors (10, 11). During the last few years, LXRs have been shown to act as major sensors of intracellular concentrations of sterols (12). The development of *lxr*-knockout (*lxr*<sup>-/-</sup>) mice has helped to elucidate the roles of LXRs in various tissues (13) that are far beyond the simple regulation of cholesterol and fatty acid homeostasis (14). Identified target genes indicate that LXRs, in addition to lipid homeostasis, are also involved in glucose homeostasis, immunity, skin development, and brain functions (15).

Even though lipid metabolism was severely affected in Sertoli cells of the LXR $\beta$ -deficient mice, they did not present any infertility. However, we and others have recently shown that mice deficient of both LXRs are completely infertile by around 5 months of age (16, 17), which suggests that both LXRs could have redundant functions in the testis, such that only the absence of both the isoforms causes infertility.

The aim of the present study was to further identify the physiological roles of both LXRs in testis using LXR-deficient mouse models. Here, we show specific cell-type expression patterns of *lxr $\alpha$*  and *lxr $\beta$*  and define complementary and/or redundant roles of both isoforms in testicular physiology. We also demonstrate that LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  are involved, respectively, in germ cell apoptosis and proliferation. Additionally, they regulate testosterone synthesis, retinoid metabolism, and lipid metabolism in response to a specific agonist *in vivo*. Combination of all these altered pathways in *lxr*<sup>-/-</sup> mice explains the infertility observed, even though the alteration in lipid metabolism seems to have a central role leading to the phenotype. Taken together, our results show novel roles for RXR/LXR $\alpha$  and RXR/LXR $\beta$  to maintain testicular integrity and reproductive functions in male.

## RESULTS

### Male Mice Deficient of Both LXR $\alpha$ and LXR $\beta$ Develop Infertility Associated with a Complete Loss of Germ Cells

To explore the mechanisms underpinning the infertility in *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice, male mice of various *lxr* genotypes ( $n = 4$ –5) were bred with three to four wild-type fertile females, and the presence of vaginal plugs was monitored daily. Consistent with previous reports (17, 18), no infertility was observed in *lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> males up to 14 months of age (Fig. 1, A–C). In contrast, infertility was observed in *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (16, 17) by the age of 5 months, clearly suggesting some complementary and/or redundant functions between the LXR isoforms. Up to 5 months of age, *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> males showed no alteration in their reproductive capacities compared with wild-type males (Fig. 1, A–C). When *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> males older than 5 months were used, there was a significant decrease in the number of vaginal plugs and only 55% of the females became pregnant (Fig. 1, A and B). The number of pups per litter dra-

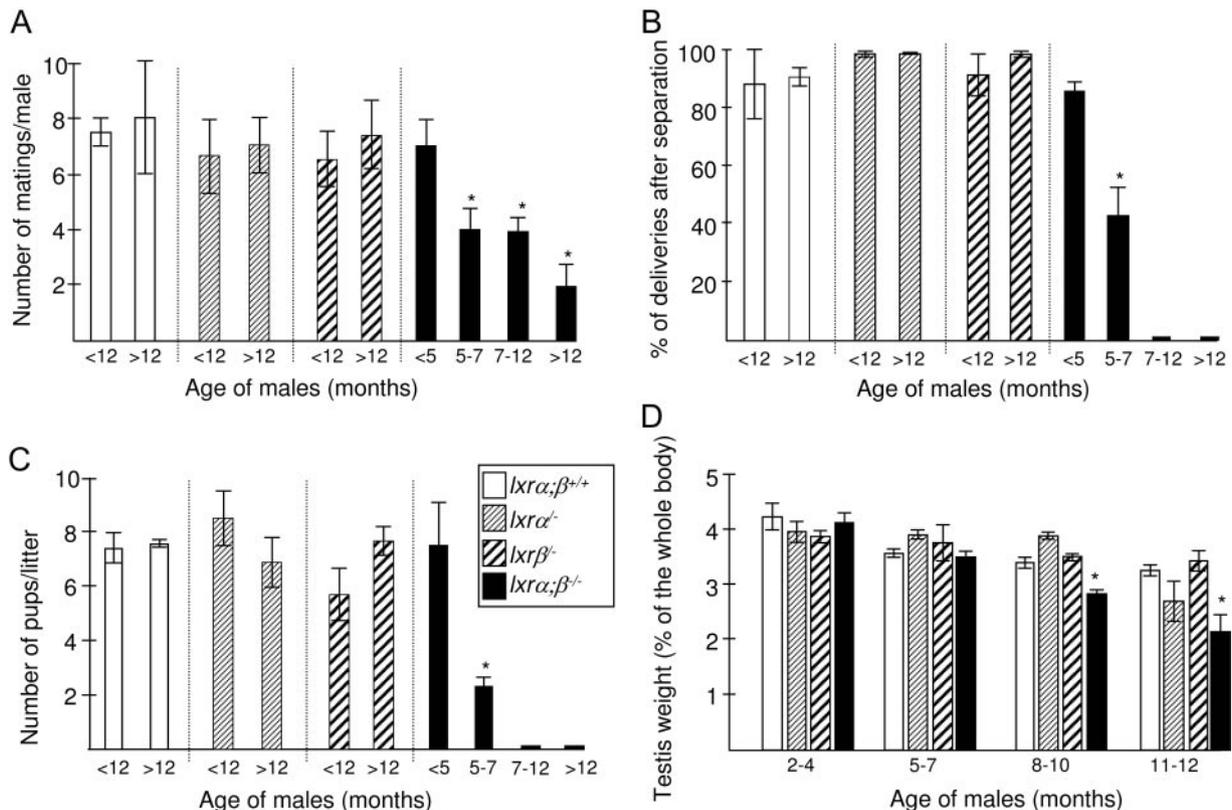
matically fell when 5- to 7-month-old *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> males were used. Finally, *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> males older than 7 months were unable to impregnate the females, demonstrating complete infertility (Fig. 1B). Altogether, these data suggested alterations in the male fertility starting around 5 months of age. In addition, a significant decline in the testis weight was observed at 9 to 10 months of age only in the *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> (Fig. 1D), when the testis showed, based upon histological examination, complete loss of germ cells.

A close observation of the testis histology showed that no major alterations were observed in the testes of *lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice up to 14 months of age, whereas *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> mice only presented some vacuoles in the Sertoli cells at up to 12 months of age (data not shown). Dramatic changes in histological characteristics could be observed with aging in *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (Fig. 2A, f–j) when compared with the wild-type controls (Fig. 2A, a–e). In *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice, histologically visible alterations appeared around 3.5 months of age, characterized by larger interstitial/Leydig cells and the presence of vacuoles in Sertoli cells (Fig. 2Ag). At 5.5 months, 20–30% of the *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> testis presented abnormal tubules (Fig. 2Ah) with cell aggregates in the center of the tubules without any spermatozoa. These aggregates seemed to be germ cells and not Sertoli cells, based on the absence of the androgen receptor immunostaining (Fig. 2B). With aging, the percentage of abnormal tubules increased and by 10 months most of the tubules were totally empty without any spermatozoa (Fig. 2Ai), by which time the mice were already completely infertile. It could be noticed that the numerous vacuoles were still present in the Sertoli cells. By 12 months, the testis morphology was completely disorganized, as shown by the presence of signs indicating that cholesterol crystals occurred (angular-shaped vacuoles), calcifications, as well as necrosis of both interstitial tissue and seminiferous tubules, and macrophage invasion (Fig. 2Aj). Oil red O staining showed that vacuoles in Sertoli cells of *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> and *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> correspond to lipids (data not shown). Biochemical analyses of the lipids showed that the accumulation was mainly due to cholesteryl esters (Fig. 2C). Consistent with a previous report (17), accumulation of cholesteryl esters was higher in *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> than in *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (data not shown).

### LXR $\alpha$ and LXR $\beta$ Are Differentially Expressed in Various Cell Types of the Testis

Altogether the previous data suggested that both LXRs isoforms are involved in the maintenance of testicular functions and morphological integrity. To identify the putative roles of LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ , we analyzed their respective expression patterns in different testicular cell types, which were selectively purified. The mRNA expression pattern of *lhcg* and *fshr*, encoding the LH-chorionic gonadotropin (CG) and FSH receptors, respectively, was used to ensure the purity of the cell populations obtained. As shown in Fig. 2D, *lxr $\alpha$*  is





**Fig. 1.** Fertility of *Lxr*<sup>-/-</sup> Mice

A, Number of matings per male. Pairing between wild-type females and males from various genotypes was monitored daily for the presence of a vaginal plug to determine whether mating occurred. B, Percentage of deliveries. After 19–20 d, efficacy of mating was visually inspected by the female delivery. C, Number of pups per litter. D, Testis weight of the wild-type and LXR knockout mice compared with the total body weight. Number of mice for each experiment,  $n = 4-5$ . All the histograms are indicated as mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA: \*,  $P < 0.05$ .

highly expressed in Leydig and germ cells (spermatocytes and spermatids). Conversely, *Lxrβ* is expressed in Sertoli cells and at a lower level in germ cells but not in interstitial cells. These results suggested that LXR isoforms might have some specific functions in Sertoli and Leydig cells and redundant functions in germ cells as suggested by the coexpression in germ cells. This hypothesis was consistent with the fact that germ cell loss was only found in *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> males.

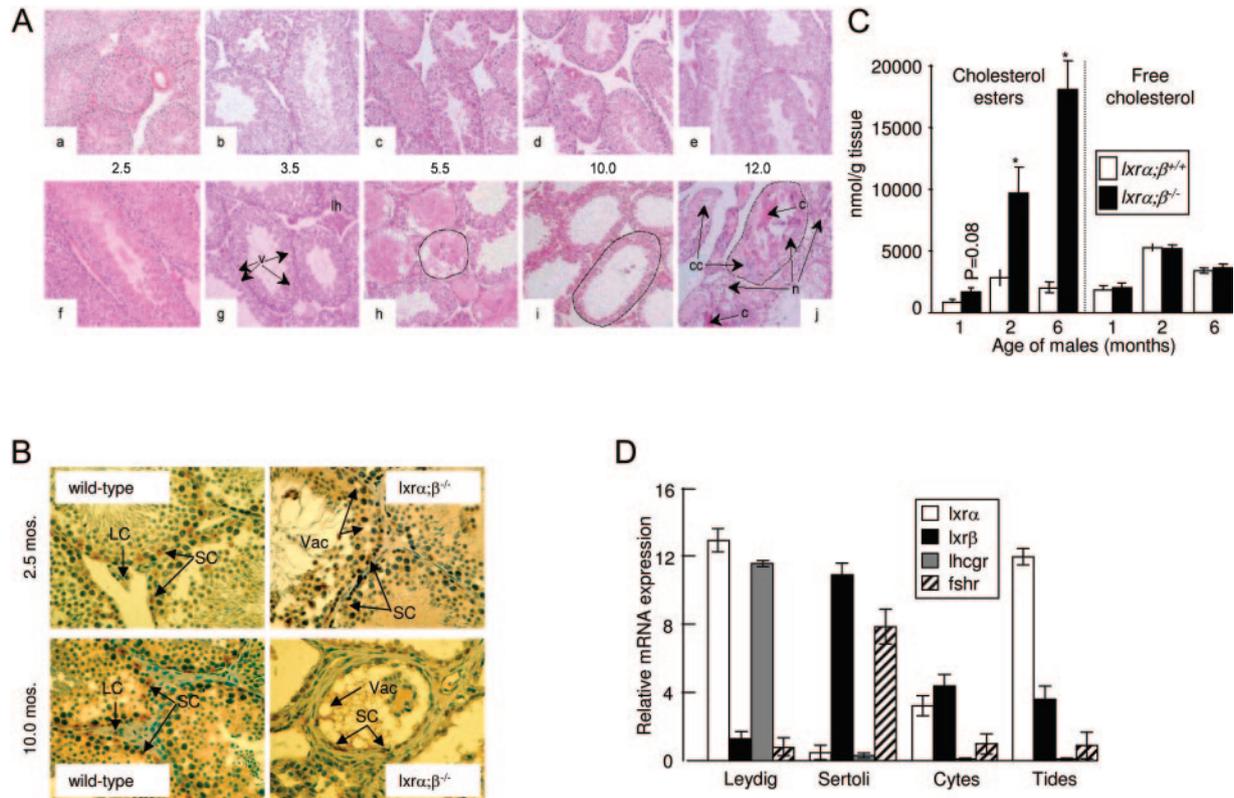
#### LXR $\alpha$ and LXR $\beta$ Are Involved in Apoptosis and Proliferation, Respectively, in Mouse Testis

Many studies have demonstrated that testis integrity and spermatogenesis are controlled by a balance between proliferation and apoptosis (19). The mRNA of *cyclinA1*, one of the most important cyclins in postmitotic germ cells (20), was less accumulated in *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> than in wild-type testis at 2.5 months ( $P < 0.07$ ), whereas no significant change was observed for *cyclinE*, *cmyc*, and *cmyb* (Fig. 3A). The mRNA expression of *cyclinA1* was further decreased at 4.5 months (Fig. 3A). Quantification of proliferation using Ki67 immunocytochemistry (Fig. 3B) showed that the number of proliferating cells was significantly lower

in *Lxrβ*<sup>-/-</sup> and *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice compared with the wild-type (decreased by 27% and 43%, respectively;  $P < 0.05$ ), whereas the *Lxrα*<sup>-/-</sup> mice showed a tendency to have 21% more Ki67-positive cells ( $P = 0.07$ ). Consistent with this fact, mRNA accumulation of *cyclinA1* was significantly lower in *Lxrβ*<sup>-/-</sup> and *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3C), suggesting that LXR $\beta$  is involved in germ cell proliferation.

With respect to the apoptotic pathway, significantly higher mRNA expression of several genes including TNF $\alpha$ , the essential regulatory subunit NF- $\kappa$ B essential modulator/inhibitor of  $\kappa$ B kinase (IKK) $\gamma$  of the IKK complex (21), and *Bad* (Bcl2-antagonist of cell death) and lower mRNA accumulation of androgen receptor (*AR*) were observed in *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> compared with the wild-type mice (Fig. 3D). Interestingly, all these alterations in mRNA expression were amplified by 4.5 months of age in *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, the mRNA expression of the proapoptotic gene *Bax* (Bcl2-associated X protein) was higher and that of the antiapoptotic gene *Bcl2* (B-cell CLL/lymphoma 2) was decreased in *Lxrα;β*<sup>-/-</sup> compared with the wild type. These results were confirmed at the protein level by Western blot analysis (Fig. 3F). Study of apoptosis





**Fig. 2.** Pathology of the Testes at Various Ages and Expression of the LXRs in the Testis  
 A, Hematoxylin-Eosin-Safran staining from wild-type (a–e) and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> (f–j) mice at 2.5, 3.5, 5.5, 10, and 12 months of age. Original magnification, ×100. Arrows indicate the vacuoles (v) within the Sertoli cells. lh, Leydig hyperplasia; cc, crystal of cholesterol; c, calcification; n, necrosis. Some tubules are surrounded by a black dashed line. B, Immunostaining of the AR in testis of wild-type and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice at 10 months of age. Counterstaining was done with hematoxylin. LC, Leydig cells; SC, Sertoli cells; Vac, vacuole. C, Biochemical analyses of the cholesterol content (mean ± SEM, n = 5–6) of wild-type and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice at 1, 2, and 6 months. One-way ANOVA: \*, *P* < 0.05 compared with the wild-type mice. D, Relative levels of *lxrα* and *lxrβ* in Leydig, Sertoli cells, spermatocytes (cytes), and spermatids (tides). Histograms are expressed as mean ± SEM (n = 5–6). 18S was used as internal control.

using terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay revealed that *lxrα*<sup>-/-</sup> and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice had significantly higher number of apoptotic cells compared with wild-type mice, whereas a slightly but not significantly decreased number of apoptotic cells (*P* = 0.09) was observed in *lxrβ*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3B). Consistent with these data, mRNA expression analyses showed a higher accumulation of the proapoptotic gene *Bax* as well as *TNFα* and a lower expression of the AR in 3.5-month-old *lxrα*<sup>-/-</sup> and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3, D and E). However, no alteration in the AR protein level was observed in these mice (data not shown). It appears thus that LXRα might be involved in the regulation of the apoptosis in the testis.

It is interesting to note that in the *lxrβ*<sup>-/-</sup> mice the lower proliferation rate is counterparted by a tendency to a lower apoptosis (Fig. 3B). In contrast, in *lxrα*<sup>-/-</sup> mice the higher apoptosis rate observed was associated with a tendency of a higher proliferation rate. The respective proliferation vs. apoptosis ratio is not statistically different in *lxrβ*<sup>-/-</sup> (11.6 ± 1.3) and *lxrα*<sup>-/-</sup>

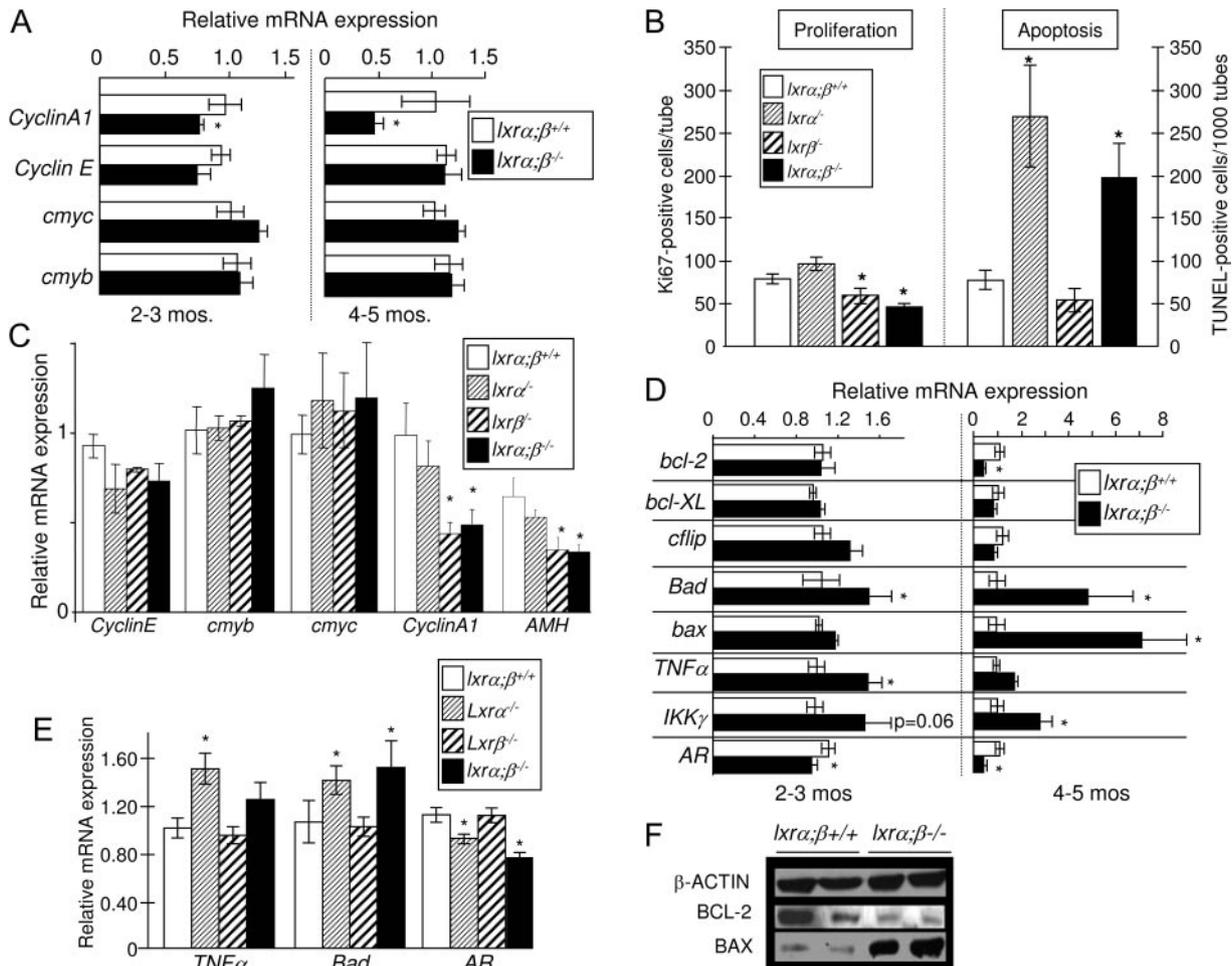
(6.3 ± 0.7) compared with wild-type mice (9.2 ± 1.4). In contrast, this proliferation/apoptosis ratio is statistically different in *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice (2.2 ± 0.4, *P* < 0.05 compared with the wild-type mice).

The treatment of mice with a LXR synthetic agonist, T0901317 (T1317), for 12 h did not alter the mRNA expression of the genes involved in proliferation or apoptosis, suggesting that these genes may not be the direct LXR targets (data not shown). Supporting this, the analysis of the 5' flanking region of these different genes with GEMSLauncher (Genomatix Software, München, Germany) did not identify any direct repeat 4 (DR4) classical LXR-response element.

**Testicular Testosterone Level Is Altered in Mice Lacking LXRα**

Because androgens have clearly been associated to the regulation of germ-cell apoptosis in testis, we checked whether the increased apoptosis observed in mice lacking LXRα could be linked to an altered level of androgens. Testosterone production was signifi-





**Fig. 3.** Proliferation and Apoptosis Status in Testes of Wild-Type and *Lxr*<sup>-/-</sup> Mice

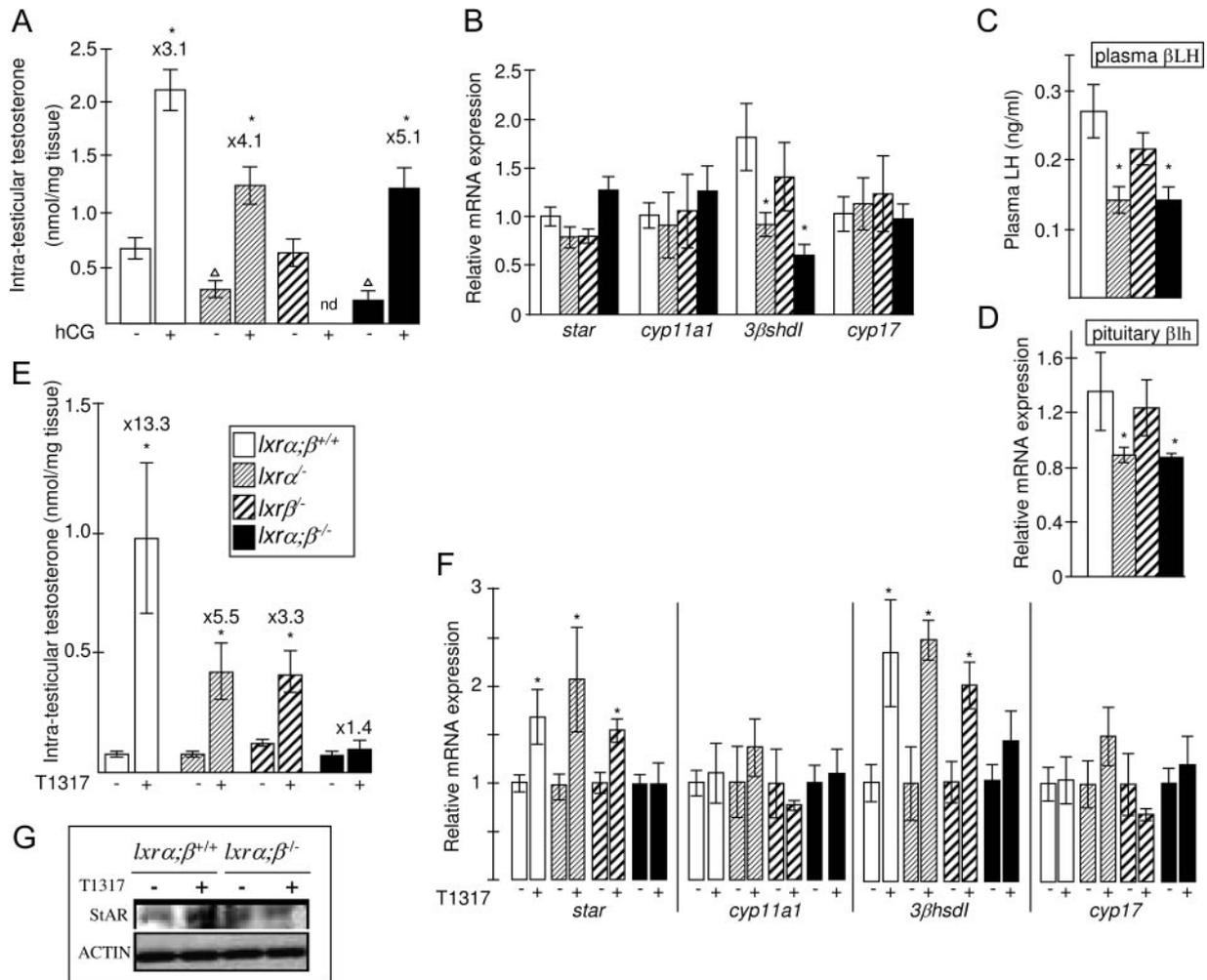
A, Relative levels of mRNA of genes encoding proteins involved in cellular proliferation (mean  $\pm$  SEM). Number of mice per experiment,  $n = 3$ –5. B, Quantification of proliferation and apoptosis in wild-type and knockout mice. Ki67 staining and TUNEL were done as described in *Materials and Methods*. Mice were 3.5 months old.  $n = 4$ –6 per group. One-way ANOVA: \*,  $P < 0.05$ . C, Proliferation status in wild-type and the various *Lxr* knockout testes. Cyclins A1 and E, *cmyc*, *cmyb*, and *AMH* were studied by qPCR as described. Mice ( $n = 3$ –6) were 3.5 months old. One-way ANOVA: \*,  $P < 0.05$ . 18S was used as an internal control. D, Apoptosis status in wild-type and knockout testes. *Bcl-2*, *bcl-XL*, *cflip*, *Bad*, *bax*, *TNF $\alpha$* , *IKK $\gamma$* , and *AR* were studied by qPCR as described. Mice ( $n = 3$ –6) were 3.5 months old. One-way ANOVA: \*,  $P < 0.05$ . 18S was used as an internal control. E, mRNA analysis of *TNF $\alpha$* , *Bad*, and *AR* in wild-type and the various *Lxr* knockout testes. Mice ( $n = 3$ –6) were 3.5 months old. One-way ANOVA: \*,  $P < 0.05$ . 18S was used as an internal control. F, Significant Western blot of *Bcl-2* and *BAX* proteins from two wild-type (4.5 months) and two *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> (4.5 months) mice.

cantly lower in *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> compared with their respective wild-type controls, whereas testosterone levels did not differ between the *Lxr $\beta$* <sup>-/-</sup> and the wild-type mice (Fig. 4A). Gene expression analysis showed that the level of type 1 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase (*3 $\beta$ hsdI*) was significantly decreased in *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (Fig. 4B), whereas the levels of steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) and the cytochromes 11a1 (*cyp11a1*) and 17 (*cyp17*) transcripts remained unchanged. It is interesting to note that androgen-target organs such as seminal vesicles and vas deferens did not show any significant change in weight (data not shown), suggesting that the existing testosterone levels in *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup>

and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice were enough for the maintenance of the secondary male sexual characteristics.

To study whether these low levels of testosterone production in mice lacking LXR $\alpha$  could be due to a central defect, plasma LH concentration was measured. A significantly lower concentration of LH was found in both *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice compared with their controls ( $P < 0.05$ ; Fig. 4C). These data were confirmed by a lower mRNA expression of the specific  $\beta$ -chain of LH in pituitary of *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice (Fig. 4D). Additionally, the *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup> mice were able to respond to human CG (hCG) challenge by increased production of testosterone similar to their wild-type controls. These data suggest that the lack of





**Fig. 4.** Endocrine Parameters of the *lxr*<sup>-/-</sup> Mice

A, Intratesticular levels of testosterone (mean ± SEM, nmol/mg tissue) in 2.5-month-old wild-type, *lxrα*<sup>-/-</sup>, *lxrβ*<sup>-/-</sup> and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice, stimulated or not with 5 IU hCG. The fold inductions were obtained from the unstimulated animals of the same genotype. Number of mice per experiment, n = 9–19. nd, Not determined. B, Basal relative expression of genes encoding steroidogenic enzymes. Number of mice per group, n = 3–6. C, Plasma LH levels (ng/ml) obtained from 3-month-old mice of the four genotypes. D, Relative expression of *βlh* in the pituitary (n = 6). E, Effect of T1317 on testosterone production by testes in 2.5-month-old wild-type, *lxrα*<sup>-/-</sup>, *lxrβ*<sup>-/-</sup>, and *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice. Number of mice per experiment, n = 10. F, Relative levels of steroidogenic genes in testes from various genotypes gavaged vehicle or T1317 as measured by qPCR. Number of mice per experiment, n = 4–6. In all experiments, one-way ANOVA: \*, P < 0.05. For the expression analysis, 18S was used as an internal control. Histograms are indicated as mean ± SEM. G, Significant Western blot of StAR and β-actin from two wild-type and two *lxrα;β*<sup>-/-</sup> (4.5 months old) mice.

LXRα results in decreased testosterone concentrations due to central defects, whereas the sensitivity of Leydig cells to LH remains unaffected (Fig. 4A). In contrast, plasma concentrations and mRNA expression level for the FSH (data not shown) were not affected by the loss of LXRα.

**LXR Agonist Increases Testosterone Secretion**

To avoid the basal differences in testosterone concentrations among the different genotypes used in the experiment, mice from the four genotypes were treated with dexamethasone for 5 d as previously de-

scribed (22). On the fifth day, the mice were gavaged with the synthetic LXR agonist T1317 or vehicle and killed 12 h later. T1317 induced a large increase in the intratesticular testosterone concentration of the wild-type mice (13.3-fold compared with the vehicle-gavaged mice); however, this response to T1317 was significantly lower in *lxrα*<sup>-/-</sup> (5.5-fold) and *lxrβ*<sup>-/-</sup> (3.3-fold) mice (Fig. 4E). The increase in testosterone concentration was correlated with a higher mRNA expression of *StAR* and *3βshdl* (Fig. 4F) in wild-type, *lxrα*<sup>-/-</sup>, and *lxrβ*<sup>-/-</sup> mice treated with T1317, whereas no variations were observed in the *lxrα;β*<sup>-/-</sup> mice treated with T1317. Nonetheless, *cyp11a1* and *cyp17*

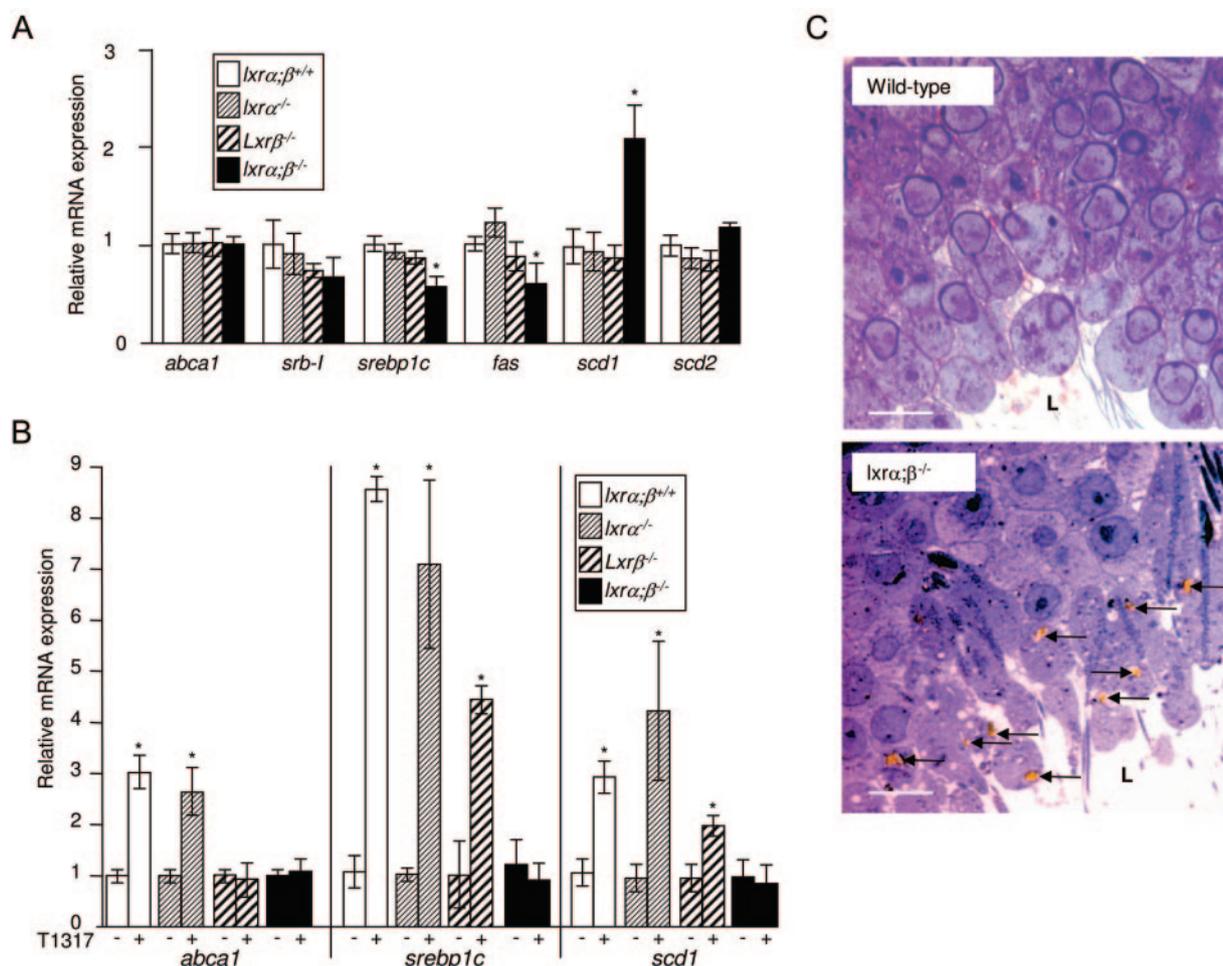


were unchanged after the T1317 treatment. This effect of T1317 on *StAR* accumulation was confirmed at the protein level by Western blot analysis (Fig. 4G).

#### Lack of LXRs Altered Expression of the Genes Involved in Fatty Acid Metabolism

Because fatty acid metabolism is important for reproductive functions (23), we analyzed the expression pattern of the genes involved in this pathway. mRNA levels of *srebp1c* (sterol response element binding protein-1c) and fatty acid synthase (*fas*), encoding the sterol response element binding protein-1c and the fatty acid synthase, respectively, were decreased by 40% in the *lxa;β<sup>-/-</sup>* mice compared to the wild-type mice (Fig. 5A;  $P < 0.05$ ). In contrast, the level of *scd1*, encoding the stearoyl coA-desaturase 1, was increased by 2-fold in the *lxa;β<sup>-/-</sup>* mice compared with the wild type (Fig. 5A;  $P < 0.05$ ). No change in the

mRNA expression was observed for scavenger receptor, class B type I, encoding the scavenger receptor B1, *abca1* (ATP-binding cassette, sub-family A member 1), and *scd2*. Treatment with T1317 induced the expression of *srebp1c* and *scd1* in the wild-type mice (Fig. 5B), whereas no variation in the expression of *fas* was observed (data not shown). Hence, whereas *srebp1c* and *scd1* appear to be regulated by both LXRs, *abca1* appeared to be mainly under the control of LXRβ because no up-regulation with T1317 was observed in mice lacking this isoform (Fig. 5B). This is consistent with the specific expression of LXRβ in the Sertoli cells (Fig. 2C) paralleled with the lipid vacuoles observed in *lxa;β<sup>-/-</sup>* and *lxa;β<sup>-/-</sup>* mice (data not shown). As both isoforms are expressed in the germ cells, it is possible that they also present similar lipid accumulation. To check this possibility, semi-thin sections of the testes were stained with azure 2 blue, by which lipids are stained yellow. Indeed, a lipid accu-



**Fig. 5.** Analysis of the Lipid Metabolism in Testes of Wild-Type and LXR-Deficient Mice

A, Relative basal levels of mRNA of *abca1*, *srb-1*, *srebp1c*, *fas*, *scd1*, and *scd2* in the testes from the various genotypes. Mice were 3.5 months old. B, Relative levels of *abca1*, *srebp1c*, and *scd1* in testes from wild-type and *lxa;β<sup>-/-</sup>* mice gavaged vehicle or T1317 as measured by qPCR. Number of mice per experiment,  $n = 5-6$ . C, Azure blue 2 staining of testis semi-thin sections. LXR-deficient mice present an abnormal accumulation of lipids (stained in yellow) in spermatids as indicated by arrows. Bar, 5  $\mu$ m. L, Lumen of the tubule.



mulation was observed in the germ cells of *lxa;β*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5C). All these results suggested that, as already described in other tissues, LXRs might be involved in the regulation of lipid homeostasis in testis.

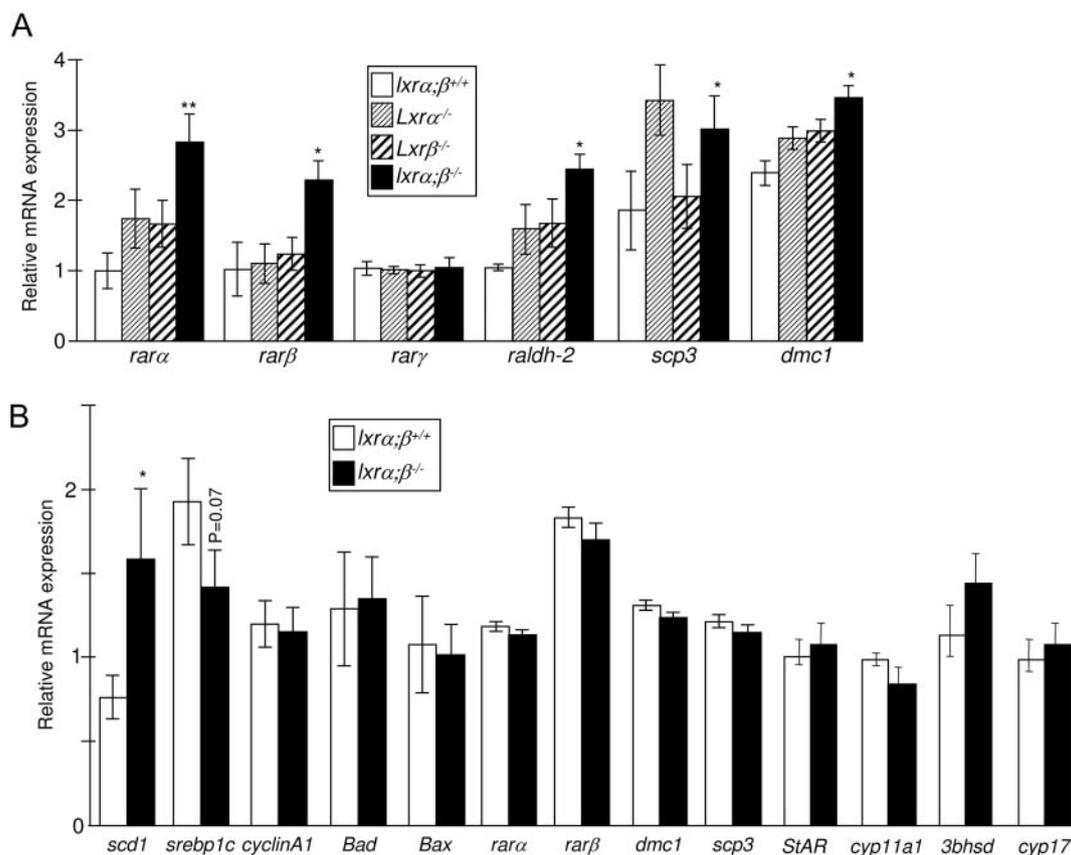
**The Genes Involved in Retinoic Pathways Are Up-Regulated in LXR-Deficient Mice**

The retinoid pathway has an important role in reproduction (24, 25). The mRNA expression of the all-*trans* retinoid receptor (RAR)<sub>α</sub> and RAR<sub>β</sub> was significantly higher in *lxa;β*<sup>-/-</sup> mice (2.6- and 2.3-fold, respectively; Fig. 6A), whereas no change was observed for RAR<sub>γ</sub>. These results suggested that the lack of LXRs modified the RAR-signaling pathway. To confirm this hypothesis, we next analyzed the expression of known RAR-target genes. The expression of *dmc1* (meiosis-specific recombinase-1), *scp3* (synaptonemal complex protein 3), and *raldh-2* (retinoic aldehyde dehydrogenase 2), encoding the meiosis-specific recombinase, the synaptonemal complex protein 3, and the retinoic aldehyde dehydrogenase 2, respec-

tively, was higher in *lxa;β*<sup>-/-</sup> mice compared with wild-type mice. Because T1317 did not change the expression of these genes 12 h after treatment and no classical DR4 LXR response elements were found on their promoters, we concluded that they were not *bona fide* LXR target genes.

**Modifications in Lipid Metabolism Could Be the *Primum Movens* of the Infertility in *lxa;β*<sup>-/-</sup> Males**

We checked which alteration could be responsible for the severe infertility observed in the *lxa;β*<sup>-/-</sup> males. In 1-month-old mice, the expression of the genes involved in apoptosis (*Bad*, *Bax*), proliferation (*CyclinA1*), the retinoic acid signaling pathway (*rara*, *rarβ*, *dmc1*, *scp3*), or steroidogenesis (*StAR*, *cyp11a1*, *3βhsd*, *cyp17*) (Fig. 6B) did not differ between the *lxa;β*<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Conversely, the expression of *scd1* and *srebpc* were basally modified in *lxa;β*<sup>-/-</sup> compared with the wild-type mice (Fig. 6B). This was paralleled with a higher accumulation of cholesteryl



**Fig. 6.** Analysis of the Retinoic Acid Signaling Pathway in Testes of Wild-Type and *lxa;β*<sup>-/-</sup> Mice  
 A, Relative basal levels of mRNA of *rara*, *rarβ*, *rarγ*, *raldh-2*, *scp3*, and *dmc1* in the testes from the various genotypes. Mice were 3.5 months old. In all experiments, histograms are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA: \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01. For the expression analysis, 18S was used as an internal control. B, Relative basal levels of mRNA of *scd1*, *srebpc*, *cyclinA1*, *bad*, *bax*, *rara*, *rarβ*, *dmc1*, *scp3*, *StAR*, *cyp11a1*, *3βhsd*, and *cyp17* in the testes from the various genotypes. Mice were 1.0 months old (n = 3 for each group). In all experiments, histograms are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA: \*, *P* < 0.05. For the expression analysis, 18S was used as an internal control.



esters in the testis of the same animals ( $P = 0.08$ ) (Fig. 2C). It could thus be suggested that the alteration in lipid homeostasis is the first event in this long process of testis disorganization in the *Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice.

## DISCUSSION

In this work, we provide evidence for the critical roles played by both LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  in the regulation of male reproductive functions. Using quantitative PCR (qPCR) on extracts enriched with different cell types of the testis, we showed that these nuclear receptors present a mirror-like profile of expression: the Leydig cells express LXR $\alpha$  and Sertoli cells LXR $\beta$ , whereas the germ cells express both LXRs. Consistent with these differential expression patterns, we demonstrate a clear involvement of each LXR within the testis. LXR $\alpha$  controls basal testosterone synthesis and is involved in the control of the germ cells apoptosis. LXR $\beta$  controls lipid metabolism of Sertoli cells by regulating cholesterol export and also germ-cell proliferation. Moreover, both LXRs together regulate ligand-induced steroidogenesis, fatty acid metabolism, and more surprisingly the retinoic acid signaling pathway in the testis. Our data show that the lack of LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  results in severe infertility due to the combined effect of the alterations in various pathways, of which the alteration of lipid metabolism appears to have a central effect in leading to this phenotype.

We recently demonstrated that LXR $\alpha$  regulates adrenal steroidogenesis (26). However, in contrast to adrenals, the lack of LXR $\alpha$  resulted in a lower secretion of testicular steroids. The lower testosterone levels observed in the *Lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice is probably due to the lower LH secretion, as these mice have reduced serum levels of LH and are still able to respond to hCG stimulation. It is well known that glucocorticoids inhibit the production of testosterone directly at the testicular level (27, 28) as well as through the inhibition of the LH secretion (29). Hence, the lower serum concentrations of testosterone and LH in *Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice could be secondary to the high level of corticosterone observed in mice lacking LXR $\alpha$  (26). Treatment with the LXR synthetic agonist induced an increase in the testicular testosterone production. Because no modification of the *lh- $\beta$*  mRNA levels was observed in the pituitary of the wild-type animals after the T1317 treatment (data not shown), it could be hypothesized that LXR $\alpha$  was the main isoform regulating the testicular steroidogenesis because of its expression in the Leydig cells. However, the slight inductions observed in the single knockout mice led us to postulate that LXR $\beta$  might also control steroidogenesis, probably through the expression of paracrine factors produced by Sertoli cells. Identification of these cellular interactions is currently under investigation.

Consistent with the expression of LXR $\beta$  in Sertoli cells, we demonstrate that *abca1* expression is spe-

cifically controlled by LXR $\beta$  in response to a T1317 treatment, without any alteration of its basal expression. These results suggest that it might be the lack of *abca1* up-regulation in response to endogenous LXR ligand rather than a decrease of its expression that is responsible for the lipid accumulations observed in the Sertoli cells, as demonstrated in different LXR knock-out models (17, 18, 30). The major impact of LXR $\beta$  in the Sertoli cells was also enlightened by the decrease of the basal anti-Müllerian hormone (AMH) mRNA in both *Lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* and *Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice (Fig. 3C).

Spermatogenesis is maintained by a delicate balance between cell proliferation, cell differentiation, and cell death (19, 31). It has been hypothesized that alteration of these processes would result in spermatogenic impairment, and thus infertility. Interestingly, proliferation and apoptosis are altered in LXR $\beta$ - and LXR $\alpha$ -deficient mice, respectively, whereas these mice did not show any fertility troubles. Indeed, in the *Lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice the lower proliferation rate was associated with a compensatory decline in apoptosis (Fig. 3B). In contrast, in *Lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice the higher apoptosis was associated with a compensatory increase in proliferation. These compensatory effects could thus be hypothesized to explain the normal fertility in the single LXR knockout mice. Interestingly, these adaptive processes have been suggested to be important during aging or infertility in humans (31). It is interesting to note that, in *Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice, the combined effect of lack of both LXRs led to a dramatic decline in proliferation and increase in apoptosis. This could be one of the explanations for the complete loss of germ cells, thus leading to the infertility. Whether LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  could have some transcriptional effect, respectively, on several pro- and antiapoptotic and proliferation gene expressions is under investigation even though no classical DR4 LXR response elements were identified in the regulating sequences of these genes using a promoter analysis software.

Expression of both LXRs in the germ cells, even at different levels, is of interest. Indeed, this result could be consistent with the fact that only *Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice show the loss of germ cells with aging. Besides, both LXRs showed redundancy in the control of retinoid pathway. Retinoic acids have been shown for many years to be important actors of testicular functions. Indeed, excess vitamin A leads to testicular lesions and spermatogenic disorders, whereas a vitamin A deficiency induces early cessation of spermatogenesis and adversely affects testosterone production (25). Our data show that the lack of LXR leads to an increase of RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , and RALDH-2 expressions, which should result in a more important retinoic acid signaling, as shown by the expression pattern of the known RAR-target genes, e.g. *dmc1* and *scp3*, and could lead to spermatogenic disorders. Interestingly, lipid accumulation was already observed in Sertoli cells of rat with a hypervitaminosis A (32), suggesting some links between retinoids and lipids. How lack of



LXRs could act on the retinoic acid signaling pathway remains to be understood.

We also demonstrate that both LXR isoforms show a redundancy in the control of lipid homeostasis. Indeed, *scd1* and *srebp1c* were found to be regulated by both LXR isoforms in the testis *in vivo*. Noteworthy, fatty acid metabolism is essential for male reproduction and notably in spermatozoa structure (23). Indeed, testes have an active lipid metabolism that produces a rearrangement of fatty acid during spermatogenesis, and it has been suggested that troubles in fatty acid metabolism could lead to a defect of germ-cell differentiation and/or maturation (23) or a spermatozoa defect as we previously reported (16).

In conclusion, we provide important evidence for specific and common roles of LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  in the testis (Fig. 7). Both the isoforms are together involved in the regulation of testosterone production at both testicular and pituitary levels, whereas the germ cell apoptosis and proliferation are individually regulated by LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ , respectively. In addition, LXRs regulate lipid and retinoic acid metabolism through the transcriptional activation of enzymes and membrane transporters. More experiments will be necessary to elucidate the exact sequence of events and the relative importance and combination of the various physiological roles of LXRs in the testis, which will probably require the use of cell-specific knockout strategy.

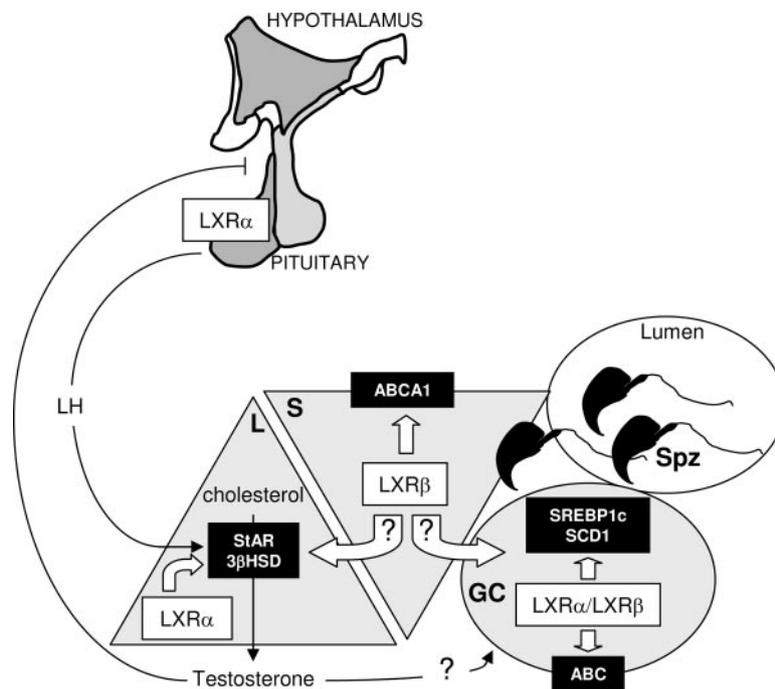
## MATERIALS AND METHODS

### Animals

*Lxr*-knockout mice (*lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup>, *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup>, and *lxr $\alpha$ ; $\beta$* <sup>-/-</sup>) (30, 33) were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) 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 gavaged with 50 mg/kg T1317 (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau, France) or vehicle (methyl-cellulose) as described (30) were previously treated with dexamethasone (Sigma-Aldrich) for 5 d (75  $\mu$ g twice a day, sc) to drop off the levels of testosterone production (22). Indeed dexamethasone treatment selectively inhibits serum  $\alpha$ LH and  $\beta$ LH mRNA responses to GnRH, but not the serum FSH or  $\beta$ FSH mRNA responses (34). Some mice were injected with 5 IU hCG. Twelve hours later mice were killed by decapitation less than 1.5 h after the beginning of the light cycle and exsanguinated before organ harvest. To reduce the effect of the stress, the time between the capture of a mouse and its death was less than 1 min. All aspects of animal care were approved by the Regional Ethics Committee (authorization CE2-04).

### Pathology Analyses

Testes from 2- to 12-month-old mice (n = 3 animals per group) were collected, fixed, and embedded in paraffin, and 4- to 6- $\mu$ m-thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin/safran. Lipid staining was performed on cryosections from 2- and 6-month-old males with 1,2 propanediol for 1 min and in Oil red O (Sigma-Aldrich) at 60 C for 7 min. Nuclei and cytoplasm were stained in Harris' hema-



**Fig. 7.** Model for the Physiological Roles of the LXRs in the Testis

Testosterone production is regulated by LXR $\alpha$  at the testicular levels as well as at the pituitary by the control of LH secretion. LXR $\beta$  expressed in the Sertoli cells regulates the lipid homeostasis by the induction of ABCA1 and might also control steroidogenesis through the induction of paracrine factors. In germ cells, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  are involved in the processes of apoptosis and proliferation together with the regulation of the lipid homeostasis.



toxylin solution (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. For semi-thin sections, chemicals were from Sigma-Aldrich and Agar Scientific (Saclay, France). Testes were fixed and post-fixed as previously described (35). After dehydration, organs were embedded in propylene oxide and epon epikote resin (vol/vol) overnight and in epon twice for 3 h. Resin polymerization was conducted at 60 C for 72 h. Semi-thin sections (0.8  $\mu\text{m}$ ) were cut with a diamond knife (Leica Ultracut S, Rueil-Malmaison, France), and stained with Azure 2 dye, which identifies lipids in yellow.

### Immunocytochemistry of the AR

Paraffin sections of Bouin-fixed testis were sectioned at 5  $\mu\text{m}$ . The sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus; Menzel-Glaser, Frelburg, Germany), deparaffinized, rehydrated, treated 20 min at 93–98 C in citric buffer (0.01 M, pH 6), rinsed in osmosed water ( $2 \times 5$  min), and washed ( $2 \times 5$  min) in Tris-buffered saline. Immunohistochemistry was conducted according to the manufacturer's recommendations as described earlier (36). Slides were then counterstained with hematoxylin.

### Lipid Measurements

Lipids were extracted as described previously (37). 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 developed with hexane, diethylether, and glacial acetic acid (80:20:2, vol/vol) and analyzed by densitometry (Sigma Scan Pro; Sigma-Aldrich) using standards as previously described (26).

### Cell Purification

Sertoli and Leydig cells were isolated from 21-d-old mice as described (38). Briefly, decapsulated testes were submitted to collagenase-dispase dissociation (0.5 mg/ml, 20 min at 34 C) in DMEM/F12 medium containing desoxyribonuclease I (0.05 mg/ml) and to gravity sedimentation (5 min). Supernatants containing Leydig cells were centrifuged ( $200 \times g$ , 10 min) and washed in PBS. Pellets containing the sedimented tubules were washed three times and the cells were dissociated with a collagenase-dispase treatment, as described above, until small clumps resulted. Sertoli cell pellets were then submitted to centrifugation ( $200 \times g$ , 10 min). Spermatogenic cells were isolated from 12-wk-old mice testes by trypsinization. The resulting crude germ cell population (containing germ cells from all developmental steps) was submitted to a centrifugal elutriation using a rotor Beckman (Fullerton, CA) JE-6, as described previously (38, 39). Two fractions enriched at 80–85% with pachytene spermatocytes and early spermatids were harvested. After collection, the different cell populations were processed for RNA and protein extraction.

### Western Blot Analysis

Protein extracts (30  $\mu\text{g}$ ) from whole testis were subjected to SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Membranes were incubated overnight at 4 C with primary polyclonal antibodies raised against Bax (1:1000; from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Bcl2 (1:1000; from Santa Cruz Biotechnology), or  $\beta$ -actin (1:2000; from Santa Cruz Biotechnology) followed by a 1-h incubation with a peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse IgG (1:10000; from Sigma).

Peroxidase activity was detected using the Western Light System (PerkinElmer Life Sciences, Courtaboeuf, France).

### TUNEL Analysis

Five-micrometer-thick paraffin-embedded sections were deparaffined with toluol followed by rehydration. 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/ $\mu\text{l}$  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. For the negative control, the enzyme was omitted from the system. Extravidin alkaline phosphatase conjugate (dilution 1:100; Sigma-Aldrich) was added onto the slides for 25 min. Sigmafast FastRed TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich) was used as the substrate according to the manufacturer's instructions. Counterstain was performed with Mayer's hematoxylin solution (Sigma-Aldrich) for 30 sec. In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted. Results are expressed as the number of TUNEL-positive cells per 1000 seminiferous tubules.

### Ki67 Staining

Ten-micrometer cryosections of testis were fixed 10 min in 4% paraformaldehyde and washed three times for 10 min in  $1 \times$  PBS. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and 0.1% citrate solution in PBS for 2 min at 4 C. 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  $1 \times$  PBS. Slides were incubated for 1 h at room temperature with a goat antirabbit secondary antibody labeled with Alexa 488 (1/250; from Invitrogen Detection Technologies, Cergy-Pontoise, France). In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted. Results are expressed as the number of Ki67-positive cells per 100 seminiferous tubules.

### Endocrine Investigations

Testosterone concentration was measured on 200  $\mu\text{l}$  of heparin-treated plasma or from frozen testis extracted with 10 vol of ethylacetate-isooctane (30:70, vol:vol). A commercial kit (ICN, Orsay, France) was used for the assays. LH values were determined on 200  $\mu\text{l}$  of EDTA-treated plasma by the Core Services of the University of Virginia Center for Research and Reproduction.

### qPCR

Testis and pituitary RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript II First-Strand Synthesis System (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) and random hexamer primers. The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the Roche Lightcycler system. Primer sequences and typical cycle threshold values (observed in untreated wild-type mice) are reported in Table 1.

### Statistical Analysis

For statistical analysis, one-way ANOVA was performed to determine whether there were differences between the various groups. A *P* value of 0.05 was considered significant.



**Table 1.** qPCR Primer Sequences and Typical Cycle Threshold (Ct) Values Observed in Untreated Wild-Type Mice

Gene	Accession No.		Sequence	Temp.	Amplicon Size (bp)	Ct
18S	AY2487	fw	GGGAGCCTGAGAAACGGC	55	68	16
		rev	GGGTCGGGAGTGGTAATTTT			
$\beta$ lh	Y10418	fw	AGAGAATGAGTTCTGCCAG	55	200	16
		rev	CTACAGGAAAGGAGACTATGG			
$lxr\alpha$	AY195871	fw	TGCCATCAGCATCTCTCTG	55	160	28
		rev	GGCTCACCAGCTTCATTAGC			
$lxr\beta$	NM_009473	fw	CGCTACAACCACGAGACAGA	55	180	26
		rev	TGTTGATGGCGATAAGCAAG			
StAR	BC082283	fw	TGTC AAGGAGATCAAGTCCTG	55	336	20.8
		rev	CGATAGGACCTGGTTGATGAT			
cyp11a	BC068264	fw	CTGCCTCCAGACTTCTTTCG	53	194	20
		rev	TTCTTGAAGGGCAGCTTGTT			
3 $\beta$ hsdI	BC052659	fw	ATGGTCTGCCTGGGAATGAC	55	206	26
		rev	ACTGCAGGAGGTGACAGACT			
cyp17	BC064793	fw	CCAGGACCCAAGTGTGTTCT	55	249	18
		rev	CCTGATACGAAAGCACTTCTCG			
abca1	NM_013454	fw	CGTTCGCGGAAGTGTCCCTA	53	83	28.3
		rev	GCTAGAGATGACAAGGAGGAGGA			
fas	BC046513	fw	GCTGCGGAAACTCAGGAAAT	53	68	21.5
		rev	AGAGACGTGTCACTCCGACTT			
srebp1c	MM_011480	fw	GGAGCCATGGATTGCACATT	55	198	24.5
		rev	GGCCCGGAAGTCACTGT			
Cyclin E	NM_007633	fw	CTGGTGAATGCTATGTCC	55	385	25
		rev	TCTTTGCTTGGGCTTTGTCC			
cmv $\beta$	NM_033597	fw	AGCGGGAATCGGATGAATCT	55	121	30
		rev	GAGCAGAAGAAGTTCCCGATTT			
cmv $\gamma$	NM_010849	fw	TGAGCCCTAGTGTCTGCAT	55	136	29
		rev	AGCCCGACTCCGACTCTT			
CyclinA1	NM_007628	fw	GATGTGTATGAAGTCGACACC	55	89	18
		rev	GTGGGGTCAACCAGCATTGG			
AMH	NM_007445	fw	AGTCACAGGACTGGACTGC	52	82	25
		rev	GGAAGTCCACGGTTAGCACC			
bcl2	NM_177410	fw	CTTAGAAAATACAGCATTGCCGAG	55	193	31
		rev	GGATGTGCTTTGCATTCTTGG			
bcl-xl	X83574	fw	CACTGTGCGTGGAAAGCGTA	55	127	19
		rev	AAAGTGTCCAGCCGCC			
Cflip	BC029223	fw	AAATGTGGACTCTAAGCCCTGCAACC	50	296	23
		rev	CGTAGGAGCCAGGATGAGTTTCTTCC			
Bad	NM_007522	fw	GGCTTGAGGAAGTCCGATCC	55	253	24
		rev	TCCATGATGACTGTTGGTGGC			
Bax	NM_007527	fw	TGGAGCTGCAGAGGATGATG	55	215	24.8
		rev	CACGGAGGAAGTCCAGTGTC			
TNF $\alpha$	NM_013693	fw	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	58	174	29.8
		rev	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC			
IKK $\gamma$	BC021431	fw	GGAGTTGGAGCAACTGAAGA	55	133	24.5
		rev	CGAATCCTTCCCTCTAAAGC			
AR	NM_013476	fw	AAATGAGTACCGCATGCACAA	55	237	15
		rev	GGAGCTTGGTGAGCTGGTAG			
scd1	NM_009127	fw	CCGGAGACCCCTTAGATCGA	53	88	26
		rev	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAAACC			
srb1	NM_016741	fw	TTGGCCTGTTTGTGGGATG	53	196	18
		rev	GGATTGCGGGTGCATGAAGG			
rar $\alpha$	NM_009024	fw	AGAACTGCATCATCAACAAGG	55	268	24
		rev	TCGTTGTTCTGAGCTGTTGTT			
rar $\beta$	BC076597	fw	TGCTCAATCCATCGAGACAC	55	297	33
		rev	CTCTTTGGACATGCCACTT			
rar $\gamma$	BC012923	fw	TCATCTGTGGAGACCGAATG	55	212	24
		rev	GCCTGGAATCTCCATCTTCA			
scp3	NM_011517	fw	GGAGCTGACATCAACAAGC	55	187	22.1
		rev	GTATATCCAGTTCCTCCACTGC			
dmc1	MGI:105393	fw	CCATATCACTACTGGGAGC	53	256	19.8
		rev	GTAATGCTTTCATGGTCTAC			
raldh-2	NM_009022	fw	TTGCAGATGCTGACTTGGAC	55	200	21.6
		rev	TCTGAGGACCCCTGCTCAGTT			

fw, Forward primer; rev, reverse primer; Temp., temperature.



## Acknowledgments

We thank Jean-Paul Saru for his excellent technical help; Mrs. Christine Puchol and Sandrine Plantade for expert technical assistance in breeding the transgenic mice; Dr. D. J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for consulting and providing the mice; Drs. C. L. Cummins (Dallas, TX), F. Caira, L. Morel, C. Beaudoin, and S. Baron (Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6547, Aubièrre, France) for critically reading the manuscript; and the members of the Chester's lab for assistance in animal dissections and discussions.

Received July 7, 2006. Accepted February 28, 2007.

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean-Marc A. Lobaccaro, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique-Université Blaise Pascal 6547, 24 avenue des Landais, 63177 Aubièrre Cedex, France. E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Blaise Pascal, the Fondation pour la Recherche Médicale INE2000-407031/1, and the Fondation BNP-Paribas. University of Virginia Center for Research in Reproduction Ligand Assay and Analysis Core is supported by National Institute of Child Health and Human Development (SCCPRR) Grants U54-HD28934. K.M. is the recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie. J.-M.A.L. is a Professor of the Université Blaise Pascal.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

## REFERENCES

- Wilson JD, Leihy MW, Shaw G, Renfree MB 2002 Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. *Mol Cell Endocrinol* 198:1–5
- Denolet E, De Gendt K, Allemeersch J, Engelen K, Marchal K, Van Hummelen P, Tan KA, Sharpe RM, Saunders PT, Swinnen JV, Verhoeven G 2006 The effect of a Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol Endocrinol* 20:321–334
- Holdcraft RW, Braun RE 2004 Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131:459–467
- Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY 2003 Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod* 68:1087–1097
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS 2003 Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125:769–784
- Saunders PT 2003 Germ cell-somatic cell interactions during spermatogenesis. *Reprod Suppl* 61:91–101
- Woolveridge I, Bryden AA, Taylor MF, George NJ, Wu FC, Morris ID 1998 Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod* 4:701–707
- Bozec A, Chuzel F, Chater S, Paulin C, Bars R, Benahmed M, Mauduit C 2004 The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens. *J Endocrinol* 183:79–90
- Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ 2001 Orphan nuclear receptors as eLixIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* 276:37735–37738
- Hu X, Li S, Wu J, Xia C, Lala DS 2003 Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol* 17:1019–1026
- Wagner BL, Valledor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED, Petrowski M, Jepsen K, Baek SH, Heyman RA, Rosenfeld MG, Schulman IG, Glass CK 2003 Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol* 23:5780–5789
- Repa JJ, Mangelsdorf DJ 2002 The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* 8:1243–1248
- Tontonoz P, Mangelsdorf DJ 2003 Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17:985–993
- Volle DH, Lobaccaro JMA 2007 Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: Beyond the “foie gras”, the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 265–266C:183–189
- Cao G, Liang Y, Jiang XC, Eacho PI 2004 Liver X receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Drug News Perspect* 17:35–41
- Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, Kocer A, Henry-Berger J, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JMA, Drevet JR 2004 Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of the mouse caput epididymis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 33:361–375
- Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, Hovatta O, Meaney S, Hultenby K, Johansson LC, Svechnikov K, Soder O, Gustafsson JA 2005 The liver X receptor- $\beta$  is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* 146:2519–2530
- Mascrez B, Ghyselinck NB, Watanabe M, Annicotte JS, Chambon P, Auwerx J, Mark M 2004 Ligand-dependent contribution of RXR $\beta$  to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep* 5:285–290
- Weinbauer GF, Aslam H, Krishnamurthy H, Brinkworth MH, Einspanier A, Hodges JK 2001 Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol Reprod* 64:120–126
- Liu D, Matzuk MM, Sung WK, Guo Q, Wang P, Wolgemuth D 1998 Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 20:377–380
- Pomerantz JL, Denny EM, Baltimore D 2002 CARD11 mediates factor-specific activation of NF- $\kappa$ B by the T cell receptor complex. *EMBO J* 21:5184–5194
- Agular BM, Vind C 1995 Effects of dexamethasone on steroidogenesis in Leydig cells from rats of different ages. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54:75–81
- Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F 1996 Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 2:246–256
- Chung SS, Wolgemuth DJ 2004 Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* 105:189–202
- Livera G, Rouiller-Fabre V, Pairault C, Levacher C, Habert R 2002 Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124:173–180
- Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefrançois-Martinez AM, Caira F, Veyssiere G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JMA 2006 Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116:1902–1912
- Monder C, Sakai RR, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ 1994 Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 134:1193–1198



28. Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C 2005 Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res* 322:147–153
29. Norman R 1993 Effects of corticotropin-releasing hormone on luteinizing hormone, testosterone, and cortisol secretion in intact male rhesus macaques. *Biol Reprod* 49:148–153
30. Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J, Caira F, Veyssiere G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JMA 2004 Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXR $\alpha$  (liver X receptor- $\alpha$ ) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 18:888–898
31. Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, Tsukamoto T 2003 Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl* 24:185–191
32. Biswas NM, Deb C 1965 Testicular degeneration in rats during hypervitaminosis A. *Endokrinologie* 49:64–69
33. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JMA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ 2000 Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524–1529
34. Rosen H, Dalkin A, Haisenleder D, Friberg RD, Ortolano G, Barkan A 1991 Dexamethasone alters responses of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors, gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids, and gonadotropins to pulsatile GnRH in male rats. *Endocrinology* 128:654–660
35. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Dechelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JMA 2007 Oxysterol nuclear receptor LXR $\beta$  regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 282:4693–4701
36. Mauduit C, Goddard I, Besset V, Tabone E, Rey C, Gasnier F, Dacheux F, Benahmed M 2001 Leukemia inhibitory factor antagonizes gonadotropin induced-testosterone synthesis in cultured porcine leydig cells: sites of action. *Endocrinology* 142:2509–2520
37. Grizard G, Sion B, Bauchart D, Boucher D 2000 Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 740:101–107
38. El Chami N, Ikhlef F, Kaszas K, Yakoub S, Tabone E, Siddeek B, Cunha S, Beaudoin C, Morel L, Benahmed M, Regnier DC 2005 Androgen-dependent apoptosis in male germ cells is regulated through the proto-oncoprotein Cbl. *J Cell Biol* 171:651–661
39. Le Magueresse-Battistoni B, Pernod G, Kolodie L, Morera AM, Benahmed M 1997 Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates plasminogen activator inhibitor-1 in rat testicular peritubular cells. *Endocrinology* 138:1097–1105



**Molecular Endocrinology** is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.



**Article 2** : Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor  $\alpha$  in human trophoblast cell line JAR.

Article publié dans Biol reprod. 2008 Feb 14; [epub ahead of print].

Joëlle Henry-Berger, Kevin Mouzat, Silvère Baron, Carmelo Bernabeu, Geoffroy Marceau, Jean-Paul Saru, Vincent Sapin, Jean-Marc A. Lobaccaro and Françoise Caira.



## Endoglin (CD105) expression is regulated by the liver X receptor $\alpha$ in human trophoblast cell line JAR

5 Joëlle HENRY-BERGER<sup>1,2,3</sup>, Kevin MOUZAT<sup>1,2,3</sup>, Silvère BARON<sup>1,2,3</sup>, Carmelo BERNABEU<sup>5</sup>, Geoffroy MARCEAU<sup>3,4</sup>, Jean-Paul SARU<sup>1,2,3</sup>, Vincent SAPIN<sup>3,4</sup>, Jean-Marc A. LOBACCARO<sup>1,2,3</sup> and Françoise CAIRA<sup>1,2,3</sup>

(1). Clermont Université, Génétique des Eucaryotes et Endocrinologie Moléculaire;

(2). CNRS UMR 6547;

10 (3). Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne;  
24 avenue des Landais, 63177 Aubière, France;

(4). INSERM, U384, Place Henri Dunan, 63000 Clermont-Ferrand, France;

(5). Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), and Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Ramiro de Maetzu 9, 28040 Madrid, Spain.

15 Address for all correspondence to: Jean-Marc Lobaccaro, UMR CNRS-UBP 6547, 24 avenue des Landais, 63177 AUBIERE Cedex, France. Tel: 33 4 73 40 74 16; Fax: 33 4 73 40 70 42; Email : [j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr](mailto:j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr)

20 **Short title: LXR $\alpha$  regulates endoglin/CD105.**

**Key-words: LXR, oxysterols, implantation, endoglin, syncytiotrophoblast**

### ABSTRACT

**Endoglin (Eng) is an auxiliary component of the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  receptor complex that binds several members of the TGF- $\beta$  family. TGF- $\beta$  is a cytokine involved in proliferation, differentiation, migration and survival of many cell types. Eng is predominantly expressed in endothelial cells, syncytiotrophoblasts and extravillous trophoblasts differentiating along the invasive pathway. In human placenta, Eng has been shown to be involved in the inhibition of trophoblast invasion. In the present study, we show that the Eng gene is a direct target of the liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), a nuclear receptor activated by oxysterols. Treatment of human choriocarcinoma JAR cells with T0901317, a synthetic LXR-selective agonist, led to a significant increase of Eng mRNA and protein levels. Six motifs were identified in silico as putative LXR response elements (LXRE) in the Eng promoter and shown to be able to bind the LXR/RXR heterodimer in vitro. When Eng promoter was transfected into JAR cells, its activity was induced by LXR agonist. Truncation of this promoter allowed the identification of one of these binding sites as a functional LXRE. Mutation of this LXRE abolished the T0901317-mediated activation of the promoter confirming this hypothesis. This study shows that Eng expression is regulated by LXR $\alpha$  in placental cells and suggests a novel mechanism by which LXR may regulate trophoblast invasion in pathologic pregnancy such as preeclampsia.**

### INTRODUCTION

The liver X receptors LXR $\alpha$  (NR1H3) and LXR $\beta$  (NR1H2) belong to a subclass of nuclear receptors that bind to naturally occurring oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols, and activate target gene expression [1]. LXR $\alpha$  expression is predominant in tissues showing high lipid metabolism including liver, intestine, adipose tissue, adrenals, kidney and testis, whereas LXR $\beta$  is ubiquitously expressed [1]. They both bind DNA as obligate heterodimers with the retinoid X receptor (RXR) for the 9-cis retinoic acid. LXR/RXR classically binds with high affinity to DNA sequences called LXRE (Liver-X-Responsive Element) composed of two direct repeats (DR) of an hexanucleotide motif separated by four nucleotides (DR4) [1]. Various studies, mainly done using the LXR-deficient mice, pointed out that LXRs were physiologically involved in the regulation of several metabolisms such as cholesterol and fatty acid metabolisms, inflammation, glucose homeostasis, epidermal differentiation and fertility (For a review see [2]). Besides, brain-penetrable LXR agonists or modulators have also been suggested as useful synthetic agents for the treatment and/or prevention of Alzheimer's disease [3]. It is thus of interest to screen for new target genes in order to understand the physiological roles of LXRs, as well as to prevent any side effects when the synthetic LXR-modulators will be available for the treatment of human diseases. Placenta is an organ where oxysterols have been shown to be within a high concentration range [4]. Moreover, we previously determined that both LXRs were present in human placenta at various stages of gestation as well as in human placental trophoblast cell lines JAR, JEG and BeWo [5]. We hypothesized that the LXRs could have some physiological roles



during early human placentation and in fetal nutrition, especially concerning cholesterol feeding of the fetus [5]. So far, only a potential role for LXR in the regulation of lipogenesis in the placenta and a possible involvement in differentiation of trophoblast cells have been shown [6]. Other studies showed that placental implantation process was modulated by LXR [7]. Moreover, several LXR-target genes (FAS, SREBP1, ABCA1, ABCG1) have been demonstrated to be expressed in the placenta and could provide a means to control delivery of maternal cholesterol to the fetus [8]. Altogether these data led us to suspect that LXR might have a crucial role in several mechanisms occurring in placental development and/or function. The identification of new target genes of LXRs in placenta would enhance the discovery of their physiological roles in that organ and open a new field of investigation to understand some obstetrical pathologies, such as preeclampsia. We developed a rapid *in silico* screening method to identify new putative LXR-target genes based on the presence of LXRE motifs in their promoters. Among the various genes identified by this method, we focused our study on endoglin/CD105 based on its involvement in placental implantation (14), a process shown to be modulated by oxysterols and LXR [7]. In this paper, we showed that the gene encoding the membrane endoglin is a direct target of LXR $\alpha$  in human syncytiotrophoblast cells.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**In silico screening for LXR-target genes** To identify putative LXR target genes in the placenta we used the FASTM computer program to associate the LXRE and SREBF1 PSSM matrices in a virtual transcriptional model in order to screen the genomic databases with Model Inspector program. The distance between the two elements ranged from 5 to 500 bp in any orientation. Using Biblosphere<sup>TM</sup> software, bibliographical and gene ontology filters (biological process, tissues expression) were applied to identify genes expressed in placenta and whose products were involved in cholesterol, steroid or lipid metabolisms. All the programs used for this *in silico* approach were included in the Genomatix package (Genomatix softwares, München, Germany).

**Reagents and plasmids.** Ligands 22(R) hydroxycholesterol (22(R)OH), 25 hydroxycholesterol (25 OH), and 9-cis retinoic acid (9-cis RA) were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle D'Abeau, France). LG268 was obtained from Ligand Pharmaceutical (La Jolla, CA) and T0901317 was purchased from Cayman Chemical (Montigny le Bretonneux, France). All ligands were diluted in DMSO. Plasmids used in transfection assays (pCMX-LXR $\alpha$ , pCMX-LXR $\beta$ , pCMX-RXR $\alpha$  and pCMX) have been described elsewhere [9]. The plasmids pCMX-FXR and pSG5-PXR are generous gift of Dr. Mangelsdorf [10] and Dr JM Pascussi [11] respectively. The reporter construct pLuc-CD105 (-

1950/+350 or proximal promoter) was derived from the human endoglin promoter as described elsewhere [12]. Briefly, PCR was carried out in the presence of sequence-specific primers flanked by HindIII/XhoI sites for directional cloning and inserted in the reporter luciferase vector pXP2. The luciferase reporter containing endoglin distal sequence (-5333 to -3535) was obtained by cloning this sequence into the reporter luciferase vector pGL3-basic vector (Promega, Charbonnières, France). To amplify this sequence, PCR was carried out from genomic purified DNA of human blood cells in the presence of specific primers:

(-5333F): 5'-GCGACCCACACCTAATTT-3' and (-3535R): 5'-GCCACTGAAGGAATTTTCAG-3'. The resulting 1799-bp fragment was cloned into pGEM-T easy (NcoI/SacI) and also in pGL3-basic (Promega) vectors. The various truncated fragments of this distal sequence were obtained by PCR amplification using specific primers: (-4735Rv): 5'-TTCAAGGCTGCAGTAAGCTG-3'; (-4107Fw): 5'-GAATGTTCTGGAAGCCAAGG-3'; (-4971Fw): 5'-TAGTTGAGACGGGGTTTTGC-3'; (-4143Rv): 5'-ACTTCAGTGGCTGAGGCTGT-3' and (-4581Fw): 5'-CAACAGATGAGCTTGTGACGA-3'.

**Cell Culture, transfection and reporter gene assays.** Human placental JAR cells were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in RPMI medium containing 100  $\mu$ g/ml gentamycin supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). On day one of transfection assay, JAR cells were seeded at 3 x 10<sup>5</sup> cells per well in 6-well plates and allowed to adhere. Eight to ten hours later, cells were washed and transfected in serum-free medium with 1  $\mu$ g/well of DNA (800 ng of luciferase reporter plasmids together with 100 ng of pCMX-RXR $\alpha$  and 100 ng of pCMX-LXR $\alpha$ /  $\beta$  or pCMX-FXR or pSG5-PXR) using Metafecten (Biontex Martinsried, Planegg, Germany). On day 2, cells were washed twice with 1x PBS, and 1 ml of serum-free medium without antibiotics containing DMSO or T0901317 (1  $\mu$ M) was applied. Twenty-four hours later, cells were harvested for luciferase activity (Yelen, Ensues-la-Redonne, France).

**RNA isolation and Northern Blot Analyses.** JAR cells were cultured in serum-free medium for 24 h prior to the addition of ligands. Cells were then incubated in the presence of T0901317 or DMSO (vehicle) for 1 to 24 h, and total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Thirty  $\mu$ g of total RNA (per lane) were separated on 1% agarose/formaldehyde gels, transferred to nylon membranes (HybondN+, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) and fixed by heating at 80°C for 2 hours. Random primed [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP-radiolabeled probes were generated using the DNA labeling kit (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Human Eng cDNA probe (+629/+1069) was amplified by PCR using two specific oligonucleotides (5'-



AGAGGTGCTTCTGGTCCTCA-3' and 3'-AGTTCCACCTTCACCGTCAC-5'). Results were quantified in a phosphorimager (Biorad, Marnes la Coquette, France) and graphed relative to the ribosomal 18S.

**Western Blot Analysis.** JAR cells were cultured in serum-free medium for 24 h prior to the addition of ligands. Vehicle (DMSO) or various natural (22(R)OH, 25OH, 9-cis RA) or synthetic ligands (T0901317 or LG268) were added at 1 $\mu$ M for 18 hours. Total protein extracts were prepared from treated JAR cell cultures (4 to 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells). Briefly, cells were rinsed once with PBS and scraped in 100  $\mu$ l lysis buffer (Hepes 20 mM, NaCl 0.42 M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, glycerol 25%, NP40 1% (v/v)) supplemented with protease inhibitors (PMSF, Complete 1X (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France)). After sonication, homogenates were centrifuged at 4°C for 10 min at 15000 g. Thirty  $\mu$ g of total proteins were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). After 1h-saturation with TBS-TWEEN 0.2 % (v/v) containing 5% (w/v) of skimmed and dried milk, membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against either endoglin (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France, 1:500) or human anti ABCA1 (Novus Biologicals, 1:500) or actin (P.A.R.I.S, Compiègne, France; 1:2000) and 1h incubation with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (P.A.R.I.S, Compiègne, France, 1:10,000). Peroxidase activity was detected with the Western Lightning System (Perkin-Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France).

**Immunocytochemistry.** JAR cells were cultured in 6-well plates (3 $\times$ 10<sup>5</sup> cell per well) on pre-coated micro coverslips with RPMI containing 10% FCS, glutamine and gentamycine. Eight hours later medium was replaced by serum-free RPMI medium without antibiotics for twelve hours. Induction of cells was performed with 25OH, 22ROH or T1317 at 1  $\mu$ M for 18 hours. Cells were then rinsed once with PBS, fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde and incubated in PBS with 2% BSA (w/v) for 1 hour. Primary antibody toward endoglin (DAKO, Trappes, France, 1:200) was added for 1 hour at room temperature in wet atmosphere. After several washes in PBS with 2% BSA, secondary FITC-conjugated antibody (P.A.R.I.S, Compiègne, France, 1:100) was added for 1h at room temperature. Nuclei were counterstained with DAPI coloration.

**Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).** Total protein extracts were prepared from wild type, *lxra*<sup>-/-</sup>, *lxr $\beta$* <sup>-/-</sup>, or *lxr $\alpha\beta$* <sup>-/-</sup> mice livers. Proteins extracted from mice livers by crushing 1g liver pieces with a Dounce in 1.5 ml high salt buffer. The extracts were kept for 20 min on ice, centrifuged twice at 15,000g for 20 min. The supernatants were aliquoted and stored in a saline buffer (Hepes 20 mM, glycerol

20%, KCl 0.1M, EDTA 0.2 mM, PMSF 0.5 mM, DTT 0.5 mM, Complete 1X) at -80°C until use. Probes were labelled with T4 polynucleotide kinase and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P dATP] (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and purified (Qiaquick Nucleotide Removal Kit, QIAGEN, Courtaboeuf, France). Binding reactions were performed with 10  $\mu$ g of protein extract and 0.05 pmol of Eng-LXRE4 oligonucleotide (Table 1) or ApoC1-LXRE oligonucleotide (5'-GCTGCCAGGGTCACTGGCGGTCAAAGGCAG-3'), in the presence or absence of 50-fold molar excess of unlabeled competitor in a 1X binding buffer (20 mM HEPES, 0.2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM spermidine, 4 mM DTT, 200  $\mu$ g/ml BSA, 8% Ficoll) and 2  $\mu$ g poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid. The non-specific competitor used in this assay was the mouse Sp1 specific sequence 5'-GGTAAGAGCCCGCCTCCTTTATCC-3'.

Complexes were resolved by electrophoresis through 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer. The gels were dried and autoradiographed.

**Site directed mutagenesis.** Site-directed mutagenesis of Eng-LXRE4 motif was performed using Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) according to manufacturer's recommendations with the primer LXRE4mut (Table 1). The mutation of the selected and amplified plasmid was verified by sequencing before its use in transfection assays.

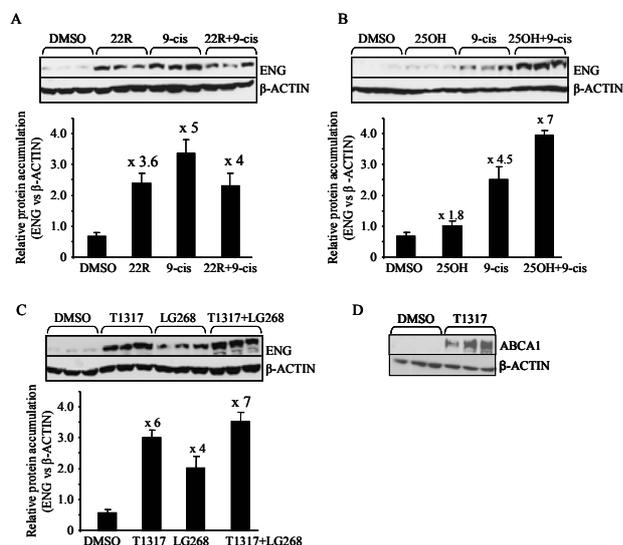
## RESULTS

### A large 6kb-region upstream the initiation site of Eng contains six putative LXRE

Because several LXR target genes have been shown to be regulated by the sterol regulatory element binding protein (SREBP) through binding sites (SRE) located closely to the LXRE sites, a pattern associating both LXRE and SRE matrices were designed (FASTM, Genomatix). Genomic libraries were screened in silico using 5'UTR and promoters subdivision database (Genomatix) and a list of several hundreds of genes was obtained. Special interest was yielded to genes involved in cholesterol/oxysterol or lipid metabolisms, atherosclerosis or steroidogenesis. Among them, studies were focused on endoglin (Eng), because of its expression in placenta including syncytiotrophoblasts [13] and its involvement in trophoblast invasion [14], a process partially inhibited by oxysterols [7]. Computer analyses identified six putative LXRE sites in the 6kb region located upstream the initiation site (Table 1). LXRE1 and LXRE2 were located in the proximal promoter (-648/-632 and -1072/-1056 respectively), while LXRE3 to 6 were detected in a region ranging from -5333 to -3535 (or distal promoter). LXRE1, LXRE3, LXRE5 and LXRE6 are located within Alu sequences specific of primate genomes. Interestingly, these Alu sequences belong to the AluSx subfamily also present



in promoters of ABCA1 [15] and ApoE [16] human genes, both genes being transcriptionally regulated by LXR. The presence of these very well-conserved LXRE sites in the upstream region suggested that Eng could be a bona fide LXR target gene in placenta.

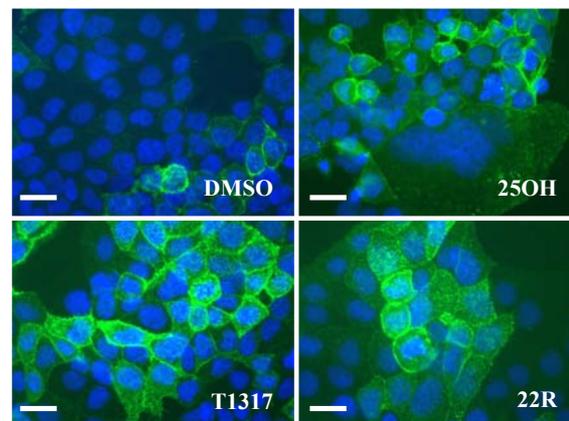


**Figure 1: Natural and synthetic LXR agonists stimulate Eng expression in choriocarcinoma JAR cells.** Cells were treated for 18h with vehicle (DMSO) or with 1 $\mu$ M of 22R-hydroxycholesterol (22R, panel A), 25-hydroxycholesterol (25OH, panel B) or T0901317 (T1317, panels C and D), alone or in combination with natural 9-cis retinoic acid (9-cis, panels A and B) or synthetic LG268 (panel C) RXR agonists, as indicated. The protein levels of Eng and  $\beta$ -actin were measured by Western blotting (A, B, C). The protein level of ABCA1, a very well-known target gene of LXR, was analyzed as a positive control (D). Histograms are indicated as mean  $\pm$  SEM (n = 3).

### Eng protein and mRNA levels are increased by LXR or RXR natural and synthetic ligands

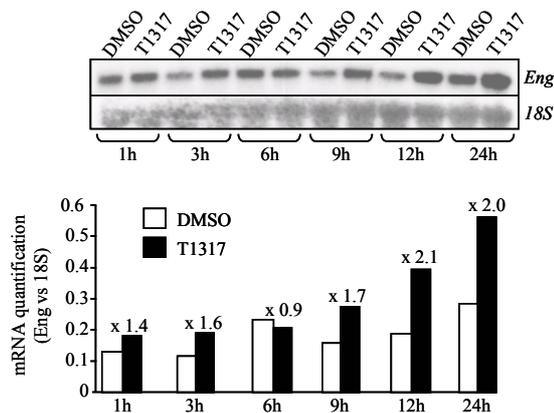
Since Eng is highly expressed in human syncytiotrophoblasts [13] and JAR choriocarcinoma cells [17], the effects of natural (22(R)OH and 25OH) and synthetic (T0901317) LXR ligands as well as natural (9-cis RA) and synthetic (LG268) RXR ligands were tested in JAR cells for 18h. Western blot analyses demonstrated that incubations with either LXR or RXR ligands induced a strong accumulation of Eng in treated cells compared with untreated cells (Figure 1A-C). LXR-ligands induced a 1.8- to 6-fold increase of Eng levels, whereas RXR-ligands showed an increase of 4- to 5-fold. The simultaneous treatment with both LXR and RXR ligands resulted in a more effective stimulation of Eng expression (from 4 to 7-fold), as expected for these nuclear receptors (17BIS). As a control, Eng protein levels appeared to be up-regulated by LXR upon ligand stimulation in a similar fashion as ABCA1 (Figure 1D), a well known LXR target gene (17 TER). The fact that Eng was highly accumulated upon treatment with T0901317 or natural LXR ligands is in agreement with immunohistochemistry experiments showing an accumulation of Eng in the cell membranes of JAR

cells treated with 25OH, 22(R)OH or T0901317 (Figure 2).



**Figure 2: Activation of LXR increases Eng expression at the membrane of choriocarcinoma JAR cells.** JAR cells were treated for 18h with vehicle (DMSO) or with 1 $\mu$ M of 22R-hydroxycholesterol (22R), 25-hydroxycholesterol (25OH) or T0901317 (T1317). Immunocytochemistry assay was performed as described as follows: Eng was detected with an anti-Eng monoclonal antibody and with a fluorescein-labeled secondary antibody (green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue).

Given the optimal response obtained with the LXR agonist T0901317, this stimulus was selected for further experiments. In order to determine the level of regulation underlying the Eng protein accumulation, Northern blot analyses of Eng mRNA were performed in JAR cells treated with T0901317 for 1 to 24h.



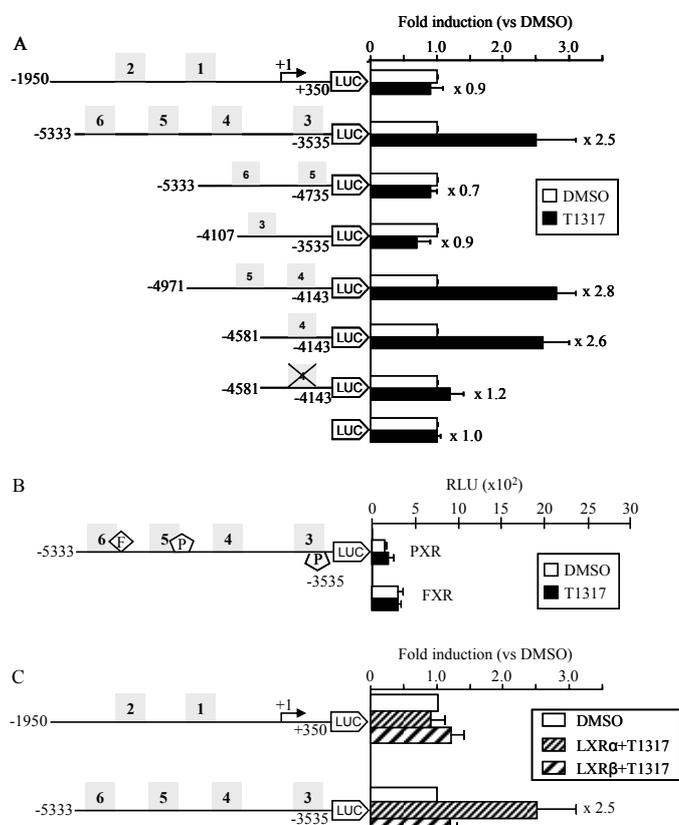
**Figure 3: LXR agonist T0901317 increases Eng mRNA levels.** JAR cells were treated for 1, 3, 6, 9, 12 or 24h with vehicle (DMSO) or 1  $\mu$ M T0901317 (T1317) as described in Material and Methods. Total RNAs were extracted and Eng mRNA level was analyzed by northern blotting. Results were normalized by 18S mRNA levels. A representative experiment out of three different ones is shown.

As shown in Figure 3, treatment with the LXR agonist consistently increased Eng mRNA levels from -1.4 to 2-fold in a time-dependent manner. Taken



together, these results suggest that LXR agonists lead to increased *Eng* mRNA and protein levels.

### LXRE4 specifically mediates *Eng* regulation by



### LXRα

The transcriptional regulation of *Eng* via LXR was explored in transient transfection assays using various truncated portions of the *Eng* promoter together with expression vectors encoding LXRα and RXRα (Figure 4).

**Figure 4: LXR-activation stimulates *Eng* distal promoter activity.** JAR cells were transiently transfected with *Eng* proximal promoter construct (pEng -1950/+350) or with *Eng* distal promoter constructs (pEng -5333/-3535; pEng -5333/-4735; pEng -4107/-3535; pEng -4971/-4143; pEng -4581/-4143) together with pCMX-RXR and pCMX-LXRα as described in “Materials and Methods” (Panel A). In panel B, cells were transfected with pEng -5333/-3535 together with pCMX-PXR or pSG5-FXR. In panel C, cells were transfected with pEng -1950/+350 or with pEng -5333/-3535 together with pCMX-RXR and pCMX-LXRα or pCMX-LXRβ. After transfection, JAR cells were incubated with vehicle (DMSO) or T1317 (1 μM) for 18h in serum free-RPMI. Luciferase assay was normalized by protein contents. Transfection assays were performed by quadruplicate in three different experiments (N=3). Numbers in grey squares indicate the number and position of the different LXREs on *Eng* promoter. PXR, pregnane-X-receptor response element ; FXR, farnesoid-X-receptor response element.

Since LXR-dependent effects on gene expression are mediated by LXRE motifs, *Eng* promoter constructs were selected to contain the six LXRE sequences identified upstream of its transcription start site (Table 1). Thus, the *Eng* promoter constructs -

1950/+350 (LXRE1 and LXRE2), -5333/-3535 (LXRE3, LXRE4, LXRE5 and LXRE6), -5333/-4735 (LXRE5 and LXRE6), -4107/-3535 (LXRE3), -4971/-4143 (LXRE4 and LXRE5), and -4581/-4143 (LXRE4) containing different combinations of LXRE motifs were used (Figure 4A). Transfection experiments with the -1950/+350 promoter fragment revealed that the LXRE1 and LXRE2 motifs were not responsive to T0901317. By contrast, the -5333/-3535 fragment showed a 2.5-fold increase of the *Eng* promoter activity in response to the LXR agonist, suggesting that, at least, one of the LXRE motifs (#3-6), included in this fragment was a functional element. To dissect the functional element(s) involved, deletions constructs -5333/-4735, -4107/-3535, -4971/-4143, and -4581/-4143 were used. Only LXRE4-containing fragments -5333/-3535, -4971/-4143 and -4581/-4143 induced a 2.5- to 2.8-fold induction of the luciferase activity in the presence of T0901317 (Figure 4A), strongly suggesting that LXRE4 is the only functional motif involved. This is in spite of the fact that RXR/LXR were able to bind all the *Eng* consensus sequences in EMSA (data not shown). To confirm that LXRE4 was involved in the transduction of the T0901317 signal, site directed mutagenesis of this response element was performed. Transfection with the corresponding mutant of the -4581/-4143 reporter vector showed that the T0901317-dependent induction was clearly abolished (1.2-fold versus 2.6). Altogether, these data demonstrate that LXRE4 mediates the activation of the reporter gene expression by T0901317.

Because T0901317 is also a high-affinity ligand for the xenobiotic receptor pregnane X receptor (PXR) (18) and the farnesoid X receptor (FXR) (19), the regulation of *Eng* promoter by LXRα could not be definitely ascertained. To address this issue, transient transfections were performed using the -5333/-3535 fragment, whose the luciferase activity is stimulated by T0901317 (Figure 4A), and expression vectors for PXR or FXR together with RXR expression vector. Figure 4B shows that incubation with T0901317 (1 μM) does not activate the gene reporter via PXR or FXR, while a 2-fold increase was observed in the presence of recombinant LXRα, confirming the specific involvement of LXRα in the activation of *Eng* expression by T0901317.

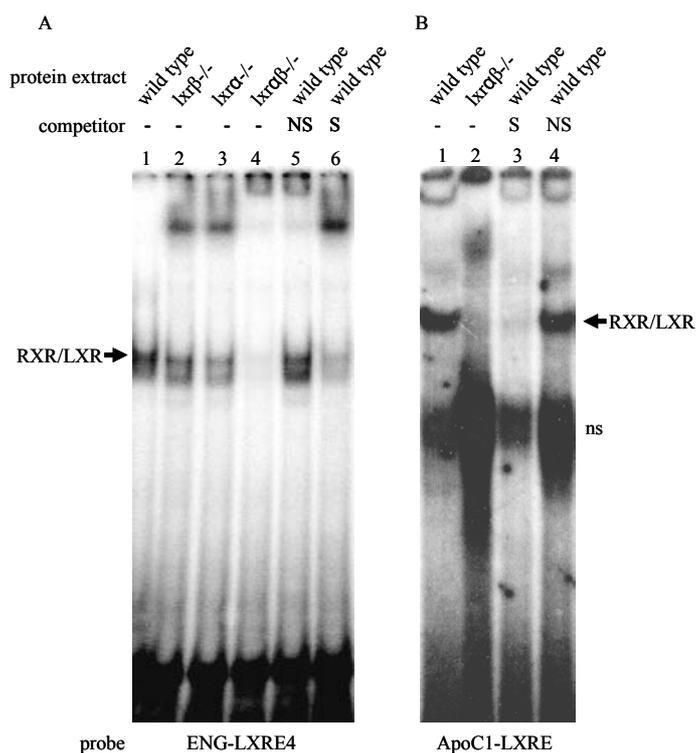
Among the various LXR-target genes, some isoform-specific genes have been described that respond to either LXRα or LXRβ (reference to support this statement). For this reason, we aimed to study whether *Eng* could be activated in the human cell line JAR by LXRα and/or LXRβ. As shown in Figure 4C, T0901317 failed to induce the expression of the reporter gene when LXRβ was co-transfected together with RXRα, indicating that none of these putative LXREs, including LXRE4, was able to mediate LXRβ activation of the reporter constructs. By contrast, upon co-transfection of LXRα with RXRα, T0901317 stimulated the promoter activity



2.5-fold. Altogether, it can be concluded that *Eng* is a target gene for LXR $\alpha$  in the human trophoblast cell line JAR.

#### The heterodimer RXR/LXR binds to Eng-LXRE4

In order to test the ability of RXR/LXR heterodimer to bind the functional LXRE, EMSA was performed using as a probe Eng-LXRE4 radiolabelled oligonucleotide as a probe together with protein extracts from livers of either wild type mice, highly expressing LXRs, or *lrx $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice devoid of LXR (Figure 5A).



**Figure 5: LXR/RXR heterodimer binds to Eng-LXRE4 with high affinity.** **A)** Electrophoretic mobility shift assay was performed using <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide of Eng-LXRE4 as a probe with total protein extracts from livers of wild type, *lrx $\alpha$* <sup>-/-</sup>, *lrx $\beta$* <sup>-/-</sup> or *lrx $\alpha\beta$* <sup>-/-</sup> knock out mice in absence or presence of unlabeled competitors (x 50): LXRE4 as a specific competitor (S) and SP1 oligonucleotide as a non-specific competitor (NS). **B)** EMSA was performed using <sup>32</sup>P-labeled ApoC1-LXRE oligonucleotide as a probe and total protein extracts from livers of wild type or *lrx $\alpha\beta$* <sup>-/-</sup> knock out mice in absence or presence of unlabeled competitors (x 50): ApoC1 oligonucleotide as a specific competitor (S) and SP1 oligonucleotide as a non-specific competitor (NS).

As shown by the signal observed in lane 1 (wild type), Eng-LXRE4 bound RXR/LXR with a similar affinity as did ApoC1-LXRE used as a positive control (Figure 5B, lane 1). To confirm that this signal was specific of RXR/LXR, proteins from liver of *lrx $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice were used (Figure 5A, lane 4). The absence of LXR proteins in this extract led to the disappearance of the previously observed complex indicating that LXR was part of it. The use of a non-labeled LXRE4 oligonucleotide (specific competitor,

S in lane 6) competed the signal obtained with proteins from wild type, while no competition was seen when mouse SP1 oligonucleotide was used as a non-specific (NS) non-labeled competitor (lane 5). Taken together, these results suggest that LXRE4 is able to specifically bind RXR/LXR. In order to determine if both LXR isoforms were able to bind LXRE4, proteins extracted from livers of *lrx $\alpha$* <sup>-/-</sup> or *lrx $\beta$* <sup>-/-</sup> mice were used. Both *lrx $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *lrx $\beta$* <sup>-/-</sup> extracts (Figure 5, lanes 3 and 2) yielded weaker signals than that of wild-type mice (lane 1), but, interestingly, no obvious difference of intensity was observed between *lrx $\alpha$* <sup>-/-</sup> and *lrx $\beta$* <sup>-/-</sup>, signals indicating that, at least *in vitro*, both isoforms are able to bind LXRE4. This in spite of the fact that only LXR $\alpha$ , but not LXR $\beta$ , proved to be functional in promoter reporter assays (Figure 4C).

#### DISCUSSION

Nowadays, LXRs are considered as interesting putative pharmacologic targets to prevent and/or treat diseases linked to lipid homeostasis disorders. Consequently, in order to identify and characterize all metabolic pathways in which LXRs are involved and to avoid any side effects of LXR agonists used as therapeutic drugs, it is of great interest to develop a method for the rapid screening of new target genes. The *in silico* method used in this paper has proved to be reliable since *Eng*, as well as many other genes published by others, were identified as putative LXR target genes. However further experiments are necessary to test the functionality of the putative LXREs and to confirm the identification of the gene as an LXR target.

Our present study focused on *Eng* gene, although apparently *Eng* is not directly involved in cholesterol or lipid metabolisms. *Eng* is a membrane protein which is part of the complex receptor for tumor growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) highly expressed, among other organs, in placenta, notably in syncytiotrophoblasts which compose the first generation of a multinucleated trophoblastic layer during implantation [13]. *Eng* is also transiently up-regulated in extravillous trophoblasts differentiating along the invasive pathway [14]. The main function of Eng/TGF- $\beta$  signalling pathway in placenta is to control proliferation, migration and invasiveness of normal human trophoblast cells [14]. On the other hand, several lines of evidence support the involvement of the LXR pathway in trophoblast biology: 1) trophoblast invasion is accompanied by an increased degradation of extracellular matrix proteins by members of Matrix Metalloproteinases (MMPs) family [14] and that the expression of MMP9 is regulated in macrophages by a mechanism dependent on LXR activation [20]; 2) T0901317 and oxidized LDLs, rich in oxysterols, significantly reduce trophoblast invasion via a mechanism involving LXR $\beta$  [7]; 3) LXR $\beta$  is able to modulate TGF- $\beta$  signalling [21]; 4) the vascular endothelial growth



factor (VEGF) gene is regulated in macrophages by LXRs [22]. Based on the fact that VEGF and Eng, two angiogenic factors, share a common activation of their transcription by hypoxia via the HIF-1 complex [12, 23], one can hypothesize that due to their similar actions, LXR might also regulate Eng. Thus, some of these studies indirectly linked LXR, oxysterols, trophoblast invasion on the one hand and TGF- $\beta$ /endoglin signaling pathway on the other hand and prompted us to hypothesize a direct link between LXR and Eng.

In this paper, we showed that the expression of Eng gene was up-regulated at both mRNA and protein levels by administration of T0901317 in human choriocarcinoma JAR cells. Among the six DR4 elements identified in silico as putative LXRE, we showed that, although they were all able to bind the heterodimer RXR/LXR, only one of them appeared to be a functional LXRE in transfection assays. We demonstrated that both the LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  isoforms were able to bind this functional LXRE in vitro, but that surprisingly, LXR $\beta$  was unable to mediate T0901317 activation of luciferase reporter gene. Although both receptors could bind the same DNA sequence in vitro, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  can differentially regulate gene expression [24]. Thus, in JAR placental cells where they are both expressed [5], they clearly do not have overlapping roles, as suggested for other organs such as the liver [25] and uterus [26]. These data strongly support the existence of specific molecular mechanisms leading to LXR $\alpha$  transactivation, such as the involvement of specific cofactors for each isoform. Such elements remain to be discovered. It is unlikely that the LXR pathway is a primary regulator of trophoblast invasion since LXR null mice show no obvious defect in placental implantation (unpublished observation). In this context, the physiological relevance Eng regulation by LXR remains to be established. Nonetheless, other studies have shown that overexpression of Eng in mouse fibroblasts [27] or endothelial cells [28] led to decreased cell migration. Furthermore, it has been hypothesized that a lower endoglin expression decreased cell adhesion and would facilitate the prostate cell migration and invasion [29]. These studies thus establish that Eng inhibits migration and invasion of various cell types such as fibroblasts, endothelial cells and prostate epithelium or prostate cancer cells. The present study demonstrates that Eng is up-regulated by LXR in choriocarcinoma cells, and as described above, most likely this up-regulation of Eng might inhibit trophoblast invasion. A previous study already linked trophoblast invasion and LXR [7]. These authors showed that treatment of extravillous cytotrophoblasts with T0901317 or oxLDL inhibited trophoblast invasion. They assumed that this effect was mediated by oxLDL internalization via LOX1 receptor whose expression was increased by oxLDL. Another study hypothesized that LXR inhibited the expression

MMP9, an enzyme implicated in extracellular matrix degradation, an essential process of normal trophoblast invasion in placental implantation [20]. Normal physiological placental invasion needs to be spatially and temporally regulated, reaching a peak at 12 weeks gestation to rapidly decline thereafter. Indeed, when extravillous trophoblasts reach the first third of endometrium, invasion needs to be stopped. This normal process is under control of several inhibitory systems involving the TGF- $\beta$  receptor complex and its anti-proliferative, anti-migratory and anti-invasive signals [30]. One of them specifically involves Eng and its ligands TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 [14] and leads to the inhibition of trophoblast outgrowth and migration by stimulating the expression of MMP9 inhibitors. In that way, invasion is stopped in syncytium and also in extravillous trophoblasts that have invaded maternal tissue and anchored the placenta. In our experiments, we demonstrated that membrane Eng was up-regulated by LXR. Knowing that normal pregnancy is always accompanied by an enhanced oxidation of LDL particles [31], and that, in preeclamptic pregnancies, there is evidence of abnormally enhanced production of lipid peroxides in maternal blood [32], one can hypothesize that an increased internalization of oxLDL in trophoblasts might activate LXR and increase membrane Eng level and consequently would enhance the TGF- $\beta$ 1/3 inhibitory-signal. This could slow down trophoblast invasion, resulting in precocious placental adherence disruption and enhancement of the preeclamptic symptoms. Indeed a shallow placentation with abnormal invasion of cytotrophoblasts and incomplete remodelling of uterine spiral arteries is observed in preeclampsia [33]. Interestingly, increased levels of soluble endoglin, secreted by the placenta, have been detected in the maternal circulation before the onset of preeclampsia, and it has been postulated that this soluble endoglin plays a pathogenic role contributing to systemic endothelial dysfunction resulting in hypertension and other systemic manifestations of preeclampsia (for a review see 34). In summary, our data suggest that inappropriate expression and/or function of Eng, such as its up-regulation by LXR, might contribute to major complications of pregnancy, such as preeclampsia.

#### ACKNOWLEDGMENTS

*We thank Angelique de Haze for her excellent technical assistance, Dr Pierre Val for helpful suggestions about mutagenesis and EMSA experiments and reading of the manuscript, Dr. D.J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas, TX) for providing the expression vectors for LXRs, RXR and FXR, Dr JM Pascussi (Inserm, Université Montpellier 1, UMR-632, Montpellier, France) for providing the expression vector pSG5-PXR, Dr. G. Veysière for critically reading the manuscript and the members of the Chester's lab for discussions. LG268 was kindly provided by Dr. M. Leibowitz (Ligand Pharmaceuticals Inc, San Diego, CA). The plasmid pSG5-PXR is a generous gift of JM Pascussi (UMR INSERM632, Montpellier, France). This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Blaise Pascal, the Fondation Danone, the Fondation pour la Recherche Médicale INE2000-407031/1 and*



the Fondation BNP-Paribas. JMAL is a Professor of the Université Blaise Pascal, KM is a Recipient of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de Recherche et de la Technologie.

#### FOOTNOTES

Eng, endoglin/CD105; LXR, liver X receptor; LXRE, LXR Responsive Element; RXR, retinoic X receptor, FAS, fatty acid synthase; ApoE/CI, apolipoprotein E/CI; ABCA1/G1, ATP-binding cassette A1/G1

#### REFERENCES

- 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. Review.
- Volle DH, Lobaccaro JM. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb;265-266:183-9 Review.
- Cao G, Bales KR, DeMattos RB, Paul SM. Liver X receptor-mediated gene regulation and cholesterol homeostasis in brain: relevance to Alzheimer's disease therapeutics. *Curr Alzheimer Res.* 2007 Apr;4 (2):179-84. Review.
- Schroepfer, GJ (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):361-554. Review.
- Marceau G, Volle DH, Gallot D, Mangelsdorf DJ, Sapin V, Lobaccaro JM. Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. *Anat Rec A.* 2005 Mar;283(1):175-81.
- Weedon-Fekjaer MS, Duttaroy AK, Nebb HI Placenta. 2005 Nov;26(10):721-8. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line.
- Pavan L, Hermouet A, Tsatsaris V, Thérond P, Sawamura T, Evain-Brion D, Fournier T. *Endocrinology.* 2004 Oct;145 (10):4583-91. Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptor
- Plösch T, van Straten EM, Kuipers F. Cholesterol transport by the placenta: placental liver x r eceptor activity as a modulator of fetal cholesterol metabolism? *Placenta.* 2007 Jul;28 (7):604-10.
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Dechelotte P, Sion B, Veysiere G, Benahmed M, Lobaccaro JM. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol.* 2007 May;21(5):1014-27.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* 1999 May 21;284 (5418):1362-5.
- Jürgen M. Lehmann<sup>\*</sup>, David D. McKee<sup>\*</sup>, Michael A. Watson<sup>\*</sup>, Timothy M. Willson<sup>§</sup>, John T. Moore<sup>†</sup>, and Steven A. Kliewer<sup>‡</sup> The Human Orphan Nuclear Receptor PXR Is Activated by Compounds That Regulate CYP3A4 Gene Expression and Cause Drug Interactions. *J Clin. Invest.* Volume 102, Number 5, September 1998, 1016-1023
- Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15;277(46):43799-808.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Buhning HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol.* 1992 Jan;4(1):83-92.
- Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JW, Lye SJ, Letarte M. *Endocrinology.* 1997 Nov;138 (11):4977-88. Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants.
- Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, Brewer HB Jr. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7987-92.
- Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Jan 22;99(2):1098. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter.
- Paik YK, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, Taylor JM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 May;82 (10):3445-9. Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene.
- Letamendia A, Lastres P, Almendro N, Raab U, Buhning H, J, Kumar S and Bernabeu C (1998) *Int J Cancer* 541-546 Endoglin, a component of the TGF-beta receptor system, is a differentiation marker of human choriocarcinoma cells.
- Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J, Caira F, Veysiere G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM. *Mol Endocrinol.* 2004 Apr;18(4):888-98. Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes.
- Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J.-M. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., and Mangelsdorf, D. J. (2000) *Science* **289**, 1524-1529 Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers
- Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E. T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* 2007 May 1;581(9):1721-6.
- Houck KA, Borchert KM, Hepler CD, Thomas JS, Bramlett KS, Michael LF, Burris TP. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab.* 2004 Sep-Oct;83 (1-2):184-7.
- Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem.* 2003 Mar 21;278(12):10443-9.
- Mo J, Fang SJ, Chen W, Blobel GC. Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXRbeta. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50788-94.
- Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L, Tontonoz P. *J Biol Chem.* 2004 Mar 12; 279 (11): 9905-11. Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4604-13.
- Beaven SW, Tontonoz P. Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu Rev Med.* 2006;57:313-29. Review.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell.* 1998 May 29;93 (5):693-704.
- Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Dechelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JM. Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem.* 2007 Feb 16;282 (7):4693-701.
- Guerrero-Esteo M, Lastres P, Letamendia A, Pérez-Alvarez MJ, Langa C, López LA, Fabra A, García-Pardo A, Vera S, Letarte M, Bernabéu C. *Eur J Cell Biol.* 1999 Sep;78(9):614-23. Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts.
- Conley BA, Koleva R, Smith JD, Kacer D, Zhang D, Bernabeu C, Vary CP. 2004. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem.* 279: 27440-9.
- Liu Y, Jovanovic B, Pins M, Lee C, Bergan RC. *Oncogene.* 2002 Nov 28;21(54):8272-81. Over expression of endoglin in human prostate cancer suppresses cell detachment, migration and invasion.
- C.H. Graham, J.J. Lysiak, K.R. McCrae and P.K. Lala , Localization of transforming growth factor-β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation. *Biol. Reprod.* 46 (1992), pp. 561-572.
- Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. 1996 Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on



- the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*. 124:261-271.
- 32 Perkins AV. 2006 Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. Apr;46 (2):77-83.
- 33 Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1592-4. Review.

34. Maynard S, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and Angiogenic Imbalance. *Annu Rev Med*. 2007 Oct 15

**Table 1. Sequences of putative LXREs (DR4) identified in Eng promoter**

Oligonucleotide	Sequence 5'→3'	Position
LXRE1	CTCGAACTCC <b>TGACCT</b> caag <b>TGATCC</b> GTCTGCCTCG	-648/-632
LXRE2	TGTAGTGTCC <b>TGACCC</b> tcag <b>AAATCT</b> CATAATGGCT	-1072/-1056
LXRE3	TAAGGCGGGT <b>GGATCA</b> cttg <b>AGGTC</b> AGGAGTTCAAG	-3931/-3915
LXRE4	AACAGGTTGG <b>GGGTTA</b> ctgg <b>AGGGCA</b> TCACAGCCGC	-4527/-4543
LXRE4mut	AACAGGTTGG <b>GGATGA</b> ctgg <b>AGGGCA</b> TCACAGCCGC	-4527/-4543
LXRE5	CTCAAACCTCC <b>TGACCT</b> catg <b>TGATCC</b> ACCCACCTTG	-4923/-4907
LXRE6	CTCGAACTCC <b>TGACCT</b> cagg <b>TGATCC</b> ACCTGCCTCG	-5258/-5242

- 15 Bold letters indicate the core of the putative RXR and LXR binding sites. Lower inner cases represent the four nucleotides separating the two binding sites in each DR4. The sequence of LXRE4 surrounded by 10 nucleotides on each side was used as a radiolabeled probe in EMSA. Underlined letters represent the mutations introduced in the LXRE4 motif. Positions of each LXRE along the Eng promoter was indicated on the right.



*Revue générale et chapitres  
d'ouvrages*



**Article 3** : Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle.

Article publié dans *Andrologie*, 2005, 15 (2):151-159.

David Volle, Jean-Marie Frenoux, Kevin Mouzat, Patrick Vernet, Magali Prod'Homme, Aurore Britan, Fabrice Saez, Joëlle Henry-Berger, Ayhan Kocer, Françoise Caira, Georges Veysiere, Joël R. Drevet, Jean-Marc Lobaccaro.



# Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle\*

David H. VOLLE<sup>1</sup>, Jean-Marie FRENOUX<sup>2</sup>, Kevin MOUZAT<sup>1</sup>, Patrick VERNET<sup>2</sup>,  
Magali PROD'HOMME<sup>1</sup>, Aurore BRITAN<sup>2</sup>, Fabrice SAEZ<sup>2</sup>, Joëlle HENRY-BERGER<sup>1</sup>,  
Ayhan KOCER<sup>2</sup>, Françoise CAIRA<sup>1</sup>, Georges VEYSSIERE<sup>1</sup>, Joël R. DREVET<sup>2a</sup>,  
Jean-Marc A. LOBACCARO<sup>1a</sup>

<sup>1</sup> Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, <sup>2</sup> Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles, UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547- GEEM, Aubière, France

## RESUME

Les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR (*Liver X receptor*)  $\alpha$  et LXR $\beta$  sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont activés par une série particulière d'oxystérols. Des antagonistes naturels ont été également identifiés comme les acides gras poly-insaturés ou certains sulfates de cholestérol plasmatiques. L'étude des souris déficientes en LXRs a permis de les associer à la régulation de nombreux métabolismes (cholestérol, acides gras, glucose, stéroïdes).

Les LXRs et leur partenaire RXR (récepteur de l'acide rétinolique 9-*cis*) sont exprimés dans le tractus génital mâle et les testicules, et leurs ligands y sont à des concentrations physiologiquement actives. Dans ces organes, l'homéostasie du cholestérol doit être strictement régulée car 1) le cholestérol est un précurseur indispensable pour la synthèse des stéroïdes testiculaires ; 2) pendant la maturation épидидymaire, la membrane plasmique des spermatozoïdes subit des changements de composition notamment la diminution de cholestérol et de lécithines.

L'analyse des souris déficientes en récepteurs LXR  $\alpha$  et LXR $\beta$  a mis en évidence une déstructuration de la couche épithéliale du segment 2 de la tête de l'épididyme, ainsi qu'une fragilité des spermatozoïdes recueillis. Au total, les analyses de physiologie intégrative et moléculaire mettent en évidence le rôle des récepteurs nucléaires LXRs dans la physiologie de la reproduction chez le mâle.

**Mots-clés :** récepteurs nucléaires, LXR, homéostasie du cholestérol, cholestérol, épидидyme, reproduction

## I. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES DES OXYSTEROLS LXRS (*Liver X Receptor*)

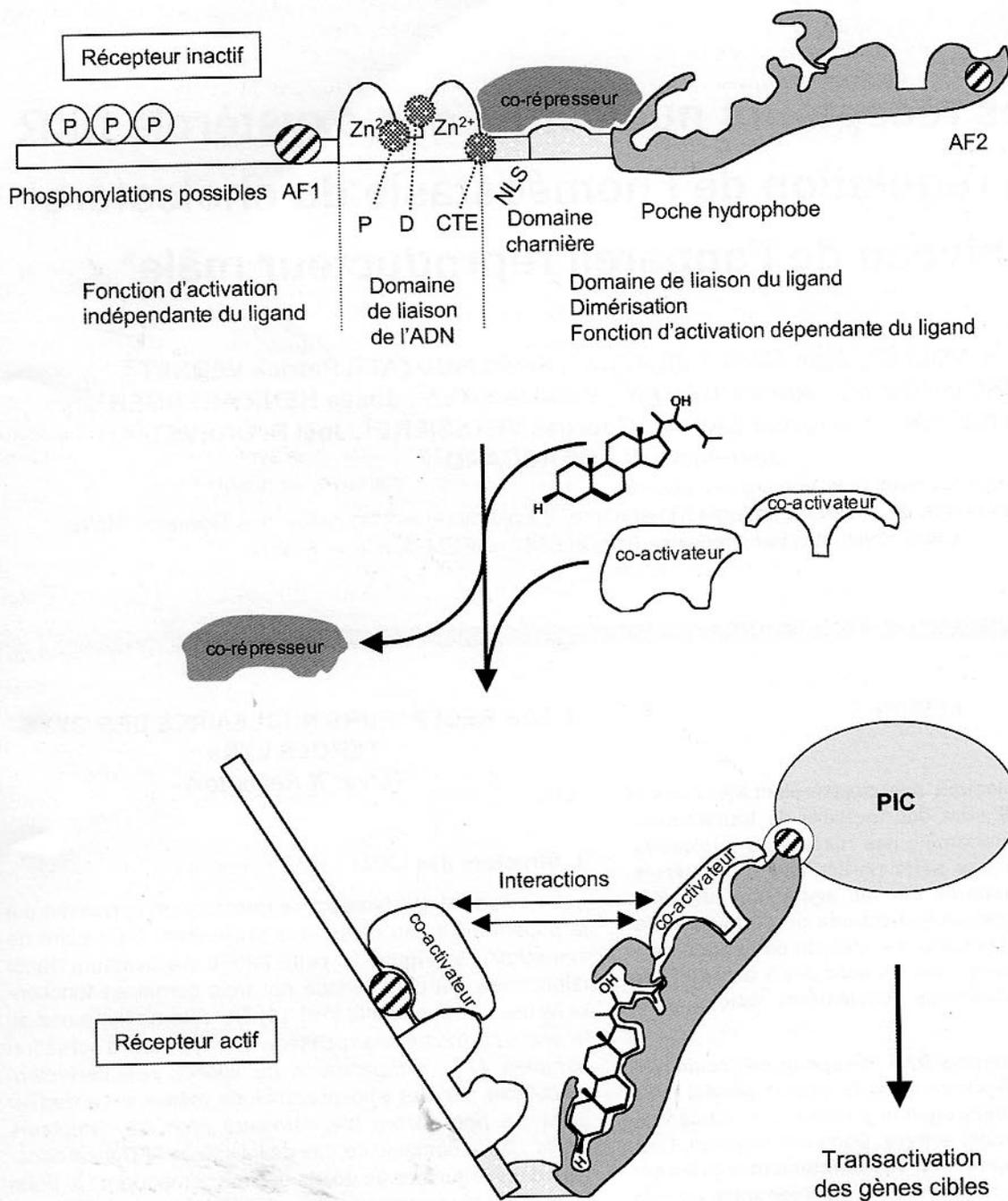
### 1. Structure des LXRS

Les LXRS sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. D'un point de vue structural (Figure 1), cette famille d'activateurs transcriptionnels est caractérisée par trois domaines fonctionnellement indépendants [19]. (1) Du côté amino-terminal, le domaine modulateur possède une fonction d'activation nommée AF1, indépendante du ligand, potentiellement modulable par des phosphorylations même si ce dernier point n'a pas encore été démontré pour les récepteurs LXRS. (2) Le domaine central de liaison de l'ADN est constitué d'une structure en doigts de zinc comportant : la boîte P (trois résidus acides aminés définissant la spécificité de fixation à l'élément de réponse hormonale), la boîte D (responsable de l'hétérodimérisation avec RXR, le récepteur de l'acide rétinolique 9-*cis*), la région CTE (*carboxy-terminal extension*). La présence de ce domaine central signe véritablement l'appartenance à la super-famille. (3) Le domaine carboxy-terminal se décompose en plusieurs

Correspondance :

Pr. Jean-Marc A. LOBACCARO - Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, UMR CNRS-Université Blaise Pascal 6547, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière, France  
- Tel (33) 473 40 74 16 - Fax (33) 473 40 70 42 -  
Email j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr





**Figure 1. Représentation schématique du récepteur LXR et principales fonctions des différents domaines.**

Le ligand utilisé dans ce schéma est le 22(R)-hydroxycholestérol, présent à forte concentration dans les tissus stéroïdogènes. AF1, domaine d'activation indépendant du ligand ; AF2, domaine d'activation dépendant du ligand ; P, séquence peptidique de reconnaissance de l'élément de réponse hormonal ; D, séquence peptidique impliquée dans la dimérisation avec RXR ; CTE, extension peptidique carboxy-terminale ; NLS, signal de localisation nucléaire ; P, phosphorylations. D'après [32].



sous-régions : un domaine charnière qui permet la fixation des co-répresseurs et contient une partie de la séquence de localisation nucléaire (NLS) ; la poche hydrophobe de liaison du ligand ; une région transactivatrice (AF2) qui est démasquée après fixation du ligand et qui peut recruter les co-activateurs. Enfin, certains déterminants peptidiques sont également impliqués dans la dimérisation du récepteur avec RXR.

## 2. Mode d'action des LXRs

Il existe deux isoformes (LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ) ayant jusqu'à 80% d'identité dans les domaines de liaison de l'ADN et de l'hormone [21]. L'analyse des profils d'expression montre que LXR $\beta$  est ubiquiste, alors que LXR $\alpha$  a une expression restreinte à des tissus présentant un fort métabolisme lipidique tels que le foie, les tissus adipeux brun et blanc, les tissus stéroïdogènes [24]. Dans leur configuration canonique, les LXRs forment des hétérodimères avec le récepteur nucléaire RXR (*retinoid X receptor*). En l'absence de ligand, l'hétérodimère est fixé constitutivement sur les éléments de réponse à l'ADN, séquences de type DR4 (*Direct Repeat 4*), situées dans la région promotrice des gènes cibles, constituées de la répétition d'hexamères (AGGTCA) espacés de quatre nucléotides. En absence de ligand, RXR/LXR est associé avec des co-répresseurs qui recrutent des histones dé-acétylases et gardent la chromatine dans un état condensé, entraînant la répression des gènes cibles. La présence d'un des deux ligands induit le départ des co-répresseurs et le recrutement de co-activateurs spécifiques

permettant l'acétylation de la chromatine par des histones acétyl-transférases, créant ainsi un environnement permissif pour l'initiation de transcription (Figure 2). L'hétérodimère RXR/LXR est dit permissif : les ligands de chaque récepteur peuvent activer la transcription des gènes cibles, et la liaison des deux ligands a un effet additif voire synergique sur la transcription des gènes cibles [36].

## 3. Les ligands des LXRs

Les LXRs sont activés par une série d'oxystérols spécifiques du lieu de synthèse [12] : le 24(S),25-époxycholestérol dans le foie, le 24(S)-hydroxycholestérol dans le cerveau; le 27-hydroxycholestérol dans les macrophages et le 22(R)-hydroxycholestérol, intermédiaire de la biosynthèse des stéroïdes, dans les tissus stéroïdogènes (Figure 3 et [32]). Le FF-MAS (*follicular fluid meiosis activating sterol* ; Figure 3), intermédiaire de la synthèse du cholestérol à partir du lanostérol retrouvé en quantité importante dans les follicules pré-ovulatoires, est un activateur efficace de LXR $\alpha$ [11]. Cependant, l'aptitude à la reprise de la méiose sur les ovocytes ne semble pas passer par les LXRs [8]. L'effet hypocholestérolémiant des LXRs a conduit de nombreux groupes pharmaceutiques à développer des agonistes non stéroïdiens spécifiques, tels que le T0901317 ([25] ; Figure 3).

Des antagonistes naturels des LXRs ont également été décrits : les hydroxy-cholestérol sulfatés (dont l'accumulation a des conséquences dramatiques au niveau de la plaque d'athérome), et certains acides gras poly-insaturés

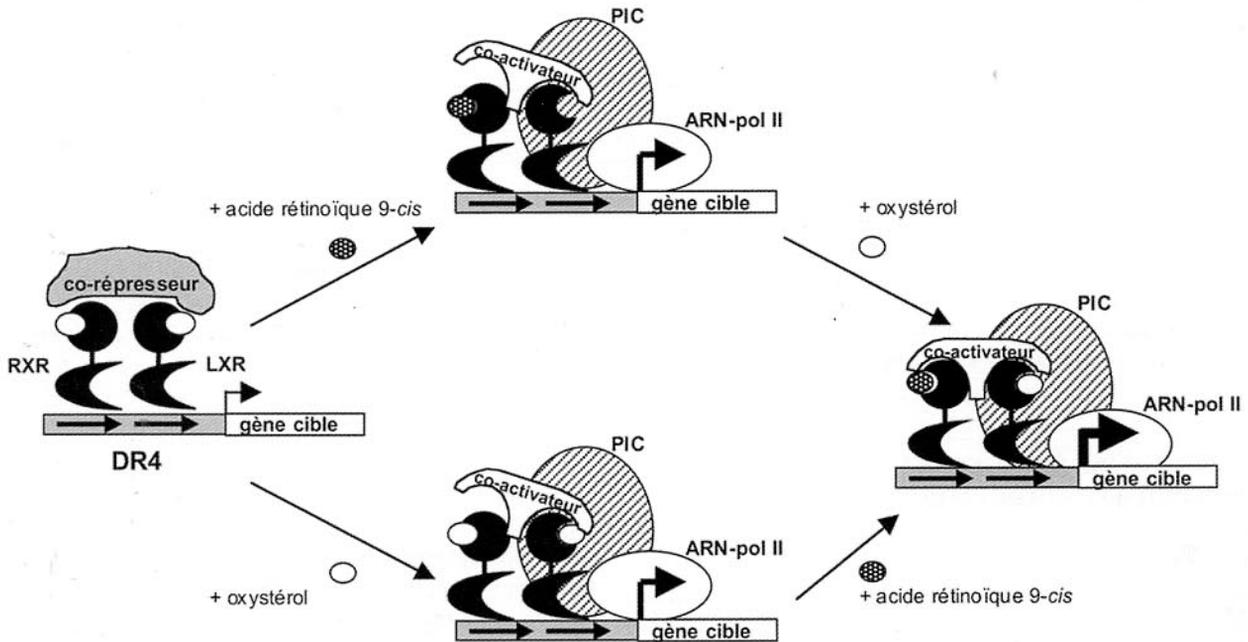


Figure 2. Mécanisme d'action de l'hétérodimère RXR/LXR sur la transcription d'un gène cible.

L'hétérodimère RXR/LXR peut être activé à la fois par l'acide rétinoïque 9-cis et l'oxystérol. La double induction induit une activité additive voire synergique sans doute par un recrutement plus efficace des co-activateurs. DR4, élément de réponse/de fixation des récepteurs LXR/RXR ; ARN-pol II, ARN polymérase II ; PIC, complexe de pré-initiation de la transcription. D'après [22].



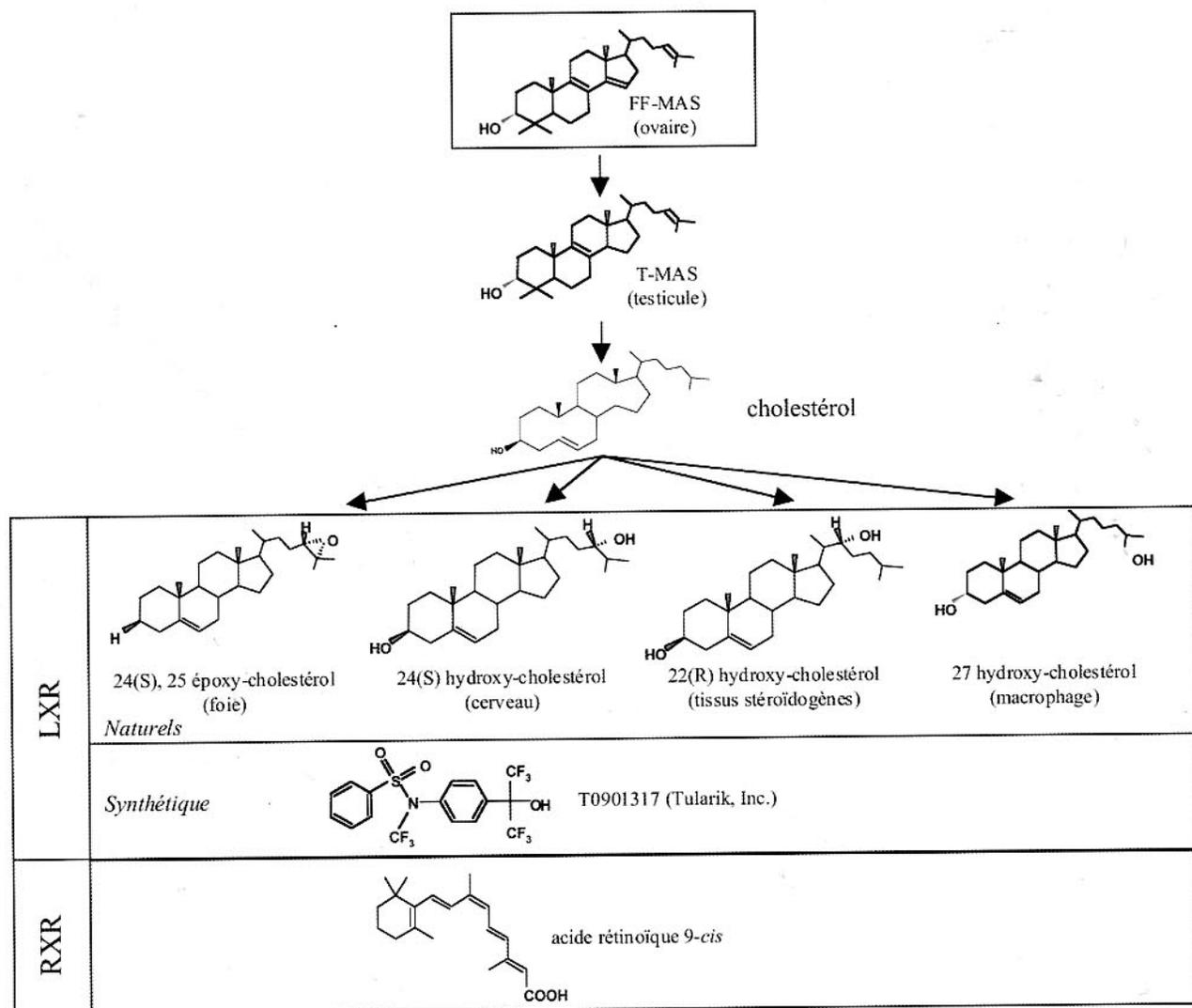


Figure 3. Agonistes naturels et synthétiques des LXRs.

Les ligands, spécifiques de certains tissus, ont des affinités et des capacités d'activation différentes pour les LXRs. Les ligands synthétiques ont une affinité de l'ordre de  $10^{-7}M$  (vs  $10^{-5}M$  pour les ligands naturels). Le T0901317 utilisé dans nos travaux est indiqué. Les FF-MAS et T-MAS se trouvent en amont de la synthèse du cholestérol. Le cholestérol (non ligand) et l'acide rétinolique 9-*cis* (ligand naturel de RXR) sont indiqués. D'après [32].

(pour une revue lire, [32]). La transformation de macrophages en cellules spumeuses « surchargées » en cholestérol, est considérée comme une part essentielle de l'initiation du développement de la plaque d'athérome. Cette accumulation de cholestérol dans les macrophages associe une entrée accrue de cholestérol, une diminution de sa sortie et de son transport inverse hépatique, et une synthèse *de novo* augmentée. Le 7-céto-cholestérol ainsi que le  $5\alpha,6\beta$ -époxy-cholestérol, composants des LDLs oxydés, sont retrouvés à de fortes concentrations dans les lésions d'athérosclérose. Sous leur forme 3-sulfatée, ces oxystérols sont des inhibiteurs des LXRs [31]. Cet effet inhibiteur est dépendant de l'interaction avec le domaine de liaison du

ligand des LXRs, et se traduit par un non-recrutement des co-activateurs. Ainsi, une concentration élevée de ces molécules semble avoir un effet inhibiteur de la capacité hypocholestérolémiante des récepteurs LXRs en diminuant la sortie du cholestérol et favorisant ainsi la transformation des macrophages en cellules spumeuses (cf. paragraphe 4).

#### 4. Fonctions physiologiques régulées par les LXRs

L'étude phénotypique de souris, dont les gènes codant LXR $\alpha$  [22] et/ou LXR $\beta$  [34] ont été invalidés par recombinaison homologe (*Lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>*) et l'analyse des protéines cibles identifiées (Figure 4) ont permis d'établir le rôle des



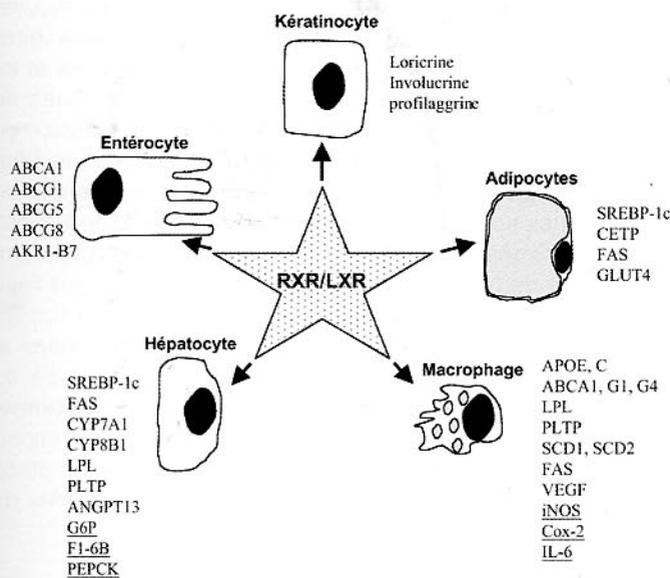


Figure 4. Quelques protéines cibles directes des récepteurs RXR/LXR dans les différents types cellulaires.

*ABCA1, ABCG1, ABCG4, ABCG5 et ABCG8*, transporteurs membranaires de la famille des ATP-binding cassettes ; *AKR1B7*, aldo-céto réductase 1-B7 ; *CYP7A1, CYP8B1, 7 $\alpha$  et 12 $\beta$ -hydroxylases* ; *LPL*, lipoprotein lipase ; *PLTP*, protéine de transfert des phospholipides ; *ANGPT13*, angiopoietin-like protein 3 ; *CETP*, protéine de transfert des esters de cholestérol ; *FAS*, synthase des acides gras ; *GLUT4*, transporteur 4 du glucose ; *SREBP-1c*, protéine 1c de liaison des éléments de réponse aux stérols ; *APOE et C*, apolipoprotéines E et C ; *SCD1 et 2*, stearoyl co-A decarboxylase ; *VEGF*, vascular endothelial growth factor ; *iNOS, NO synthase inducible* ; *IL-6*, interleukine 6 ; *COX-2*, cyclo-oxygénase 2 ; *G6P*, glucose-6-phosphatase ; *F1,6B*, fructose-1,6-biphosphatase ; *PEPCK*, phospho-énol-pyruvate carboxy kinase. Les protéines dont l'accumulation est diminuée sont soulignées. Les noyaux sont indiqués en noirs, les lipides en gris. Adapté d'après [32].

LXR $\alpha$  *in vivo* [27]. Schématiquement, ils contrôlent l'homéostasie de trois métabolismes cholestérol, acides gras et glycémie, et ils interviennent dans les processus inflammatoires.

Au niveau de l'homéostasie lipidique (cholestérol et acides gras), les LXR $\alpha$  sont considérés comme des facteurs **hypocholestérolémiant**s. Lorsque les souris *Lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>* sont nourries avec un régime riche en cholestérol, elles développent une hépatomégalie de type « foie gras », caractérisée par une accumulation d'esters de cholestérol dans les hépatocytes, non compensée par la présence de LXR $\alpha$  [22]. Chez les souris sauvages, le même régime induit *CYP7A1* via LXR $\alpha$ . Cette enzyme catalyse l'étape initiale et limitante de la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, et permet la transformation de l'excès de cholestérol en acides biliaires. La stéatose hépatique observée chez les sou-

ris *Lxr $\alpha$ <sup>-/-</sup>* est due à l'absence de régulation de *CYP7A1*. De plus, les LXR $\alpha$  stimulent l'expression de certains transporteurs de la famille ABC (*ATP-Binding Cassette*) comme *ABCA1* [5, 25], *ABCG1/ABCG8* [34], *ABCG5* et *ABCG8* [26]. Ces transporteurs membranaires sont responsables de la sortie de cholestérol des macrophages et des entérocytes. Les LXR $\alpha$  stimulent également le retour hépatique des lipides *via* la régulation des apolipoprotéines *ApoE/CII/CIV* [17]. On comprend donc que le blocage des ABC puisse induire l'accumulation cellulaire d'esters de cholestérol. En parallèle, l'activation de *srebp-1c* (*sterol regulatory element binding protein 1c*) [23], de *fas* (*fatty acid synthase*) [13] et d'*acc* (*acetyl-CoA carboxylase*) [29] confère aux LXR $\alpha$  un effet **hypertriglycéridémiant**, rendant à ce jour difficile l'utilisation en thérapie humaine de molécules agonistes [14] pour traiter l'athérosclérose. Des nouveaux ligands non hypertriglycéridémiants sont actuellement développés (pour une revue lire [32]).

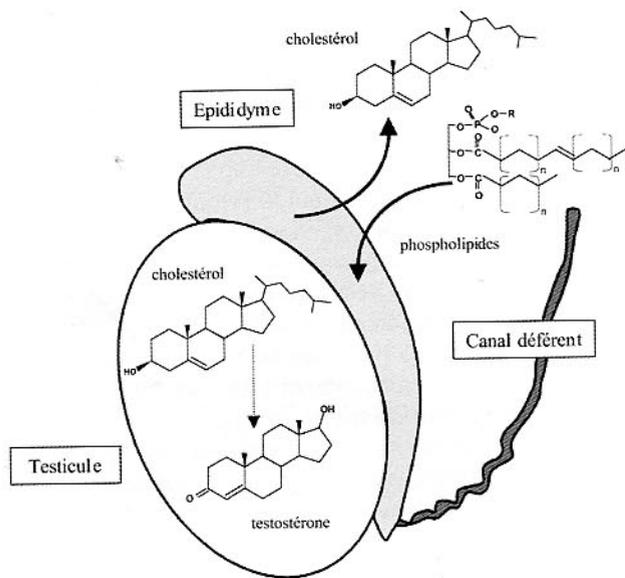
Les LXR $\alpha$  exercent un effet négatif sur l'expression des gènes codant la glucose-6-phosphatase, la fructose-1-6-biphosphatase et la phospho-énol-pyruvate carboxy-kinase (*PEPCK*) [4], inhibant ainsi la synthèse de glucose. A l'inverse, ils régulent positivement l'expression du gène codant le transporteur de glucose *glut4* [18], stimulant ainsi l'entrée de glucose dans l'adipocyte. Au total, les LXR $\alpha$  sont **hypoglycémiant**s.

Par ailleurs, les LXR $\alpha$  régulent négativement le **processus inflammatoire** en inhibant l'expression de médiateurs de l'inflammation dans le macrophage, comme *iNOS* (*inducible nitric oxide synthase*), *Cox-2* (*cyclooxygenase 2*) et *IL-6* (*interleukine-6*) [15]. De plus, LXR $\alpha$  permet la différenciation de l'épiderme chez la souris [16]. Cet effet impliquerait la synthèse de protéines de structure telles que la loricrine, l'involucrine et la proflaggrine. En outre, des travaux récents [35] ont identifié le gène *vegf* (*vascular endothelial growth factor*) comme cible des LXR $\alpha$ , suggérant leur rôle dans la régulation de l'**angiogénèse**.

## II. CONTRÔLE DE L'HOMÉOSTASIE DU CHOLESTÉROL DANS LE TRACTUS GÉNITAL MÂLE

Le cholestérol est un acteur important dans la maturation des spermatozoïdes tant au niveau testiculaire que post-testiculaire. Au niveau gonadique, c'est le précurseur indispensable à la synthèse des androgènes, facteurs clés de la différenciation mâle et de la spermiogénèse. De même, au niveau de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, les taux de cholestérol doivent être maintenus dans un intervalle étroit de concentration (Figure 5). En effet, il est clair maintenant que l'efflux de cholestérol entraînant des changements de fluidité membranaire constitue une partie du signal conduisant à la capacitation des spermatozoïdes (voir pour revue [1]). Une forte concentration en cholestérol membranaire peut inhiber indirectement la capacitation en rigidifiant la membrane, en diminuant les possibilités de liberté de conformation, et ainsi l'activité biologique des protéines qui se trouvent à la surface des sper-





**Figure 5. Représentation schématique du rôle des lipides dans l'appareil reproducteur masculin.**

**Le cholestérol est le précurseur de la voie de synthèse des androgènes. Au niveau épидидymaire, on note une modification du ratio cholestérol/phospholipides de la membrane des spermatozoïdes pendant leur trajet.**

matozoïdes. Un autre effet du cholestérol résulterait dans la modification de l'activité de transporteurs membranaires d'ions ou d'enzymes. Au niveau de la membrane enveloppant l'acrosome, il apparaît que le cholestérol membranaire n'est pas disposé au hasard mais organisé en « radeaux », c'est à dire, regroupé en sous-domaines [6]. Par analogie avec les cellules somatiques, il semble que cette organisation membranaire particulière soit impliquée dans la modulation des signaux de transduction membranaire ou le métabolisme cellulaire (pour une revue lire [33]).

Chez les mammifères, tout au long du trajet dans l'épididyme, la membrane des spermatozoïdes subit une modification du ratio stérols/phospholipides. Il est très difficile de généraliser car selon les espèces les mouvements de stérols au cours de la maturation épидидymaire sont très variables. Plusieurs auteurs ont rapportés que la quantité de stérols dans la membrane des spermatozoïdes de mammifères a tendance à diminuer au cours de la maturation épидидymaire [1, 9, 20]. Pour d'autres espèces, on assiste à des remplacements du cholestérol par une forme dérivée du cholestérol (cholestérol sulfates ou esters de cholestérol) ou par un autre stérol (desmostérol) permettant de garder invariante la quantité de stérols au cours de la maturation épидидymaire [1]. De façon intéressante, les stérols sulfatés sont des inhibiteurs de l'acrosome, permettant ainsi de prévenir d'une libération prématurée des enzymes protéolytiques responsables de la réaction acrosomique. Cette inhibition est levée dans le tractus génital femelle sous l'action de sulfatases [2, 28]. Parallèlement, les cholestérols sulfa-

tes sont aussi des inhibiteurs des LXR [31]. Ces mouvements de stérols lors de la maturation épидидymaire impliquent qu'il doit exister dans le compartiment luminal et au niveau de l'épithélium épидидymaire des phénomènes de transports actifs des stérols. En effet, la simple diffusion du cholestérol est impossible dans le milieu aqueux environnant les spermatozoïdes, il n'est donc pas surprenant de trouver des accepteurs de cholestérol dans le fluide luminal. De même, des apolipoprotéines et des transporteurs membranaires de type ABC ont été trouvés exprimés dans l'épididyme [10]. Les récepteurs nucléaires LXRs participent probablement à cette homéostasie locale du cholestérol et de ses dérivés dans l'épididyme. Il n'est pas illusoire de supposer que les différents stérols perdus par les spermatozoïdes lors de leur maturation épидидymaire soient importés dans les cellules épithéliales dans lesquelles, en partie *via* les LXRs, ils coordonnent un ensemble de gènes du métabolisme lipidique.

### III. RÔLE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES LXRS DANS L'ÉPIDIDYME

L'importance du contrôle de l'homéostasie lipidique dans la maturation des spermatozoïdes nous a amené à analyser le rôle des LXRs dans l'épididyme. De plus, nous avons montré que les souris mâles dont les deux gènes  $LXR\alpha$  et  $LXR\beta$  avaient été invalidés par recombinaison homologue présentaient une stérilité secondaire à l'âge de 6-7 mois, alors qu'une souris sauvage mâle est fertile jusqu'à 24 mois (DH Volle, manuscrit soumis). Puisque la fertilité n'était pas altérée chez les souris transgéniques jeunes et ainsi leur spermatogenèse semblait suffisante à cet âge, nous avons recherché l'impact de l'absence des LXR au niveau de l'épididyme [7].

L'étude des transcrits de  $LXR\alpha$  et  $LXR\beta$  par RT-PCR (ou de la protéine dans le cas de  $LXR\alpha$ ) montre une expression de ces gènes dans la tête et la queue de l'épididyme, avec un niveau plus intense pour l'isoforme bêta que alpha, et un gradient tête-corps-queue pour  $LXR\alpha$ . L'analyse histologique des épидидymes fait apparaître une forte désorganisation de l'épithélium de la région proximale de la tête (segments 1 et 2) associant une disparition totale des microvillosités caractéristiques et un élargissement de la lumière, lié à la présence de matière amorphe non lipidique (Figure 6). L'apparition de ce phénotype commence vers 6 mois et la désorganisation est totale vers 10 mois. Il est intéressant de noter que l'absence d'une seule des deux isoformes (alpha ou bêta) n'est pas suffisante pour altérer la structure de l'épithélium au même âge. La présence de nombreuses vésicules réfringentes est également visible au niveau de l'épithélium des segments 1 et 2, ainsi que dans le tissu conjonctif environnant, et ce uniquement dans les coupes d'épididymes provenant de souris déficientes en LXRs. Le nombre et la taille de ces vacuoles augmentent avec l'âge des souris. La coloration à l'huile rouge de coupes d'épididyme a clairement montré une accumulation de lipides neutres. La composition exacte de ces lipides est en cours d'analyse. De façon intéressante, les souris transgéniques présentent une diminution des concentrations plasmatiques



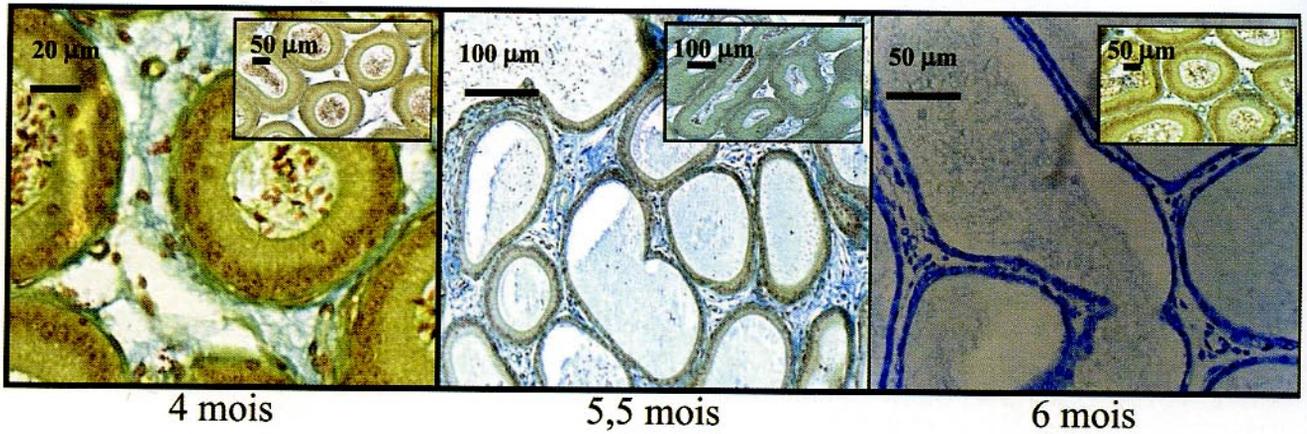


Figure 6. Analyse histologique du segment 2 de la tête de l'épididyme de souris *lxrα;β-/-* ou sauvage (inserts).

On peut observer l'élargissement de la lumière au niveau du segment 2 de la tête de l'épididyme et l'amincissement de l'épithélium. Cette déstructuration localisée de l'épithélium épидидymaire apparaît dans une fourchette de temps étroite entre 5 mois et 6 mois d'âge.

et testiculaires en androgènes (DH Volle, manuscrit soumis) pouvant, *a priori*, expliquer le développement du phénotype épидидymaire au cours du temps. Le traitement pendant 15 jours de souris *lxrα;β-/-* de 7,5 à 10 mois par les androgènes n'a pas permis de restaurer une structure normale suggérant ainsi que la diminution des androgènes testiculaires ne peut à elle seule expliquer la survenue du phénotype épидидymaire.

Les LXR étant des facteurs de transcription, il était intéressant de tester la présence d'une dérégulation transcriptionnelle de gènes cibles potentiels chez les animaux transgéniques. Nous avons focalisé notre étude sur les gènes *gpx5* et *pea3*, spécifiques de la tête de l'épididyme, et *gpx3*, marqueur de la queue de l'organe. Les analyses par *northern blot* montrent une diminution significative de l'accumulation des transcrits *gpx5* et *pea3* au niveau de la tête. Ces gènes étant exprimés préférentiellement dans les cellules épithéliales, la diminution de leur expression semble *a priori* secondaire à la déstructuration du tissu.

L'accumulation des lipides neutres observée en histologie est à mettre en rapport avec l'absence d'expression du gène *abcg1/abc8*, codant un transporteur membranaire du cholestérol : les souris sauvages nourries avec l'agoniste synthétique T0901317 présentent une augmentation de l'accumulation du transcrit par rapport aux témoins. La régulation d'*abcg1/abc8* par les LXR a également été observée dans les cellules TCC de la tête de l'épididyme, démontrant ainsi l'utilité de cette nouvelle lignée [3] pour le criblage de nouveaux gènes cibles des LXR dans l'épididyme. Ce travail de recherche est en cours de réalisation.

Certains segments de l'épididyme étant fortement affectés par la perte des LXR, nous avons analysé la morphologie des spermatozoïdes recueillis dans la queue de l'épididyme de souris sauvages et *lxrα;β-/-* de 12 mois. Les souris trans-

géniques présentaient une oligo-tératospermie, associant une fragilité de la structure puisque la tête était systématiquement séparée du corps et un flagelle anormal avec des degrés d'angularité variables pouvant aller jusqu'à une structure en épingle à cheveux, identique à celle observée chez la souris sur-exprimant *gpx5* [30]. Les causes de la fragilité et de l'anomalie structurale n'ont pas encore été identifiées.

#### IV. CONCLUSIONS

Les données présentées démontrent le rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la physiologie de la reproduction chez le mâle, en particulier dans le maintien des structures cellulaires épидидymaires. L'efflux du cholestérol membranaire des spermatozoïdes contribue au contrôle de la capacitation ; les mécanismes moléculaires de cet effet ne sont qu'imparfaitement compris. La connaissance des processus permettant les échanges du cholestérol au niveau des spermatozoïdes contribuera sans doute à appréhender les signaux qui régulent leur maturation.

L'utilisation conjointe de souris dont les gènes codant les LXR ont été invalidés et d'agonistes spécifiques des deux isoformes ouvrent de plus des perspectives de recherche pour la caractérisation de nouveaux gènes cibles des oxystérols et de l'acide rétinoïque 9-*cis* au niveau des territoires sexuellement différenciés chez le mâle.

Ces résultats posent aussi la question d'une utilisation à long terme d'agonistes spécifiques utilisés en thérapeutique en vue de faire baisser le cholestérol sanguin et soulignent l'intérêt fondamental de connaître le rôle physiologique des LXR dans ces organes.



## REFERENCES

- AWANO M., KAWAGUCHI A., MOHRI H. : Lipid composition of Hamster epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 1993, 99: 375-383.
- BOUTHILLIER M., BLEAU G., CHAPDELAINE A., ROBERTS K.D. : Distribution of steroid sulfotransferase in the male hamster reproductive tract. *Biol. Reprod.*, 1984, 31 : 936-941.
- BRITAN A., LAREYRE J.J., LEFRANCOIS-MARTINEZ A.M. et al. : Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2004, 224 : 41-53.
- CAO G., LIANG Y., BRODERICK C.L. et al. : Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278 : 1131-1136.
- COSTET P., LUO Y., WANG N., TALL A.R. : Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 28240-28245.
- CROSS N.L. : Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 1998, 59 : 7-11.
- FRENOUX J., VERNET P., VOLLE D.H. et al. : Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J. Mol. Endocrinol.*, 2004, 33 : 361-375.
- GRONDAHL C., OTTESEN J.L., LESSL M. et al. : Meiosis-activating sterol promotes resumption of meiosis in mouse oocytes cultured in vitro in contrast to related oxysterols. *Biol. Reprod.*, 1998, 58 : 1297-1302.
- HALL J.C., HADLEY J., DOMAN T. : Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl.*, 1991, 12 : 76-87.
- HSIA N., CORNWALL G.A. : DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis. *Biol. Reprod.*, 2004, 70 : 448-457.
- JANOWSKI B.A., WILLY P.J., DEVI T.R., MANGELSDORF D.J. : An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 1996, 383 : 728-731.
- JANOWSKI B.A., GROGAN M.J., JONES S.A. et al. : Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 1999, 96 : 266-271.
- JOSEPH S.B., LAFFITTE B.A., PATEL P.H. et al. : Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 : 11019-11025.
- JOSEPH S.B., 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 : 7604-7609.
- JOSEPH S.B., CASTRILLO A., LAFFITTE B.A., MANGELSDORF D.J., TONTONOZ P. : Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.*, 2003, 9 : 213-219.
- KOMUVES L.G., SCHMUTH M., FOWLER A.J. et al. : Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, 118 : 25-34.
- LAFFITTE B.A., REPA J.J., JOSEPH S.B. et al. : LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 2001, 98 : 507-512.
- LAFFITTE B.A., CHAO L.C., 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. U S A*, 2003, 100 : 5419-5424.
- LOBACCARO J.M., REPA J.J., LU T.T. et al. : Régulation du métabolisme lipidique par les récepteurs nucléaires orphelins. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 2001, 62 : 239-347.
- PARKS J.E., HAMMERSTEDT R.H. : Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol. Reprod.*, 1985, 32 : 653-668.
- PEET D.J., JANOWSKI B.A., MANGELSDORF D.J. : The LXRs : a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998, 8 : 571-575.
- PEET D.J., TURLEY S.D., MA W. et al. : Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 1998, 93 : 693-704.
- REPA J.J., LIANG G., OU J. et al. : Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.*, 2000, 14 : 2819-2830.
- REPA J.J., MANGELSDORF D.J. : The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2000, 16 : 459-481.
- REPA J.J., TURLEY S.D., LOBACCARO J.M.A. et al. : Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, 2000, 289 : 1524-1529.
- REPA J.J., BERGE K.E., 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 : 18793-18800.
- REPA J.J., MANGELSDORF D.J. : The liver X receptor gene team : potential new players in atherosclerosis. *Nat. Med.*, 2002, 8 : 1243-1248.
- ROBERTS K.D. : Sterol sulfates in the epididymis : synthesis and possible function in the reproductive process. *J. Steroid Biochem.*, 1987, 27 : 337-341.
- SCHULTZ J.R., TU H., LUK A. et al. : Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.*, 2000, 14 : 2831-2838.
- SIPILA P., COOPER T.G., YEUNG C.H. et al. : Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16 : 2603-2617.
- SONG C., HIIPAKKA R.A., LIAO S. : Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors : implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids*, 2001, 66 : 473-479.
- SOUIDI M., DUBRAC S., PARQUET M. et al. : Oxystérols : métabolisme, rôle biologique et pathologies associées. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 2004, 28 : 279-293.
- TRAVIS A.J., KOPF G.S. : The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110 : 731-736.
- VENKATESWARAN A., REPA J.J., LOBACCARO J.M. et al. : Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 14700-14707.
- WALCZAK R., JOSEPH S.B., LAFFITTE B.A. et al. : Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279 : 9905-9911.
- WILLY P.J., UMESONO K., ONG E.S. et al. : LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.*, 1995, 9 : 1033-1045.



\* Une partie du travail a bénéficié du soutien de l'Université Blaise Pascal, du CNRS, de la Fondation pour la Recherche Médicale (#INE2000-407031/1), de la Fondation BNP-Paribas.

<sup>a</sup> contribution équivalente.

## ABSTRACT

### Role of LXR nuclear oxysterol receptors in male reproduction

David H. VOLLE , Jean-Marie FRENOUX, Kevin MOUZAT, Patrick VERNET, Magali PROD'HOMME, Aurore BRITAN, Fabrice SAEZ, Joëlle HENRY-BERGER, Ayhan KOCER, Françoise CAIRA, Georges VEYSSIERE, Joël R. DREVET and Jean-Marc A. LOBACCARO

Nuclear oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ , are transcription factors that belong to the nuclear receptor superfamily. They bind and are activated by a specific class of oxysterols. Natural antagonists have also been described, such as polyunsaturated fatty acids or plasma sulfated oxysterols.

Phenotypic analysis of mice lacking LXR $\alpha$  and/or LXR $\beta$  demonstrated their roles in various physiologic processes and metabolisms (lipid or glucose homeostasis). LXR, as well as their heterodimeric partner RXR, the nuclear receptor for 9-*cis* retinoic acid, were shown to be expressed in male genital tracts and testes, and their respective ligands were found at physiologically active concentrations. In these organs, cholesterol homeostasis must be strictly regulated, as: 1) cholesterol is involved in androgen synthesis, and 2) during epididymal maturation of spermatozoa, the plasma membrane undergoes various modifications, mainly exchanges between cholesterol and phospholipids.

We recently described that knock-out mice for both LXR encoding genes presented structural abnormalities of the epithelium of the head of the epididymis. These mice also presented fragile spermatozoa. Integrative and molecular physiology studies demonstrate a new role of these nuclear receptors in male reproductive physiology.

**Key-words :** nuclear receptors, LXR, cholesterol homeostasis, male reproduction



**Article 4** : Criblage de nouveaux gènes cibles des récepteurs des oxystérols LXRs impliqués dans le maintien de l'épithélium épидидymaire et la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme.

Article publié dans *Andrologie*, 2006, 16 (1):16-23.

Ayhan Kocer, Fabrice Saez, Kevin Mouzat, Patrick Vernet, Jean-Marc A. Lobaccaro, Joël R. Drevet.



# Criblage de nouveaux gènes cibles des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR impliqués dans le maintien de l'épithélium épидидymaire et la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme

Ayhan KOCER, Fabrice SAEZ<sup>1</sup>, Kevin MOUZAT<sup>2</sup>, Patrick VERNET<sup>1</sup>,  
Jean-Marc A. LOBACCARO<sup>2</sup>, Joël R. DREVET<sup>1</sup>

Laboratoire de Biologie du Développement et de la Reproduction ; INRA, Jouy en Josas,  
<sup>1</sup>Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles ; UMR CNRS 6547-GEEM - Université Blaise Pascal, Aubière,  
<sup>2</sup>Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire ; UMR CNRS 6547-GEEM - Université Blaise Pascal, Aubière.

## RESUME

Les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR sont impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et le métabolisme lipidique. Les souris déficientes pour les 2 isoformes LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  présentent une perturbation sévère de la structure de l'épithélium des segments 1 et 2 de la tête de l'épididyme ainsi qu'une fragilité des spermatozoïdes. Ces altérations ont pour conséquence d'engendrer une stérilité totale chez les souris mâles âgées de 10 mois.

A ce jour, aucun travail n'a été effectué sur le rôle des LXR au niveau de l'épididyme. Une lignée cellulaire issue de la tête de l'épididyme murin (cellules B2) a été utilisée pour rechercher *in vitro* des gènes cibles épидидymaires des LXR. La présence d'une isoforme des LXR (LXR $\alpha$ ) a été mise en évidence par immunocytochimie et la capacité de réponse des cellules B2 à un agoniste synthétique des LXR (T0901317) a été vérifiée. Ces résultats valident les cellules B2 comme modèle d'étude. Des analyses protéomiques en électrophorèse bidimensionnelle ont été menées sur les cellules B2 traitées au T0901317. Cela a permis d'isoler 8 protéines régulées positivement par les LXR. Une seule a pu être identifiée : la polyubiquitine, dont l'implication dans l'homéostasie cellulaire du cholestérol a déjà été rapportée.

**Mots clés :** épидидyme, récepteurs nucléaires, LXR, cholestérol, reproduction

## I. INTRODUCTION

### A. Epididyme

#### 1. Anatomico-histologie

Du préfixe grec épi (sur) et de la racine didyme (jumeau testicule), l'épididyme est un long canal, situé sur la face postérieure du testicule, qui relie les canaux efférents au canal déférent. Ce canal est très contourné et forme des lobules séparés par des travées conjonctives. Le canal épидидymaire est de longueur variable selon les espèces (un mètre chez la souris, cinq mètres chez l'homme et quatre vingt mètres chez l'étalon) [6]. Cet organe peut être divisé chez les mammifères en trois régions anatomiquement distinctes : la tête (région proximale ou antérieure) qui intègre l'extrémité des canaux efférents et le segment initial, le corps (partie médiane) et la queue (région distale ou postérieure) d'apparence plus bulbeuse, connectée au canal déférent [23, 27]. Chez la souris, la tête de l'épididyme peut être subdivisée, selon les auteurs, en 3 ou 5 régions, sur la base d'une séparation physique de sous territoires par l'intermédiaire de cloisons conjonctives ou septa [1] et/ou de caractéristiques structurales des cellules principales [2].

Correspondance :

Pr Joël DREVET - Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles. UMR CNRS 6547 - GEEM Université Blaise Pascal  
24 Avenue des Landais - 63177 Aubière. France -  
Tel 04 73 40 74 13 - Fax 04 73 40 70 42 -  
Email Joël.drevet@univ-bpclermont.fr



D'un point de vue histologique, la lumière de l'épididyme est bordée d'un épithélium pseudostratifié chez la souris, constitué de plusieurs types cellulaires : une couche de cellules principales où s'intercalent des cellules apicales, claires et en halo [57, 54]. Ces différents types de cellules présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées. Le diamètre du canal épидидymaire augmente de la tête vers la queue en raison de la diminution de la hauteur des cellules principales. La paroi du tubule est entourée de fibres musculaires lisses qui présentent des contractions péristaltiques régulières, contrôlées par des fibres nerveuses sympathiques contenues dans du tissu conjonctif [53].

## 2. Fonctions de l'épididyme

### **a) Transport, maturation, protection et stockage des spermatozoïdes**

Après avoir traversé les canaux efférents, les spermatozoïdes sont pris en charge par l'épididyme qui assure leur transit par les contractions des fibres musculaires lisses qui l'entourent afin de les acheminer vers la queue de l'épididyme. C'est au cours de ce transit que se fait la maturation des spermatozoïdes. En effet, d'un point de vue fonctionnel, les spermatozoïdes qui sortent des testicules sont immobiles et incapables de reconnaître et de féconder l'ovocyte. La maturation post-testiculaire, permettant aux spermatozoïdes d'acquérir le pouvoir fécondant et la mobilité, se déroule progressivement durant la traversée de l'organe et plus ou moins précocement selon les espèces. Cela se fait grâce à une interaction perpétuelle, tout le long de l'épididyme, entre les spermatozoïdes immatures et le microenvironnement intraluminal créé par l'épithélium épидидymaire. En effet, la composition du liquide intraluminal varie graduellement le long de l'épididyme de façon propre à chaque région de l'organe. Cela va ainsi créer un environnement unique dû, en partie, à la spécificité tissulaire, territoriale et cellulaire d'expression de gènes codant pour des protéines ubiquitaires ou spécifiques sécrétées ou relarguées par des processus apoclines [11, 34].

La composition du fluide résulte également de l'absorption de la majorité du liquide provenant des testicules *via* les canaux efférents dans un premier temps, puis au sein de l'épididyme du transport sélectif de composants provenant du sérum et de la sécrétion de macromolécules synthétisées par l'épithélium épидидymaire, plus particulièrement par les cellules principales (de la tête). L'ensemble de ces phénomènes va entraîner des modifications morphologiques et biochimiques des spermatozoïdes telles que le remaniement de leur membrane plasmique. Ces remaniements sont surtout des modifications de la composition lipidique et protéique de la membrane plasmique des spermatozoïdes qui seront abordés plus loin dans ce même chapitre. Le fluide épидидymaire va également participer à la survie des spermatozoïdes, par la présence de petites molécules organiques telles que le glucose, l'inositol ou la carnitine. Cette dernière est captée par les spermatozoïdes pour être transformée en acétyl carnitine qui sera utilisée comme un substrat énergétique pour la mobilité [9].

Le fluide épидидymaire va aussi maintenir l'intégrité des spermatozoïdes. En effet, les spermatozoïdes sont des cellules haploïdes avec un ADN fortement condensé, incapables de synthétiser des protéines et possédant un cytoplasme réduit. C'est pourquoi leurs propres protections face aux différents types d'agression telles que les attaques immunitaires, oxydatives et protéolytiques sont limitées. Cette protection est alors assurée d'une part par la présence de la barrière hémato-épидидymaire qui protège les spermatozoïdes contre le système immunitaire [49] et d'autre part par la sécrétion de protéines et de petites molécules protectrices par l'épithélium épидидymaire.

Les spermatozoïdes, plus que toute autre cellule, sont très exposés aux radicaux libres présents dans l'environnement à cause de la présence d'acides gras poly insaturés (AGPI) au niveau de leur membrane plasmique. Cette exposition est accrue par leur temps de passage et de stockage dans l'épididyme. Les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'affecter l'intégrité des spermatozoïdes soit en entraînant des dommages de l'ADN, soit en peroxydant les AGPIs de la membrane plasmique, d'où la nécessité d'une protection accrue au niveau de l'épididyme. Cette protection est assurée par la sécrétion de protéines telles que des glutathion peroxydases (GPXs) [64], des superoxyde dismutases (SOD) [48], la catalase [60] et la « clusterin » [15]. D'autres protéines comme la « Cystatin-related epididymal spermatogenic » (CRES) ont un rôle d'inhibiteur de protéase, protégeant les spermatozoïdes contre les dommages protéolytiques possibles en cas de libération prématurée des enzymes acrosomiales durant le transit épидидymaire [10]. Cette protection est maintenue même au niveau de la queue de l'épididyme qui sert de lieu de stockage pour les spermatozoïdes matures et assure le maintien de leur intégrité avant l'éjaculation.

### **b) Réorganisation de la membrane spermatique**

Le fluide épидидymaire, riche en lipides et protéines, va assurer des modifications morphologiques et biochimiques des spermatozoïdes, telles que le remaniement structural de leur membrane plasmique qui est à la base de la reconnaissance et de la fusion spermatozoïde-ovocyte.

#### *• Remodelage de la composition protéique*

Les modifications des protéines membranaires du spermatozoïde ont surtout lieu dans la partie proximale de l'épididyme. Elles consistent en des variations du degré de glycosylation [62, 61], de phosphorylation [46], d'oxydation des protéines [55], ou encore d'hydrolyses par le biais d'enzymes sécrétées dans le fluide (glycosidases, glycosyltransférases, hydrolases, protéases) [26]. De plus, la fixation aux spermatozoïdes de nouvelles protéines sécrétées par l'épididyme est le deuxième volet de la maturation membranaire des spermatozoïdes. Cette sécrétion de protéines se fait majoritairement au niveau de la tête de l'épididyme. En effet, 60% des protéines synthétisées dans la région proximale de l'épididyme chez les rongeurs sont sécrétées dans la lumière [63]. Chez d'autres mammifères comme le cheval, le bélier et le verat, 80% des protéines sont sécrétées dans la tête de l'organe et environ 15 pro-



téines différentes représentent la majorité des sécrétions [14]. Certaines, comme la protéine DE synthétisée et sécrétée par le segment proximal, viennent s'associer fortement à la région dorsale de l'acrosome du spermatozoïde par des liaisons ioniques [8]. La protéine DE semble jouer un rôle dans la reconnaissance entre les spermatozoïdes et l'ovocyte. Cette action a été mise en évidence suite à l'observation que l'immunisation de rats mâles et femelles par la protéine DE provoque une inhibition de la fertilité. D'autres protéines telles que la protéine P26h chez le hamster (orthologue de P34H chez l'homme), synthétisée au niveau du corps de l'épididyme, viennent se fixer dans la membrane plasmique au niveau de la région acrosomique du spermatozoïde *via* une ancre lipidique [22, 39, 40]. Cette protéine interviendrait dans la liaison des spermatozoïdes avec la zone pellucide des ovocytes. La plupart de ces protéines ont donc un rôle important dans l'acquisition du pouvoir fécondant.

A ce remodelage protéique s'ajoute un remodelage lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde.

#### • *Remodelage lipidique de la membrane plasmique*

La membrane cellulaire forme une barrière structurale plus ou moins perméable entre le cytoplasme et le compartiment extracellulaire. Elle forme également une matrice permettant l'incorporation de protéines. Elle est constituée d'un mélange hétérogène de phospholipides, de glycolipides, de stérols et de glycoprotéines [56]. La proportion relative de ces différents éléments varie au cours de leur maturation épидидymaire, aboutissant à une membrane possédant des propriétés particulières [25]. En effet, de manière générale, chez de nombreuses espèces, on observe au cours de la maturation épидидymaire une augmentation des AGPIs (acide docosapentaénoïque, acide docosahéxaénoïque) par rapport aux acides gras saturés (AGS) [24]. Dans le même temps, le rapport cholestérol/phospholipides (chol/PL) diminue entraînant une augmentation de la fluidité de la membrane plasmique du spermatozoïde. Le rapport chol/PL est à la fois un indicateur de la fluidité et un déterminant dans les phénomènes de capacitation et de réaction acrosomique. En effet, de nombreux auteurs ont montré que l'efflux du cholestérol joue un rôle important dans les phénomènes de capacitation des spermatozoïdes et dans la signalisation conduisant à la réaction acrosomique. L'efflux du cholestérol semble augmenter la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique du spermatozoïde permettant, entre autre, l'influx d'ions calciques qui vont déclencher l'activation de signaux de transduction conduisant à la capacitation [65]. La diminution du cholestérol membranaire engendre des changements de la structure de la membrane, lui donnant des capacités fusogéniques essentielles à la réaction acrosomique et à la fusion spermatozoïde-ovocyte. D'autre part, des récepteurs comme le récepteur au mannose sont démasqués suite à cet efflux. Ce récepteur est impliqué dans l'interaction entre le spermatozoïde et la zone pellucide de l'ovocyte qui contient des résidus mannose et des protéines mannosylées. L'efflux du cholestérol induit également une augmentation du pH intracellulaire qui est requise pour la réaction

acrosomique [13]. Tous ces événements indiquent un rôle central du cholestérol dans la physiologie et dans la maturation post testiculaire des spermatozoïdes.

### 3. Contrôle de l'expression des gènes épидидymaires

L'expression région-spécifique des gènes épидидymaires, accompagnant la segmentation fonctionnelle dans le sens antéropostérieur, sous-entend une régulation complexe et rigoureuse, reposant sur plusieurs niveaux.

Le premier niveau de régulation se fait *via* des facteurs provenant du fluide testiculaire. Cette régulation dite « lumicrine » a été mise en évidence après ligation des canaux efférents [31]. Son action porte principalement sur les cellules des segments initiaux et proximaux de la tête de l'épididyme. Les facteurs lumicrines, provenant majoritairement des testicules, peuvent être des composants solubles tels que des ions, des solutés organiques, des protéines et les androgènes associés aux « Sex Binding Proteins » (SBP) [43]. Parmi ces facteurs, on a identifié le « beta fibroblast growth factor » (bFGF) qui régule l'activité catalytique et le niveau d'expression de la  $\gamma$  glutamyl transpeptidase dans le segment initial de la tête de l'épididyme [36].

Le deuxième niveau de contrôle est réalisé par des facteurs dits paracrines. En effet, les activités de sécrétion d'une région de l'épididyme peuvent influencer ou réguler d'autres régions épидидymaires. Cela a été mis en évidence dans le modèle de souris invalidées pour le récepteur tyrosine kinase « c-ros » dont le phénotype est une absence de différenciation du segment initial de l'épididyme. Dans ce contexte, on enregistre des changements dans les profils d'expression génique et protéique des régions sous-jacentes [12]. Parmi ces facteurs paracrines, on trouve aussi la proenkephaline sécrétée par le segment initial de la tête de l'épididyme [21], ou les lipocalines comme l'« epididymal retinoic acid binding protein » (E-RABP) [38] sécrétée au niveau de la tête et du corps de l'épididyme. Cette dernière protéine semble être impliquée dans la régulation paracrine de l'expression de gènes en contrôlant la voie de signalisation de l'acide rétinoïque.

Enfin, à toutes ces régulations s'ajoute une régulation endocrine. Le mécanisme par lequel les systèmes endocriniens participent à l'expression des gènes épидидymaires de manière région spécifique peut être dû à une distribution restreinte des récepteurs et/ou des ligands [12]. Il est bien établi que la différenciation et les fonctions épидидymaires sont principalement sous le contrôle des androgènes tels que la testostérone dont la forme la plus active est la dihydrotestostérone (DHT) issue de la conversion de la testostérone *via* l'enzyme 5 $\alpha$  réductase présente au niveau des cellules épидидymaires [53]. Ces composés agissent *via* un récepteur nucléaire spécifique « Androgen Receptor » (AR). Une fois le complexe récepteur/ligand formé, celui-ci se fixe sur des séquences nucléiques spécifiques « Androgen Response Element » (ARE) situées sur les promoteurs des gènes cibles. Des expériences d'orchidectomie ont montré que les androgènes régulent l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines consi-



dérées comme des produits finaux de la différenciation cellulaire épithéliale tels que GPX5 et PEA3 [16, 37, 44, 17]. D'autres systèmes endocriniens peuvent contrôler l'expression régionalisée des gènes de l'épididyme. Ceci a pu être observé après l'inactivation de gènes tels que le gène codant pour le récepteur aux œstrogènes « Estrogen Receptor  $\alpha$  » (ER $\alpha$ ). Ce récepteur est principalement exprimé au niveau des canaux efférents et du segment 1 de la tête de l'épididyme et semble réguler la réabsorption du fluide luminal, le transport ionique et le maintien de la structure épithéliale [18, 29, 30]. Les souris mâles ER $\alpha$   $^{-/-}$  sont stériles, en partie suite à un défaut de réabsorption du fluide testiculaire par les canaux efférents.

De la même façon, il a été montré que l'acide rétinoïque peut participer à la modulation de l'expression régionalisée des gènes épидидymaires notamment à cause de la différence de distribution spatiale des récepteurs à l'acide rétinoïque « Retinoid Acid Receptor » (RAR) et « Retinoid X Receptor » (RXR) [68, 3]. Plus récemment, l'inactivation des gènes codant pour les récepteurs nucléaires « Liver X Receptor  $\alpha$  et  $\beta$  » (LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ) impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et le métabolisme lipidique, suggère aussi que les LXRs seraient impliqués dans le maintien de la structure de l'épithélium de l'épididyme au niveau des segments 1 et 2 de la tête [19].

## B. Les Récepteurs Nucléaires LXRs

L'accès privilégié aux modèles de souris invalidées pour les LXRs (collaboration : Pr J.M Lobaccaro, UMR 6547 GEEM) associé à l'observation d'un phénotype épидидymaire dans les doubles mutants LXR  $\alpha\beta$   $^{-/-}$ , nous a conduit à nous intéresser aux rôles joués par ces récepteurs nucléaires aux oxystérols dans la physiologie de l'épididyme.

Les récepteurs LXRs codent pour des facteurs de transcription qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il existe deux isoformes LXR $\alpha$  ou NR1H3 [5] et LXR $\beta$  ou NR1H2 [58]. L'analyse des séquences ADN a montré que ces deux récepteurs présentent une identité de 77% dans les domaines de liaison du ligand (LBD) et de liaison à l'ADN (DBD). Les profils d'expression des deux récepteurs sont différents : LXR $\alpha$  est préférentiellement exprimé dans les tissus où le métabolisme lipidique joue un rôle important (foie, rein, tissu adipeux...) alors que LXR $\beta$  semble s'exprimer de façon plus ubiquiste [41, 42]. Ces récepteurs agissent en formant des hétérodimères obligatoires avec le RXR qui est le récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque. L'hétérodimère est permissif car il peut être activé à la fois par les ligands de LXR et/ou de RXR. L'hétérodimère LXR/RXR se lie à des éléments de réponse « Liver X Response Element » (LXRE) de type « Direct Repeat » (DR4), c'est à dire une séquence hexanucléotidique imparfaite répétée et séparée de quatre nucléotides (la séquence canonique du DR4 est la suivante : TGGTCAnnnnAGTTCA). Les ligands naturels activant les LXRs sont des oxystérols qui sont des dérivés métaboliques du cholestérol [20, 33]. Les agonistes synthétiques ont été développés pour les LXRs et les RXRs tels que le T0901317 [52] et le LG 268, respectivement [66].

## 1. Rôles des LXRs

Les LXRs jouent un rôle décisif dans l'homéostasie du cholestérol et le métabolisme lipidique. Ceci a été mis en évidence par la création par recombinaison homologique d'un modèle murin invalidé pour le gène LXR $\alpha$  (LXR $\alpha$   $^{-/-}$ ) [48]. Ces souris ne sont plus capables de maintenir leur résistance naturelle à un régime riche en cholestérol ce qui se traduit par une accumulation très importante d'esters de cholestérol au niveau du foie [47]. De la même façon, des souris invalidées pour le gène LXR $\beta$  (LXR $\beta$   $^{-/-}$ ) ont été obtenues mais ne présentent pas le même phénotype que les souris LXR $\alpha$   $^{-/-}$ . Les souris LXR $\beta$   $^{-/-}$  présentent une résistance au cholestérol associée à une augmentation légère du poids corporel. Le croisement des deux lignées a permis de générer des souris présentant la double inactivation, ayant le même phénotype que les animaux LXR $\alpha$   $^{-/-}$ . Ces expériences d'inactivation attestent de l'implication importante du récepteur LXR $\alpha$  dans la régulation du métabolisme lipidique. Plusieurs gènes impliqués dans le transport, le stockage, la synthèse et le catabolisme du cholestérol dans les cellules hépatiques ont été identifiés comme étant des gènes cibles directs des LXRs.

## 2. LXRs et le tractus génital mâle

De nombreuses études ont pu mettre en évidence l'importance des lipides dans la physiologie du testicule, notamment dans sa fonction stéroïdogène. Par exemple, l'inactivation du gène de la lipase hormono-sensible (HSL) induit une stérilité. Cette enzyme hydrolyse les esters de cholestérol et libère le précurseur de la synthèse des stéroïdes : le cholestérol. Le rôle majeur du cholestérol au niveau des testicules et de l'épididyme a aussi été montré par des modèles « Knock out » des LXRs. Chez les souris LXR $\alpha\beta$   $^{-/-}$ , les analyses histologiques montrent une destruction massive du testicule survenant à 10 mois, qui se traduit par une hyperplasie des cellules de Leydig et une vacuolisation des cellules de Sertoli et une perturbation de la spermatogenèse [66, 35]. Au niveau des segments 1 et 2 de la tête de l'épididyme, le phénotype se caractérise par une diminution de l'épaisseur des canaux et une absence des stéréocils de l'épithélium, généralement observés au niveau des cellules principales du segment 2. Ce phénotype épидидymaire apparaît seulement autour de 6 mois. Les spermatozoïdes de ces souris présentent des anomalies qui se traduisent par une fragilité de la pièce intermédiaire et une variation de l'angulation entre la tête et le flagelle. Les souris deviennent totalement stériles au bout de 10 mois [19, 67].

Ce phénotype observé au niveau de l'épididyme, chez les souris invalidées pour les LXRs, laisse supposer un rôle possible des LXRs dans la régulation de l'expression de gènes exprimés au niveau du segment 1 et 2 de la tête de l'épididyme, ainsi que dans le maintien de la structure de l'épithélium épидидymaire et de l'intégrité des spermatozoïdes.

A ce jour, aucun travail n'a été effectué sur le rôle joué par les LXRs au niveau de l'épididyme. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à rechercher au niveau de l'épidi-



dyme les gènes cibles des LXR $\alpha$  par une approche *in vitro* à partir d'une lignée cellulaire immortalisée, issue de la tête de l'épididyme murin (cellules B2). Ces cellules B2 ont été obtenues à partir de cultures primaires de cellules de la tête de l'épididyme dans lesquelles des mutations aléatoires ont conduit à leur immortalisation [7]. Ces cellules expriment plusieurs gènes considérés comme des marqueurs de l'activité de la tête de l'épididyme *in vivo* confirmant ainsi un état différencié proche de celui retrouvé dans l'organe.

Notre travail a tout d'abord consisté à valider notre modèle d'études en vérifiant qu'elles exprimaient les récepteurs LXR $\alpha$  et qu'elles répondaient bien aux agonistes. Puis, une étude protéomique a été utilisée afin de rechercher des gènes cibles des LXR $\alpha$ .

## II. MATERIELS ET METHODES

### 1. Cultures cellulaires

Deux lignées de cellules ont été utilisées pour notre étude. La lignée cellulaire NIH 3T3, issue de cellules fibroblastiques et la lignée cellulaire B2 issue de culture primaire de la tête de l'épididyme de souris (obtenue au laboratoire par le Pr Lefrançois Martinez [7]).

Les cellules NIH 3T3 sont cultivées dans des boîtes de 10cm de diamètre (Falcon, BD Biosciences, France) contenant 10ml de milieu de culture NIH 3T3 (Tableau 1), à 37°C, en présence de 5% de CO $_2$ . Les cellules B2 sont co-cultivées avec les cellules NIH 3T3, qui servent de couche nourricière, à 35°C en présence de 5% de CO $_2$  dans du milieu de prolifération B2 (Tableau 2). Cette co-culture se fait soit dans des boîtes de 10cm de diamètre (Falcon) pour l'extraction des protéines, soit sur des lamelles de verre 18x18mm, dans des boîtes 6 puits pour les analyses en immunocytochimie et de coloration à l'huile rouge.

**Tableau 1 : composition du milieu de prolifération des cellules NIH 3T3.**

Lignée	Composition du milieu de culture	Concentration
3T3	L-glutamine	2 mM
	Pénicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 $\mu$ g/ml
	Sérum de veau fœtal déstéroïdé	10 % (v/v)
	Milieu DMEM/HAM F12	qsp 500ml

### Repiquage des cellules

**a) NIH 3T3** : les cellules sont passées à confluence toutes les semaines, elles sont rincées 3 fois au PBS 1X sans calcium ni magnésium (Invitrogen, Gibco, France), supplémenté par 100 U/ml de pénicilline et 50  $\mu$ g/ml de strepto-

**Tableau 2 : composition du milieu de prolifération des cellules B2.**

Lignée	Composition du milieu de culture	Concentration
B2	Transferrine	10 $\mu$ g/ml
	Sélénium	17,3 ng/ml
	Insuline	10 $\mu$ g/ml
	8 bromo AMPc	25 $\mu$ g/ml
	L-glutamine	2 mM
	EGF	10 ng/ml
	Ethanolamine	0,6 $\mu$ g/ml
	Tampon HEPES	20 mM
	Pénicilline	100 U/ml
	Streptomycine	100 $\mu$ g/ml
	Toxine cholérique	10 ng/ml
	Hydrocortisone	10 $^{-6}$ M
Milieu DMEM/HAM F12	qsp 500ml	

mycine. Puis, elles sont décollées par 1ml de solution de trypsine 0,4% (m/v)-EDTA 1mM (Gibco) durant 20min à 35°C. Après neutralisation de la solution de trypsine par une dilution dans du milieu NIH 3T3, les cellules sont centrifugées pendant 5min à 200g à 4°C. Ensuite, le culot est repris dans 5ml de milieu NIH 3T3 et les cellules 3T3 sont comptées sur une cellule de Mallasez avant d'êtreensemencées à raison de 150 000 cellules par boîte contenant du 10ml milieu NIH 3T3 (la viabilité des cellules est estimée par exclusion du bleu Trypan).

**b) B2** : on procède de la même façon sauf que les cellules sont décollées avec 2ml de solution de trypsine durant 20min et qu'elles sontensemencées sur des cellules 3T3 traitées à la mitomycine et incubées dans du milieu de prolifération.

### 2. Immunocytochimie de LXR $\alpha$ dans les cellules B2

#### Immunodétection par fluorescence

Après une semaine, les cellules cultivées sur lamelle de verre sont fixées dans les puits de culture avec de la paraformaldéhyde 4% (m/v dans du PBS 1X) durant 10min à température ambiante et perméabilisées par un solution PBS 1X, Triton 1% durant 6min. Les cellules sont alors incubées dans une solution de saturation (PBS 1X, sérum de chèvre 1% et BSA 8%) durant une heure à température ambiante. Puis les cellules sont incubées avec l'anticorps anti-LXR $\alpha$  dilué au 150 $^{\text{ème}}$  dans une solution PBS 1X contenant 1% de sérum de chèvre et 1% de BSA pendant toute la nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 5min dans du PBS 1X, les cellules sont incubées pendant une heure à température ambiante en présence d'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la fluorescéine dilué au 200 $^{\text{ème}}$



(PARIS, France) dans une solution de PBS 1X contenant 1% de sérum de chèvre et 1% de BSA. Enfin les cellules sont rincées avec du PBS 1X et les lamelles sont montées sur des lames avec un milieu de montage colorant les noyaux au DAPI (Vectashield Hard set with DAPI, Vector).

### 3. Huile Rouge

Les cellules B2, cultivées sur des lamelles de verre, sont incubées pendant 48 heures avec  $1\mu\text{M}$  d'un agoniste des LXR $\alpha$  (T0901317, Sigma, France) et/ou avec  $1\mu\text{M}$  d'un agoniste des RXR $\alpha$  (LG 268, Ligand Pharmaceuticals, San Diego, CA). Les cellules sont alors fixées dans les puits de culture avec de la paraformaldéhyde 10% dans du PBS 1X (Sigma) durant 5min à température ambiante et traitées avec le 1,2 propanediol (Sigma) pendant 1min afin de chasser l'eau. Puis les lames sont plongées dans un bain d'huile rouge (Sigma) durant 30min à 60°C. Les cellules sont contre colorées avec l'hématoxyline Harris (Sigma) diluée au demi dans de l'eau distillé, durant 1min. Après rinçage à l'eau du robinet, les lamelles sont montées sur des lames avec du glycérol 50% et observées au microscope. Les inclusions lipidiques apparaissent en rouge.

### 4. Electrophorèse bidimensionnelle

#### a) Extraction de protéines

Les cellules B2, cultivées dans les boîtes 10cm, sont reprises puis centrifugées durant 10min à 200g à 4°C. Les culots cellulaires sont repris avec un tampon de solubilisation des protéines (Tris 50mM-EDTA 1mM) ne contenant pas de sels pouvant gêner l'isofocalisation des protéines. L'extraction des protéines est alors réalisée par sonication (3x30 secondes) dans de la glace. L'homogénat est centrifugé à 10 000g durant 15mn à 4°C, puis le surnageant est récupéré et les protéines totales sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford grâce au kit de dosage de protéine (BIO-RAD, France) en spectrophotométrie à 595nm. Le surnageant est stocké à -20°C.

#### b) Isofocalisation (première dimension)

##### Réhydratation des bandelettes de gel

La bandelette de gel d'isofocalisation (7cm, pH 3-10, Bio-Rad) est réhydratée de manière passive avec du tampon de réhydratation (Urée 8M, CHAPS 4%, DTT 20mM, Biolytes 0,2%, bleu de bromophénol 0,001%) contenant 100 $\mu\text{g}$  de protéines. La réhydratation dure huit heures à 20°C, la bandelette étant recouverte d'huile minérale pour éviter le dessèchement du gel. Au cours de cette réhydratation, les protéines vont pénétrer dans le gel.

##### Isofocalisation

La focalisation est réalisée à l'aide de l'appareil « PROTEAN IEF cell » (Bio-Rad). Les côtés acides et basiques du gel sont connectés respectivement à l'anode et à la cathode du plateau de focalisation et le gel est recouvert d'huile minérale pour éviter qu'il ne dessèche. Les paramètres de focalisation des protéines pour les bandelettes sont les suivants (1<sup>ère</sup> étape : 50 volts/9 heures, 2<sup>ème</sup> étape : 200 volts/1 heure, 3<sup>ème</sup> étape : 4000 volts/3 heures (rapi-

de), 4<sup>ème</sup> étape : 4000 volts/heure (lent)). C'est durant l'isofocalisation que les protéines vont migrer selon leur point isoélectrique.

#### c) SDS PAGE (deuxième dimension)

##### Equilibration

Les protéines sont ionisées avec du SDS et réduites dans la solution d'équilibration I (Urée 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, glycérol 20%, DTT 130mM) pendant 15min. Une seconde incubation est faite dans la solution d'équilibration II contenant du iodoacétamide, durant 20mn (Urée 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, glycérol 20%, iodoacétamide 135mM). Ceci prévient la réoxydation des protéines au cours de l'électrophorèse et alkyle le DTT résiduel, minimisant ainsi les traînées verticales. Ces tampons doivent être préparés au dernier moment.

##### SDS PAGE

Les bandelettes sont déposées sur un gel SDS PAGE 12% et recouvertes par un gel de concentration d'Agarose 1% (Sea Plaque agarose, low gelling temperature, TEBU, France). La migration est effectuée sous tension constante de 200V et elle est stoppée lorsque le bleu de bromophénol sort du gel de séparation.

##### Coloration au nitrate d'argent

La coloration des polypeptides au nitrate d'argent (« EMBL silver staining protocol ») est celle décrite par Mortz et al [45]. Cette coloration est compatible avec le traitement des spots protéiques par spectrométrie de masse.

##### Analyse des spots

Les gels colorés sont scannés puis analysés par l'intermédiaire du logiciel PD QUEST version 7.1 (Bio-Rad). Les spots sélectionnés sont prélevés et envoyés pour être séquencés par spectrométrie de masse (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight » MALDI-TOF ; voyager DE super STR Applied Biosystems, USA) à l'INRA de Theix (Christophe Chambon, plateforme protéomique Bloc 4). Les peptides sont analysés par le logiciel « Mascot » (<http://www.matrixscience.com>).

## III. RESULTATS

### 1. Localisation de la protéine LXR $\alpha$ dans les cellules B2

Il a été montré par western blot que la protéine LXR $\alpha$  s'exprime au niveau de la tête de l'épididyme *in vivo* [19]. Il a été également montré par RT-PCR que les ARNm de LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  s'expriment dans les cellules B2 [7]. Aussi, nous nous sommes intéressés à visualiser par immunocytochimie la présence et la localisation de la protéine LXR $\alpha$  dans les cellules B2 à l'aide d'un anticorps anti-LXR $\alpha$  développé dans l'équipe du Pr. JM. Lobacarro.

L'analyse d'immunodétection en utilisant un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine permet de montrer que LXR $\alpha$  est présente au niveau péri nucléaire et nucléaire. Ceci est visible par la superposition de la fluorescence



spécifique et du marquage du noyau au DAPI (Figure 1 g-i). En revanche, les incubations avec l'anticorps secondaire marqué seul (Figure 1 d-f) ou avec le sérum pré immun (Figure 1 a-c) ne montrent aucun signal fluorescent. Ces résultats attestent que le marquage est spécifique de la protéine LXR $\alpha$ . La protéine LXR $\alpha$  est donc présente dans les cellules B2 et localisée au niveau nucléaire et péri nucléaire. Dans cette étude seule la protéine LXR $\alpha$  a été étudiée car nous ne possédions pas l'anticorps anti LXR $\beta$ .

## 2. Réponse des cellules B2 aux agonistes des LXRs et/ou des RXRs

Dans le but d'utiliser les cellules B2 comme modèle dans la recherche de cibles épидидymaires des LXRs nous avons testé si les cellules B2 étaient capables de répondre aux ligands synthétiques des LXRs (T0901317) et des RXRs (LG268). Pour visualiser la réponse physiologique des cellules B2 aux différents traitements, nous avons procédé à une coloration à l'huile rouge mettant spécifiquement en évidence les lipides neutres tels que les triglycérides et les esters de cholestérol.

Les résultats montrent qu'il y a une accumulation de gouttelettes lipidiques (marquées en rouge) au niveau cytoplasmique après traitement des cellules B2 au T0901317 seul (Figure 2b) par rapport aux cellules contrôles traitées avec le DMSO (Figure 2a). Cette accumulation cytoplasmique de gouttelettes lipidiques est observable sur la majorité des cellules B2. Les mêmes observations sont faites après traitement des cellules B2 au LG268 seul (Figure 2c). Le traitement avec les deux agonistes provoque une accumulation beaucoup plus importante des gouttelettes lipidiques (Figure 2d) par rapport à chacun des agonistes seul. L'association des deux ligands permet donc un effet synergique. L'ensemble de ces résultats confirme que les cellules B2 répondent de manière très nette aux agonistes des LXRs.

Ces résultats suggèrent que ces cellules peuvent être utilisées comme modèle d'étude afin de rechercher des cibles épидидymaires des LXRs *in vitro*.

## 3. Etude du profil d'expression protéique des cellules B2

Les cibles épидидymaires des LXRs ont été recherchées *in vitro* sur les cellules B2 murines par une approche protéomique.

Les cellules ont été incubées durant 24, 48, 72 heures (h) avec 1 $\mu$ M d'agoniste des LXRs (T0901317). Après chaque temps d'incubation, les cellules ont été reprises afin d'extraire les protéines. Pour chacune des conditions, nous avons étudié le profil protéique des cellules B2 traitées ou non traitées avec le T0901317 par électrophorèse bidimensionnelle. Puis, l'ensemble des spots apparaissant pour chacune des conditions a pu être apprécié après coloration des gels SDS-PAGE au nitrate d'argent (Figure 3). L'observation de ces gels montre un profil de migration des protéines semblable pour chacune des conditions. On peut constater que peu de protéines sont détectées dans les régions de faible pI (entre 3 et 5). A l'inverse, beaucoup

plus de protéines sont visibles à des pI élevés (entre 7 et 9). Afin d'analyser les gels de manière plus précise, nous avons procédé à une analyse informatique en utilisant le logiciel PD-QUEST (version 7.1 ; Bio-Rad). Après avoir défini un gel comme référence, le logiciel permet de comparer plusieurs gels d'une même condition entre eux (en l'occurrence quatre gels différents dans notre étude). Au moment de la comparaison, il est important de choisir un maximum de spots communs qui vont servir de repères. Ces repères vont permettre au logiciel d'établir une correspondance entre les gels moyens et de les normaliser en une géométrie cohérente et unique. Ainsi pour chacune des conditions, le logiciel va créer un gel de référence ou gel moyen représentatif des quatre gels différents en retenant seulement les spots communs. Les analyses comparatives sont ensuite réalisées à partir des gels moyens.

Dans un premier temps, nous avons comparé les gels moyens des conditions 24h, 48h, 72h avec le gel moyen correspondant au contrôle DMSO. Dans un deuxième temps nous avons comparé les gels moyens 48h et 72h avec le gel moyen 24h. Ces deux étapes d'analyse successives nous ont permis d'identifier un certain nombre de spots identiques et non identiques à chaque condition. Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 3. Pour la suite de l'analyse, nous avons choisi de travailler sur des spots protéiques apparaissant de manière commune dans les trois conditions étudiées, et préférentiellement ceux dont l'intensité de coloration est nette. Les spots sélectionnés sont indiqués sur la Figure 3 : ils sont concentrés dans la zone de faible poids moléculaire (entre 13 et 25 kDa), avec des pI compris entre 5 et 8 environ (Figure 3 b, c, d). Huit spots intéressants ont été identifiés sur les gels et prélevés pour être analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Avant d'être analysés par spectrométrie de masse, les spots subissent une digestion enzymatique à la trypsine afin de donner différents peptides. Les protéines correspondant aux peptides sont identifiées avec le programme « Mascot ». Une première série d'analyse en spectrométrie de masse n'a donné qu'un résultat significatif ( $p < 0,05$ ) pour le spot 1 identifié comme étant la polyubiquitine 4 de souris « *Mus musculus* » (numéro d'accèsion AK088453, Genbank). En ce qui concerne les autres protéines, elles sont en cours d'analyse.

## IV. DISCUSSION

Les phénotypes observés chez les souris mutantes pour les deux gènes LXR $\alpha$  et LXR $\beta$  suggèrent un rôle fonctionnel des LXRs au niveau de l'épididyme notamment dans le maintien de la structure de l'épithélium et l'intégrité des spermatozoïdes. Dans le but d'aborder le rôle des LXRs et des oxystérols dans la physiologie de l'épididyme, nous avons recherché *in vitro* les gènes qui sont des cibles directes ou indirectes des LXRs en utilisant des cellules épидидymaires murines en culture [7].

Dans un premier temps, il était important de valider le modèle de cellules utilisées vis à vis de la réponse aux LXRs par différentes approches simples. Les expériences d'immunolocalisation montrent clairement que la protéine



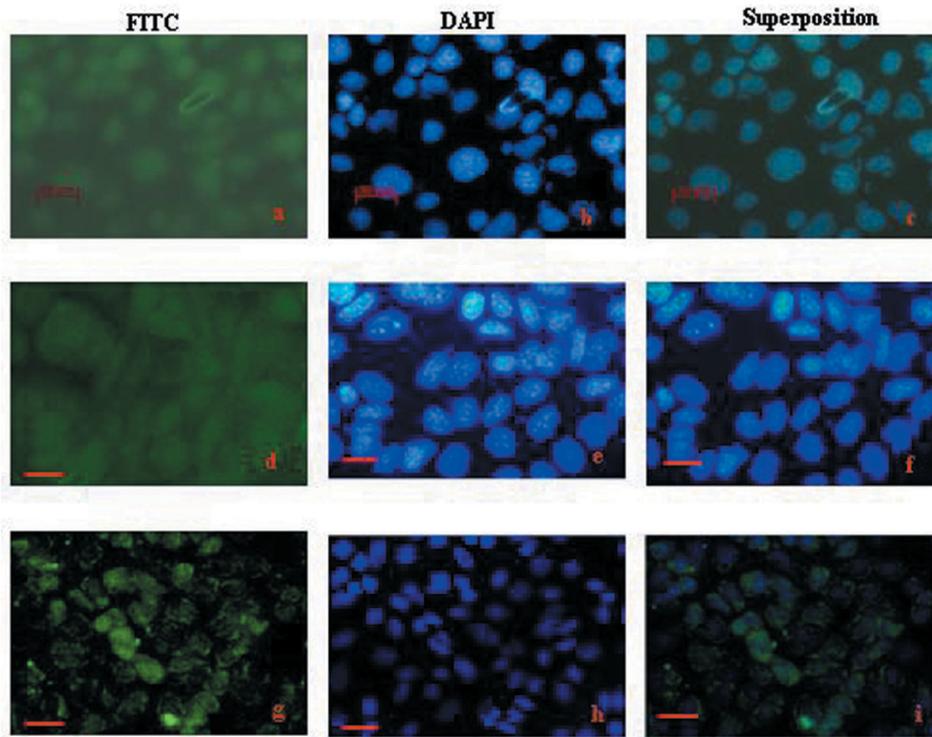


Figure 1 : Immunodétection par fluorescence de la protéine LXR $\alpha$  dans les cellules B2. Les cellules sont incubées soit en présence de sérum pré-immun (a-c), soit en présence de l'anticorps anti-LXR $\alpha$  (1/150e) (g-i), puis en présence d'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (1/200e) donnant un marquage vert. Un témoin en présence d'anticorps secondaire seul été réalisé (d-f). Les noyaux sont colorés en bleu par le DAPI (b, e, h). Les images (c, f, i) correspondent à la superposition des deux images FITC et DAPI. Les barres de calibration représentent 50 $\mu$ m.

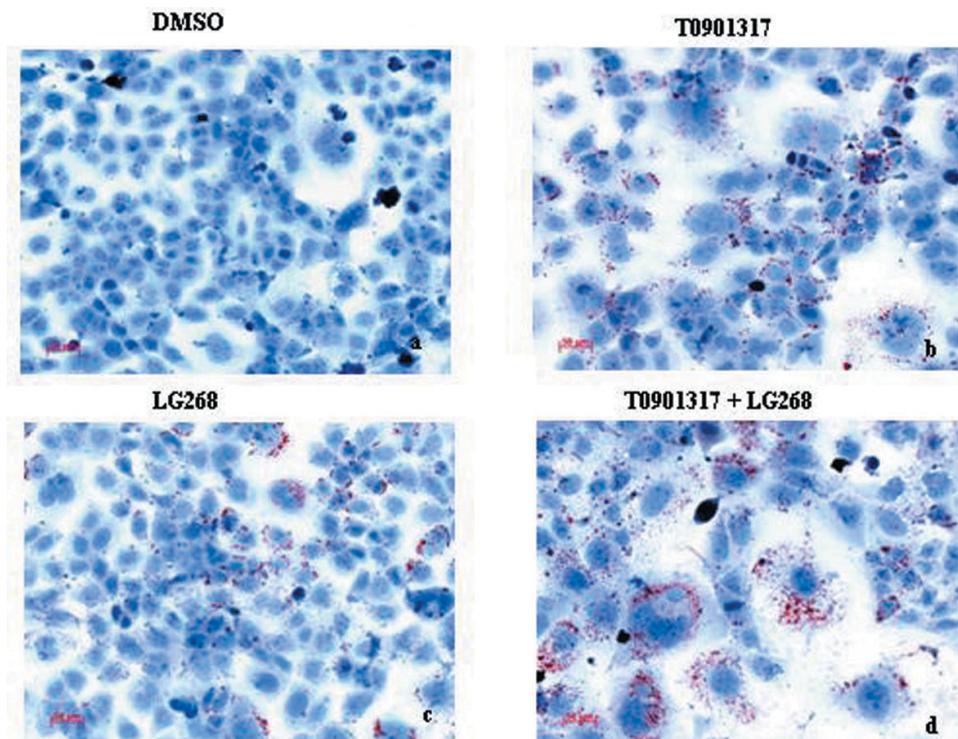
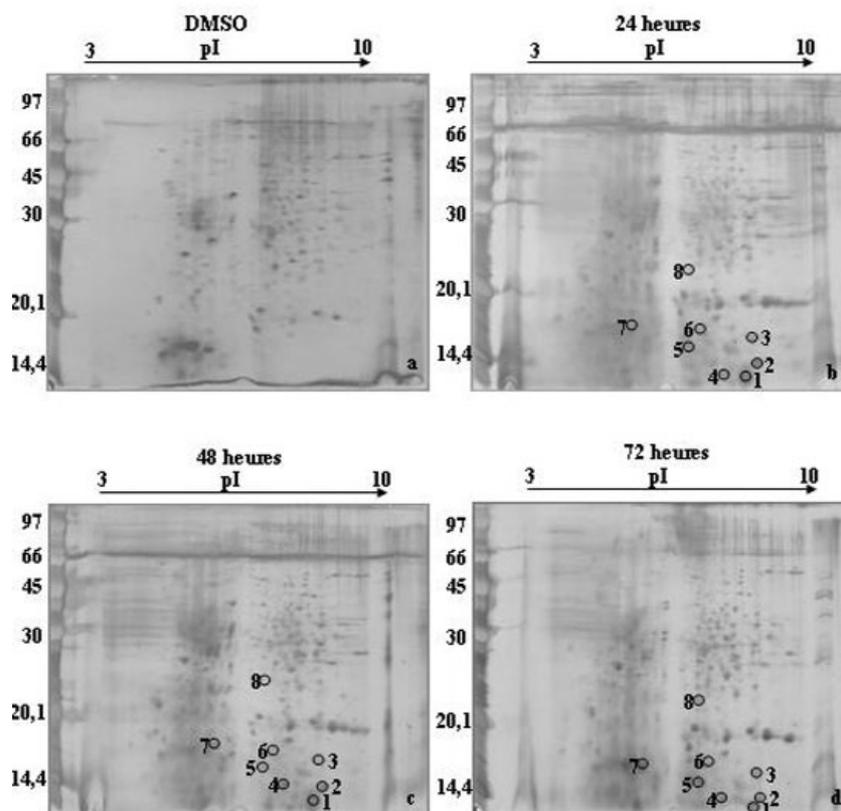


Figure 2 : Coloration à l'huile rouge des cellules B2 stimulées par les agonistes des LXRs et des RXRs. Les cellules sont incubées avec un agoniste synthétique des LXRs à 1 $\mu$ M (T0901317) (b), avec un agoniste synthétique des RXRs à 1 $\mu$ M (LG268) (c), ou avec les deux à la fois (d). Les cellules incubées avec le DMSO (a) correspondent au contrôle. Les cellules sont colorées à l'huile rouge après 48 heures d'incubation dans les différentes conditions, puis contre-colorées avec l'hématoxyline (coloration bleue).





**Figure 3 : Identification des spots suite à l'analyse des gels moyens. Les spots sélectionnés par l'analyse informatique des gels moyens sont repérés sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (encerclés et numérotés). Ils sont prélevés et analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le poids moléculaire exprimé en kilo dalton (kDa) apparaît à gauche et le point isoélectrique (pI) en haut des gels.**

**Tableau 3 : Comparaison des spots des différents gels.**

	DMSO/24H	DMSO/48H	DMSO/72H	24/48H	24/72H
<b>Spots Identiques</b>	225	226	223	247	249
<b>Spots non identiques</b>	119	152	128	97	94

Les gels moyens 24, 48 et 72 heures sont comparés avec le gel correspondant au DMSO. Puis les gels moyens 48 et 72 heures sont comparés avec le gel moyen correspondant à 24 heures. Les valeurs indiquent le nombre de spots identiques ou non identiques entre les deux conditions mentionnées.

LXR $\alpha$  est présente dans les cellules B2 et que sa distribution est nucléaire et péri nucléaire. Cette localisation n'est pas cohérente avec le dogme selon lequel les récepteurs nucléaires orphelins sont plutôt nucléaires et non cytoplasmiques. Cependant, certains auteurs ont pu observer de telles localisations cytoplasmiques pour d'autres récepteurs nucléaires tels que PPAR $\gamma$ 2 [59], RXRs et RARs (Nezzar H, communication personnelle). Sachant que la synthèse des protéines a lieu dans le cytoplasme, cela pourrait donc expliquer cette localisation péri nucléaire ou laisser supposer une action possible dans le cytoplasme. Il serait intéressant d'étudier d'une part si cette localisation est retrouvée *in vivo* au niveau de l'épididyme par une approche d'immunohistochimie et d'autre part si cette loca-

lisation péri nucléaire change pour une localisation nucléaire après traitement avec les agonistes des LXRs *in vitro*. Les mêmes expériences seront à réaliser lorsque l'anticorps anti-LXR $\beta$  sera disponible.

Après avoir montré la localisation de LXR $\alpha$  dans nos cellules, il était important de déterminer la fonction de ces récepteurs dans ces cellules B2. C'est pourquoi nous avons entrepris de mettre en évidence cette fonction *via* une coloration à l'huile rouge. Les résultats de cette coloration montrent que les cellules B2 accumulent des gouttelettes lipidiques après incubation avec l'agoniste synthétique des LXRs (T0901317). De plus, comme attendu pour un hétérodimère LXR/RXR permissif, cette accumulation est augmentée de manière synergique en incubant les cellules



avec les deux agonistes des LXR $\alpha$  et des RXR $\alpha$  (T0901317 et LG268). Ces résultats ne permettent pas de discriminer l'action de LXR $\alpha$  par rapport à LXR $\beta$  mais suggèrent l'existence d'un métabolisme lipidique actif dans les cellules B2. Il serait intéressant de doser les lipides d'une part dans les cellules traitées ou non traitées avec l'agoniste des LXR $\alpha$  afin de connaître la nature des lipides accumulés (triglycérides, esters de cholestérol...), et d'autre part dans le milieu de culture sachant que les cellules B2 sont cultivées en absence de sérum.

Nous avons vu en introduction les remaniements importants du cholestérol de la membrane des spermatozoïdes au cours du transit épидидymaire. Ces remaniements sont fondamentaux pour les capacités fonctionnelles des spermatozoïdes (capacitation, réaction acrosomique). La compréhension des mécanismes impliqués dans le mouvement du cholestérol dans les cellules B2, en relation avec le rôle des LXR $\alpha$ , pourrait nous amener à mieux comprendre les phénomènes physiologiques *in vivo*. Ceci est supporté par les phénotypes observés sur les spermatozoïdes des souris déficientes pour les gènes de l'apolipoprotéine B (Apo B) [32] et du récepteur à l'apolipoprotéine E (ApoRE) [4] qui sont impliqués dans l'efflux cellulaire de cholestérol et exprimés dans l'épididyme. Ces souris sont stériles et présentent un défaut de maturation des spermatozoïdes pour lesquels on observe des aspects morphologiques anormaux, affectant notamment l'angulation flagellaire, phénotype retrouvé dans les animaux LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>.

L'ensemble de ces résultats permet de considérer les cellules B2 comme un modèle *in vitro* opportun pour appréhender des gènes épидидymaires cibles des LXR $\alpha$ . La recherche de gènes cibles a été menée par une approche protéomique. Cette méthode nous a permis d'identifier des protéines dont l'expression est régulée positivement par traitement avec l'agoniste des LXR $\alpha$  (T0901317) dans les trois conditions (24h, 48h, 72h). Parmi huit spots sélectionnés, un seul (spot 1) a donné un résultat significatif après avoir été analysé par MALDI-TOF. Les autres spots n'ont pas pu être identifiés probablement car les protéines contenues étaient en trop faible quantité. Ces résultats s'expliquent en grande partie par les limites de la technique bidimensionnelle :

- La première limite repose sur le type de bandelettes utilisées. En effet, la quantité maximale de protéines séparées en première dimension est limitée à 100 $\mu$ g même si les recommandations du fournisseur indiquent jusqu'à 500 $\mu$ g. Lorsqu'on dépose de grandes quantités de protéines, les migrations (première et deuxième dimensions) ne se font pas correctement, probablement du à un trop fort encombrement. Pour s'affranchir de ces contraintes, il faudra utiliser des bandelettes de grande taille afin de pouvoir focaliser isoélectriquement de plus fortes quantités de protéines, et des bandelettes ayant des gammes de pH restreintes comprenant les pI des spots identifiés afin de mieux les séparer (pI de 5 à 10).
- La deuxième limite s'explique par le type de coloration utilisée. La coloration au nitrate d'argent est beaucoup

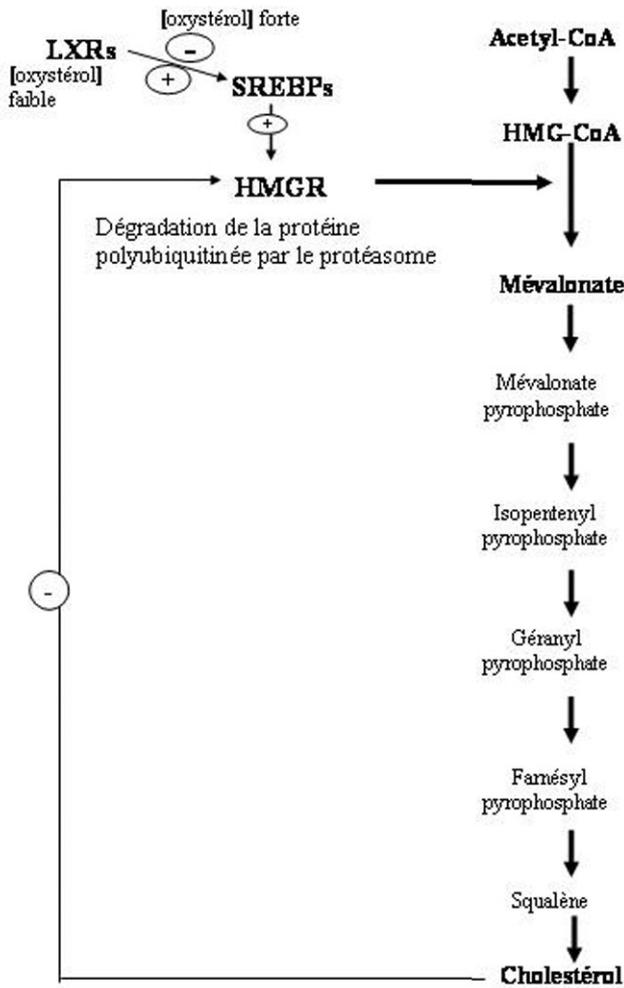
plus sensible que celle utilisant le bleu de Coomassie colloïdal, permettant ainsi de visualiser des spots de faible intensité et donc de faible quantité alors que seules les protéines majeures sont révélées par le bleu de Coomassie colloïdal. De plus, avec le nitrate d'argent, la digestion à la trypsine ne s'effectue pas de façon optimale ce qui occasionne des erreurs dans l'analyse du séquençage. Dans nos conditions expérimentales, aucun spot n'a pu être visualisé en utilisant la méthode de coloration au bleu colloïdal, même pour des quantités de protéines élevées (150 et 200 $\mu$ g de protéines). Pour un séquençage efficace, il faudra grouper les spots d'au moins 4 à 6 gels différents afin d'avoir une quantité suffisante de protéines.

En ce qui concerne le spot identifié (spot 1), celui-ci correspond à une polyubiquitine. Ce résultat est intéressant car il a été décrit récemment que l'ubiquitine pouvait être impliqué dans plusieurs fonctions telles que la réparation de l'ADN, la transcription, la transduction de signaux et dans les phénomènes endocytose-exocytose [51]. De plus il a été montré qu'une régulation des stérols intracellulaires passe par une étape de protéolyse ubiquitine-dépendante de la « 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase » ou « HMG-CoA reductase » (HMGR) [50]. HMGR est une enzyme limitante de la synthèse endogène du cholestérol. Elle permet la transformation de l'acétate en mévalonate qui constitue la première étape limitante de la voie du mévalonate. C'est à partir du mévalonate que va se faire la synthèse endogène du cholestérol (Figure 4). Cette synthèse est régulée de manière très fine : selon la quantité de stérols présents dans la cellule, il va y avoir une régulation positive ou négative de la synthèse du cholestérol. La régulation fait intervenir un certain nombre d'acteurs, notamment les « Sterol Regulatory Element Binding Proteins » (SREBPs) qui régulent positivement HMGR. Ainsi l'excès de cholestérol ou de ses dérivés (oxystérols) va agir comme un inhibiteur de HMGR pré existant en induisant sa dégradation. Cette dégradation, qui se fait par le protéasome, est la résultante d'une polyubiquitination de HMGR induite par le cholestérol ou ses dérivés qui vont diminuer le taux de HMGR et donc la synthèse endogène du cholestérol [28]. Pour confirmer notre hypothèse, il faudra rechercher si l'expression de la protéine HMGR est diminuée après traitement des cellules B2 par le T0901317.

Pour la suite des travaux, de nouvelles analyses bidimensionnelles devraient permettre d'identifier tous les spots sélectionnés. Une fois les protéines identifiées, une analyse bibliographique sera menée pour vérifier si ces protéines sont des cibles connues des LXR $\alpha$ . Dans ce cas, il faudra étudier l'expression épидидymaire de ces protéines, leur régionalisation éventuelle au niveau de la tête de l'épididyme plus précisément à l'endroit où apparaît le phénotype chez les souris LXR $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup> par des analyses différentielles de l'expression *in vivo* (PCR quantitative en temps réel, northern blot). Si des anticorps sont disponibles, l'expression protéique et la localisation pourront être déterminées par des analyses immunohistochimiques. Si les protéines



## REFERENCES



**Figure 4 : Voie de synthèse du mévalonate qui aboutit à la synthèse du cholestérol. HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme-A ; HMGR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme-A réductase ; CoA : coenzyme-A ; LXR : « Liver X Receptor » ; SREBPs : « Sterol Regulatory Element Binding Proteins » ; [oxystérols] : concentration en oxystérol ; + et - : régulation positive ou négative.**

identifiées ne sont pas des cibles connues des LXR, il faudra rechercher *in silico* la présence d'un LXRE dans le promoteur des gènes correspondant.

A plus long terme après avoir identifié un certain nombre de gènes régulés soit directement soit indirectement par LXR au niveau de l'épididyme, il sera intéressant de mettre en relation cette régulation avec la maturation des spermatozoïdes et le maintien de la structure épithéliale de la tête de l'épididyme.

1. ABE K., TAKANO H., ITO T. : Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. Arch. Histol. Jpn, 1983, 46 : 51-68.
2. ABOU-HAILA A., FAIN-MAUREL M.A. : Regional differences of the proximal part of mouse epididymis : morphological and histochemical characterization. Anat. Rec., 1984, 209 : 197-208.
3. AKMAL K.M., DUFOUR J.M., KIM K.H. : Region-specific localization of retinoic acid receptor-alpha expression in the rat epididymis. Biol. Reprod., 1996, 54 : 1111-1119.
4. ANDERSEN O.M., YEUNG C.H., VORUM H. et al. : Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development. J. Biol. Chem., 2003, 278 : 23989-23995.
5. APFEL R., BENBROOK D., LERNHARDT E. et al. : A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. Mol. Cell Biol., 1994, 14 : 7025-7035.
6. BARONE R. : Anatomie Comparée des mammifères domestiques. Tome 4 Splanchnologie II. Paris, Vigot, 1990.
7. BRITAN A., LAREYRE J.J., LEFRANCOIS-MARTINEZ A.M. et al. : Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. Mol. Cell Endocrinol., 2004, 224 : 41-53.
8. COHEN D.J., ROCHWEGER L., ELLERMAN D.A. et al. : Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein. Mol. Reprod. Dev., 2000, 56 : 180-188.
9. COOPER T.G. : Role of the epididymis in mediating changes in the male gamete during maturation. Adv. Exp. Med. Biol., 1995, 377 : 87-101.
10. CORNWALL G.A., CAMERON A., LINDBERG I. et al. : The cystatin-related epididymal spermatogenic protein inhibits the serine protease prohormone convertase 2. Endocrinology, 2003, 144 : 901-908.
11. CORNWALL G.A., HANN S.R. : Specialized gene expression in the epididymis. J. Androl., 1995, 16 : 379-383.
12. CORNWALL G.A., LAREYRE J.J., MATUSIK R.J. et al. : Gene expression and epididymal function. In : Robaire B., Hinton B.T. eds. The epididymis : From molecules to clinical practice. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002 : 169-199.
13. CROSS N.L. : Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol. Reprod., 1998, 59 : 7-11.
14. DACHEUX J.L., GATTI J.L., CASTELLA S. et al. : The epididymal protein. In : Hinton B.T., Turner T.T. eds. The third international conference on the epididymis. New York, The Van Doren Company, 2003, 115-122.
15. DACHEUX J.L., DACHEUX F. : Protein secretion in the epididymis. In : Robaire B., Hinton B.T. eds. The epididymis : From molecules to clinical practice. New York, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2002 : 151-168.
16. DREVET J.R., LAREYRE J.J., SCHWAAB V. et al. : The PEA3 protein of the Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene gpx5. Mol. Reprod. Dev., 1998, 49 : 131-140.
17. DUFAURE J.P., DREVET J.R. : La régulation de l'expression des gènes dans l'épididyme. Médecine/Science, 1998, 14 : 1392-1398.



18. EDDY E.M., WASHBURN T.F., BUNCH D.O. et al. : Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology*, 1996, 137 : 4796-4805.
19. FRENOUX J.M., VERNET P., VOLLE D.H. et al. : Nuclear oxysterol receptors, LXR, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and sperm post-testicular maturational events. *J. Mol. Endocrinol.*, 2004, 33 : 361-375.
20. FU X., MENKE J.G., CHEN Y. et al. : 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 : 38378-38387.
21. GARRETT J.E., GARRETT S.H., DOUGLASS J.A. : Spermatozoa-associated factor regulates proenkephalin gene expression in the rat epididymis. *Mol. Endocrinol.*, 1990, 4 : 108-118.
22. GAUDREAUULT C., LE GARE C., BERUBE B., SULLIVAN R. : Hamster sperm protein, p26h: a member of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Biol. Reprod.*, 1999, 61 : 264-273.
23. GLOVER T.D., NICANDER L. : Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fertil., Suppl*, 1971, 13 : 39-50.
24. HAIDL G., OPPER C. : Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum. Reprod.*, 1997, 12 : 2720-2723.
25. HALL J.C., HADLEY J., DOMAN T. : Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl.*, 1991, 12 : 76-87.
26. HALL J.C., KILLIAN G.J. : Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. *Biol. Reprod.*, 1987, 36 : 709-718.
27. HAMILTON D. : Anatomy of mamalian male accessory reproductive organs. In : Laming G. ed. *Marshall's Physiology of Reproduction, reproduction in the Male*. Edinburg, Churchill Livingstone, 1990, Vol 2 : 691-746.
28. HAMPTON R.Y. : Proteolysis and sterol regulation. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2002, 18 : 345-378.
29. HESS R.A., BUNICK D., LEE K.H. et al. : A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature*, 1997, 390 : 509-512.
30. HESS R.A., BUNICK D., LUBAHN D.B., ZHOU Q., BOUMA J. : Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. *J. Androl.*, 2000, 21 : 107-121.
31. HINTON B.T., LAN Z.J., RUDOLPH D.B., LABUS J.C., LYE R.J. : Testicular regulation of epididymal gene expression. *J. Reprod. Fertil., Suppl*, 1998, 53 : 47-57.
32. HUANG L.S., VOYIAZAKIS E., CHEN H.L., RUBIN E.M., GORDON J.W. : A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1996, 93 : 10903-10907.
33. JANOWSKI B.A., GROGAN M.J., JONES S.A. et al. : Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, 96 : 266-271.
34. KIRCHHOFF C. : Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol.*, 1999, 188 : 133-202.
35. KIRSTEN M.R., GERTRUD U.S., KNUT R.S. et al. : The liver X receptor is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology*, 2005, 146 : 2519-2530.
36. LAN Z.J., LABUS J.C., HINTON B.T. : Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors : role of basic fibroblast growth factor. *Biol. Reprod.*, 1998, 58 : 197-206.
37. LAREYRE J.J., CLAESSENS F., ROMBAUTS W., DUFAURE J.P., DREVET J.R. : Characterization of an androgen response element within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase 5 gene. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1997, 129 : 33-46.
38. LAREYRE J.J., MATTEI M.G., KASPER S. et al. : Structure and putative function of a murine epididymal retinoic acid-binding protein (mE-RABP). *J. Reprod. Fertil. Suppl*, 1998, 53 : 59-65.
39. LEGARE C., BERUBE B., BOUE F. et al. : Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol. Reprod. Dev.*, 1999, 52 : 225-233.
40. LEGARE C., GAUDREAUULT C., ST-JACQUES S., SULLIVAN R. : P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis. *Endocrinology*, 1999, 140 : 3318-3327.
41. LOBACCARO J.M., REPA J.J., LU T.T. et al. : Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 2001, 62 : 239-247.
42. LU T.T., REPA J.J., MANGELSDORF D.J. : Orphan nuclear receptors as eLiXIRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276 : 37735-37738.
43. MERCIER-BODARD C., ALFSEN A., BAULIEU E.E. : Sex steroid binding plasma protein (SBP). *Acta Endocrinol (Copenh), Suppl*. 1970, 147 : 204-224.
44. MOORE H.D., BEDFORD J.M. : The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. *Anat. Rec.*, 1979, 193 : 313-327.
45. MORTZ E., KROGH T.N., VORUM H., GÖRG A. : Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight analysis. *Proteomics*, 2001, 1 : 1359-1363.
46. NATH D., MAJUMDER G.C. : Maturation-dependent modification of the protein phosphorylation profile of isolated goat sperm plasma membrane. *J. Reprod. Fertil.*, 1999, 115 : 29-37.
47. PEET D.J., TURLEY S.D., MA W. et al. : Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*, 1998, 93 : 693-704.
48. PERRY A.C., JONES R., HALL L. : Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. *Biochem. J.*, 1993, 293 : 21-25.
49. POLLANEN P., COOPER T.G. : Immunology of the testicular excurrent ducts. *J. Reprod. Immunol.*, 1994, 26 : 167-216.
50. RAVID T., DOOLMAN R., AVNER R., HARATS D., ROITELMAN J. : The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275 : 35840-35847.
51. REBECCA L.W., GORDON C., MAYER R.J. : Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nature Reviews*, 2005, 6 : 599-609.
52. REPA J.J., MANGELSDORF D.J. : The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2000, 16 : 59-81
53. ROBAIRE B., HERMO L. : Efferents ducts, epididymis, vas



deferens : structure, functions, and their regulation. In : Knobil E. ed. The physiology of reproduction. New York, Raven Press, 1988 : 999-1080

54. ROBAIRE B., JERVIS K.M., EZER N. : Cell Dynamics and Death in the Epididymal Epithelium. In : Hinton B.T., Turner T.T. eds. The third international conference on the epididymis. New York, The Van Doren Company, 2003 : 35-49.
55. SHALGI R., SELIGMAN J., KOSOWER NS. : Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation : analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. Biol. Reprod., 1989, 40 : 1037-1045.
56. SINOWATZ F., VOLGMAYR J.K., GABIUS H.J., FRIESS A.E. : Cytochemical analysis of mammalian sperm membranes. Prog. Histochem. Cytochem., 1989, 19 : 1-74.
57. SORANZO L., DADOUNE J.P., FAIN-MAUREL M.A. : Segmentation of the epididymal duct in mouse : an ultrastructural study. Reprod. Nutr. Dev., 1982, 22 : 999-1012.
58. TEBOUL M., ENMARK E., LI Q., WIKSTROM A.C., PELTO-HUIKKO M., GUSTAFSSON J.A. : OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92 : 2096-2100.
59. THUILLIER P., BAILLIE R., SHA X., CLARKE S.D. : Cytosolic and nuclear distribution of PPARgamma2 in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. J. Lipid. Res., 1998, 39 : 2329-2338.
60. TRAMER F., ROCCO F., MICALI F., SANDRI G., PANFILI E. : Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. Biol. Reprod., 1998, 59 : 753-758.
61. TULSIANI D.R., ORGEBIN-CRIST M.C., SKUDLAREK M.D. : Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. J. Reprod. Fertil., Suppl., 1998, 53 : 85-97.
62. TULSIANI D.R., SKUDLAREK M.D., HOLLAND M.K. : Orgebin-Crist M.C. : Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. Biol. Reprod., 1993, 48 : 417-428.
63. TURNER T.T., AVERY E.A., SAWCHUK T.J. : Assessment of protein synthesis and secretion by rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. Int. J. Androl., 1994, 17 : 205-213.
64. VERNET P., RIGAUDIERE N., GHYSELINCK N., DUFAYRE J.P., DREVET J.R. : In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. Biochem. Cell Biol., 1996, 74 : 125-131.
65. VISCANTI P.E., NING X., FORNES M.W. et al. : Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm : cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. Dev. Biol., 1999, 214 : 429-443.
66. VOLLE D.H., DÉCHELOTTE P., CUMMINS C.C. et al. : Deficient mice for oxysterol nuclear receptors LXRs show a rapid decrease of fertility associated with testicular destructuration. 2004 (en cours de préparation).
67. VOLLE D.H., FRENOUX J.M., MOUZAT K. et al. : Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle. Andrologie, 2005, 15 : 151-159.
68. WAN Y.J., WANG L., WU T.C. : Detection of retinoic acid receptor mRNA in rat tissues by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Mol. Endocrinol., 1992, 9 : 291-294.

Prix du meilleur DEA - SALF 2004

Manuscrit reçu : novembre 2005 ; accepté décembre 2005.

## ABSTRACT

**Screening for LXR target genes involved in the maintenance of mouse caput epididymis structure and function**

**Ayhan KOCER, Fabrice SAEZ, Kevin MOUZAT, Patrick VERNET, Jean-Marc A. LOBACCARO, Joël R. DREVET.**

Liver X receptors (LXRs) are involved in cholesterol homeostasis and lipid metabolism. *Lxr* knock-out mice for the two isoforms *Lxra* and *Lxrb* exhibit severe disruption of the structure of caput epididymidis segment 1 and 2 epithelium and increased sperm fragility. These defects generate infertility in 10-month-old male mice.

The role of LXRs in the epididymis have not yet been investigated. A cell line obtained from mouse caput epididymidis (B2 cells) was used to screen for LXR epididymal target genes *in vitro*. The presence of one isoform of LXR (LXR $\alpha$ ) was detected by immunocytochemistry and the capacity of B2 cells to respond to a synthetic agonist of LXRs (T0901317) was verified. These results validated the use of B2 cells as a model. Bidimensional electrophoresis was performed on B2 cells treated with T0901317. Eight proteins up-regulated by LXRs were isolated. Only one protein has been identified: polyubiquitin, which has already been reported to be involved in cellular cholesterol homeostasis.

**Key-words:** epididymis, Nuclear receptors, LXR, cholesterol, male reproduction



**Article 5** : Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique.

Article publié dans Ann Biol Clin (Paris). 2006 Nov-Dec;64(6):535-48.

Gueguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M.



# Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique

## *Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance*

Y. Guéguen<sup>1</sup>  
K. Mouzat<sup>2</sup>  
L. Ferrari<sup>3</sup>  
E. Tissandie<sup>1</sup>  
J.M.A. Lobaccaro<sup>2</sup>  
A.-M. Batt<sup>4†</sup>  
F. Paquet<sup>1</sup>  
P. Voisin<sup>1</sup>  
J. Aigueperse<sup>1</sup>  
P. Gourmelon<sup>1</sup>  
M. Souidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, Direction de la radioprotection de l'homme, Fontenay-aux-Roses <yann.gueguen@irsn.fr>

<sup>2</sup> Physiologie comparée et Endocrinologie moléculaire, UMR Université Blaise Pascal-CNRS 6547, Aubière

<sup>3</sup> Évaluation et prévention des risques professionnels et environnementaux, Inserm ERI n°11, Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de médecine Vandœuvre-les-Nancy

<sup>4</sup> Inserm U525, Centre du médicament, Université Henri Poincaré - Nancy 1, Faculté de pharmacie, Nancy

† Décédée le 29 mars 2006

**Résumé.** Les cytochromes P450 (CYP) constituent une superfamille de 57 gènes codant pour des enzymes qui métabolisent un grand nombre de médicaments mais également des substances endogènes (stéroïdes, eicosanoïdes, vitamines...). Ces enzymes jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques, dont les médicaments, et ont un rôle primordial dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (polluants, pesticides...). La régulation des CYP est essentiellement transcriptionnelle : les récepteurs nucléaires sont reconnus comme des médiateurs clés de la modulation des enzymes du métabolisme des médicaments. Ils ont pour ligands des substances exogènes mais également endogènes, qui peuvent avoir une action agoniste ou antagoniste sur ces facteurs de transcription. La co-administration de médicaments, ligands agonistes ou antagonistes des récepteurs nucléaires, peut conduire à des toxicités sévères, une perte de l'efficacité thérapeutique ou un déséquilibre du métabolisme d'endobiotiques. Le polymorphisme génétique de ces enzymes joue également un rôle non négligeable dans leur activité métabolique et doit être pris en compte lors de l'administration de médicaments. Ainsi, l'activité des CYP étant dépendante du génotype et de l'environnement, elle est depuis peu utilisée en tant que biomarqueur permettant d'évaluer les conséquences d'une exposition à des molécules environnementales ou la susceptibilité à certaines pathologies.

**Mots clés :** *cytochrome P450, xénobiotiques, récepteurs nucléaires, détoxification, physiopathologie, régulation*

**Abstract.** Cytochromes P450 (CYPs) are a superfamily of 57 genes coding for drug metabolizing enzymes and endobiotic metabolizing enzymes (steroids, eicosanoids, vitamins...). This is the main metabolizing enzyme system for foreign compounds, including drugs, which has a primary role in organism protection against potential harmful insults from the environment (pollutants, pesticides...). The CYPs regulation is essentially transcriptional: nuclear receptors are recognized as key mediators for the control of drug metabolizing enzymes. Their ligands are exogenous and also endogenous molecules that can up-regulate or down-regulate these transcription factors. Treatment with drugs or xenobiotics, which are nuclear receptor agonists or antagonists, can lead to severe toxicities, loss of therapeutic effect or endobiotic metabolism disorders. Genetic polymorphisms of these enzymes have an important role in their activity and must be taken into account during drug administration.

Article reçu le 12 avril 2006,  
accepté le 30 août 2006

**Tirés à part :** Y. Guéguen



Then, CYP activity depends on genotype and environment; this is recently used as biomarker to determine human exposure to environmental molecules or to predict the susceptibility to certain pathologies.

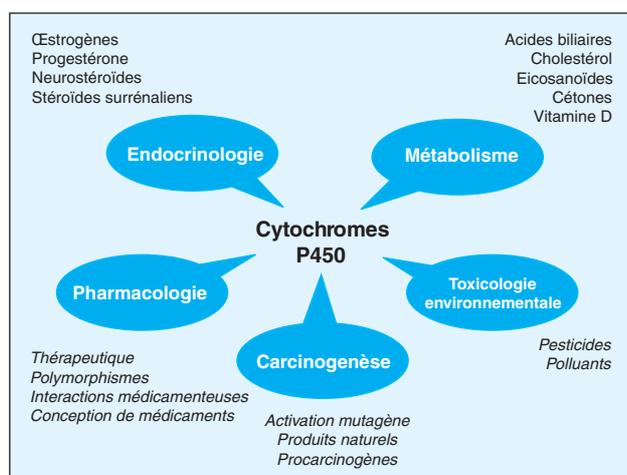
**Key words:** cytochrome P450, xenobiotics, nuclear receptor, detoxification, physiopathology, regulation

La membrane cellulaire constitue une barrière efficace protégeant la cellule contre les molécules toxiques et des xénobiotiques hydrosolubles. À l'inverse, les molécules hydrophobes ayant la faculté de franchir aisément la membrane peuvent s'accumuler dans la cellule et atteindre rapidement un seuil de toxicité. Au cours de leur évolution, les organismes ont développé des systèmes limitant l'accumulation de ces composés : il s'agit de transporteurs membranaires permettant une sortie rapide des molécules indésirables et des systèmes de conversion chimique en molécules plus hydrophiles dont l'élimination par les fluides corporels est ainsi facilitée. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes P450 (CYP ou P450), jouent un rôle central dans les phénomènes de biotransformation, du métabolisme et/ou de la détoxification de ces composés étrangers à l'organisme (figure 1) [1, 2]. Le métabolisme des xénobiotiques se décompose en 3 phases qui aboutissent au final à l'élimination des substances étrangères dans la bile et l'urine. Les enzymes de la phase I (essentiellement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, catalysent essentiellement les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse ; les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases ou GST, UDP glucuronosyltransférases ou UGT...), dites de conjugaison, catalysent les réactions de transfert, généralement après fonctionnalisation ; les transporteurs de la phase III

(*P-glycoprotein* ou Pgp, *multidrug resistance proteins* ou MRP...) transportent au travers des membranes des xénobiotiques, et surtout des dérivés conjugués.

La superfamille des cytochromes P450 humains comprend 57 gènes qui codent des enzymes jouant un rôle primordial dans la détoxification des xénobiotiques. Il est maintenant acquis qu'elles sont également impliquées dans le métabolisme de nombreux composés endogènes, tels que l'acide arachidonique et des éicosanoïdes, le cholestérol et les acides biliaires, des stéroïdes et la vitamine D (figure 1).

Une caractéristique d'une partie de cette famille d'enzymes capable de métaboliser des xénobiotiques est leur faible expression basale et leur expression élevée en présence d'inducteurs. La régulation de ces enzymes du métabolisme des xénobiotiques a été largement étudiée depuis plus de 40 ans, à commencer par l'induction par le phénobarbital [3], mais la compréhension des mécanismes moléculaires est récente. Les récepteurs nucléaires sont reconnus comme des médiateurs clés de la régulation des enzymes du métabolisme des médicaments. La régulation des enzymes de la famille des cytochromes P450 étant essentiellement transcriptionnelle, les autres modes de régulation ne sont donc pas évoqués dans cette revue. L'induction ou l'inhibition des CYP et d'autres enzymes du métabolisme des médicaments peut altérer la clairance et donc le taux sérique de ces médicaments ou des xénobiotiques. Ces régulations, en plus des polymorphismes génétiques existants, contribuent aux variations inter- et intra-individuelles de la réponse aux médicaments. De nombreuses pathologies sont également associées au polymorphisme génétique des cytochromes P450. La dernière partie de cette revue sera donc consacrée à l'importance en clinique de ces polymorphismes.



**Figure 1.** Implications physiologiques et physiopathologiques des cytochromes P450.

## Généralités sur les cytochromes P450

### Définition

Les CYP constituent une famille d'hémaprotéines initialement identifiées comme des pigments dans des microsomes de foie de rat [4]. En effet, le nom de cytochrome P450 provient de la propriété de ces pigments d'émettre un spectre d'absorbance à 450 nm, spécifique de ces hémaprotéines [5].



Les propriétés catalytiques d'oxydation et de réduction varient en fonction de la nature de la partie protéique du CYP (apoprotéine). Les CYP permettent un grand nombre de réactions, dont la plus importante est l'hydroxylation. Afin de les rendre fonctionnels, les CYP ont également besoin d'une source d'électrons. Ces électrons sont apportés par une autre protéine : la NADP cytochrome P450 réductase si le cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique, la ferredoxine si le cytochrome P450 est situé dans les mitochondries. Le NADPH est la source majeure d'électrons dans ce système (figure 2) [6].

Les propriétés connues des CYP de mammifères peuvent être résumées comme suit :

- les CYP sont formés d'environ 500 acides aminés. Une cystéine localisée près de la région carboxy-terminale de la protéine permet la liaison thiol-ligand, essentielle pour le fer héminique. La région N-terminale est riche en AA hydrophobes et permet la fixation de la protéine aux membranes ;
- ces enzymes sont appelées mono-oxygénases, car elles incorporent un atome d'oxygène à partir d'oxygène moléculaire. Elles transforment une grande variété de composés chimiques. Certains CYP catalysent le métabolisme d'un nombre limité de structures chimiques (tels que les stéroïdes ou les acides gras), alors que d'autres CYP présentent une spécificité de substrats plus large ;
- dans les tissus tels que le foie, l'intestin et les surrénales, la concentration de CYP excède largement la concentration des autres hémoprotéines. En effet, la concentration des CYP peut atteindre 50  $\mu\text{M}$  dans le foie de rat, représentant ainsi plus de 1 % des protéines du foie ; dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes les CYP peuvent former plus de 20 % des protéines de cette fraction membranaire ;
- les CYP ont habituellement une expression ubiquitaire, mais certains tissus n'expriment de manière constitutive que certaines isoformes ;
- l'expression de la plupart des CYP est régulée par des facteurs de transcription qui sont activés par différents composés chimiques. La capacité d'un composé à servir d'inducteur est généralement liée à une famille de CYP.

### Classification et nomenclature

La purification et le séquençage de nombreux CYP ont été réalisés dans différents laboratoires. Il existe plus de 3 000 séquences de gènes de CYP connus appartenant à toutes les espèces. Chez l'homme, 57 gènes et 47 pseudogènes ont été séquencés (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

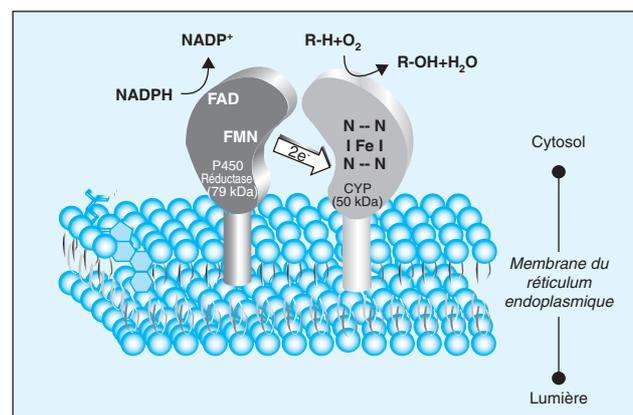
Dans le système des mono-oxygénases, la variété des propriétés catalytiques trouve son origine dans la diversité de structure de la partie apoprotéique du cytochrome P450. Selon le degré d'homologie entre les séquences primaires

des acides aminés constitutifs, les critères phylogénétiques et l'organisation génétique, les cytochromes P450 ont été ainsi répartis en familles et sous-familles [7].

La nomenclature actuelle des cytochrome P450 consiste à nommer un gène ou un ADNc par le symbole *CYP*, suivi d'un chiffre arabe désignant la famille, d'une lettre majuscule désignant la sous-famille, puis d'un chiffre arabe pour chaque gène [8]. Pour désigner l'ARNm ou la protéine, la même nomenclature est employée sans l'attribut italique. En règle générale, les CYP appartenant à une même famille possèdent plus de 40 % d'homologie de séquence et à l'intérieur d'une même sous-famille, l'identité peut être supérieure à 55 %. Les gènes appartenant à une même sous-famille sont groupés sur un même chromosome en *clusters*.

### Structure tridimensionnelle et localisation membranaire

L'alignement de toutes les séquences d'acides aminés des CYP fait apparaître une très faible conservation et seuls trois acides aminés sont parfaitement conservés. Néanmoins, cette variabilité ne préclude pas à une forte conservation de leur topographie générale et de leur structure repliée [9]. La partie la plus conservée est logiquement retrouvée dans le cœur de la protéine et reflète le mécanisme commun de transfert d'électrons et de protons et d'activation d'oxygène. La région la plus variable correspond à la partie N-terminale impliquée dans l'adressage et



**Figure 2.** Localisation membranaire de cytochromes P450 dans le réticulum endoplasmique. La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochromes P450 a lieu sur la face externe du réticulum endoplasmique où est créée l'enzyme. Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer (Fe) fixé par des liaisons de coordinances. Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le composé organique est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique (R-OH). R : médicaments, acides gras, stéroïdes, polluants.



l'ancrage à la membrane, et à la séquence de liaison et de reconnaissance du substrat [10]. Contrairement aux CYP bactériens, les CYP eucaryotes sont associés à la membrane externe du réticulum endoplasmique ou se trouvent dans les mitochondries (membrane interne, externe ou matrice).

Les récents progrès réalisés dans la détermination des structures tridimensionnelles cristallographiques des CYP impliqués dans le métabolisme des médicaments et la visualisation de la manière dont les molécules se fixent aux sites actifs de cette classe d'enzymes, devraient faciliter le développement de nouveaux médicaments. En effet, l'industrie pharmaceutique attache une attention particulière à la structure tridimensionnelle des cytochromes P450 permettant de mieux comprendre et de mieux prédire les interactions entre la molécule cible et les CYP [11, 12].

### Rôles physiologiques des cytochromes P450

Les CYP des familles 1, 2 et 3 sont généralement impliqués dans la phase I du métabolisme des médicaments et d'autres composés étrangers à l'organisme, alors que les autres possèdent des fonctions endogènes. Dans le foie, les proportions des différents CYP sont connues : le CYP3A4 (20 à 50 %), le CYP2C8/9 (10 à 30 %), le CYP2D6 (2 à 6 %), le CYP2C19 (1 à 10 %), le CYP1A2 (1 à 13 %), le CYP2E1 (7 %) ainsi que les CYP2A6, et 4A [2, 13]. Ils représentent plus de 90 % des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif des médicaments. Les mono-oxygénases à cytochrome P450 sont également essentielles dans les phénomènes de biotransformation de substances physiologiques (stéroïdes, acides biliaires, vitamine D, acides gras, prostaglandines, leucotriènes, rétinoïdes, amines biogènes...) (tableau 1).

Dans cette revue, nous développerons essentiellement les CYP impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, puis nous aborderons succinctement quelques métabolismes de composés endogènes catalysés par les CYP.

#### *Métabolisme des xénobiotiques (médicaments et substances toxiques)*

Parmi les 57 CYP humains, 15 sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques appartenant essentiellement aux familles 1, 2 et 3. Bien que quelques substrats endogènes aient été identifiés, la grande majorité des molécules transformées sont des xénobiotiques. En effet, plus de 90 % du métabolisme des médicaments passe par l'activité des CYP et plus de 2 000 substrats ont été identifiés à ce jour [14].

#### **Famille CYP1**

Cette famille est composée de trois gènes (CYP1A1, 1A2, 1B1) régulés au niveau transcriptionnel par la voie AhR-ARNT (*aryl hydrocarbon receptor-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Cette régulation sera discutée plus en détail par la suite.

Ces trois enzymes détoxifient ou activent de nombreux procarcinogènes environnementaux, des toxines et quelques médicaments [15-17]. L'activité du CYP1A est induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), tels que ceux retrouvés dans les produits d'incinération de composés industriels, la fumée de cigarette, les viandes grillées, mais également certains végétaux crucifères (brocoli, choux de Bruxelles). L'expression du CYP1A1 et du CYP1B1 est principalement extra-hépatique et est inductible dans pratiquement tous les tissus étudiés, dont les poumons, la glande mammaire et le placenta. À l'inverse, CYP1A2 est exprimé essentiellement au niveau du foie et représente environ 13 % des CYP hépatiques. Les CYP1A1, CYP1B1 et probablement CYP1A2 métabolisent des composés endogènes, tels que les prostaglandines, les œstrogènes et la mélatonine [17].

#### **Famille CYP2**

La famille CYP2 est la plus grande famille de CYP chez l'homme. À la différence de la famille CYP1, les membres de cette famille ne partagent pas le même système de régulation. Les spécificités de substrats et de tissus sont également très différentes. Nous nous concentrerons dans ce chapitre sur les CYP2C et CYP2D qui sont quantitativement les plus importants de cette famille dans le foie et qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme des médicaments.

#### **Famille CYP2C**

Elle est composée de 4 gènes : CYP2C8, 2C9, 2C18 et 2C19. L'isoenzyme CYP2C9 est la plus abondante, suivi par 2C8 et 2C19. En plus de transformer de nombreux composés endogènes comme l'acide arachidonique, ce système métabolise environ 25 % des médicaments utilisés en clinique [13].

Les médicaments métabolisés par le CYP2C sont fréquemment prescrits tels que le losartan, la fluvastatine, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens, des antidépresseurs ainsi que des produits à index thérapeutique étroit dont la warfarine et la phénytoïne. La rifampicine et les barbituriques sont des inducteurs du CYP2C. Le polymorphisme génétique de cette famille a une importance clinique non négligeable, se traduisant notamment par une vitesse de métabolisme très variable selon les patients [18, 19].

#### **Famille CYP2D**

Chez l'homme, le CYP2D6 est le seul gène actif de la sous-famille CYP2D qui comprend trois gènes (2D6, 2D7



et 2D8). Certains polymorphismes de CYP2D6 entraînant une altération de son expression ou de son activité enzymatique ont été associés à une déficience du métabolisme des médicaments [20]. À l'inverse, les formes avec plusieurs copies du gène, identifiées chez certains individus, aboutit à un métabolisme très rapide des médicaments [21]. En conséquence, le métabolisme de plusieurs médicaments fréquemment utilisés est affecté, dont celui des analgésiques, du dextrométorphan, des antiarythmiques, des antidépresseurs, des antihistaminiques, des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et des hallucinogènes comme la kétamine [22]. Cette enzyme intervient également dans le métabolisme de composés endogènes, notamment certains neurotransmetteurs [23, 24]. L'expression de CYP2D pourrait également jouer un rôle dans la détoxification de polluants chimiques environnementaux tels que les pesticides.

### Famille CYP3

La famille CYP3 comprend seulement une sous-famille, le CYP3A composé de 4 gènes 3A4, 3A5, 3A7 et 3A43 [8] dont l'expression tissulaire diffère : CYP3A4 est exprimé principalement dans le foie, CYP3A5 dans les tissus extra-hépatiques, et CYP3A7 dans le foie fœtal.

CYP3A4 a un rôle fondamental puisqu'on estime que plus de 50 % des médicaments sont métabolisés par cette enzyme (antibiotiques, anesthésiques, antihistaminiques, corticostéroïdes, statines, inhibiteurs de la protéase du VIH, certaines benzodiazépines, immunosuppresseurs...) (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>). CYP3A4 peut ainsi être impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses importantes en clinique. Des stéroïdes naturels tels que la testostérone et la progestérone [25, 26] sont également métabolisés par cette enzyme. Un important système de régulation contrôle l'expression de cette enzyme, notamment par l'activation de facteurs de transcription par des ligands spécifiques [27]. Les propriétés pharmacologiques de ce système de régulation expliquent la capacité de certains médicaments à protéger l'organisme des effets toxiques d'autres composés. Selon qu'il se produit une induction ou une inhibition de cette enzyme, l'efficacité thérapeutique d'un médicament ou de sa forme active peut également être modulée. Par conséquent, l'administration concomitante par voie orale d'un inhibiteur du CYP3A4 (jus de pamplemousse) et d'un médicament substrat de cette même isoenzyme (statines) peut entraîner une augmentation très importante de la concentration plasmatique du médicament et conduire ainsi à une toxicité accrue [28].

### Métabolisme des endobiotiques

Les CYP sont impliqués dans la détoxification de xénobiotiques mais également dans celui de molécules endogènes (ou endobiotiques). Ainsi, bien que cette revue soit centrée

**Tableau 1.** Fonctions métaboliques des cytochromes P450.

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinolique
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7 $\alpha$ -hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

sur le métabolisme des xénobiotiques, il paraît important à ce stade de faire un bref rappel des voies catalysant les endobiotiques puisque de nombreuses interrelations entre le métabolisme des endobiotiques et celui des xénobiotiques existent. Ce sont essentiellement les CYP des familles 4 à 51 qui présentent des fonctions de biotransformation de molécules endogènes telles que la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, des stérols, des prostaglandines, des acides gras et de la vitamine D3 [2, 17], mais les familles 1 à 3 participent également au catabolisme de ces substances endogènes (*tableau 1*).

Six cytochromes P450 participent à la stéroïdogénèse : les CYP11A1, 11B1 et 11B2 sont des enzymes mitochondriales alors que les CYP17A1, 19A1 et 21A2 sont localisées dans le réticulum endoplasmique. CYP17A1 est nécessaire à la synthèse du cortisol, de la testostérone et d'œstrogènes ; CYP19A1 transforme quant à lui les androgènes en œstrogènes. Le CYP21 catalyse une étape essentielle de la synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes à partir de précurseurs stéroïdes. Les CYP qui métabolisent les médicaments peuvent également jouer un rôle dans le métabolisme de composés endogènes, habituellement celui des stéroïdes tels que l'œstradiol et la testostérone [29]. Ainsi, certaines enzymes dont CYP3A seraient capables de contrôler les concentrations des hormones sexuelles (œstrogènes et androgènes).

Un bon exemple de cette dualité de fonction (endogène et exogène) est observé pour les CYP qui métabolisent



l'acide arachidonique. Au moins 14 CYP appartenant aux familles CYP1, 2, 3, 4, 5A et 8A participent directement ou secondairement à ce métabolisme. Les prostaglandines D, E, F, éicosanoïdes (EET, HETE), leukotriènes et thromboxane A<sub>2</sub> ainsi générés jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques : vasoconstriction et vasodilatation, réponse allergique, agrégation plaquettaire, transport ionique, hyperthermie... [30-32].

Le métabolisme du cholestérol et la biosynthèse des acides biliaires sont également fortement dépendants d'enzymes à cytochrome P450. Le CYP51A1 a un rôle clé dans la synthèse du cholestérol et est l'un des cytochromes P450 les mieux conservés au cours de l'évolution [33]. La synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol est la principale voie catabolique conduisant à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Cette transformation métabolique est catalysée par au moins sept cytochromes P450 différents, dont des membres des familles CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 et CYP46 [34-36].

Ces quelques données soulignent ainsi le rôle des CYP dans la modulation des concentrations plasmatiques de médicaments. De plus, l'implication des mêmes systèmes de détoxification dans la transformation de molécules exogènes et endogènes peut se traduire par des interférences entre le métabolisme endogène et le métabolisme des médicaments ou xénobiotiques.

### Régulation transcriptionnelle des gènes codant les cytochromes P450

La régulation des enzymes impliquées dans le catabolisme des médicaments est un acteur important du métabolisme de ces molécules et de leur efficacité thérapeutiques. Les gènes codant ces enzymes sont inductibles par de nombreux xénobiotiques ou par des ligands endogènes. Il est maintenant clairement établi que la plupart de ces molécules, essentiellement exogènes, vont moduler l'activité transcriptionnelle de certains récepteurs nucléaires ayant pour cibles les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des médicaments. Il est important de noter que ces mêmes récepteurs nucléaires peuvent également réguler des transporteurs membranaires dont les activités vont réduire l'efficacité thérapeutique des médicaments. Ce point ne sera pas développé dans ce chapitre. Ces récepteurs appartiennent à une grande famille de facteurs de transcription activés par des ligands. Ceux-ci sont représentés par une grande variété de molécules lipophiles telles que les stéroïdes, les acides gras, les éicosanoïdes, les acides biliaires et les oxystérols. Cependant, certains récepteurs, dont aucun ligand endogène n'a encore été identifié, peuvent être activés par des médicaments et d'autres xénobiotiques. Parfois, des polluants tels que la

dioxine ou des pesticides, peuvent être des ligands de ces récepteurs. Dans la majorité des cas, la présence d'un ligand endogène ou exogène va moduler la transcription des gènes cibles selon une séquence mécanistique maintenant bien établie (pour une revue lire [35]). Schématiquement, en absence de ligand les facteurs de transcription sont bloqués par des protéines nucléaires (co-represseurs) ou cytoplasmiques (chaperonnes). L'arrivée d'une molécule activatrice (ligand ou autre) va entraîner le départ des protéines « bloquantes » et la libération des capacités transcriptionnelles du facteur de transcription. L'analyse des liens qui existent entre les récepteurs nucléaires et les différents agonistes exogènes (ou toxicogénomique [37]) représente un champ d'étude en pleine expansion [38, 29] ; il sera ainsi possible de comprendre les effets toxiques de molécules agonistes, de classer de nouvelles molécules en fonction de leurs effets biologiques, et d'identifier les facteurs environnementaux qui peuvent moduler l'innocuité et l'efficacité de médicaments existants ou futurs.

Si de nombreux récepteurs nucléaires ont été associés à la régulation transcriptionnelle des cytochromes P450 catabolisant ou détoxifiant les xénobiotiques [29], nous focaliserons ce chapitre sur les récepteurs nucléaires des prégnanes (PXR), des acides gras poly-insaturés (PPAR), de l'androstérone (CAR) et celui moins conventionnel de la dioxine (AhR) qui modulent les gènes codant les enzymes de la phase I et II du métabolisme. Dans la plupart des cas, c'est à partir de l'utilisation de souris dont les gènes endogènes ont été invalidés, ainsi que celles de souris « humanisées », c'est-à-dire dont le gène a été remplacé par la forme humaine, qu'ont été identifiées les cibles moléculaires de ces récepteurs nucléaires et les agonistes endogènes ou exogènes (xénobiotiques). Les récepteurs nucléaires LXR et FXR également régulateurs de CYP et de transporteurs membranaires régulant la détoxification des acides biliaires ne seront pas évoqués.

#### PXR

Le récepteur nucléaire orphelin PXR (*pregnane X receptor*), aussi appelé récepteur des stéroïdes et des xénobiotiques (SXR) ou récepteur activé par les prégnanes, a été identifié par différentes équipes indépendamment, à la fois chez la souris et dans l'espèce humaine (pour une revue lire [39]). Un orthologue a été identifié par la suite chez le rat, le lapin, le chien et le porc. À la différence des autres récepteurs nucléaires, la comparaison de la séquence en acides aminés du domaine de liaison du ligand montre de grandes divergences entre tous les orthologues de PXR. Ces spécificités expliquent les différences observées dans l'induction des gènes codant les CYP par les différents médicaments. Ce point crucial démontre l'intérêt de disposer de modèles animaux se rapprochant le plus possible



du modèle humain pour étudier les effets de xénobiotiques dans l'induction du métabolisme ou de la détoxification des médicaments et ce, pour en augmenter l'efficacité thérapeutique. Ce récepteur est exprimé abondamment dans le foie, l'intestin grêle, le côlon et la glande mammaire. Il est intéressant de noter que ces mêmes tissus sont les sites majeurs d'expression des gènes codant les cytochromes CYP3A.

PXR est un récepteur exclusivement nucléaire qui s'hétérodimérise avec le récepteur RXR de l'acide rétinoïque 9-*cis*. À ce jour, l'inducteur le plus puissant du PXR humain est l'hyperforine, molécule isolée du millepertuis (*Hypericum perforatum*), couramment utilisée en phytothérapie dans le traitement de certains états dépressifs. On comprend donc l'intérêt considérable d'élucider les mécanismes moléculaires régulant l'induction des enzymes de détoxification afin de prévenir les effets indésirables liés à cette phytothérapie [39, 40].

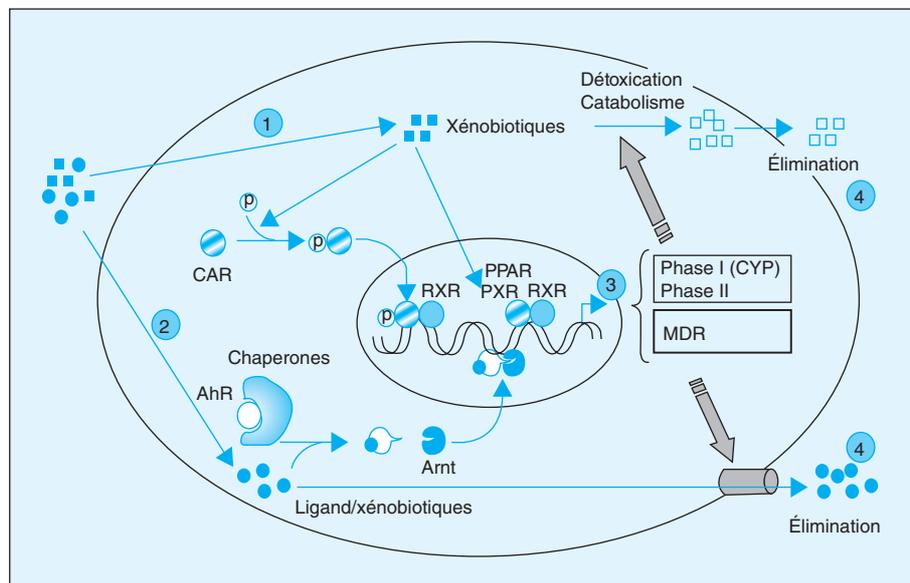
PXR est le régulateur transcriptionnel de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des médicaments (figure 3). Parmi les gènes cibles chez l'homme, on retrouve ceux codant les enzymes de la phase I telles les mono-oxygénases CYP2B6, CYP2C8 et C9, CYP3A4 et 7. CYP3A est responsable du métabolisme oxydatif de la

plupart des médicaments ainsi que de celui des xénobiotiques d'origine alimentaire et environnementale. En plus des enzymes oxydatives de la phase I, PXR peut également réguler la transcription des enzymes de conjugaison de la phase II comme les glutathion S transférases, les sulfotransférases et les UDP-glucuronosyltransférases. Enfin, PXR peut activer le gène MDR1 impliqué dans la sortie cellulaire des molécules exogènes [41].

PXR est donc un acteur clé du système adaptatif de défense contre les xénobiotiques. Le récepteur est activé par de nombreuses molécules endogènes ou exogènes (stéroïdes, antibiotiques, antifongiques, anticancéreux et l'antidépresseur naturel extrait de millepertuis) (tableau 2 [42]). L'analyse cristallographique de la poche de fixation du ligand a mis en évidence une cavité importante permettant l'interaction du récepteur avec de nombreuses molécules hydrophobes. PXR peut donc être considéré comme un *senseur* de toxines hydrophobes [39, 43].

### CAR

D'un point de vue phylogénique, CAR (*constitutive androstane receptor*) est très proche de PXR. Exprimé essentiellement dans le foie, et dans une moindre mesure dans l'intestin, les reins, les poumons, le cœur et les mus-



**Figure 3.** Régulation de la détoxification et du catabolisme des xénobiotiques par les récepteurs nucléaires PXR, PPAR, CAR et le facteur de transcription AhR. Lorsque des xénobiotiques pénètrent dans une cellule, plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu pour limiter l'accumulation de produits toxiques : 1) l'activation de la capacité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires peut être réalisée directement par liaison dans la poche de liaison hydrophobe du ligand (cas de PPAR ou PXR) ou par phosphorylation de la protéine (cas du récepteur CAR par les phénobarbitates) ; 2) certains xénobiotiques se comportent comme des ligands de la protéine AhR : la liaison entraîne la séparation des protéines chaperonnes qui bloquent AhR dans le cytoplasme, la dimérisation avec Arnt et leur fixation sur les promoteurs des gènes cibles. Dans les deux cas, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des protéines provoque une réponse accrue de la cellule, et (3) la synthèse de deux types de protéines : les enzymes de la phase I et de la phase II impliqués dans la détoxification ou le catabolisme des xénobiotiques ou des protéines de transport de type MDR (*multi drug resistance proteins*) ; *in fine* (4), les xénobiotiques sont éliminés de la cellule. Pour plus de détails se référer au texte.



**Tableau 2.** Molécules agonistes des récepteurs nucléaires PXR, CAR, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , et du facteur de transcription AhR impliqués dans les processus de détoxication et d'élimination des xénobiotiques.

Facteurs de transcription	Agonistes potentiels	Exemples d'agonistes	Gènes cibles chez l'homme
PXR	Extraits de plantes	Hyperforine (millepertuis)	CYP2B6
	Statines	Lovastatine	CYP2C8
	Antibiotiques	Rifampicine	CYP2C89
	Antidiabétiques (TZD)	Troglitazone	CYP3A4
	Barbituriques	Phénobarbital	CYP3A7
	Acides biliaires	Acide ursodéoxycholique	GST
	Stéroïdes de synthèse	RU486, dexaméthasone	ST
	Stéroïdes naturels	Prégnénolone	UGT1A1
	Antihormones	Acétate de cyprotérone	MDR1
	CAR	Analgésiques	Acétaminophène (paracétamol)
Barbituriques		Phénobarbital	CYP2C9
Opiacés		Cocaïne	CYP2C19
PPAR $\alpha$	Hypolipémiants (lactones)	Chlofibrate, fénofibrate	CYP1A
			CYP2A
			CYP2C
			CYP2E
			CYP4A
			UGT1A4
			UGT2B4
PPAR $\gamma$	Antidiabétiques (TZD)	Rosiglitazone	CYP4A
AhR	Hydrocarbures polycycliques aromatiques	Dioxine	CYP1A1
	Benzo(a)pyrène	Fumée de cigarette	CYP1A2
	Antiulcéreux (benzimidazole)	Oméprazole	CYP1B1

CYP : cytochrome P450 ; GST : glutathione S transférase ; ST : sulfotransférase ; UGT : UDP-glucuronosyltransférase ; MDR1 : *multi drug resistance protein 1* ; TZD : thiazolidinediones. D'après [42].

cles, CAR interagit avec deux métabolites endogènes de la testostérone : l'androstanol et l'androsténol [44, 45]. La fixation de ces molécules dans la poche de fixation du ligand se traduit contre toute attente par une inhibition des capacités transcriptionnelles de CAR, faisant de ce récepteur le premier exemple d'un facteur de transcription régulé négativement par des ligands endogènes. Au-delà de ce mécanisme, le phénobarbital régule l'activité transcriptionnelle de CAR en augmentant son déplacement depuis le cytoplasme vers le noyau (figure 3). L'utilisation de l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase de type 2A, a démontré que le phénobarbital augmentait la phosphorylation de CAR. Dans l'espèce humaine, l'activation de CAR est associée à une induction des gènes codant des CYP tels que CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 (tableau 2).

Au total, il existe clairement une interaction entre les voies de régulation activées par PXR et CAR [39]. Même si l'analyse des éléments de réponse localisés dans le promoteur des gènes suggère que les deux voies de régulation sont distinctes, il existe des arguments physiologiques et physiopathologiques montrant que CAR peut être considéré comme un senseur de xénobiotiques, et ce même si son spectre d'action est loin d'être aussi large que celui de PXR, sans doute en raison d'une poche de fixation du ligand plus étroite que celle de PXR.

### PPAR

Les récepteurs PPAR (*peroxysome proliferative activated receptor*) comportent trois isotopes (alpha, bêta/delta et gamma). De façon générale, ces récepteurs sont des régulateurs clés de l'homéostasie glucidique, du métabolisme des lipides, de la prolifération et de la différenciation cellulaire (pour une revue sur les PPAR voir [46]). De nombreux effets toxiques des ligands de PPAR $\gamma$  ont été décrits, mais ce sont ceux de PPAR $\alpha$  qui ont été le plus étudiés à ce jour. À côté des acides gras poly-insaturés qui sont les ligands endogènes des PPAR, les fibrates, agents couramment utilisés comme hypolipémiants, sont aussi des ligands de PPAR $\alpha$  retrouvés en grande quantité dans le foie (tableau 2). D'autres agonistes xénobiotiques ont été associés chez les rongeurs à une prolifération de peroxisomes (d'où le nom donné aux récepteurs), à une induction de la prolifération cellulaire et à la suppression de l'apoptose, avec parfois une hépatomégalie et une carcinogénèse [47]. Ces mécanismes abondamment étudiés chez le hamster ont été peu abordés dans l'espèce humaine. Du point de vue de la détoxication, PPAR active aussi bien la transcription de gènes de phase I (CYP1A, CYP2A, CYP2C et CYP2E) que de la phase II de conjugaison comme UGT1A4, et surtout UGT2B4, impliqué



dans la glucuronidation de l'acide hyodéoxycholique, dérivé beaucoup moins toxique que l'acide biliaire lithocholique [48].

### RXR

Le récepteur de l'acide rétinoïque 9-*cis* n'est pas, *per se*, impliqué dans les mécanismes d'induction des CYP par les médicaments. Les données concernant ce récepteur ayant déjà fait l'objet d'une revue [35] ne seront pas détaillées dans cette revue. Étant un partenaire de fixation obligatoire des récepteurs PXR, CAR et PPAR, il semble opportun de signaler que RXR peut modifier la réponse de ces derniers en fonction de la présence de son ligand ou de toute autre molécule agoniste.

### AhR

AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) est structurellement distinct de la super-famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un facteur de transcription de la famille Per-Arnt-Sim présentant des domaines d'interaction hélice-boucle-hélice. Détecté chez presque tous les vertébrés, AhR est présent dans la glande mammaire, le foie, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, et l'utérus [49]. En absence de ligand, AhR est séquestré dans le cytoplasme dans un complexe de molécules chaperonnes (figure 3). La liaison du ligand entraîne la translocation nucléaire de AhR et s'associe avec son partenaire Arnt (*AhR-nuclear translocator*). Le dimère Arnt-AhR avec son ligand peut alors se fixer en amont des gènes cibles au niveau des promoteurs pour moduler leur activité transcriptionnelle. Parmi la centaine de gènes cibles identifiés, CYP1A1 et 1B1 occupent une place de choix, car ils sont impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.

AhR fixe une dioxine, le 2,3,7,8 TCDD (tétrachlorodibenzo-p-dioxin), ainsi que d'autres molécules d'hydrocarbures polycycliques aromatiques fortement hydrophobes, telles que les furanes. Des molécules endogènes ont une faible affinité pour AhR comme la biliverdine, mais également certains rétinoïdes de synthèse et certains pesticides. L'activité transcriptionnelle de AhR peut être inhibée de façon tout à fait intéressante par un dérivé phénolique présent dans le raisin et le vin, le resvératrol, et un oxystérol, le 7-cétocholestérol [50].

Au total, il est maintenant clairement établi que les récepteurs nucléaires peuvent modifier l'induction des CYP impliqués dans les processus de catabolisme/détoxication des médicaments et donc perturber la cinétique d'action des molécules et leur demi-vie. De plus, l'administration concomitante de molécules thérapeutiques et des produits *a priori* inoffensifs, comme le millepertuis ou certains jus de fruits, peut conduire à une inefficacité des médicaments, voire à des effets indésirables. De plus, la démonstration de l'efficacité d'un médicament doit de plus en

plus tenir compte de l'induction des enzymes de la phase I et des modèles utilisés, puisque certains récepteurs nucléaires comme PXR se comportent différemment selon les espèces animales. Au total, la découverte des récepteurs nucléaires comme senseurs des xénobiotiques intervenant dans la régulation des enzymes impliquées dans le métabolisme des médicaments pose la question de l'émergence de ces mêmes récepteurs comme cibles thérapeutiques. Ainsi, l'inhibition de CAR pourrait peut-être prévenir l'accumulation des métabolites hépatotoxiques du paracétamol. À l'inverse, l'induction de PXR pourrait constituer une voie de traitement des patients atteints de cholestase présentant un fort niveau d'acide biliaire. C'est d'ailleurs sur ce principe que repose l'utilisation de l'acide ursodéoxycholique dans le traitement de cette pathologie. Les différents récepteurs nucléaires étant également exprimés dans de nombreux tissus et impliqués dans l'homéostasie de nombreux métabolismes, il appartiendra d'étudier les effets des ligands agonistes sur des animaux « humanisés » avant d'envisager l'utilisation de ces molécules en thérapeutique humaine.

## Importance des cytochromes P450 en clinique

Le métabolisme des médicaments est une étape cruciale dans leur détoxication et leur élimination. Seuls quelques CYP sont fortement impliqués dans les voies de transformation et d'élimination des principes actifs chez l'homme. Il s'agit des CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C9/19, 2D6, 2E1 et 3A4.

### Les différents polymorphismes

Les cytochromes P450 cités ci-dessus sont parmi les enzymes les plus étudiées sur le plan génétique car il existe une forte variabilité individuelle des activités basales et induites, le polymorphisme étant défini comme une variabilité génétique présente dans plus de 1 % de la population. Dans certains cas, ces variations génétiques (génotype) peuvent être associées à des modifications de l'activité enzymatique (phénotype).

### Polymorphisme d'activité

Dans ce cas, l'expression du gène et la quantité de protéines sont inchangées, seule l'activité enzymatique est modifiée. L'effet peut être une augmentation de l'activité (qualifié de « métaboliseur » rapide) ou une diminution de celle-ci (qualifié de « métaboliseur » lent). Le paradigme est constitué par CYP2D6, qui est non seulement le plus étudié, mais également celui pour lequel les différents cas de figure sont rapportés. Ainsi ces modifications d'activité vont altérer la biodisponibilité des médicaments en aug-



**Tableau 3.** Pathologies d'origine génétique pour lesquelles un polymorphisme (CYP1B1, CYP2A6, CYP2D6, CYP7A1, CYP27A1) ou une mutation (CYP11B, CYP17 et CYP21) de P450 est impliqué, d'après [51-56].

Gène	Pathologie
CYP1B1	Glaucome
CYP2A6	Dépendance à la nicotine
CYP2D6	Parkinson
CYP7A1	Hypercholestérolémie
CYP11B	Déficience en aldostérone
CYP17, CYP21	Hyperplasie surrénalienne
CYP27A1	Xanthomatose cérébro-tendineux

**Tableau 4.** Fréquence allélique des polymorphismes affectant le métabolisme des médicaments dans la population caucasienne, d'après [58].

Gène	Prévalence (%)
CYP 1A1/2	10
CYP 2A6	5
CYP 2C9	3
CYP 2C19	5-20
CYP 2D6	5-7
CYP 2E1	> 1

**Tableau 5.** Fréquence allélique de polymorphismes de CYP2D6 conduisant à une activité métabolique lente selon les populations, d'après [21, 58].

Population	Fréquence de « métaboliseurs lents » (%)
Caucasiens	5-10
Japonais	0,7
Chinois	0,7
Moyen-Orientaux	2
Afro-Américains	6,1

mentant ou diminuant leurs métabolismes dépendant des CYP. Les polymorphismes décrits pour les différents CYP sont présentés sur le site : <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>.

### Polymorphisme de régulation

L'action des facteurs de transcription sur la régulation transcriptionnelle des gènes étant dépendante de la séquence de l'ADN dans les promoteurs, on peut concevoir que des mutations et/ou polymorphismes géniques de ces régions puissent entraîner des modifications de leur régulation. En retour, le niveau de protéines peut être affecté. Ainsi, un polymorphisme particulier du gène CYP1A2 qui modifie la réponse aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a été associé à une susceptibilité accrue de développer un cancer du poumon [2].

### Pathologies associées à un polymorphisme génétique de cytochrome P450

Plusieurs pathologies sont associées à des modifications de séquences de CYP (*tableau 3*) [51-56]. Si le lien entre certaines mutations de CYP2D6 et la maladie de Parkinson est encore discuté à l'heure actuelle, la relation entre certains polymorphismes de CYP2A6 et la dépendance à la nicotine est clairement établie [57]. De plus, même s'il s'agit d'une pathologie endocrinienne, il faut souligner l'importance des nombreuses mutations du gène CYP21B, codant une des enzymes de la stéroïdogénèse, associées à l'hyperplasie congénitale des surrénales, une des cinq pathologies dont le dépistage est réalisé à la naissance (prévalence de 1/5 000). Dans la plupart des cas, il s'agit de la conversion génique du gène CYP21B en pseudogène CYP21A. (Voir <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>).

### Polymorphismes affectant le métabolisme des médicaments

Les gènes présentant un polymorphisme affectant d'une façon ou d'une autre le métabolisme des médicaments sont présentés dans le *tableau 4* [58] avec la fréquence allélique dans la population caucasienne. Pour les gènes CYP2A6 et 2D6, des duplications complètes ont été décrites, conduisant à un métabolisme accéléré des substrats et donc à une moindre efficacité thérapeutique par augmentation de la quantité de protéine. Dans le cas particulier de CYP2D6 (plus de 90 allèles décrits : <http://www.imm.ki.se/CYPalleles>), un individu a exprimé jusqu'à treize copies du même gène. Le *tableau 5* [21, 58] présente les fréquences alléliques des « métaboliseurs lents » de CYP2D6 dans différentes populations. Ainsi, la forte variabilité de CYP2D6 dans les différentes populations a conduit les industriels à développer des molécules échappant au métabolisme par cette enzyme [21, 58]. Il reste cependant de nombreux médicaments métabolisés par CYP2D6. Il s'agit en particulier de bêta-bloquants, d'antiarythmiques, d'antidépresseurs tricycliques, d'antipsychotiques ainsi que de certains inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine [19].

Pour CYP2C9, les variants « métaboliseurs lents » concernent jusqu'à 13 % de la population [18]. Les médicaments visés sont essentiellement la phénytoïne et la warfarine [19]. En ce qui concerne CYP2C19, les variations génétiques affectant l'efficacité de l'enzyme représentent jusqu'à 32 % de la population [18]. Plusieurs médicaments sont concernés dont les inhibiteurs de la pompe à proton [19].

Pour CYP3A, le retentissement clinique a été longtemps controversé. Des études récentes montrent cependant clairement un lien entre certains polymorphismes de CYP3A5 et une variation de la pharmacocinétique de certains médicaments. Les médicaments dont le métabolisme est affecté par les polymorphismes de CYP3A5 sont le midazolam



[59], le sirolimus [60, 61], le tacrolimus [62], la ciclosporine [63], la simvastatine et l'atorvastatine [64]. Il a également été montré un impact du polymorphisme de CYP3A4 sur le métabolisme de la nifédipine [65], du tacrolimus [62] ou de la yohimbine [66]. Un travail récent indique que CYP3A7 présente un polymorphisme fonctionnel, présent essentiellement pendant la vie fœtale. Ce nouvel allèle est réparti différemment selon les populations et présente également une répartition tissulaire différente de l'expression constitutive de CYP3A7. Il est vraisemblable que de futurs travaux décriront les variations de cinétique de médicaments induites par cet haplotype [67].

### Interactions médicamenteuses

La biodisponibilité des médicaments peut également être affectée par des interactions médicamenteuses entraînant une toxicité ou l'inefficacité thérapeutique.

### Inhibition de l'activité enzymatique

Le premier mode d'interaction est l'interférence provoquée par une seconde molécule agissant sur le même site catalytique, provoquant ainsi une inhibition compétitive, avec la possibilité ou non de détruire définitivement l'activité métabolique. Dans la mesure où la majorité des médicaments est prise en charge par CYP3A4, la cinétique métabolique de cette enzyme est l'une des plus étudiées. Lors d'essais cliniques, si la molécule d'intérêt est la cible de CYP3A4, des essais d'interférence médicamenteuse sont alors réalisés. Les molécules les plus affectées sont généralement celles présentant des marges thérapeutiques étroites telles que la cyclosporine A. Largement décrites pour des molécules thérapeutiques, dont les macrolides, ces inhibitions peuvent également survenir avec des produits de consommation courante, comme les jus de fruits. Le cas du jus de pamplemousse a été mis en exergue au début des années 1990 car sa consommation régulière conduisait à une inhibition du métabolisme de certains médicaments *via* l'inhibition de CYP3A. Dans certains cas cette propriété d'inhibition des CYP peut être bénéfique : le ritonavir, un inhibiteur de CYP3A, permet de réduire les posologies des autres antirétroviraux utilisés dans le traitement du sida [19].

### Induction de l'activité enzymatique

L'augmentation de l'activité enzymatique peut avoir des effets nocifs ou bénéfiques. En règle générale l'induction d'une voie métabolique va limiter l'efficacité d'un médicament [19]. Il est donc conseillé de vérifier l'éventuel potentiel inducteur de la prescription, afin de ne pas perturber un traitement déjà équilibré. L'induction de CYP3A4 par le millepertuis (dont le mécanisme précis a été décrit plus haut) a conduit à une limitation de son usage thérapeutique [68]. À l'inverse, l'induction du métabolisme du cyclophosphamide augmente la production du

métabolite pharmacologiquement actif, cette particularité pouvant être exploitée dans certains protocoles thérapeutiques [69].

CYP2C9/19, CYP2B6 et CYP3A sont régulés par les facteurs de transcription du fait de la présence de séquences consensus dans les promoteurs des gènes. Ainsi, l'utilisation de molécules inductrices doit-elle être réalisée avec prudence afin de ne pas perturber les traitements en cours. Les principaux agents inducteurs sont la rifampicine, certains anticonvulsivants (carbamazépine, phénytoïne, phénobarbital), les glucocorticoïdes, le modafinil, les glitazones ainsi que certains anti-rétroviraux (efavirenz, nevirapine). (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>).

Lorsque l'activation du métabolisme conduit à une augmentation de la concentration des métabolites toxiques, dans la plupart des cas ceux-ci sont éliminés. La limitation de cette détoxification réside dans la saturation des systèmes d'élimination entraînant ainsi une augmentation des accidents thérapeutiques. L'exemple le plus caricatural est celui de l'alcool qui, en induisant CYP2E1, augmente la toxicité hépatique du paracétamol chez l'alcoolique [70].

### Les cytochromes P450 en tant que biomarqueurs

#### Exposition à des polluants

L'activité des CYP dépend donc du génotype de l'individu mais également des interférences potentielles avec l'environnement. Il est maintenant clairement admis que des polluants environnementaux, comme la fumée de cigarette, peuvent modifier l'activité enzymatique des CYP impliqués dans les processus de détoxification des xénobiotiques. Le métabolisme de la caféine est accéléré chez les fumeurs [71]. Cette caractéristique a été utilisée dans le suivi des fumeurs souhaitant un sevrage [72]. L'étude de la vitesse de métabolisation de la caféine peut également être exploitée pour analyser la concentration plasmatique en PolyChloroBiphényles (PCB) [73]. De même, l'évaluation de l'activité de CYP1A peut être utilisée afin de déterminer l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et aux PCB [74]. Aux exceptions près citées ci-dessus, l'étude des activités des CYP reste néanmoins limitée à des études chez l'animal, puisque les CYP sont des enzymes tissulaires. Cela implique que chez l'homme on ne peut accéder le plus souvent qu'au dosage des métabolites.

#### Facteurs de susceptibilité

Dans le domaine des pathologies chroniques, l'activité des CYP est souvent considérée comme un facteur de susceptibilité de développer certaines pathologies, notamment par la production de métabolites potentiellement mutagènes. Ainsi, CYP2E1 a été associé à la sensibilité accrue aux nitrosamines et à certains cancers secondaires comme celui de la vessie [2, 75]. CYP1A est lui associé au cancer du poumon [2, 75].



### Conclusion

Bien que les CYP soient des enzymes connues depuis de nombreuses années, leur implication dans le métabolisme des médicaments et leur rôle dans la physiopathologie de certaines affections justifient à eux seuls l'intérêt grandissant pour ces protéines. L'analyse de leurs rôles dans les différents processus biologiques souligne la complexité de leur action et la gamme étendue de leurs cibles moléculaires. Le développement de médicaments ayant un spectre thérapeutique plus large mais une spécificité rendue métabolique plus étroite par les CYP représentera un des challenges pour les industriels, tout en prenant en compte les interactions potentielles avec les molécules endogènes et les polluants environnementaux. De plus, la découverte récente des récepteurs nucléaires régulant l'expression de ces enzymes ouvre de nouvelles voies de recherche sur la modulation du métabolisme des xénobiotiques, et par là même, l'efficacité des traitements proposés. Il est maintenant clairement établi que ces récepteurs nucléaires établissent des interrelations entre eux et avec d'autres voies de signalisation. En conséquence, les xénobiotiques, qui sont des ligands de ces récepteurs nucléaires, peuvent moduler l'homéostasie de nombreux endobiotiques (hormones, vitamine D, cholestérol...). À moyen terme, la compréhension de ces interrelations permettra de mieux appréhender les conséquences physiopathologiques de stimuli affectant le métabolisme des médicaments et leurs éventuels effets indésirables. À plus long terme, le développement de molécules modifiant l'activité de ces récepteurs nucléaires permettra sans doute d'optimiser l'efficacité thérapeutique des médicaments.

**Remerciements.** Les auteurs dédient cet article au professeur Anne-Marie Batt décédée le 29 mars 2006. Les auteurs remercient vivement le Docteur Jean-René Jourdain pour la lecture critique du manuscrit et Stéphane Grison pour la réalisation des figures. Une partie des activités de recherche de K. Mouzat et J.M.A. Lobaccaro est soutenue par une subvention des fondations FRM-BNP Paribas.

### Références

1. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 1999 ; 369 : 1-10.
2. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999 ; 20 : 25-137.
3. Remmer H, Merker HJ. Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum : association with drug-metabolizing enzymes. *Science* 1963 ; 142 : 1657-8.
4. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1958 ; 75 : 376-86.
5. Omura T, Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 1962 ; 237 : 1375-6.
6. Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 13469-72.
7. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, *et al.* The P450 gene superfamily : recommended nomenclature. *DNA* 1987 ; 6 : 1-11.
8. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, *et al.* P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996 ; 6 : 1-42.
9. Graham SE, Peterson JA. How similar are P450s and what can their differences teach us ? *Arch Biochem Biophys* 1999 ; 369 : 24-9.
10. Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450 : a success story. *Genome Biol* 2000 ; 1 : S3003.
11. Williams PA, Cosme J, Vinkovic DM, *et al.* Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* 2004 ; 305 : 683-6.
12. Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 38091-4.
13. Lewis DF. 57 varieties : the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* 2004 ; 5 : 305-18.
14. Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes : human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 2002 ; 34 : 83-448.
15. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998 ; 11 : 559-603.
16. Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 2004 ; 95 : 1-6.
17. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002 ; 360 : 1155-62.
18. Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes : an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ; 20 : 342-9.
19. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 2211-21.
20. Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, *et al.* Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988 ; 331 : 442-6.
21. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) : clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005 ; 5 : 6-13.
22. Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes : a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997 ; 29 : 413-580.
23. Hiroi T, Imaoka S, Funae Y. Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 ; 249 : 838-43.
24. Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T. CYP2D in the brain. *Drug Metab Pharmacokin* 2003 ; 18 : 337-49.
25. Pelkonen O, Maenpää J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 1998 ; 28 : 1203-53.



26. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4 : regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999 ; 39 : 1-17.
27. Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA. Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002 ; 42 : 1-23.
28. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 2000 ; 38 : 41-57.
29. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism : the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2003 ; 55 : 649-73.
30. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res* 2001 ; 89 : 753-62.
31. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes : advances in eicosanoid biology. *Science* 2001 ; 294 : 1871-5.
32. Muller B. Pharmacology of thromboxane A2, prostacyclin and other eicosanoids in the cardiovascular system. *Therapie* 1991 ; 46 : 217-21.
33. Lepesheva GI, Waterman MR. CYP51--the omnipotent P450. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 215 : 165-70.
34. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, Lutton C. Hepatic and extrahepatic sterol 27-hydroxylase : roles in cholesterol and bile acid metabolism and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2003 ; 27 : 100-11.
35. Souidi M, Dubrac S, Parquet M, *et al.* Oxysterols : metabolism, biological role and associated diseases. *Gastroenterol Clin Biol* 2004 ; 28 : 279-93.
36. Souidi M, Parquet M, Dubrac S, Lutton C. New bile acid biosynthesis pathways. *Gastroenterol Clin Biol* 2001 ; 25 : 81-92.
37. Ulrich RG. The toxicogenomics of nuclear receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 2003 ; 7 : 505-10.
38. Meyer UA, Gut J. Genomics and the prediction of xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002 ; 181-182 : 463-6.
39. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor : a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 2002 ; 23 : 687-702.
40. Moore LB, Goodwin B, Jones SA, *et al.* St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 7500-2.
41. Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L, Evans RM, Xie W. A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. *Curr Drug Metab* 2003 ; 4 : 59-72.
42. Handschin C, Podvinez M, Meyer UA. *In silico* approaches, and *in vitro* and *in vivo* experiments to predict induction of drug metabolism. *Drug News Perspect* 2003 ; 16 : 423-34.
43. Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002 ; 62 : 638-46.
44. Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, *et al.* Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* 1998 ; 395 : 612-5.
45. Dufort I, Soucy P, Lacoste L, Luu-The V. Comparative biosynthetic pathway of androstenol and androgens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 ; 77 : 223-7.
46. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors : nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999 ; 20 : 649-88.
47. Bosgra S, Mennes W, Seinen W. Proceedings in uncovering the mechanism behind peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Toxicology* 2005 ; 206 : 309-23.
48. Barbier O, Duran-Sandoval D, Pineda-Torra I, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 32852-60.
49. Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects of TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003 ; 1619 : 263-8.
50. Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 3054-9.
51. White PC. Aldosterone synthase deficiency and related disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2004 ; 217 : 81-7.
52. Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA. The genetic basis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002 ; 73 : 363-70.
53. Tyndale RF. Genetics of alcohol and tobacco use in humans. *Ann Med* 2003 ; 35 : 94-121.
54. Hubacek JA, Pitha J, Skodova Z, *et al.* Polymorphisms in CYP-7A1, not APOE, influence the change in plasma lipids in response to population dietary change in an 8 year follow-up ; results from the Czech Monica study. *Clin Biochem* 2003 ; 36 : 263-7.
55. Sarfarazi M, Stoilov I. Molecular genetics of primary congenital glaucoma. *Eye* 2000 ; 14 (Pt 3B) : 422-8.
56. Javitt NB. 25R,26-hydroxycholesterol revisited : synthesis, metabolism, and biologic roles. *J Lipid Res* 2002 ; 43 : 665-70.
57. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clin Pharmacol Ther* 2005 ; 77 : 145-58.
58. Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy : the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 2004 ; 25 : 193-200.
59. He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther* 2005 ; 77 : 373-87.
60. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, *et al.* The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005 ; 14 : 37-42.
61. Anglicheau D, Le Corre D, Lechaton S, *et al.* Consequences of genetic polymorphisms for sirolimus requirements after renal transplant in patients on primary sirolimus therapy. *Am J Transplant* 2005 ; 5 : 595-603.
62. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003 ; 74 : 245-54.
63. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, *et al.* *In vitro* metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004 ; 68 : 1889-902.



64. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, *et al.* Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2004 ; 14 : 523-5.
65. Lee SJ, Bell DA, Coulter SJ, Ghanayem B, Goldstein JA, Recombinant CYP. 3A4\*17 is defective in metabolizing the hypertensive drug nifedipine, and the CYP3A4\*17 allele may occur on the same chromosome as CYP3A5\*3, representing a new putative defective CYP3A haplotype. *J Pharmacol Exp Ther* 2005 ; 313 : 302-9.
66. Le Corre P, Parmer RJ, Kailasam MT, *et al.* Human sympathetic activation by alpha2-adrenergic blockade with yohimbine : bimodal, epistatic influence of cytochrome P450-mediated drug metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 2004 ; 76 : 139-53.
67. Rodriguez-Antona C, Axelson M, Otter C, Rane A, Ingelman-Sundberg M. A novel polymorphic cytochrome P450 formed by splicing of CYP3A7 and the pseudogene CYP3AP1. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 28324-31.
68. Mannel M. Drug interactions with St John's wort : mechanisms and clinical implications. *Drug Saf* 2004 ; 27 : 773-97.
69. Rooney PH, Telfer C, McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. The role of cytochrome P450 in cytotoxic bioactivation : future therapeutic directions. *Curr Cancer Drug Targets* 2004 ; 4 : 257-65.
70. Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005 ; 45 : 177-202.
71. Zevin S, Benowitz NL. Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet* 1999 ; 36 : 425-38.
72. Faber MS, Fuhr U. Time response of cytochrome P450 1A2 activity on cessation of heavy smoking. *Clin Pharmacol Ther* 2004 ; 76 : 178-84.
73. Fitzgerald EF, Hwang SA, Lambert G, Gomez M, Tarbell A. PCB exposure and *in vivo* CYP1A2 activity among Native Americans. *Environ Health Perspect* 2005 ; 113 : 272-7.
74. Fent K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 2003 ; 140-141 : 353-65.
75. Guengerich FP. Cytochrome P450 : what have we learned and what are the future issues ? *Drug Metab Rev* 2004 ; 36 : 159-97.



## *Références bibliographiques*



1. Aboulghar, M. A., R. T. Mansour, G. I. Serour, B. A. Elhelw and M. Shaarawy (1998) Elevated concentrations of angiogenin in serum and ascitic fluid from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* 13(8):2068-71
2. Albers, M., B. Blume, T. Schlueter, M. B. Wright, I. Kober, C. Kremoser, U. Deuschle and M. Koegl (2006) A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands. Competitive recruitment of activators and repressors. *J Biol Chem* 281(8):4920-30
3. Alberti, S., G. Schuster, P. Parini, D. Feltkamp, U. Diczfalusy, M. Rudling, B. Angelin, I. Bjorkhem, S. Pettersson and J. A. Gustafsson (2001) Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest* 107(5):565-73
4. Alberti, S., K. R. Steffensen and J. A. Gustafsson (2000) Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene* 243(1-2):93-103
5. Anderson, L. M., S. E. Choe, R. Y. Yukhananov, R. L. Hopfner, G. M. Church, R. E. Pratt and V. J. Dzau (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
6. Andersson, C., M. M. Zaman, A. B. Jones and S. D. Freedman (2007) Alterations in immune response and PPAR/LXR regulation in cystic fibrosis macrophages. *J Cyst Fibros*
7. Andreasen, K. R., M. L. Andersen and A. L. Schantz (2004) Obesity and pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83(11):1022-9
8. Antonio, V., B. Janvier, A. Brouillet, M. Andreani and M. Raymondjean (2003) Oxysterol and 9-cis-retinoic acid stimulate the group IIA secretory phospholipase A2 gene in rat smooth-muscle cells. *Biochem J* 376(Pt 2):351-60
9. Aranda, A. and A. Pascual (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81(3):1269-304
10. Araya, Z. and K. Wikvall (1999) 6alpha-hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1438(1):47-54
11. Aumais, J. P., H. S. Lee, C. DeGannes, J. Horsford and J. H. White (1996) Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 271(21):12568-77
12. Baker, S. J. and N. Spears (1999) The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum Reprod Update* 5(2):153-65
13. Baker, S. J., V. Srsen, R. Lapping and N. Spears (2001) Combined effect of follicle-follicle interactions and declining follicle-stimulating hormone on murine follicle health in vitro. *Biol Reprod* 65(4):1304-10
14. Bakir, F., S. Kher, M. Pannala, N. Wilson, T. Nguyen, I. Sircar, K. Takedomi, C. Fukushima, J. Zapf, K. Xu, S. H. Zhang, J. Liu, L. Morera, L. Schneider, N. Sakurai, R. Jack and J. F. Cheng (2007) Discovery and structure-activity relationship studies of indole derivatives as liver X receptor (LXR) agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 17(12):3473-9
15. Barau, G., P. Y. Robillard, T. C. Hulsey, F. Dedecker, A. Laffite, P. Gerardin and E. Kauffmann (2006) Linear association between maternal pre-pregnancy body mass index and risk of caesarean section in term deliveries. *Bjog* 113(10):1173-7
16. Barish, G. D., M. Downes, W. A. Alaynick, R. T. Yu, C. B. Ocampo, A. L. Bookout, D. J. Mangelsdorf and R. M. Evans (2005) A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol* 19(10):2466-77
17. Barnett, K. R., C. Schilling, C. R. Greenfeld, D. Tomic and J. A. Flaws (2006) Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update* 12(5):537-55
18. Beaven, S. and Tontonoz, P. (2006) Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu Rev Med* 57:313-29



19. Beigneux, A. P., A. H. Moser, J. K. Shigenaga, C. Grunfeld and K. R. Feingold (2000) The acute phase response is associated with retinoid X receptor repression in rodent liver. *J Biol Chem* 275(21):16390-9
20. Bergdahl, A. and K. Sward (2004) Caveolae-associated signalling in smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 82(5):289-99
21. Berge, K. E., H. Tian, G. A. Graf, L. Yu, N. V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes and H. H. Hobbs (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290(5497):1771-5
22. Berto, A. G., L. O. Sampaio, C. R. Franco, R. M. Cesar, Jr. and Y. M. Michelacci (2003) A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. *Biochim Biophys Acta* 1619(1):98-112
23. Bettoun, D. J., T. P. Burris, K. A. Houck, D. W. Buck, 2nd, K. R. Stayrook, B. Khalifa, J. Lu, W. W. Chin and S. Nagpal (2003) Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin D receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 17(11):2320-8
24. Bookout, A. L. and D. J. Mangelsdorf (2003) Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 1(e012)
25. Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375(6530):377-82
26. Bramlett, K. S., K. A. Houck, K. M. Borchert, M. S. Dowless, P. Kulanthaivel, Y. Zhang, T. P. Beyer, R. Schmidt, J. S. Thomas, L. F. Michael, R. Barr, C. Montrose, P. I. Eacho, G. Cao and T. P. Burris (2003) A natural product ligand of the oxysterol receptor, liver X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 307(1):291-6
27. Brendel, C., K. Schoonjans, O. A. Botrugno, E. Treuter and J. Auwerx (2002) The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 16(9):2065-76
28. Brooks-Wilson, A., M. Marcil, S. M. Clee, L. H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J. A. Collins, H. O. Molhuizen, O. Loubser, B. F. Ouellette, K. Fichter, K. J. Ashbourne-Excoffon, C. W. Sensen, S. Scherer, S. Mott, M. Denis, D. Martindale, J. Frohlich, K. Morgan, B. Koop, S. Pimstone, J. J. Kastelein, J. Genest, Jr. and M. R. Hayden (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22(4):336-45
29. Brown, A. J. and W. Jessup (1999) Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142(1):1-28
30. Brown, L. F., K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak and L. van de Water (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176(5):1375-9
31. Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20):11041-8
32. Buchwalter, G., C. Gross and B. Waslyk (2004) Ets ternary complex transcription factors. *Gene* 324(1-14)
33. Budev, M. M., A. C. Arroliga and T. Falcone (2005) Ovarian hyperstimulation syndrome. *Crit Care Med* 33(10 Suppl):S301-6
34. Caira, F., P. Antonson, M. Peltto-Huikko, E. Treuter and J. A. Gustafsson (2000) Cloning and characterization of RAP250, a novel nuclear receptor coactivator. *J Biol Chem* 275(8):5308-17
35. Camenisch, G., M. T. Pisabarro, D. Sherman, J. Kowalski, M. Nagel, P. Hass, M. H. Xie, A. Gurney, S. Bodary, X. H. Liang, K. Clark, M. Beresini, N. Ferrara and H. P. Gerber (2002) ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem* 277(19):17281-90



36. Cao, G., Y. Liang, C. L. Broderick, B. A. Oldham, T. P. Beyer, R. J. Schmidt, Y. Zhang, K. R. Stayrook, C. Suen, K. A. Otto, A. R. Miller, J. Dai, P. Foxworthy, H. Gao, T. P. Ryan, X. C. Jiang, T. P. Burris, P. I. Eacho and G. J. Etgen (2003) Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 278(2):1131-6
37. Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein and T. Werner (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21(13):2933-42
38. Castrillo, A., S. B. Joseph, C. Marathe, D. J. Mangelsdorf and P. Tontonoz (2003a) Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 278(12):10443-9
39. Castrillo, A., S. B. Joseph, S. A. Vaidya, M. Haberland, A. M. Fogelman, G. Cheng and P. Tontonoz (2003b) Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 12(4):805-16
40. Cha, J. Y. and J. J. Repa (2007) The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 282(1):743-51
41. Challis, J. R. G. and L. S. J. (1994) Parturition. E. Knobil and J. D. Neill. *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, 2, pp 985-1032
42. Chawla, A., W. A. Boisvert, C. H. Lee, B. A. Laffitte, Y. Barak, S. B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. A. Edwards, L. K. Curtiss, R. M. Evans and P. Tontonoz (2001a) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7(1):161-71
43. Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf (2001b) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294(5548):1866-70
44. Chen, J., A. D. Cooper and B. Levy-Wilson (1999) Hepatocyte nuclear factor 1 binds to and transactivates the human but not the rat CYP7A1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 260(3):829-34
45. Chen, J. D. and R. M. Evans (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548):454-7
46. Chen, M., S. Beaven and P. Tontonoz (2005) Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J Lipid Res* 46(12):2570-9
47. Chen, M., M. N. Bradley, S. W. Beaven and P. Tontonoz (2006) Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Lett* 580(20):4835-41
48. Chen, W., G. Chen, D. L. Head, D. J. Mangelsdorf and D. W. Russell (2007) Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* 5(1):73-9
49. Chu, K., M. Miyazaki, W. C. Man and J. M. Ntambi (2006) Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol* 26(18):6786-98
50. Collins, J. L., A. M. Fivush, M. A. Watson, C. M. Galardi, M. C. Lewis, L. B. Moore, D. J. Parks, J. G. Wilson, T. K. Tippin, J. G. Binz, K. D. Plunket, D. G. Morgan, E. J. Beaudet, K. D. Whitney, S. A. Kliewer and T. M. Willson (2002) Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 45(10):1963-6
51. Collot-Teixeira, S., J. Martin, C. McDermott-Roe, R. Poston and J. L. McGregor (2007) CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 75(3):468-77
52. Condon, J. C., D. B. Hardy, K. Kovaric and C. R. Mendelson (2006) Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* 20(4):764-75



53. Condon, J. C., P. Jeyasuria, J. M. Faust and C. R. Mendelson (2004) Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):4978-83
54. Costet, P., Y. Luo, N. Wang and A. R. Tall (2000) Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275(36):28240-5
55. Cummins, C. L., D. H. Volle, Y. Zhang, J. G. McDonald, B. Sion, A. M. Lefrancois-Martinez, F. Cairra, G. Veyssiere, D. J. Mangelsdorf and J. M. Lobaccaro (2006) Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116(7):1902-12
56. Davies, J. D., K. L. Carpenter, I. R. Challis, N. L. Figg, R. McNair, D. Proudfoot, P. L. Weissberg and C. M. Shanahan (2005) Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280(5):3911-9
57. de Jong, A., J. Plat and R. P. Mensink (2003) Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J Nutr Biochem* 14(7):362-9
58. de Kretser, D. M., M. P. Hedger, K. L. Loveland and D. J. Phillips (2002) Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update* 8(6):529-41
59. Dearry, A., J. A. Gingrich, P. Falardeau, R. T. Fremeau, Jr., M. D. Bates and M. G. Caron (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347(6288):72-6
60. Delvigne, A. and S. Rozenberg (2002) A qualitative systematic review of coasting, a procedure to avoid ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients. *Hum Reprod Update* 8(3):291-6
61. Dentin, R., P. D. Denechaud, F. Benhamed, J. Girard and C. Postic (2006) Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 136(5):1145-9
62. Dissen, G. A., H. E. Lara, W. H. Fahrenbach, M. E. Costa and S. R. Ojeda (1994) Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 134(3):1146-54
63. Dockery, P. and A. W. Rogers (1989) The effects of steroids on the fine structure of the endometrium. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 3(2):227-48
64. Doherty, D. A., E. F. Magann, J. Francis, J. C. Morrison and J. P. Newnham (2006) Pre-pregnancy body mass index and pregnancy outcomes. *Int J Gynaecol Obstet* 95(3):242-7
65. Driancourt, M. A., A. Gougeon, D. Royère and C. Thibault (1991a) La fonction ovarienne. C. Thibault and M. C. Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse Editions Marketing SA, pp 273-278
66. Driancourt, M. A., D. Royère, B. Hédon and M. C. Levasseur (1991b) Cycles œstriens et cycles menstruels. C. Thibault and M. C. Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse Editions Marketing SA, pp 573-587
67. Drouineaud, V., P. Sagot, C. Garrido, E. Logette, V. Deckert, P. Gambert, C. Jimenez, B. Staels, L. Lagrost and D. Masson (2007) Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol Hum Reprod* 13(6):373-9
68. Duran-Sandoval, D., A. C. Thomas, B. Bailleul, J. C. Fruchart and B. Staels (2003) [Pharmacology of PPARalpha, PPARgamma and dual PPARalpha/gamma agonists in clinical development]. *Med Sci (Paris)* 19(8-9):819-25
69. Durlinger, A. L., M. J. Gruijters, P. Kramer, B. Karels, T. R. Kumar, M. M. Matzuk, U. M. Rose, F. H. de Jong, J. T. Uilenbroek, J. A. Grootegoed and A. P. Themmen (2001) Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142(11):4891-9



70. Durlinger, A. L., J. A. Visser and A. P. Themmen (2002) Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction* 124(5):601-9
71. Efanov, A. M., S. Sewing, K. Bokvist and J. Gromada (2004) Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 53 Suppl 3(S75-8)
72. Elchalal, U. and J. G. Schenker (1997) The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome--views and ideas. *Hum Reprod* 12(6):1129-37
73. Engel, T., S. Lorkowski, A. Lueken, S. Rust, B. Schluter, G. Berger, P. Cullen and G. Assmann (2001) The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 288(2):483-8
74. Enskog, A., M. Henriksson, M. Unander, L. Nilsson and M. Brannstrom (1999) Prospective study of the clinical and laboratory parameters of patients in whom ovarian hyperstimulation syndrome developed during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 71(5):808-14
75. Escriva, H., R. Safi, C. Hanni, M. C. Langlois, P. Saumitou-Laprade, D. Stehelin, A. Capron, R. Pierce and V. Laudet (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13):6803-8
76. Farnegardh, M., T. Bonn, S. Sun, J. Ljunggren, H. Ahola, A. Wilhelmsson, J. A. Gustafsson and M. Carlquist (2003) 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* 278(40):38821-8
77. Feltkamp, D., F. F. Wiebel, S. Alberti and J. A. Gustafsson (1999) Identification of a novel DNA binding site for nuclear orphan receptor OR1. *J Biol Chem* 274(15):10421-9
78. Ferlitsch, K., M. O. Sator, D. M. Gruber, E. Rucklinger, C. J. Gruber and J. C. Huber (2004) Body mass index, follicle-stimulating hormone and their predictive value in in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 21(12):431-6
79. Forman, B. M., B. Ruan, J. Chen, G. J. Schroepfer, Jr. and R. M. Evans (1997) The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):10588-93
80. Freeman, M. E. (1994) The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. E. Knobil and J. D. Neill. *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, 2, pp 613-658
81. Fu, X., J. G. Menke, Y. Chen, G. Zhou, K. L. MacNaul, S. D. Wright, C. P. Sparrow and E. G. Lund (2001) 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 276(42):38378-87
82. Gan, X., R. Kaplan, J. G. Menke, K. MacNaul, Y. Chen, C. P. Sparrow, G. Zhou, S. D. Wright and T. Q. Cai (2001) Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. *J Biol Chem* 276(52):48702-8
83. Georget, V., B. Terouanne, J. C. Nicolas and C. Sultan (2002) Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry* 41(39):11824-31
84. Gerin, I., V. W. Dolinsky, J. G. Shackman, R. T. Kennedy, S. H. Chiang, C. F. Burant, K. R. Steffensen, J. A. Gustafsson and O. A. MacDougald (2005) LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem* 280(24):23024-31
85. Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding and V. Laudet (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58(4):685-704



86. Ghisletti, S., W. Huang, S. Ogawa, G. Pascual, M. E. Lin, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (2007) Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25(1):57-70
87. Giguere, V. (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 20(5):689-725
88. Gimpl, G. and F. Fahrenholz (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 81(2):629-83
89. Girling, J. E. and P. A. Rogers (2005) Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 8(2):89-99
90. Glass, C. K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 15(3):391-407
91. Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104(4):503-16
92. Goldstein, J. L., R. A. DeBose-Boyd and M. S. Brown (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124(1):35-46
93. Gore-Langton, R. E. and D. T. Armstrong (1994) Follicular steroidogenesis and its control. E. Knobil and J. D. Neill. *The Physiology of Reproduction, Second Edition*. Raven Press, 1, pp 571-628
94. Grondahl, C., J. L. Ottesen, M. Lessl, P. Faarup, A. Murray, F. C. Gronvald, C. Hegele-Hartung and I. Ahnfelt-Ronne (1998) Meiosis-activating sterol promotes resumption of meiosis in mouse oocytes cultured in vitro in contrast to related oxysterols. *Biol Reprod* 58(5):1297-302
95. Grudzinskas, J. G. and P. E. Egbase (1998) Prevention of ovarian hyperstimulation syndrome: novel strategies. *Hum Reprod* 13(8):2051-3
96. Gueguen, Y., K. Mouzat, L. Ferrari, E. Tissandie, J. M. Lobaccaro, A. M. Batt, F. Paquet, P. Voisin, J. Aigueperse, P. Gourmelon and M. Souidi (2006) [Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance]. *Ann Biol Clin (Paris)* 64(6):535-48
97. Hashimoto, K., S. Matsumoto, M. Yamada, T. Satoh and M. Mori (2007) Liver X receptor-alpha gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* 148(10):4667-75
98. Hay, R. T. (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18(1):1-12
99. Hazzard, T. M. and R. L. Stouffer (2000) Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14(6):883-900
100. Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare and M. G. Parker (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387(6634):733-6
101. Herath, K., H. Jayasuriya, J. G. Ondeyka, Z. Guan, R. P. Borris, E. Stijfhoorn, D. Stevenson, J. Wang, N. Sharma, K. Macnaul, J. G. Menke, A. Ali, M. J. Schulman and S. B. Singh (2005a) Guttiferone I, a new prenylated benzophenone from *Garcinia humilis* as a liver X receptor ligand. *J Nat Prod* 68(4):617-9
102. Herath, K. B., H. Jayasuriya, Z. Guan, M. Schulman, C. Ruby, N. Sharma, K. MacNaul, J. G. Menke, S. Kodali, A. Galgoci, J. Wang and S. B. Singh (2005b) Anthrabenzoquinones from *Streptomyces* sp. as liver X receptor ligands and antibacterial agents. *J Nat Prod* 68(9):1437-40
103. Hermann, B. P. and L. L. Heckert (2007) Transcriptional regulation of the FSH receptor: new perspectives. *Mol Cell Endocrinol* 260-262(100-8)
104. Hollenberg, S. M. and R. M. Evans (1988) Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55(5):899-906
105. Hollenberg, S. M., C. Weinberger, E. S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. B. Thompson, M. G. Rosenfeld and R. M. Evans (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047):635-41



106. Homburg, R. and V. Insler (2002) Ovulation induction in perspective. *Hum Reprod Update* 8(5):449-62
107. Hong, T., T. Nakagawa, W. Pan, M. Y. Kim, W. L. Kraus, T. Ikehara, K. Yasui, H. Aihara, M. Takebe, M. Muramatsu and T. Ito (2004) Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* 317(1):259-64
108. Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass and *et al.* (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548):397-404
109. Hu, B., M. Collini, R. Unwalla, C. Miller, R. Singhaus, E. Quinet, D. Savio, A. Halpern, M. Basso, J. Keith, V. Clerin, L. Chen, C. Resmini, Q. Y. Liu, I. Feingold, C. Huselton, F. Azam, M. Farnegardh, C. Enroth, T. Bonn, A. Goos-Nilsson, A. Wilhelmsson, P. Nambi and J. Wrobel (2006) Discovery of phenyl acetic acid substituted quinolines as novel liver X receptor agonists for the treatment of atherosclerosis. *J Med Chem* 49(21):6151-4
110. Hu, B., J. Jetter, D. Kaufman, R. Singhaus, R. Bernotas, R. Unwalla, E. Quinet, D. Savio, A. Halpern, M. Basso, J. Keith, V. Clerin, L. Chen, Q. Y. Liu, I. Feingold, C. Huselton, F. Azam, A. Goos-Nilsson, A. Wilhelmsson, P. Nambi and J. Wrobel (2007) Further modification on phenyl acetic acid based quinolines as liver X receptor modulators. *Bioorg Med Chem* 15(10):3321-33
111. Hu, X. and M. A. Lazar (2000) Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 11(1):6-10
112. Hu, X., S. Li, J. Wu, C. Xia and D. S. Lala (2003) Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol* 17(6):1019-26
113. Hu, X., Y. Li and M. A. Lazar (2001) Determinants of CoRNR-dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21(5):1747-58
114. Huang, C. J., D. Feltkamp, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1998) Synergistic activation of RLD-1 by agents triggering PKA and PKC dependent signalling. *Biochem Biophys Res Commun* 243(3):657-63
115. Huang, T. H., V. Razmovski-Naumovski, N. K. Salam, R. K. Duke, V. H. Tran, C. C. Duke and B. D. Roufogalis (2005) A novel LXR-alpha activator identified from the natural product *Gynostemma pentaphyllum*. *Biochem Pharmacol* 70(9):1298-308
116. Hussein, M. R. (2005) Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 11(2):162-77
117. Huszar, G. and J. M. Roberts (1982) Biochemistry and pharmacology of the myometrium and labor: regulation at the cellular and molecular levels. *Am J Obstet Gynecol* 142(2):225-37
118. Huuskonen, J., P. E. Fielding and C. J. Fielding (2004) Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4):703-8
119. Huuskonen, J., M. Vishnu, P. E. Fielding and C. J. Fielding (2005) Activation of ATP-binding cassette transporter A1 transcription by chromatin remodeling complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6):1180-5
120. Ide, T., H. Shimano, T. Yoshikawa, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, M. Nakakuki, S. Yatoh, Y. Iizuka, S. Tomita, K. Ohashi, A. Takahashi, H. Sone, T. Gotoda, J. Osuga, S. Ishibashi and N. Yamada (2003) Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling. *Mol Endocrinol* 17(7):1255-67
121. Inaba, T., M. Matsuda, M. Shimamura, N. Takei, N. Terasaka, Y. Ando, H. Yasumo, R. Koishi, M. Makishima and I. Shimomura (2003) Angiotensin-like protein 3 mediates hypertriglyceridemia induced by the liver X receptor. *J Biol Chem* 278(24):21344-51



122. Ishii, S., K. Iizuka, B. C. Miller and K. Uyeda (2004) Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44):15597-602
123. Itaya, H., T. Imaizumi, H. Yoshida, M. Koyama, S. Suzuki and K. Satoh (2001) Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Thromb Haemost* 85(1):171-6
124. Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20(197-216
125. Janowski, B. A., M. J. Grogan, S. A. Jones, G. B. Wisely, S. A. Kliewer, E. J. Corey and D. J. Mangelsdorf (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1):266-71
126. Janowski, B. A., P. J. Willy, T. R. Devi, J. R. Falck and D. J. Mangelsdorf (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383(6602):728-31
127. Jayasuriya, H., K. B. Herath, J. G. Ondeyka, Z. Guan, R. P. Borris, S. Tiwari, W. de Jong, F. Chavez, J. Moss, D. W. Stevenson, H. T. Beck, M. Slattery, N. Zamora, M. Schulman, A. Ali, N. Sharma, K. MacNaul, N. Hayes, J. G. Menke and S. B. Singh (2005) Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J Nat Prod* 68(8):1247-52
128. Jaye, M. C., J. A. Krawiec, N. Campobasso, A. Smallwood, C. Qiu, Q. Lu, J. J. Kerrigan, M. De Los Frailes Alvaro, B. Laffitte, W. S. Liu, J. P. Marino, Jr., C. R. Meyer, J. A. Nichols, D. J. Parks, P. Perez, L. Sarov-Blat, S. D. Seepersaud, K. M. Steplewski, S. K. Thompson, P. Wang, M. A. Watson, C. L. Webb, D. Haigh, J. A. Caravella, C. H. Macphee, T. M. Willson and J. L. Collins (2005) Discovery of substituted maleimides as liver X receptor agonists and determination of a ligand-bound crystal structure. *J Med Chem* 48(17):5419-22
129. Jick, H., G. L. Zornberg, S. S. Jick, S. Seshadri and D. A. Drachman (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356(9242):1627-31
130. Joseph, S. B., M. N. Bradley, A. Castrillo, K. W. Bruhn, P. A. Mak, L. Pei, J. Hogenesch, M. O'Connell R, G. Cheng, E. Saez, J. F. Miller and P. Tontonoz (2004) LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119(2):299-309
131. Joseph, S. B., A. Castrillo, B. A. Laffitte, D. J. Mangelsdorf and P. Tontonoz (2003) Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9(2):213-9
132. Joseph, S. B., B. A. Laffitte, P. H. Patel, M. A. Watson, K. E. Matsukuma, R. Walczak, J. L. Collins, T. F. Osborne and P. Tontonoz (2002a) Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277(13):11019-25
133. Joseph, S. B., E. McKilligin, L. Pei, M. A. Watson, A. R. Collins, B. A. Laffitte, M. Chen, G. Noh, J. Goodman, G. N. Hagger, J. Tran, T. K. Tippin, X. Wang, A. J. Lusis, W. A. Hsueh, R. E. Law, J. L. Collins, T. M. Willson and P. Tontonoz (2002b) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11):7604-9
134. Kabiru, W. and B. D. Raynor (2004) Obstetric outcomes associated with increase in BMI category during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 191(3):928-32
135. Kamat, B. R., L. F. Brown, E. J. Manseau, D. R. Senger and H. F. Dvorak (1995) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 146(1):157-65
136. Kaneko, E., M. Matsuda, Y. Yamada, Y. Tachibana, I. Shimomura and M. Makishima (2003) Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 278(38):36091-8
137. Kaplan, R., T. Zhang, M. Hernandez, F. X. Gan, S. D. Wright, M. G. Waters and T. Q. Cai (2003) Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *J Lipid Res* 44(1):136-43



138. Kase, E. T., G. H. Thoresen, S. Westerlund, K. Hojlund, A. C. Rustan and M. Gaster (2007) Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia* 50(10):2171-80
139. Kaul, D. and M. I. Baba (2005) Genomic effect of vitamin 'C' and statins within human mononuclear cells involved in atherogenic process. *Eur J Clin Nutr* 59(8):978-81
140. Kawai, K., S. Sasaki, H. Morita, T. Ito, S. Suzuki, H. Misawa and H. Nakamura (2004) Unliganded thyroid hormone receptor-beta1 represses liver X receptor alpha/oxysterol-dependent transactivation. *Endocrinology* 145(12):5515-24
141. Kennedy, M. A., A. Venkateswaran, P. T. Tarr, I. Xenarios, J. Kudoh, N. Shimizu and P. A. Edwards (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
142. Kher, S., K. Lake, I. Sircar, M. Pannala, F. Bakir, J. Zapf, K. Xu, S. H. Zhang, J. Liu, L. Morera, N. Sakurai, R. Jack and J. F. Cheng (2007) 2-Aryl-N-acyl indole derivatives as liver X receptor (LXR) agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 17(16):4442-6
143. Khovidhunkit, W., M. S. Kim, R. A. Memon, J. K. Shigenaga, A. H. Moser, K. R. Feingold and C. Grunfeld (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45(7):1169-96
144. Kim, M. S., T. R. Sweeney, J. K. Shigenaga, L. G. Chui, A. Moser, C. Grunfeld and K. R. Feingold (2007) Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXRalpha, PPARalpha, PPARgamma, LXRalpha, and the coactivators SRC-1, PGC-1alpha, and PGC-1beta in liver cells. *Metabolism* 56(2):267-79
145. Kim, S. W., K. Park, E. Kwak, E. Choi, S. Lee, J. Ham, H. Kang, J. M. Kim, S. Y. Hwang, Y. Y. Kong, K. Lee and J. W. Lee (2003) Activating signal cointegrator 2 required for liver lipid metabolism mediated by liver X receptors in mice. *Mol Cell Biol* 23(10):3583-92
146. Kitajima, Y., T. Endo, K. Nagasawa, K. Manase, H. Honnma, T. Baba, T. Hayashi, H. Chiba, N. Sawada and T. Saito (2006) Hyperstimulation and a gonadotropin-releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. *Endocrinology* 147(2):694-9
147. Kliewer, S. A., J. M. Lehmann and T. M. Willson (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284(5415):757-60
148. Kliewer, S. A., S. S. Sundseth, S. A. Jones, P. J. Brown, G. B. Wisely, C. S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T. M. Willson, J. M. Lenhard and J. M. Lehmann (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4318-23
149. Knaus, H. G., O. B. McManus, S. H. Lee, W. A. Schmalhofer, M. Garcia-Calvo, L. M. Helms, M. Sanchez, K. Giangiacomo, J. P. Reuben, A. B. Smith, 3rd and *et al.* (1994) Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels. *Biochemistry* 33(19):5819-28
150. Knight, P. G. and C. Glister (2006) TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132(2):191-206
151. Knopp, R. H., M. R. Warth, D. Charles, M. Childs, J. R. Li, H. Mabuchi and M. I. Van Allen (1986) Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. *Biol Neonate* 50(6):297-317
152. Koishi, R., Y. Ando, M. Ono, M. Shimamura, H. Yasumo, T. Fujiwara, H. Horikoshi and H. Furukawa (2002) Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat Genet* 30(2):151-7



153. Koldamova, R. P., I. M. Lefterov, M. Staufienbiel, D. Wolfe, S. Huang, J. C. Glorioso, M. Walter, M. G. Roth and J. S. Lazo (2005) The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 280(6):4079-88
154. Kolodgie, F. D., A. P. Burke, G. Nakazawa, Q. Cheng, X. Xu and R. Virmani (2007) Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where does it come from? *Curr Opin Lipidol* 18(5):500-7
155. Komuves, L. G., M. Schmuth, A. J. Fowler, P. M. Elias, K. Hanley, M. Q. Man, A. H. Moser, J. M. Lobaccaro, M. L. Williams, D. J. Mangelsdorf and K. R. Feingold (2002) Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 118(1):25-34
156. Koos, R. D. (1995) Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biol Reprod* 52(6):1426-35
157. Kramer, P. R. and S. Wray (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
158. Kung, F. T., S. Y. Chang, F. J. Huang and K. C. Lan (2007) VEGF, IVF clinical variables and ovarian hyperstimulation syndrome: a prospective study of the preimplantation luteal phase. *J Reprod Med* 52(5):365-74
159. Kurioka, H., K. Takahashi, N. Kita and Y. Noda (2005) Hemorrhagic ovarian cyst without peritoneal bleeding in a patient with ovarian hyperstimulation syndrome: case report. *Chin Med J (Engl)* 118(18):1577-81
160. Kwok, R. P., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger, R. G. Brennan, S. G. Roberts, M. R. Green and R. H. Goodman (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370(6486):223-6
161. Laffitte, B. A., L. C. Chao, J. Li, R. Walczak, S. Hummasti, S. B. Joseph, A. Castrillo, D. C. Wilpitz, D. J. Mangelsdorf, J. L. Collins, E. Saez and P. Tontonoz (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
162. Laffitte, B. A., S. B. Joseph, R. Walczak, L. Pei, D. C. Wilpitz, J. L. Collins and P. Tontonoz (2001a) Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol* 21(22):7558-68
163. Laffitte, B. A., J. J. Repa, S. B. Joseph, D. C. Wilpitz, H. R. Kast, D. J. Mangelsdorf and P. Tontonoz (2001b) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(2):507-12
164. Lala, D. S., R. Mukherjee, I. G. Schulman, S. S. Koch, L. J. Dardashti, A. M. Nadzan, G. E. Croston, R. M. Evans and R. A. Heyman (1996) Activation of specific RXR heterodimers by an antagonist of RXR homodimers. *Nature* 383(6599):450-3
165. Landis, M. S., H. V. Patel and J. P. Capone (2002) Oxysterol activators of liver X receptor and 9-cis-retinoic acid promote sequential steps in the synthesis and secretion of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. *J Biol Chem* 277(7):4713-21
166. Landrier, J. F., J. Grober, J. Demydchuk and P. Besnard (2003) FXRE can function as an LXRE in the promoter of human ileal bile acid-binding protein (I-BABP) gene. *FEBS Lett* 553(3):299-303
167. Lang, S. E., S. B. McMahon, M. D. Cole and P. Hearing (2001) E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J Biol Chem* 276(35):32627-34
168. Laudet, V. (1997) Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19(3):207-26
169. Lazar, M. A. (2003) Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 1(e001)



170. Lazar, M. A. and T. M. Willson (2007) Sweet dreams for LXR. *Cell Metab* 5(3):159-61
171. Lee, S., D. K. Lee, Y. Dou, J. Lee, B. Lee, E. Kwak, Y. Y. Kong, S. K. Lee, R. G. Roeder and J. W. Lee (2006) Coactivator as a target gene specificity determinant for histone H3 lysine 4 methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42):15392-7
172. Lefrancois-Martinez, A. M., C. Tournaire, A. Martinez, M. Berger, S. Daoudal, D. Tritsch, G. Veyssiere and C. Jean (1999) Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 274(46):32875-80
173. Lehmann, J. M., S. A. Kliewer, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, B. B. Oliver, J. L. Su, S. S. Sundseth, D. A. Winegar, D. E. Blanchard, T. A. Spencer and T. M. Willson (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272(6):3137-40
174. Lerch, T. F., M. Xu, T. S. Jardetzky, K. E. Mayo, I. Radhakrishnan, R. Kazer, L. D. Shea and T. K. Woodruff (2007) The structures that underlie normal reproductive function. *Mol Cell Endocrinol* 267(1-2):1-5
175. Levin, E. R., G. F. Rosen, D. L. Cassidenti, B. Yee, D. Meldrum, A. Wisot and A. Pedram (1998) Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Invest* 102(11):1978-85
176. Leymarie, P. and J. Martal (1991) Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. C. Thibault and M. C. Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse Editions Marketing SA, pp 403-421
177. Li, X., S. Zhang, G. Blander, J. G. Tse, M. Krieger and L. Guarente (2007) SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR. *Mol Cell* 28(1):91-106
178. Li, Y., C. Bolten, B. G. Bhat, J. Woodring-Dietz, S. Li, S. K. Prayaga, C. Xia and D. S. Lala (2002) Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol Endocrinol* 16(3):506-14
179. Liu, W., S. Chen, J. Dropinski, L. Colwell, M. Robins, M. Szymonifka, N. Hayes, N. Sharma, K. MacNaul, M. Hernandez, C. Burton, C. P. Sparrow, J. G. Menke and S. B. Singh (2005) Design, synthesis, and structure-activity relationship of podocarpic acid amides as liver X receptor agonists for potential treatment of atherosclerosis. *Bioorg Med Chem Lett* 15(20):4574-8
180. Lobaccaro, J. M., N. Poujol, L. Chiche, S. Lumbroso, T. R. Brown and C. Sultan (1996) Molecular modeling and in vitro investigations of the human androgen receptor DNA-binding domain: application for the study of two mutations. *Mol Cell Endocrinol* 116(2):137-47
181. Lobaccaro, J. M., J. J. Repa, T. T. Lu, F. Caira, J. Henry-Berger, D. H. Volle and D. J. Mangelsdorf (2001) [Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]. *Ann Endocrinol (Paris)* 62(3):239-47
182. Lu, T. T., M. Makishima, J. J. Repa, K. Schoonjans, T. A. Kerr, J. Auwerx and D. J. Mangelsdorf (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6(3):507-15
183. Luisi, B. F., W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto and P. B. Sigler (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352(6335):497-505
184. Lund, E. G., L. B. Peterson, A. D. Adams, M. H. Lam, C. A. Burton, J. Chin, Q. Guo, S. Huang, M. Latham, J. C. Lopez, J. G. Menke, D. P. Milot, L. J. Mitnaul, S. E. Rex-Rabe, R. L. Rosa, J. Y. Tian, S. D. Wright and C. P. Sparrow (2006) 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* 71(4):453-63



185. Lundholm, L., S. Moverare, K. R. Steffensen, M. Nilsson, M. Otsuki, C. Ohlsson, J. A. Gustafsson and K. Dahlman-Wright (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
186. Luo, Y., C. P. Liang and A. R. Tall (2001) The orphan nuclear receptor LRH-1 potentiates the sterol-mediated induction of the human CETP gene by liver X receptor. *J Biol Chem* 276(27):24767-73
187. Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407(6801):233-41
188. Maheshwari, A., L. Stofberg and S. Bhattacharya (2007) Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. *Hum Reprod Update* 13(5):433-44
189. Mak, P. A., H. R. Kast-Woelbern, A. M. Anisfeld and P. A. Edwards (2002a) 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):2037-41
190. Mak, P. A., B. A. Laffitte, C. Desrumaux, S. B. Joseph, L. K. Curtiss, D. J. Mangelsdorf, P. Tontonoz and P. A. Edwards (2002b) 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(35):31900-8
191. Malik, S. and R. G. Roeder (2005) Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem Sci* 30(5):256-63
192. Maltier, J. P., C. Legrand and M. Breuiller (1991) La parturition. C. Thibault and M. C. Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse Editions Marketing SA, pp 465-486
193. Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83(6):841-50
194. Marceau, G., D. H. Volle, D. Gallot, D. J. Mangelsdorf, V. Sapin and J. M. Lobaccaro (2005) Placental expression of the nuclear receptors for oxysterols LXRalpha and LXRbeta during mouse and human development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 283(1):175-81
195. McCormack, S. A. and S. R. Glasser (1980) Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol. *Endocrinology* 106(5):1634-49
196. McCracken, J. A., E. E. Custer and J. C. Lamsa (1999) Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79(2):263-323
197. McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002) Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* 143(7):2461-5
198. McMahon, S. B., H. A. Van Buskirk, K. A. Dugan, T. D. Copeland and M. D. Cole (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94(3):363-74
199. McMahon, S. B., M. A. Wood and M. D. Cole (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20(2):556-62
200. Menke, J. G., K. L. Macnaul, N. S. Hayes, J. Baffic, Y. S. Chao, A. Elbrecht, L. J. Kelly, M. H. Lam, A. Schmidt, S. Sahoo, J. Wang, S. D. Wright, P. Xin, G. Zhou, D. E. Moller and C. P. Sparrow (2002) A novel liver X receptor agonist establishes species differences in the regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7a). *Endocrinology* 143(7):2548-58
201. Michan, S. and D. Sinclair (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404(1):1-13
202. Minucci, S., M. Leid, R. Toyama, J. P. Saint-Jeannet, V. J. Peterson, V. Horn, J. E. Ishmael, N. Bhattacharyya, A. Dey, I. B. Dawid and K. Ozato (1997) Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 17(2):644-55



203. Mitro, N., P. A. Mak, L. Vargas, C. Godio, E. Hampton, V. Molteni, A. Kreuzsch and E. Saez (2007a) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445(7124):219-23
204. Mitro, N., L. Vargas, R. Romeo, A. Koder and E. Saez (2007b) T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 581(9):1721-6
205. Mo, J., S. J. Fang, W. Chen and G. C. Blobe (2002) Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXRbeta. *J Biol Chem* 277(52):50788-94
206. Molteni, V., X. Li, J. Nabakka, F. Liang, J. Wityak, A. Koder, L. Vargas, R. Romeo, N. Mitro, P. A. Mak, H. M. Seidel, J. A. Haslam, D. Chow, T. Tuntland, T. A. Spalding, A. Brock, M. Bradley, A. Castrillo, P. Tontonoz and E. Saez (2007) N-Acylthiadiazolines, a new class of liver X receptor agonists with selectivity for LXRbeta. *J Med Chem* 50(17):4255-9
207. Myatt, L. and S. J. Lye (2004) Expression, localization and function of prostaglandin receptors in myometrium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(2):137-48
208. Myers, S. A., S. C. Wang and G. E. Muscat (2006) The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors modulate genes and pathways involved in skeletal muscle cell metabolism. *J Biol Chem* 281(34):24149-60
209. Navot, D., E. J. Margalioth, N. Laufer, A. Birkenfeld, A. Relou, A. Rosler and J. G. Schenker (1987) Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 48(1):57-61
210. Nilsson, M., K. Dahlman-Wright, C. Karelmo, J. A. Gustafsson and K. R. Steffensen (2007) Elk1 and SRF transcription factors convey basal transcription and mediate glucose response via their binding sites in the human LXRB gene promoter. *Nucleic Acids Res* 35(14):4858-68
211. Noble, K., J. Zhang and S. Wray (2006) Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol* 570(Pt 1):29-35
212. Noguchi-Yachide, T., A. Aoyama, M. Makishima, H. Miyachi and Y. Hashimoto (2007) Liver X receptor antagonists with a phthalimide skeleton derived from thalidomide-related glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17(14):3957-61
213. Norman, J. E., S. Bollapragada, M. Yuan and S. M. Nelson (2007) Inflammatory pathways in the mechanism of parturition. *BMC Pregnancy Childbirth* 7 Suppl 1(S7)
214. Oberkofler, H., E. Schraml, F. Krempler and W. Patsch (2003) Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* 371(Pt 1):89-96
215. Ogawa, D., J. F. Stone, Y. Takata, F. Blaschke, V. H. Chu, D. A. Towler, R. E. Law, W. A. Hsueh and D. Bruemmer (2005) Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ Res* 96(7):e59-67
216. Okuwaki, M., T. Takada, Y. Iwayanagi, S. Koh, Y. Kariya, H. Fujii and H. Suzuki (2007) LXR alpha transactivates mouse organic solute transporter alpha and beta via IR-1 elements shared with FXR. *Pharm Res* 24(2):390-8
217. Ondeyka, J. G., H. Jayasuriya, K. B. Herath, Z. Guan, M. Schulman, J. Collado, A. W. Dombrowski, S. S. Kwon, C. McCallum, N. Sharma, K. MacNaul, N. Hayes, J. G. Menke and S. B. Singh (2005) Steroidal and triterpenoidal fungal metabolites as ligands of liver X receptors. *J Antibiot (Tokyo)* 58(9):559-65
218. Orlova, V. V. and T. Chavakis (2007) Regulation of vascular endothelial permeability by junctional adhesion molecules (JAM). *Thromb Haemost* 98(2):327-32
219. Otsuka, F., R. K. Moore, X. Wang, S. Sharma, T. Miyoshi and S. Shimasaki (2005) Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology* 146(8):3362-7



220. Ou, J., H. Tu, B. Shan, A. Luk, R. A. DeBose-Boyd, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein and M. S. Brown (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
221. Palinski, W. and C. Napoli (2002) The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *Faseb J* 16(11):1348-60
222. Park, D. S., S. E. Woodman, W. Schubert, A. W. Cohen, P. G. Frank, M. Chandra, J. Shirani, B. Razani, B. Tang, L. A. Jelicks, S. M. Factor, L. M. Weiss, H. B. Tanowitz and M. P. Lisanti (2002) Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am J Pathol* 160(6):2207-17
223. Parker, K. L. and B. P. Schimmer (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.* 18(3): 361-77
224. Parker, M. G. and R. White (1996) Nuclear receptors spring into action. *Nat Struct Biol.* 3(2):113-5
225. Patel, N. V. and B. M. Forman (2004) Linking lipids, Alzheimer's and LXRs? *Nucl Recept Signal* 2(e001)
226. Pavan, L., A. Hermouet, V. Tsatsaris, P. Therond, T. Sawamura, D. Evain-Brion and T. Fournier (2004) Lipids from oxidized low-density lipoprotein modulate human trophoblast invasion: involvement of nuclear liver X receptors. *Endocrinology* 145(10):4583-91
227. Pawar, A., J. Xu, E. Jerks, D. J. Mangelsdorf and D. B. Jump (2002) Fatty acid regulation of liver X receptors (LXR) and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in HEK293 cells. *J Biol Chem* 277(42):39243-50
228. Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer and D. J. Mangelsdorf (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93(5):693-704
229. Pellicer, A., C. Albert, A. Mercader, F. Bonilla-Musoles, J. Remohi and C. Simon (1999) The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 71(3):482-9
230. Petkovich, M., N. J. Brand, A. Krust and P. Chambon (1987) A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330(6147):444-50
231. Plat, J. and R. P. Mensink (2002) Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *Faseb J* 16(10):1248-53
232. Plat, J., J. A. Nichols and R. P. Mensink (2005) Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res* 46(11):2468-76
233. Plosch, T., E. M. van Straten and F. Kuipers (2007) Cholesterol transport by the placenta: placental liver X receptor activity as a modulator of fetal cholesterol metabolism? *Placenta* 28(7):604-10
234. Potter, J. and P. J. Nestel (1978) Cholesterol balance during pregnancy. *Clin Chim Acta* 87(1):57-61
235. 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
236. Puigserver, P. and B. M. Spiegelman (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 24(1):78-90



237. Pulkkinen, M. O., S. Nyman, M. M. Hamalainen and J. Mattinen (1998) Proton NMR spectroscopy of the phospholipids in human uterine smooth muscle and placenta. *Gynecol Obstet Invest* 46(4):220-4
238. Quinet, E. M., D. A. Savio, A. R. Halpern, L. Chen, C. P. Miller and P. Nambi (2004) Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J Lipid Res* 45(10):1929-42
239. Radhakrishnan, A., Y. Ikeda, H. J. Kwon, M. S. Brown and J. L. Goldstein (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(16):6511-8
240. 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
241. Repa, J. J., K. E. Berge, C. Pomajzl, J. A. Richardson, H. Hobbs and D. J. Mangelsdorf (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277(21):18793-800
242. Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein and D. J. Mangelsdorf (2000a) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14(22):2819-30
243. Repa, J. J. and D. J. Mangelsdorf (2000) The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16(459-81
244. Repa, J. J., S. D. Turley, J. A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R. A. Heyman, J. M. Dietschy and D. J. Mangelsdorf (2000b) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289(5484):1524-9
245. Richards, J. S. (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15(2):209-18
246. Robel, P. (2001) La stéroïdogenèse: les enzymes et la régulation de leur expression. C. Thibault and M. C. Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse Edition Marketing S.A, pp 144-154
247. Robertson, K. M., G. U. Schuster, K. R. Steffensen, O. Hovatta, S. Meaney, K. Hultenby, L. C. Johansson, K. Svechnikov, O. Soder and J. A. Gustafsson (2005) The liver X receptor- $\beta$  is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* 146(6):2519-30
248. Rocchi, S. and J. Auwerx (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, the ultimate liaison between fat and transcription. *Br J Nutr* 84 Suppl 2(S223-7
249. Romero, R., J. Espinoza, J. P. Kusanovic, F. Gotsch, S. Hassan, O. Erez, T. Chaiworapongsa and M. Mazer (2006) The preterm parturition syndrome. *Bjog* 113 Suppl 3(17-42
250. Rousseau, J. P. and Y. Ménézé (1991) Rôle du tractus génital femelle dans les déplacements et la survie des gamètes et de l'œuf fécondé. C. Thibault and M. C. Levasseur. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipse Editions Marketing SA, pp 359-376
251. Rudigoz, R. C., P. Gaucherand and D. Dargent (1989) [The obstetrical outlook in uterine malformations]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 18(2):185-91
252. Russell, D. L. and R. L. Robker (2007) Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update* 13(3):289-312
253. Sabol, S. L., H. B. Brewer, Jr. and S. Santamarina-Fojo (2005) The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 46(10):2151-67



254. Sadovsky, Y. and S. Adler (1998) Selective modulation of estrogen receptor action. *J Clin Endocrinol Metab* 83(1):3-5
255. Saito, H., S. Nakatsuru, J. Inazawa, T. Nishihira, J. G. Park and Y. Nakamura (1997) Frequent association of alternative splicing of NER, a nuclear hormone receptor gene in cancer tissues. *Oncogene* 14(5):617-21
256. Salonen, R. M., K. Nyyssonen, J. Kaikkonen, E. Porkkala-Sarataho, S. Voutilainen, T. H. Rissanen, T. P. Tuomainen, V. P. Valkonen, U. Ristonmaa, H. M. Lakka, M. Vanharanta, J. T. Salonen and H. E. Poulsen (2003) Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 107(7):947-53
257. Sapin, V., L. Blanchon, A. F. Serre, D. Lemery, B. Dastugue and S. J. Ward (2001) Use of transgenic mice model for understanding the placentation: towards clinical applications in human obstetrical pathologies? *Transgenic Res* 10(5):377-98
258. Schmidt, A., R. Vogel, M. K. Holloway, S. J. Rutledge, O. Friedman, Z. Yang, G. A. Rodan and E. Friedman (1999) Transcription control and neuronal differentiation by agents that activate the LXR nuclear receptor family. *Mol Cell Endocrinol* 155(1-2):51-60
259. Schmidt, A., R. Vogel, S. J. Rutledge, E. E. Opas, G. A. Rodan and E. Friedman (2005) Cross-talk between an activator of nuclear receptors-mediated transcription and the D1 dopamine receptor signaling pathway. *Pharmacol Biochem Behav* 80(3):379-85
260. Schmidt, R. J., J. V. Ficorilli, Y. Zhang, K. S. Bramlett, T. P. Beyer, K. Borchert, M. S. Dowless, K. A. Houck, T. P. Burris, P. I. Eacho, G. Liang, L. W. Guo, W. K. Wilson, L. F. Michael and G. Cao (2006) A 15-ketosterol is a liver X receptor ligand that suppresses sterol-responsive element binding protein-2 activity. *J Lipid Res* 47(5):1037-44
261. Schroepfer, G. J., Jr. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80(1):361-554
262. Schroepfer, G. J., Jr., D. Monger, A. S. Taylor, J. S. Chamberlain, E. J. Parish, A. Kisic and A. A. Kandutsch (1977a) Inhibitors of sterol synthesis. Hypocholesterolemic action of dietary 5 $\alpha$ -cholest-8(14)-en-3 $\beta$ -ol-15-one in rats and mice. *Biochem Biophys Res Commun* 78(4):1227-33
263. Schroepfer, G. J., Jr., E. J. Parish, H. W. Chen and A. A. Kandutsch (1977b) Inhibition of sterol biosynthesis in L cells and mouse liver cells by 15-oxygenated sterols. *J Biol Chem* 252(24):8975-80
264. Schulman, I. G., C. Li, J. W. Schwabe and R. M. Evans (1997) The phantom ligand effect: allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. *Genes Dev* 11(3):299-308
265. Schultz, J. R., H. Tu, A. Luk, J. J. Repa, J. C. Medina, L. Li, S. Schwendner, S. Wang, M. Thoolen, D. J. Mangelsdorf, K. D. Lustig and B. Shan (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14(22):2831-8
266. Schwabe, J. W., L. Chapman, J. T. Finch and D. Rhodes (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
267. Schwabe, J. W., D. Neuhaus and D. Rhodes (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 348(6300):458-61
268. Sevov, M., L. Elfineh and L. B. Cavelier (2006) Resveratrol regulates the expression of LXR-alpha in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 348(3):1047-54
269. Sherwood, O. D. (1994) Relaxin. E. Knobil and J. D. Neill. *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, 1, pp 861-1010



270. Shiau, A. K., D. Barstad, P. M. Loria, L. Cheng, P. J. Kushner, D. A. Agard and G. L. Greene (1998) The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95(7):927-37
271. Shilatifard, A. (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 75(243-69
272. Shinar, D. M., N. Endo, S. J. Rutledge, R. Vogel, G. A. Rodan and A. Schmidt (1994) NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* 147(2):273-6
273. Shulman, A. I., C. Larson, D. J. Mangelsdorf and R. Ranganathan (2004) Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* 116(3):417-29
274. Singh, S. B., J. G. Ondeyka, W. Liu, S. Chen, T. S. Chen, X. Li, A. Bouffard, J. Dropinski, A. B. Jones, S. McCormick, N. Hayes, J. Wang, N. Sharma, K. Macnaul, M. Hernandez, Y. S. Chao, J. Baffic, M. H. Lam, C. Burton, C. P. Sparrow and J. G. Menke (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
275. Smith, R. D., E. B. Babiychuk, K. Noble, A. Draeger and S. Wray (2005) Increased cholesterol decreases uterine activity: functional effects of cholesterol alteration in pregnant rat myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol* 288(5):C982-8
276. Smitz, J. E. and R. G. Cortvrindt (2002) The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 123(2):185-202
277. Soleas, G. J., E. P. Diamandis and D. M. Goldberg (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30(2):91-113
278. Song, C., R. A. Hiipakka and S. Liao (2000) Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* 65(8):423-7
279. Song, C., R. A. Hiipakka and S. Liao (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
280. Song, C. and S. Liao (2000) Cholestenic acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology* 141(11):4180-4
281. Souidi, M., S. Dubrac, M. Parquet, D. H. Volle, J. M. Lobaccaro, D. Mathe, O. Combes, P. Scannf, C. Lutton and J. Aigueperse (2004) [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* 28(3):279-93
282. Sparrow, C. P., J. Baffic, M. H. Lam, E. G. Lund, A. D. Adams, X. Fu, N. Hayes, A. B. Jones, K. L. Macnaul, J. Ondeyka, S. Singh, J. Wang, G. Zhou, D. E. Moller, S. D. Wright and J. G. Menke (2002) A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1 mRNA and stimulating cholesterol efflux. *J Biol Chem* 277(12):10021-7
283. Steffensen, K. R., E. Holter, N. Alikhani, W. Eskild and J. A. Gustafsson (2003) Glucocorticoid response and promoter occupancy of the mouse LXRA gene. *Biochem Biophys Res Commun* 312(3):716-24
284. Steffensen, K. R., K. Robertson, J. A. Gustafsson and C. Y. Andersen (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
285. Steffensen, K. R., G. U. Schuster, P. Parini, E. Holter, C. M. Sadek, T. Cassel, W. Eskild and J. A. Gustafsson (2002) Different regulation of the LXRA promoter activity by isoforms of CCAAT/enhancer-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 293(5):1333-40
286. Stocco, C., C. Telleria and G. Gibori (2007) The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 28(1):117-49



287. Strott, C. A. (2002) Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* 23(5):703-32
288. Sun, L. P., J. Seemann, J. L. Goldstein and M. S. Brown (2007) Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(16):6519-26
289. Sunahara, R. K., H. B. Niznik, D. M. Weiner, T. M. Stormann, M. R. Brann, J. L. Kennedy, J. E. Gelernter, R. Rozmahel, Y. L. Yang, Y. Israel and *et al.* (1990) Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347(6288):80-3
290. Svensson, S., T. Ostberg, M. Jacobsson, C. Norstrom, K. Stefansson, D. Hallen, I. C. Johansson, K. Zachrisson, D. Ogg and L. Jendeborg (2003) Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRA $\alpha$  and RXR $\beta$  ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *Embo J* 22(18):4625-33
291. Szewczyk, J. W., S. Huang, J. Chin, J. Tian, L. Mitnaul, R. L. Rosa, L. Peterson, C. P. Sparrow and A. D. Adams (2006) SAR studies: designing potent and selective LXR agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 16(11):3055-60
292. Szöllösi, D. (1991) Maturation de l'ovocyte. C. Thibault and M. C. Levasseur. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Ellipse Editions Marketing SA, pp 299-314
293. Taggart, M. J. (2001) Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? *News Physiol Sci* 16(61-5)
294. Talukdar, S. and F. B. Hillgartner (2006) The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- $\alpha$  gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res* 47(11):2451-61
295. Tamehiro, N., Y. Sato, T. Suzuki, T. Hashimoto, Y. Asakawa, S. Yokoyama, T. Kawanishi, Y. Ohno, K. Inoue, T. Nagao and T. Nishimaki-Mogami (2005) Riccardin C: a natural product that functions as a liver X receptor (LXR) $\alpha$  agonist and an LXR $\beta$  antagonist. *FEBS Lett* 579(24):5299-304
296. Tamura, K., Y. E. Chen, M. Horiuchi, Q. Chen, L. Daviet, Z. Yang, M. Lopez-Ilasaca, H. Mu, R. E. Pratt and V. J. Dzau (2000) LXRA $\alpha$  functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(15):8513-8
297. Tamura, K., Y. E. Chen, Y. Tanaka, M. Sakai, Y. Tsurumi, Y. Koide, M. Kihara, R. E. Pratt, M. Horiuchi, S. Umemura and V. J. Dzau (2004) Nuclear receptor LXRA $\alpha$  is involved in cAMP-mediated human renin gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 224(1-2):11-20
298. Taragnat, C., M. Berger and C. Jean (1988) Preliminary characterization, androgen-dependence and ontogeny of an abundant protein from mouse vas deferens. *J Reprod Fertil* 83(2):835-42
299. Terasaka, N., A. Hiroshima, A. Ariga, S. Honzumi, T. Koieyama, T. Inaba and T. Fujiwara (2005) Liver X receptor agonists inhibit tissue factor expression in macrophages. *Febs J* 272(6):1546-56
300. Thomas, J., K. S. Bramlett, C. Montrose, P. Foxworthy, P. I. Eacho, D. McCann, G. Cao, A. Kiefer, J. McCowan, K. L. Yu, T. Grese, W. W. Chin, T. P. Burris and L. F. Michael (2003) A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) versus liver X receptor. *J Biol Chem* 278(4):2403-10
301. Thomson, A. J., J. F. Telfer, A. Young, S. Campbell, C. J. Stewart, I. T. Cameron, I. A. Greer and J. E. Norman (1999) Leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 14(1):229-36
302. Tobin, K. A., H. H. Steineger, S. Alberti, O. Spydevold, J. Auwerx, J. A. Gustafsson and H. I. Nebb (2000) Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor- $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 14(5):741-52



303. Tobin, K. A., S. M. Ulven, G. U. Schuster, H. H. Steineger, S. M. Andresen, J. A. Gustafsson and H. I. Nebb (2002) Liver X receptors as insulin-mediating factors in fatty acid and cholesterol biosynthesis. *J Biol Chem* 277(12):10691-7
304. Tontonoz, P. and D. J. Mangelsdorf (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17(6):985-93
305. Tortora, G. J. and S. R. Grabowski (1993) Le système reproducteur. D. Université. Principes d'anatomie et de physiologie. Centre Educatif et Culturel Inc., pp 984-1035
306. 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
307. Vale, W. W., L. M. Bilezikjian and C. Rivier (1994) Inhibins and activins. E. Knobil and J. D. Neill. *The Physiology of Reproduction*, Second Edition. Raven Press, 1, pp 1861-1878
308. Venkateswaran, A., B. A. Laffitte, S. B. Joseph, P. A. Mak, D. C. Wilpitz, P. A. Edwards and P. Tontonoz (2000a) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22):12097-102.
309. Venkateswaran, A., J. J. Repa, J. M. Lobaccaro, A. Bronson, D. J. Mangelsdorf and P. A. Edwards (2000b) Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 275(19):14700-7
310. Visser, J. (2006) [Role of anti-Mullerian hormone in follicle recruitment and maturation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 35(5 Pt 2):2S30-2S34
311. Visser, J. A., F. H. de Jong, J. S. Laven and A. P. Themmen (2006) Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131(1):1-9
312. Vlahcevic, Z. R., R. T. Stravitz, D. M. Heuman, P. B. Hylemon and W. M. Pandak (1997) Quantitative estimations of the contribution of different bile acid pathways to total bile acid synthesis in the rat. *Gastroenterology* 113(6):1949-57
313. Vlahos, N. F. and O. Gregoriou (2006) Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1092(247-64
314. Volle, D. H., J. M. Frenoux, K. Mouzat, P. Vernet, M. Prod'Homme, A. Britan, F. Saez, J. Henry-Berger, A. Kocer, F. Caira, G. Veyssiere, J. R. Drevet and J. M. Lobaccaro (2005) Rôle des récepteurs nucléaires des oxystérols LXR dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol au niveau de l'appareil reproducteur mâle. *Andrologie* 15(2):151-159
315. Volle, D. H. and J. M. Lobaccaro (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
316. Volle, D. H., K. Mouzat, R. Duggavathi, B. Siddeek, P. Dechelotte, B. Sion, G. Veyssiere, M. Benahmed and J. M. Lobaccaro (2007) Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21(5):1014-27
317. Volle, D. H., J. J. Repa, A. Mazur, C. L. Cummins, P. Val, J. Henry-Berger, F. Caira, G. Veyssiere, D. J. Mangelsdorf and J. M. Lobaccaro (2004) Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 18(4):888-98
318. Wagner, B. L., A. F. Valledor, G. Shao, C. L. Daige, E. D. Bischoff, M. Petrowski, K. Jepsen, S. H. Baek, R. A. Heyman, M. G. Rosenfeld, I. G. Schulman and C. K. Glass (2003) Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol* 23(16):5780-5789



319. Walczak, R., S. B. Joseph, B. A. Laffitte, A. Castrillo, L. Pei and P. Tontonoz (2004) Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J Biol Chem* 279(11):9905-11
320. Wallberg, A. E., S. Yamamura, S. Malik, B. M. Spiegelman and R. G. Roeder (2003) Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1 $\alpha$ . *Mol Cell* 12(5):1137-49
321. Wang, W., W. L. Dentler and R. T. Borchardt (2001) VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(1):H434-40
322. Wang, Y., A. H. Moser, J. K. Shigenaga, C. Grunfeld and K. R. Feingold (2005) Downregulation of liver X receptor- $\alpha$  in mouse kidney and HK-2 proximal tubular cells by LPS and cytokines. *J Lipid Res* 46(11):2377-87
323. Weedon-Fekjaer, M. S., A. K. Duttaroy and H. I. Nebb (2005) Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. *Placenta* 26(10):721-8
324. Weidner, N., J. P. Semple, W. R. Welch and J. Folkman (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324(1):1-8
325. Willy, P. J. and D. J. Mangelsdorf (1997) Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 11(3):289-98
326. Willy, P. J., K. Umesono, E. S. Ong, R. M. Evans, R. A. Heyman and D. J. Mangelsdorf (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9(9):1033-45
327. Wolozin, B., W. Kellman, P. Russeau, G. G. Celesia and G. Siegel (2000) Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57(10):1439-43
328. Wong, J., C. M. Quinn and A. J. Brown (2007) Synthesis of the oxysterol, 24(S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol. *Lipids Health Dis* 6(10)
329. Xu, J. and Q. Li (2003) Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 17(9):1681-92
330. Yamamoto, T., H. Shimano, N. Inoue, Y. Nakagawa, T. Matsuzaka, A. Takahashi, N. Yahagi, H. Sone, H. Suzuki, H. Toyoshima and N. Yamada (2007) Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 282(16):11687-95
331. Yamashita, H., M. Takenoshita, M. Sakurai, R. K. Bruick, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, D. Arnot and K. Uyeda (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16):9116-21
332. Yang, C., J. G. McDonald, A. Patel, Y. Zhang, M. Umetani, F. Xu, E. J. Westover, D. F. Covey, D. J. Mangelsdorf, J. C. Cohen and H. H. Hobbs (2006) Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 281(38):27816-26
333. Yang, C., L. Yu, W. Li, F. Xu, J. C. Cohen and H. H. Hobbs (2004) Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J Clin Invest* 114(6):813-22
334. Yoshikawa, T., T. Ide, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, S. Yatoh, T. Kitamine, H. Okazaki, Y. Tamura, M. Sekiya, A. Takahashi, A. H. Hasty, R. Sato, H. Sone, J. Osuga, S. Ishibashi and N. Yamada (2003) Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol* 17(7):1240-54



335. Yoshikawa, T., H. Shimano, N. Yahagi, T. Ide, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, M. Nakakuki, S. Tomita, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, A. Takahashi, H. Sone, J. Osuga Ji, T. Gotoda, S. Ishibashi and N. Yamada (2002) Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem* 277(3):1705-11
336. Yue, L., F. Ye, C. Gui, H. Luo, J. Cai, J. Shen, K. Chen, X. Shen and H. Jiang (2005) Ligand-binding regulation of LXR/RXR and LXR/PPAR heterodimerizations: SPR technology-based kinetic analysis correlated with molecular dynamics simulation. *Protein Sci* 14(3):812-22
337. Zaghini, I., J. F. Landrier, J. Grober, S. Krief, S. A. Jones, M. C. Monnot, I. Lefrere, M. A. Watson, J. L. Collins, H. Fujii and P. Besnard (2002) Sterol regulatory element-binding protein-1c is responsible for cholesterol regulation of ileal bile acid-binding protein gene in vivo. Possible involvement of liver-X-receptor. *J Biol Chem* 277(2):1324-31
338. Zelcer, N., N. Khanlou, R. Clare, Q. Jiang, E. G. Reed-Geaghan, G. E. Landreth, H. V. Vinters and P. Tontonoz (2007) Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25):10601-6
339. Zhao, S. P., J. Yang, J. Li, S. Z. Dong and Z. H. Wu (2007) Effect of niacin on LXRA and PPARgamma expression and HDL-induced cholesterol efflux in adipocytes of hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol*
340. Zhou, Q. Y., D. K. Grandy, L. Thambi, J. A. Kushner, H. H. Van Tol, R. Cone, D. Pribnow, J. Salon, J. R. Bunzow and O. Civelli (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347(6288):76-80
341. 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 U S A* 91(10):4175-9
342. Zitzer, H., W. Wenthe, M. B. Brenner, S. Sewing, K. Buschard, J. Gromada and A. M. Efanov (2006) Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 147(8):3898-905





## ***Résumé***

Le cholestérol, élément nutritif indispensable mais toxique en excès, est naturellement converti en oxystérols. Les LXR $\alpha$  (*Liver X Receptor*)  $\alpha$  et  $\beta$  sont les récepteurs nucléaires des oxystérols ayant un rôle hypocholestérolémiant et contrôlant plusieurs fonctions physiologiques.

Notre but a été d'étudier leur rôle dans la reproduction chez la femelle. Dans l'ovaire, l'induction de l'ovulation chez des souris *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* provoque une hyperstimulation ovarienne (OHSS), caractérisée par une augmentation de la masse, des troubles vasculaires et de la sensibilité hormonale. Les LXR $\alpha$  contrôlent de plus l'œstradiolémie. Au niveau utérin, nous montrons un rôle spécifique de LXR $\beta$ . Les souris *lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* présentent une séquestration anormale d'esters de cholestérol dans les myocytes associée à un défaut de contractilité utérine.

Cette étude montre l'importance des LXR $\alpha$  dans la reproduction chez la femelle et permettra de comprendre le lien entre déséquilibre alimentaire et troubles de la fertilité.

## ***Abstract***

Cholesterol is an essential nutrient although toxic in excess, naturally converted into oxysterols. LXR $\alpha$  (*Liver X Receptor*)  $\alpha$  and  $\beta$  are nuclear receptors for oxysterols which have a hypocholesterolemiant role and control many physiologic functions.

Our aim was to study their role in female reproductive physiology. In the ovary, ovulation induction in *lxr $\alpha$ ; $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice caused an ovarian hyperstimulation (OHSS), characterized by ovarian enlargement, vascular troubles and increased hormonal sensitivity. Besides, LXR $\alpha$  control estradiol production. In the uterus, we pointed the existence of a specific function for LXR $\beta$ . *Lxr $\beta$ <sup>-/-</sup>* mice present an abnormal sequestration of cholesteryl esters in myocytes associated with an uterine contractility defect.

These data point for the first time the importance of the LXR $\alpha$  in female reproductive function and will help in the future to understand mechanisms involved in fertility defects due to alimentary disequilibrium.