



HAL
open science

Rôle des récepteurs des oxystérols LXR_s (Liver X Réceptors) dans le processus de carcinogenèse prostatique chez la souris

Julie Dufour

► **To cite this version:**

Julie Dufour. Rôle des récepteurs des oxystérols LXR_s (Liver X Réceptors) dans le processus de carcinogenèse prostatique chez la souris. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22342 . tel-00865801

HAL Id: tel-00865801

<https://theses.hal.science/tel-00865801>

Submitted on 25 Sep 2013

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

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

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 607

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

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

Présentée et soutenue publiquement

par

Julie DUFOUR

le 28 février 2013

Rôle des récepteurs des oxystéroïdes, LXRs (Liver X Receptors), dans le processus de
carcinogénèse prostatique chez la souris.

Rapporteurs : Pr. Philippe BOUGNOUX, INSERM U 1069, Tours

Dr. Jean-Marc VANACKER, UMR 5242 IGFL, Lyon

Examineur : Pr. Arlette DARFEUILLE-MICHAUD, M2iSH UMR INSERM U1017 USC

INRA 2018, Clermont-Ferrand

Dr. Kévin MOUZAT, Laboratoire de Biochimie, Nîmes

Directeur de thèse : Dr. Silvère BARON, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Laboratoire UMR GReD CNRS-INSERM-Clermont Université

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 607

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

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

Présentée et soutenue publiquement

par

Julie DUFOUR

le 28 février 2013

Rôle des récepteurs des oxystéroïdes, LXRs (Liver X Receptors), dans le processus de
carcinogénèse prostatique chez la souris.

Rapporteurs : Pr. Philippe BOUGNOUX, INSERM U 1069, Tours

Dr. Jean-Marc VANACKER, UMR 5242 IGFL, Lyon

Examineur : Pr. Arlette DARFEUILLE-MICHAUD, M2iSH UMR INSERM U1017 USC

INRA 2018, Clermont-Ferrand

Dr. Kévin MOUZAT, Laboratoire de Biochimie, Nîmes

Directeur de thèse : Dr. Silvère BARON, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Laboratoire UMR GReD CNRS-INSERM-Clermont Université

A Tonton,

A Gatién,

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse : Le Professeur Philippe Bougnoux, le Docteur Jean-Marc Vanacker, le Professeur Arlette Darfeuille-Michaud et le Docteur Kévin Mouzat d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Jean Marc, je te remercie de m'avoir accueillie dans l'équipe et de n'avoir jamais douté que je pouvais mener ce travail de thèse à bien. Je tiens également à te remercier pour tes conseils notamment pour les présentations orales, l'écriture de la revue et du papier et plus légèrement d'avoir enrichi mon recueil de blagues et d'expressions de bon goût. Enfin, merci pour les cookies subway que tu n'as jamais manqué de me réserver ainsi que le million de M&M's que j'ai pu consommer grâce à toi !

Silvère, tu le sais cette thèse n'aura pas tous les jours été facile à vivre pour moi, je tiens à te remercier pour ton optimisme permanent face aux situations les plus décourageantes. Je te remercie pour tes conseils et ta formation rigoureuse que certaines mauvaises langues pourraient qualifier de « psychorigide » mais qui a porté ses fruits. Merci surtout d'avoir pensé au plan B et de m'avoir assistée dans la réalisation de ce projet, les manip, l'écriture et les révisions. J'espère vraiment que le projet des précieux va apporter de nombreux résultats.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe LXR : David, Françoise, Amalia, Florence, Hugues, Marine, Aurélie, Salwan, Emmanuelle, Christine, Candice, Anthony.

Amalia, David et Françoise, je vous remercie pour vos conseils lors des réunions d'équipe et pour votre aide lors de la préparation de ma planche de thèse.

Aurélie, ton arrivée a apporté une vraie touche de bonne humeur ! Je regrette que tu ne sois pas venue plus tôt. Merci pour ton rire, le seul qui a pu rentrer en concurrence avec le mien. Tes talents reconnus de pâtissière, tes conseils, ta gentillesse et ton écoute me manqueront. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes multiples projets !!

Marine, cheftaine de la qPCR, quel rôle difficile ! Merci, pour nos discussions et nos rires. J'espère que tes projets t'apporteront toute la réussite que tu mérites !

Salwan, merci pour nos discussions prostatiques mais également thyroïdiennes et pour ta bonne humeur. Je te souhaite plein de réussite dans ta thèse.

Emmanuelle, dernière arrivée, tu es venue renforcer le clan un peu déprécié des Blondes de l'équipe !! Merci pour

ta discrétion, ton humour et ta gentillesse. Je compte sur toi pour bien t'occuper d'EP après notre départ... Bon courage pour la suite de ta thèse, je te souhaite pleins de résultats attendus ou inattendus !!

Merci à Angélique et Jean-Paul pour votre aide technique, votre bonne humeur et votre écoute.

Merci à mes copines de paillasse Pierre et Hugnette : A tous les deux, je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos vies professionnelles et familiales...

Pierre, je te remercie pour tes conseils, ton écoute et ta bonne humeur (si si c'est vrai !). Nos blagues communes me manqueront surtout lorsqu'il n'y a qu'Anna qui les comprend...(Ce sont les meilleures celles-là !).

Hugnette, merci pour ta bonne humeur communicative et ta coolitude. Je tiens également à te remercier pour nos discussions et ton aide sur les manips, les papiers et la planche de thèse.

Merci aux filles du bureau : Duchesse, Anna, Coco, Emmanuelle et Fanny, pour nos discussions scientifiques et non-scientifiques. Partager le bureau avec vous toutes restera un très bon souvenir !

Duchesse, comme tu m'as manqué pour cette dernière année, heureusement qu'il y a skype ! On en a passé des bons moments, au bureau, au labo, en congrès, en soirées... Mais tu as également été présente pour les moments les moins bons que ce soit au labo ou de ta contrée lointaine et je tiens à te remercier pour tout cela. J'espère que tu ne resteras pas éloignée trop longtemps de la France mais je te souhaite toute la réussite que tu mérites.

Anna, on en a partagé des choses, bureau (surtout le tien), rue et donc trajet pour venir au labo (désolée pour ce dernier mois où tu as dû traîner un boulet...), chambre en congrès, trajet en train, séries TV... Que de souvenirs et surtout de fous rires (si je te parle de dilution tu comprends ce que je veux dire...). Elles me manqueront les soirées greluches, ciné, raclettes, St Patrick et même les matchs de l'ASM. Pour tous ces moments où tu m'as aidée, encouragée et soutenue, je te remercie. Je te souhaite plein de réussite pour la suite, le post-doc et le reste. Prenez le temps de profiter un peu quand même !!

Coco, quel joli surnom... Copine de bureau et de paillasse aussi ! Mais n'oublions pas cette particularité que nous partageons : lesTOCs. L'enfer des portes diverses et variées, les radiateurs, incubateurs et autres machines électriques qui nous gâchent quand même un peu la vie !! Le côté positif, c'est qu'on peut finir la thèse sans avoir fait brûler le labo donc OUI tu l'as fermé ou éteint cet objet qui te tracasse à minuit !! Merci pour nos discussions, ton écoute et ta gentillesse. Je te souhaite tout plein de belles choses pour la suite.

Fanny, l'ancienne du bureau !! Merci d'avoir été présente pendant une partie de ma thèse et merci pour tes conseils, ton humour et ton optimisme.

Merci aux filles du RU : Anna, EP, Emmanuelle, Cameron, Gaëlle, Matthias

EP affectueusement nommée « la gazette » pour sa grande capacité à collecter les infos scientifiques et autres... Merci d'avoir été là tout au long de ce parcours de thèse et notamment avec Anna durant cette difficile dernière année... Je n'oublierai pas nos pauses thés, nos discussions animées au labo et en dehors, nos débriefing PLL, PBV, Super C et autres. Je sais que cette période n'est pas la plus simple pour toi mais tu le sais, notre porte est grande ouverte (surtout si tu fais des gâteaux..) et skype sera connecté en cas de besoin.

Cameron, je tiens à te remercier pour ta gentillesse et tes conseils médicaux. Je te souhaite de belles choses pour la suite dans tes divers projets!

Matthias, même si tu n'as partagé que quelques repas avec nous, comment oublier que nous avons traversé une épreuve de taille : les doctoriales. On oubliera ni le casino, ni le Nect Bar, ni le vin rouge...Je te souhaite une fin de thèse sereine ainsi que de la réussite dans tes projets futurs!!

Merci aux étudiants et post-doc passés et présents du laboratoire, Abdel, Aurélien, Cécile, Fatim, Georges, Jean-Jo, Rafik et Sabrina.

Rafik, je te souhaite plein de réussite avec tes manip de chips et autres et surtout du courage avec mes souris Pten qui nous auront posé quelques soucis...

Merci aux animaliers, Christine, Sandrine et Philippe pour nos discussions et pour votre patience vis à vis de mes souris pas toujours très coopératives !

Merci à tous les membres du laboratoire pour vos conseils et votre bonne humeur. Les moments passés en salle café, aux repas de Noël ou encore aux piques-niques resteront de très bons souvenirs!

Merci aux Greluches, Anna, Cécile, Lucie et Sandrine. Nos repas, soirées détente qui même s'ils n'ont pas été assez nombreux, m'ont permis de me vider la tête. Je vous souhaite tout plein de belles choses pour la suite.

Merci aux vieilles thésardes, Duch, Elo et Sansan pour vos conseils, pour nos soirées, nos fous-rires, nos potins...

Les amis d'avant le labo :

Merci aux copines les plus anciennes, Sab, Cycy et Stef, je vous souhaite tout plein de belles choses !!

Sabrina, ça en fait des années qu'on se connaît et je tiens à te remercier d'avoir toujours été à l'écoute malgré la distance.

Cygy, et Stef, les Toulousaines merci pour nos coups de fils du dimanche soir sur la route.

Merci aux potes de la Corrèze, même si on ne s'est pas beaucoup vu durant ces 3 ans et demi, chaque retour au pays a été une bouffée d'air pour Gatien et moi. Pour nos soirées et délires en tout genre je vous remercie.

Merci aux voisins de Blyes, de vous être si bien occupés de mon Gatien dans les moments les plus durs. On en a des repas à la maison à rattraper...

La famille

Vous le savez je regrette beaucoup de ne pas avoir profité plus souvent de vous.

Merci d'abord à vous Papa et Maman : Papa pour ton optimisme à toute épreuve, tes conseils de management pas toujours très efficaces je dois te l'avouer. Maman, tes expressions faites maison, ta patience, ton écoute et tes encouragements.

Thomas, on ne s'est pas beaucoup vu durant ces 3 ans et demi... Quelle idée de t'être exilé dans ch'Nord ???
Merci d'avoir su largement occuper les parents...

Merci aux grands-parents pour leur confiance et leur réconfort : Mamie Léa et Papy Jacques : J'aurais aimé passer plus de temps en Corrèze, on en a des coupes de champagne à rattraper ! Mamie Suzon et Antoine merci de vous être occupés des petits pendant nos vacances et pour les cafés et pâtisseries des week-ends ! J'ai hâte que vous veniez tous nous voir dans notre chez nous.

Chloé et Lucas merci d'être venus me soutenir le jour de ma thèse.

Merci à la famille de Gatien, même si nous nous sommes moins vus, chaque week-end en Corrèze nous a permis de nous ressourcer et de repartir d'un bon pied.

Nanou et Guinou, je ne peux pas vous oublier dans ces remerciements. Ma Nanou ta présence quotidienne m'a été d'une grande aide et d'un grand réconfort. Mon Guinou, comment oublier nos promenades en plein hiver par -10°C (merci Gatien).

Gatien, comment te remercier... Sans toi, je ne crois pas que j'aurai pu surmonter toutes ces épreuves. Ta présence sans faille malgré cette satané distance, tes encouragements, ta confiance en moi, m'ont permis de terminer ce travail. Il est grand temps maintenant qu'on profite de notre nouvelle vie...

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

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

4^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Fd, 24 nov 2011. Les récepteurs nucléaires LXR et leurs gènes cibles dans le cancer de la prostate

4^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Fd, 3 déc 2009 Hyperplasie prostatique : régime hyperlipidique et rôle des récepteurs LXR

Journées de la recherche de l'IFR 79 santé Auvergne, Clermont-Fd, 29 oct 2009 Caractérisation du phénotype d'hyperplasie prostatique chez les souris invalidées pour les récepteurs LXR

Communications affichées :

7^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA. Lyon, 20-21 mars 2012

Dufour J, De Boussac H, Viennois E, Pommier A, Caira F, Hoang JJ, Trousson A, Lobaccaro JMA, Baron S. *Cholesterol homeostasis controls prostate carcinogenesis progression* .

EMBO Nuclear Receptors. Sitges, 16-20 sept 2011

Dufour J, Viennois E, Pommier A, Caira F, Lobaccaro JMA, Baron S. *LXR α and β are targeted during prostate carcinogenesis*.

Journées de l'école doctorale. Clermont-Fd, 21 et 22 avril 2011

Dufour J, Pommier A, Viennois E, Alves G, Caira F, Lobaccaro JMA, Baron S. *Do LXR α and β slow down prostate carcinogenesis?*

6^{èmes} Journées Scientifiques du Cancéropôle CLARA. Lyon, 28-29 mars 2011.

Dufour J, Pommier A, Viennois E, Alves G, Caira F, Lobaccaro JMA, Baron S. *Do LXR α and β slow down prostate carcinogenesis?*

Androgens 2010. Leuven, 25 et 26 Nov 2010

Dufour J, Pommier A, Alves G, Viennois E, Communal Y, Manin M, Caira F, Lobaccaro JMA, Baron S. *Lipid-rich diet induces prostate hyperplasia in LXR deficient mice*.

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

Dufour J, Pommier A, Alves G, De Boussac H, Lours C, Volle DH, Lobaccaro JMA and Baron S. *Lack of Liver X Receptors leads to cell proliferation in a model of mouse dorsal prostate epithelial cell*. PLoS ONE 2013 (**Article 1**)

Pommier A, Dufour J, Alves G, Viennois E, De Boussac H, Trousson A, Volle DH, Caira F, Val P, Arnaud P, Lobaccaro JMA and Baron S. *Liver X Receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice*. Accepté PLoS Genetics. (**Article 2**)

Les articles suivants sont présentés en annexe :

De Boussac H, Pommier A, Dufour J, Trousson A, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JMA. *LXR, prostate cancer and cholesterol: the Good, the Bad and the Ugly*. Am J Cancer Res 2013;3(1):58-69. **Review (Article 3)**

Dufour J, Viennois E, De Boussac H, Baron S, Lobaccaro JM. *Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer*. Curr Opin Pharmacol. 2012 Dec;12(6):724-8. doi: 10.1016/j.coph.2012.06.012. Epub 2012 Jul 19. **Review (Article 4)**

Viennois E, Esposito T, Dufour J, Pommier A, Fabre S, Kemeny JL, Guy L, Morel L, Lobaccaro JMA. *LXR α regulates androgen response in prostate epithelium*. Endocrinology. 2012 Jul;153(7):3211-23. Epub 2012 Apr 30. (**Article 5**)

Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S. *Selective liver X receptor modulators (SLiMs) : What use in human health ?* Mol Cell Endocrinol. 2011 Sep 1 **Review (Article 6)**

El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, Caira F, Drevet JR, Volle DH, Baron S, Saez F, Lobaccaro JM. *Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male*. Biochim Biophys Acta. 2011 Aug 15. **Review (Article 7)**

Viennois E, Pommier AJC, Mouzat K, Oumeddour A, El-Hajjaji F-Z, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JMA. *Targeting Liver X Receptors in human health: deadlock or promising trail ?* Expert Opin Ther Targets. 2011; 15(2):219-232 **Review (Article 8)**

Pommier A, Dufour J, Viennois E, Volle DH, Caira F, Baron S and Lobaccaro JMA. *Cholestérol et cancer de la prostate : données épidémiologiques*. Médecine Clinique; endocrinology et diabète. Hors série. **Revue (Article 9)**

RÉSUMÉ

De nombreuses études épidémiologiques associent le cholestérol avec l'incidence et le développement du cancer de la prostate. Parmi les acteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol, les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β sont identifiés comme d'importants régulateurs intra-cellulaires capables d'ajuster les niveaux d'accumulation de cette molécule. En parallèle, ces récepteurs peuvent exercer des effets anti-prolifératif et pro-apoptotique sur des cellules tumorales prostatiques. L'ensemble de ces données suggère un rôle protecteur des LXRs dans le cadre du cancer de la prostate.

Les objectifs de ces travaux ont été d'étudier les mécanismes moléculaires reliant les LXRs au cycle cellulaire et de comprendre le rôle de ces récepteurs nucléaires dans le processus de la carcinogenèse prostatique.

Nous avons ainsi montré que les LXRs exerçaient leur effet anti-prolifératif sur des cellules murines épithéliales prostatiques (MPECs) notamment *via* des modulations des voies de transduction PI3K/AKT et MAPK. Ces résultats font de ces cellules un modèle d'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet.

Les souris *Lxr $\alpha\beta$ -/-* nourries avec un régime riche en cholestérol présentent un phénotype de néoplasie prostatique associé à un profil transcriptomique proche de celui de souris modèles de cancer de la prostate démontrant l'effet protecteur des LXRs dans une condition d'hypercholestérolémie.

Enfin, l'expression et l'activité des LXRs et leur gènes cibles ont été étudiées dans un modèle murin de carcinogenèse prostatique, les souris *Pten-/-*, dont l'invalidation du gène suppresseur de tumeur *Pten* est spécifique de l'épithélium prostatique. De manière intéressante, nous montrons que les LXRs sont activés au cours de la carcinogenèse prostatique et que la perte des LXRs dans les souris *Pten-/-* entraîne une accélération de la progression tumorale.

Au final, ces résultats mettent en lumière que les LXRs peuvent exercer un rôle de barrière limitant la progression tumorale, notamment par l'intermédiaire de leurs gènes cibles codant les cassettes d'efflux de cholestérol, *Abca1* et *Abcg1*.

Mots clés : Cancer, Prostate, LXRs, Cholestérol, PTEN.

ABSTRACT

Several epidemiological studies associate cholesterol to prostate cancer incidence and development. Among the actors involved in cholesterol metabolism, the nuclear receptors LXR α and β have been identified as important intracellular regulators, able to adjust cholesterol accumulation. In parallel, these receptors exert anti-proliferative and pro-apoptotic effects on prostate tumor cells. Altogether, these data suggest a protective role of LXRs against prostate cancer.

This work aimed at understanding the molecular mechanisms linking LXRs to cell cycle regulation and prostate carcinogenesis.

We showed that LXRs are able to exert their anti-proliferative effect on murine prostate epithelial cells (MPECs) *via* modulation of PI3K/AKT and MAPK pathways. These results demonstrate the value of these cells to study the molecular mechanisms involved in this LXR effect.

Lxra β $^{-/-}$ mice fed a high cholesterol diet, display prostate neoplasia and a transcriptomic profil close to the one of a mouse model of prostate cancer demonstrating the protective effect of LXRs in hypercholesterolemia condition.

Expression and activity of LXRs and their target genes have been studied in a mouse model of prostate cancer, the *Pten* $^{-/-}$ mice with a knock-out of the tumour suppressor *Pten* specifically in the prostate epithelium. Interestingly, we showed that LXRs are activated during prostate carcinogenesis and that the loss of LXRs in *Pten* $^{-/-}$ mice leads to an acceleration of tumor progression.

In summary, these results highlight the role of LXRs as a barrier to constrain tumor progression in particular through their target genes *Abca1* and *Abcg1*.

Key words : Cancer, Prostate, LXRs, Cholesterol, PTEN.

ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACACA	<i>Acetyl CoA carboxylase alpha</i>
ACAT	Acyl-CoA acyl-transférase
AF	<i>Activating function</i>
AMACR	α -méthylacyl coenzyme A racémase
AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARR	<i>Androgen response region</i>
ASC-2	<i>Activating signal cointegrator-2</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
bHLH-Zip	<i>Helix-loop-helix leucine zipper</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
CBP	<i>c-AMP response element binding protein</i>
CEH	<i>Cholesterol ester hydrolase</i>
CENP-C	<i>Centromere protein C</i>
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate response element binding protein</i>
COPII	<i>Coat protein II</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase 2</i>
CPA	Acétate de cyprotérone
CREB	<i>Cyclic AMP response element binding protein</i>
CRPC	<i>Castration resistant prostate cancer</i>
CYP7A1	<i>Cytochrome p450 cholesterol 7α-hydroxylase</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DES	Diéthylstilbestrol
DHA	Acide docosahexaénoïque
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	DiHydroTestostérone
DIG	<i>Detergent-insoluble glycolipidenriched complexes</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DR	<i>Direct repeat</i>

DRM	<i>Detergent resistant membrane domain</i>
DTT	Dithiothréitol
EC	Ester de cholestérol
ECBU	Examen cyto bactériologique des urines
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELaC2	<i>Ela C homolog 2</i>
EN2	<i>Engrailed 2</i>
EPCA	<i>Early Prostate Cancer Antigen</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAS	Apo-1 ; <i>Apoptosis antigen-1</i>
FASL	<i>FAS ligand</i>
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
FBP	<i>Fructose 1,6-biphosphatase</i>
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
G6P	<i>Glucose 6 phosphatase</i>
Gab ^{1/2}	<i>Grb 2-associated binder 1/2</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter 4</i>
GRIP-1	<i>Glucocorticoid receptor interacting protein 1</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase-3β</i>
GSK	GlaxoSmithKline
HBP	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HDAC	Histone déacétylase
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HE	Hématoxyline-éosine
HGPIN	<i>High grade prostatic intra-epithelial neoplasia</i>
HIFU	<i>High intensity focused ultrasound</i>
hK2	<i>human glandular kallikrein 2</i>
HPC1	<i>Hereditary prostate cancer locus-1</i>
Hras	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HSD3B	<i>3β-hydroxy steroid dehydrogenase</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>

IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IDOL	<i>Inducible degrader of the LDLR</i>
IGF-R	<i>Insulin growth factor-receptor</i>
IL-6	<i>Interleukine 6</i>
ILK	<i>Integrin linked kinase</i>
INSIG	<i>Insulin induced gene</i>
IPSS	<i>International prostatic symptom score</i>
IR	<i>Inverted repeat</i>
IRS-1/2	<i>Insulin receptor substrate 1/2</i>
KLK3	<i>Human kallikrein 3</i>
LADY	<i>Large T transgenic mouse model</i>
LB	Lame basale
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LCAT	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
LGPIN	<i>Low grade prostatic intra-epithelial neoplasia</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
LHRH	<i>Luteinizing hormone releasing hormone</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LPB	<i>Large Probasine</i>
LPL	Lipoprotéine lipase
LRH1	<i>Liver receptor homolog 1</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
LXRE	<i>LXR response element</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MLXIPL	<i>Max like protein X interacting protein-like</i>
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
MPAKT	<i>Murine prostate restricyed Akt kinase transgenic mice</i>
MPR	<i>Mouse prostate reconstitution</i>
MSR1	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>

mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
N-Cor	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NKX3.1	<i>NK homeobox 3.1</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NPC	<i>Niemann-Pick type C</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1 like 1</i>
ORP	<i>Oxysterol-binding protein- related protein</i>
PAP	<i>Prostatic Acid Phosphatase</i>
PB	Probasine
PCA3	<i>Prostate Cancer Antigen 3</i>
PCK	<i>Phospho enol pyruvate carboxykinase</i>
PDGF-R	<i>Platelet derived growth factor-receptor</i>
PDK	<i>Phosphatidylinositide dependent kinase</i>
PDZ	PSD95 (<i>Post Synaptic Density protein</i>), Dlg1 (<i>Drosophila disc large tumor suppressor</i>), Zo-1 (<i>Zonula occludens-1</i>)
PEST	Proline (G), Glutamate (E), Sérine (S) et Thréonine (T)
PGC1	<i>PPAR gamma coactivator 1</i>
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIA	Proinflammatory atrophy
PIN	<i>Prostatic intra-epithelial neoplasia</i>
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PL	Phospholipide
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2 alpha</i>
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
PtdInsP	<i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
Rap250	<i>Nuclear receptor-activating protein</i>

Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RB	<i>Retinoblastoma</i>
RE	Reticulum endoplasmique
RNaseL	Ribonuclease L
ROR	<i>RAR related Orphan Receptor</i>
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RTUP	Résection trans-urétrale
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
S1P	<i>Site-1 protease</i>
SBP	<i>Spermin binding protein</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage-activating protein</i>
SCD1	<i>Stearoyl CoA desaturase 1</i>
SCP-2	<i>Sterol carrier protein 2</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHC	<i>Src homology 2 domain containing</i>
SHIP-1/2	<i>SH2 domain containing inositol phosphatase</i>
SHP	<i>Short heterodimeric partner</i>
SIRT1	Sirtuine 1
SKP2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SMRT	<i>Silencing mediator for RAR and TR</i>
SR-BI	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
SRC-1	<i>Nuclear receptor coactivator 1</i>
SRE	<i>Sterol response element</i>
SREBP	<i>Sterol response element binding protein</i>
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory</i>
START	<i>Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transport</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
SWI/SNF	<i>Mating type switching/sucrose non fermenting</i>
TEM	Transition épithélium-mésenchyme
Tfm	<i>Testicular feminized mouse</i>
TG	Triglycéride

TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMPRSS-ETS	<i>Transmembrane protease serine 2- E Twenty six</i>
TRAMP	<i>Transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate</i>
TRL	<i>Triglyceride rich lipoprotein</i>
TRRAP	<i>Transformation/transcription domain-associated protein</i>
UGS	<i>UroGenital Sinus</i>
UGT1A3	<i>UDP glucuronosyltransferase 1 family polypeptide A3</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
Wnt	<i>Wingless integration site</i>

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. PHYSIOLOGIE ET PATHOLOGIES NON-CANCEREUSES DE LA PROSTATE	6
1. Physiologie de la prostate	6
A Structure et fonction	6
B Morphogenèse de la prostate	7
a. Les étapes du développement.....	7
b. L'implication de la signalisation androgénique.....	7
2. Pathologies prostatiques non cancéreuses.....	8
A Prostatites.....	8
B Hypertrophie Bénigne de la Prostate (HBP).....	9
a. Epidémiologie et Facteurs de risque.....	9
b. Symptômes et Diagnostic.....	10
c. Histologie et Traitements	10
1) <i>Le traitement médicamenteux</i>	10
2) <i>Le traitement chirurgical</i>	11
II. CANCER DE LA PROSTATE	12
1. Epidémiologie et facteurs de risque	12
A L'âge	12
B Les facteurs génétiques.....	12
C Le mode de vie	14
a. L'alimentation	14
b. Les agents environnementaux.....	15
2. Symptôme et diagnostic.....	15
A Les biomarqueurs sériques.....	16
B Les biomarqueurs histologiques.....	17
C Les biomarqueurs urinaires	17
3. Les étapes de la carcinogenèse prostatique et classification	18
A L'atrophie inflammatoire proliférative (PIA).....	18
B La néoplasie intra-épithéliale ou PIN	19
C Le carcinome	19
D Le cancer métastatique.....	20
E La classification TMN	20
F Le score de Gleason	20
4. Traitement	20
A La chirurgie	21
B La radiothérapie externe.....	21
C La curiethérapie.....	21
D Les ultrasons focalisés de haute densité ou HIFU (<i>High Intensity Focused Ultrasound</i> , Ablaterm®).....	22
E L'hormonothérapie	22
a. L'ablation des testicules	22
b. Les traitements médicamenteux.....	22
1) <i>Les analogues ou antagonistes de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)</i>	22
2) <i>Les anti-androgènes</i>	23
F La chimiothérapie	23
III. LES MODELES MURINS DE CANCER PROSTATIQUE	24

1. Les bases moléculaires	24
A Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (onco-suppresseur).....	24
B Les fusions de gènes	25
2. Modèle MPR (<i>Mouse Prostate Reconstitution</i>)	26
3. Les modèles d'invalidation de suppresseurs de tumeurs.....	26
A Méthodes de transgénèse utilisées.....	26
B Les invalidations du gène suppresseur de tumeur <i>Pten</i>	28
a. <i>Pten</i> est une phosphatase inhibitrice de la voie PI3K	28
b. Fonctions de PTEN indépendantes de la voie PI3K	30
c. Invalidation de <i>Pten</i>	31
C Invalidation d'autres suppresseurs de tumeur	33
a. L'onco-suppresseur p53.....	33
b. La protéine RB.....	33
c. L'onco-suppresseur à homéodomaine NKX3.1 (<i>NK homeobox 3.1</i>).....	34
d. L'inhibiteur du cycle p27 ^{KIP1}	34
D Modèles bigéniques	35
E Les modèles murins utilisant le SV40	36
a. Le modèle LADY (<i>Large T Transgenic Mouse Model</i>).....	36
b. Le modèle TRAMP (<i>TRansgenic Adenocarcinome of the Mouse Prostate</i>)	37
F Modèles murins mettant en jeu des oncogènes.....	37
G Modèles transgéniques basés sur les fusions de gènes	38
IV. LE CHOLESTÉROL ET LE CANCER DE LA PROSTATE	39
1. Homéostasie et Métabolisme du cholestérol.....	39
A Synthèse <i>de novo</i>	39
B Influx du cholestérol.....	40
C Transport intra-cellulaire	41
D Efflux du cholestérol.....	42
E Fonctions cellulaires du cholestérol.....	44
2. Régulation de l'homéostasie du cholestérol.....	44
A La voie SREBP-2	45
B Les LXRs	46
a. Généralités sur les récepteurs nucléaires	46
b. Structure et Mécanisme d'action des LXRs	47
c. Ligands	49
1) <i>Naturels</i>	49
2) <i>Synthétiques</i>	50
d. Rôle des LXRs dans l'homéostasie du cholestérol.....	50
1) <i>Les LXRs et acides biliaires : synthèse, métabolisme et excrétion</i>	51
2) <i>Les LXRs et le transport inverse du cholestérol</i>	52
3) <i>Les LXRs et la synthèse de novo</i>	52
4) <i>Les LXRs et le captage de cholestérol</i>	53
5) <i>Les LXRs et l'absorption intestinale de cholestérol</i>	53
6) <i>Autres fonctions physiologiques des LXRs</i>	53
e. LXR α et β , deux acteurs majeurs de la physiologie et la pathologie prostatique	55
3. Cholestérol et cancer de la prostate.....	56
A Le cholestérol : un facteur de risque.....	56
B Les statines et le cancer	57
a. Généralités sur les statines	57
b. Statines et cancer de la prostate	57
C Action du cholestérol en contexte tumoral.....	58
V. PRESENTATION DU PROJET DE RECHERCHE.....	60

RESULTATS	63
<u>ARTICLE 1 :</u>	<u>64</u>
<u>ARTICLE 2 :</u>	<u>66</u>
<u>PROJET 3:</u>	<u>69</u>
DISCUSSION & PERSPECTIVES	77
ANNEXES	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	96

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

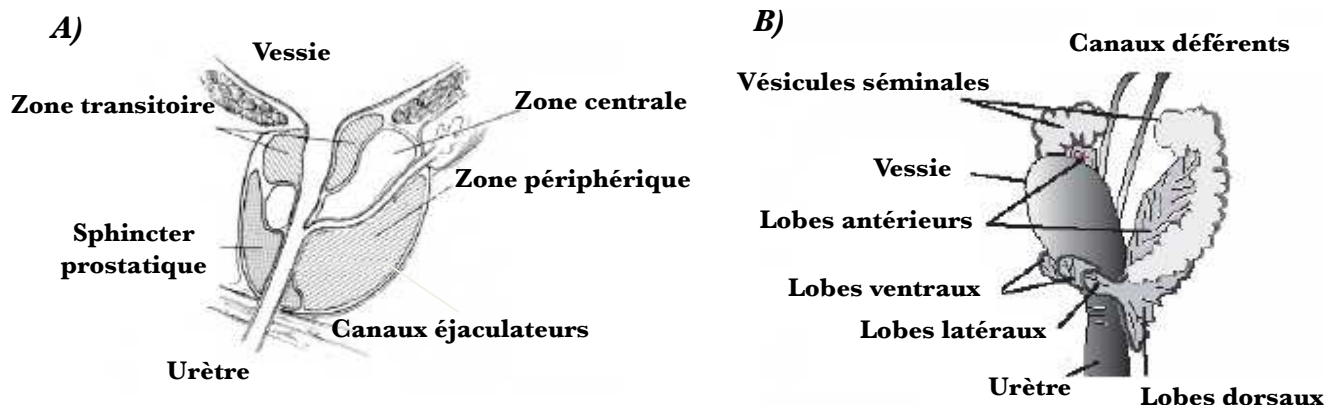


Figure 1 : Anatomie des prostates humaine et murine

La différence principale entre les deux espèces réside dans l'organisation en plusieurs lobes séparés chez la souris. **A)** Coupe sagittale de prostate humaine. **B)** Vue latérale de prostate murine. Modifié d'après Abate-Shen *et al.*, 2000.

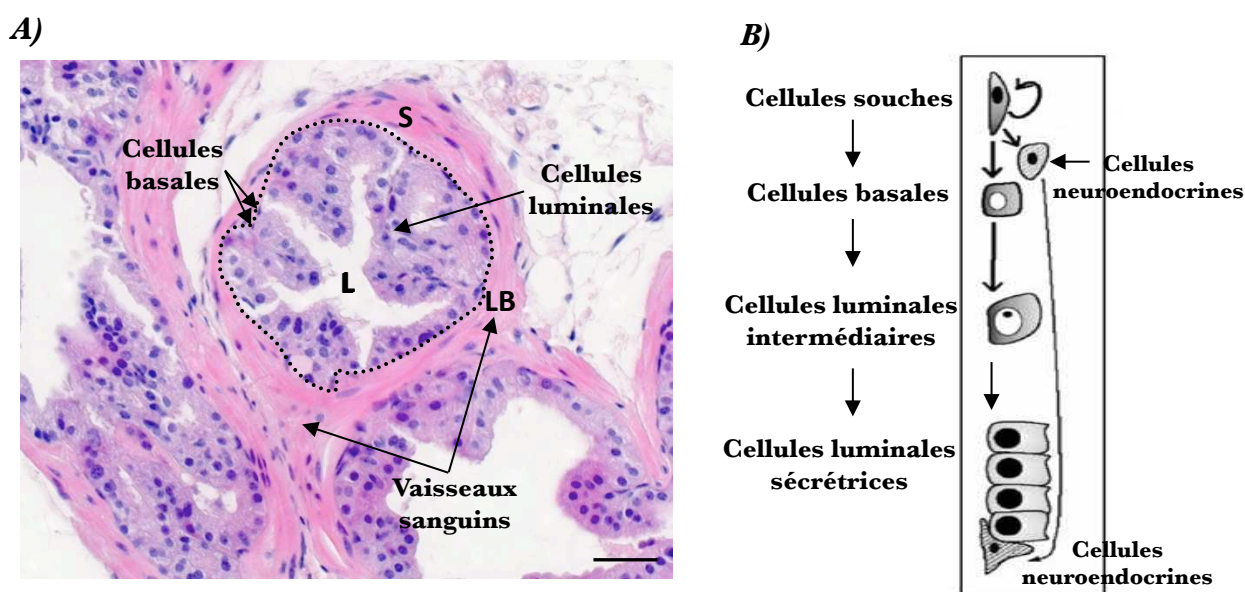


Figure 2: Représentation de l'épithélium prostatique du lobe dorsal chez la souris

A) Coupe de prostate dorsale de souris (coloration hématoxyline-éosine). On retrouve l'organisation classique d'un tissu glandulaire exocrine : des cellules épithéliales (basales et luminales) qui bordent une lumière (L) et reposant sur une lame basale (LB). Autour d'un *acinus* (entouré par une ligne pointillée), on observe le stroma (S), tissu de soutien riche en fibroblastes, muscles lisses et vaisseaux sanguins. Sur cette coloration, les cellules neuroendocrines ne sont pas visibles. Barre d'échelle: 50 μ m. **B)** Différenciation des cellules épithéliales de prostate. Les cellules souches sont à l'origine de cellules neuroendocrines et basales. Ces dernières se différencient en cellules intermédiaires ou transitoires luminales puis luminales sécrétrices. Modifié d'après Litvinov *et al.*, 2003.

I. Physiologie et pathologies non-cancéreuses de la prostate

1. Physiologie de la prostate

A Structure et fonction

La prostate humaine est une glande de l'appareil génital masculin sous forme d'une masse unique encapsulée, entourant l'urètre et située à la base de la vessie. Sa taille augmente avec l'âge, de la taille d'un pois à la naissance, elle atteint celle d'une noix (15 à 20 g et 3 à 4 cm de long) à l'âge adulte. Elle contient 30 à 50 glandes tubulo-alvéolaires qui se déversent dans 15 à 25 canaux excrétoires indépendants ouvrant sur l'urètre.

Dans la prostate humaine, trois zones sont habituellement décrites : la zone centrale, la zone de transition et la zone périphérique (Figure 1A) (Selman, 2011).

Partie glandulaire de la prostate, la zone de transition entoure l'urètre. La zone centrale, située autour de la zone de transition est d'aspect conique, traversée par les canaux éjaculateurs et composée d'un stroma dense. Située à la face postérieure de la prostate, la zone périphérique est proche du rectum et représente 80 % du volume de la glande.

Chez les rongeurs tels que le rat et la souris, la prostate se divise en quatre lobes distincts présents chacun en deux exemplaires situés autour de l'urètre : les lobes ventraux, latéraux, dorsaux et antérieurs (Figure 1B). Malgré ces différences anatomiques, les prostates humaine et murine sont proches d'un point de vue histologique (Figure 2A).

Ainsi, un stroma fibro-musculaire composé de collagène, de vaisseaux sanguins et de nerfs entoure la partie glandulaire de la prostate formée par un ensemble de lobules exocrines, ou acini, dont les sécrétions sont drainées vers l'urètre par de multiples conduits. Les acini sécrétoires de la prostate ont une forme irrégulière due aux sécrétions rejetées dans la lumière de la glande. L'épithélium est quant à lui pseudostratifié, de forme cuboïdale ou en colonne. Une couche de cellules basales entrecoupées de cellules souches ou plus rarement de cellules neuro-endocrines repose sur une lame basale délimitant les acini. Les cellules luminales sécrétrices, situées au contact de la lumière de l'acinus sont acidophiles et rejettent leur produit de sécrétion au niveau de la lumière (Figure 2B).

Au cours de l'orgasme masculin, la prostate ainsi que le tissu musculaire qui l'entoure se contractent conduisant à l'expulsion du liquide prostatique dans le canal urétral où il entre en contact avec les spermatozoïdes et le liquide séminal. Le fluide prostatique représente environ 25 % du volume du sperme et exerce un rôle nourricier et protecteur des spermatozoïdes. Il

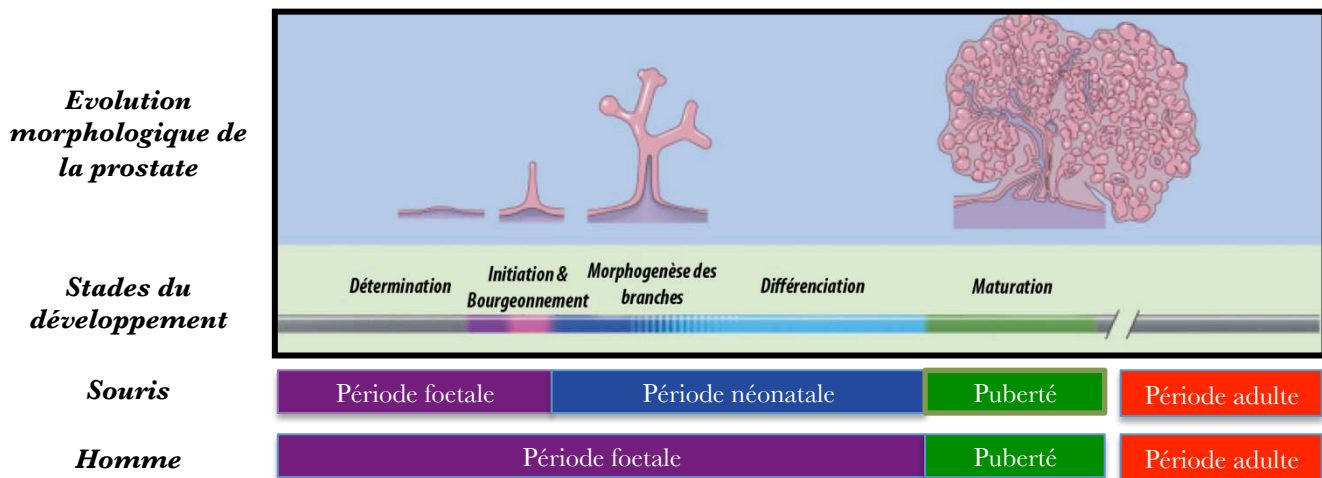


Figure 3 : Morphogenèse de la prostate.

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

est notamment composé d'acide citrique, de fibrinolysine (enzyme liquéfiant le sperme) et de phosphatases acides.

B Morphogenèse de la prostate

a. Les étapes du développement

Le développement de la prostate suit cinq étapes : la détermination, l'initiation et le bourgeonnement, la morphogenèse des branches, la différenciation et la maturation (Figure 3).

Chez l'homme, ces processus se déroulent au cours des deuxième et troisième trimestres de grossesse et prennent fin à la naissance (Prins and Putz, 2008). En effet, dès la 10^{ème} semaine de gestation, la formation de la prostate est notamment permise par la production de testostérone par les testicules fœtaux autour de la 8^{ème} semaine. Ainsi, la croissance des bourgeons prostatiques à partir du sinus urogénital (UGS, *urogenital sinus*) est initiée suite à la liaison de la 5 α -dihydrotestostérone avec le récepteur des androgènes (AR ; *Androgen Receptor*) localisé dans le tissu mésenchymateux (Shannon and Cunha, 1983; Timms, 2008). Ces excroissances débutent sous forme de solides cordons de cellules épithéliales qui subissent une élongation puis une morphogenèse intensive de branchement durant les stades tardifs de la croissance fœtale. En période post-natale, sous l'influence des androgènes, les canaux forment une lumière et l'épithélium formant le revêtement des acini se différencie et synthétise les produits de sécrétion.

Chez la souris, le développement de la prostate a été décrit en 3 étapes : l'induction (14,5 à 17,5 jours post-coïtum), la morphogenèse de branchement (18,5 jours post-coïtum à 15 jours post-nataux) et l'acquisition de la fonction sécrétoire (25 à 45 jours post-nataux) (Pritchard and Nelson, 2008).

b. L'implication de la signalisation androgénique

La différenciation des structures et des compartiments prostatiques est régie par un « code morphogénétique » c'est-à-dire la fenêtre d'expression de gènes particuliers que nous n'aborderons pas dans ce manuscrit (Marker et al., 2003; Meeks and Schaeffer, 2011). La prostate étant un organe sensible aux hormones, nous nous intéresserons plus particulièrement à la régulation hormonale majeure au niveau prostatique, la voie androgénique.

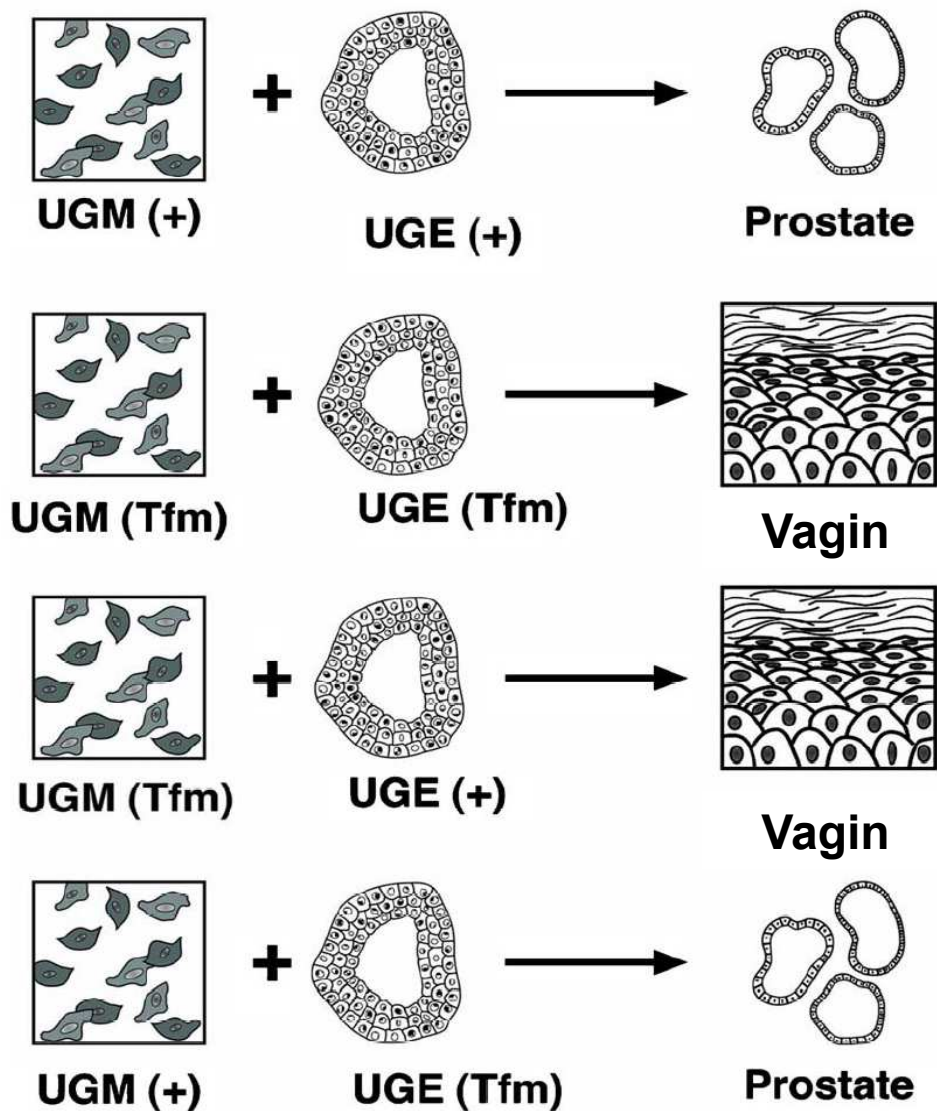


Figure 4 : L'effet des androgènes sur l'épithélium prostatique est médié par le mésenchyme au cours du développement.

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

Les premières étapes du développement prostatique que sont la détermination et l'initiation dépendent des androgènes produits par les testicules fœtaux. La testostérone est convertie en 5 α -dihydrotestostérone, androgène actif au sein de la prostate par l'enzyme 5 α -réductase exprimée au niveau du sinus urogénital dès la 9^{ème} semaine de gestation chez l'Homme (Imperato-McGinley et al., 1974).

L'effet des androgènes est médié par leur liaison à AR. Ainsi, les souris mutantes *tfm* qui possèdent un AR non-fonctionnel et une insensibilité complète aux androgènes présentent une absence de prostate (Cunha and Lung, 1978). De plus, des études sur ces souris ont montré que la signalisation androgénique restreinte au mésenchyme de l'UGS est suffisante pour induire la formation des bourgeons épithéliaux et des canaux suggérant une action paracrine des androgènes du mésenchyme vers l'épithélium (Lasnitzki and Mizuno, 1980; Cunha et al., 2004) (Figure 4). Des expériences de privation androgénique par castration ou traitement pharmacologique ont montré à l'âge adulte une involution des épithélia génitaux et notamment celui de la prostate (Litvinov et al., 2003). De plus, lors de la différenciation des cellules épithéliales, seules les cellules luminales expriment AR (Prins and Birch, 1995) ce qui conforte l'implication des androgènes dans la fonction de sécrétion exercée par les cellules épithéliales (Cooke et al., 1991).

Les androgènes et leur récepteur ont un rôle fondamental à la fois dans le développement prostatique et dans la carcinogenèse prostatique (Gelman, 2002). AR peut être assimilé à un proto-oncogène qui lorsqu'il fonctionne correctement contrôle à la fois le développement et la différenciation de la prostate. Cependant, au cours de la carcinogenèse, AR peut subir une amplification génique et/ou des mutations « gain-de-fonction » conduisant les cellules tumorales à augmenter leur survie et leur prolifération (Feldman and Feldman, 2001).

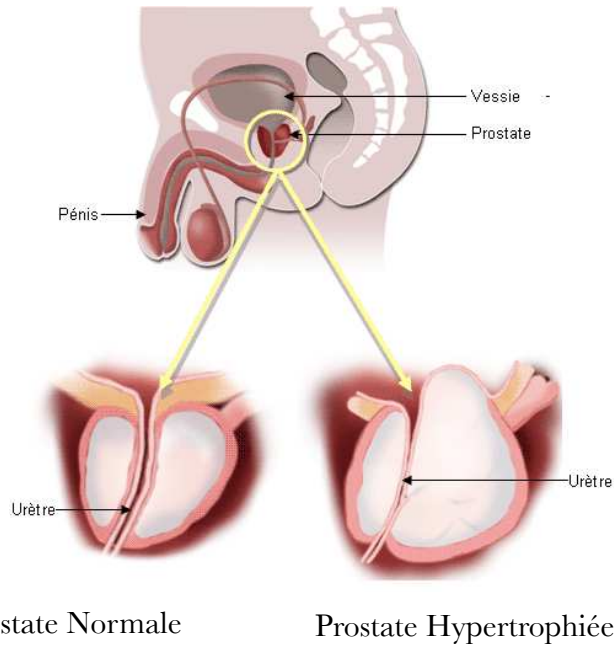
2. Pathologies prostatiques non cancéreuses

A Prostatites

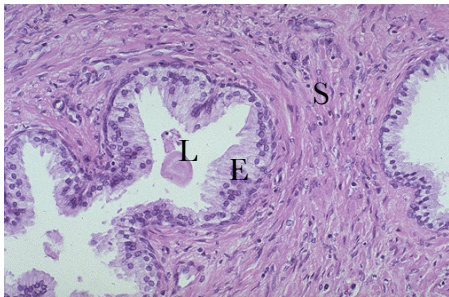
Les prostatites sont des inflammations de la prostate dues principalement à une infection.

La prostatite aiguë est caractérisée par une crise unique et intense alors que la prostatite chronique va quant à elle perdurer plusieurs mois. Les signes principaux de ces pathologies sont la présence de fièvre, de frissons, d'une grande fatigue, associés à des symptômes urinaires

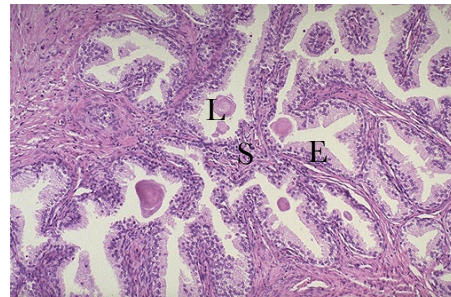
A)



B)



Prostate Normale



Prostate Hypertrophiée

Figure 5 : Comparaison entre prostate normale et HBP.

A) et **B)**: Représentation schématique et histologique d'une prostate normale et d'une prostate présentant une Hypertrophie Bénigne (HBP) L, lumière ; S, stroma ; E, épithélium.

<http://library.med.utah.edu/WebPath/MALEHTML/MALEIDX.html>

(brûlure, difficultés à uriner ou besoin d'uriner trop fréquent). Lorsqu'elle est aiguë, la prostatite est accompagnée de signes grippaux tels que des douleurs musculaires diffuses et articulaires. Le toucher rectal permet de détecter une prostate inflammatoire chaude, douloureuse et parfois augmentée de volume. L'examen cyto bactériologique des urines (ECBU) permet l'identification des bactéries ou germes à l'origine de la pathologie dont les plus courants sont *Escherichia coli*, *Streptococcus D* ou encore des chlamydiae, gonocoques ou mycoplasmes.

Cette pathologie est principalement traitée grâce à la prise d'antibiotiques et les troubles urinaires sont soulagés par des antalgiques, des anti-inflammatoires et des alpha1-bloquants (α1-bloquants) pour favoriser la relaxation des fibres musculaires et la vidange de la vessie.

B Hypertrophie Bénigne de la Prostate (HBP)

a. Epidémiologie et Facteurs de risque

L'Hypertrophie ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP) touche 90 % des hommes de plus de 80 ans. Elle se développe au niveau de la zone transitoire et se traduit par la mise en place d'un adénome caractérisé par une augmentation de volume et indépendant du reste de la prostate (Figure 5A) (Selman, 2011).

On distingue différents types d'HBP :

- HBP microscopique : correspond à l'apparition de lésions histologiques d'HBP et concerne 75 à 85 % des hommes de plus de 40 ans.
- HBP macroscopique : caractérisée par l'apparition de l'hypertrophie, elle touche 50 % des hommes de plus de 50 ans.
- HBP clinique : regroupe les hommes présentant soit une HBP microscopique soit macroscopique associée à des troubles urinaires.

En France, la chirurgie de l'HBP est la deuxième opération la plus pratiquée après celle de la cataracte et l'incidence de l'HBP s'accroît avec l'âge. Des méta-analyses suggèrent un lien entre HBP et désordres métaboliques (obésité (Parsons et al., 2006), diabète (Gupta et al., 2006; Sarma et al., 2009)). Malgré des études contradictoires, l'alimentation notamment la consommation de viande rouge et d'un régime riche en graisse, semble augmenter le risque de développer une HBP (Kristal et al., 2008).

b. Symptômes et Diagnostic

L'HBP est associée à deux grands types de troubles urinaires (McVary, 2003) :

- les troubles irritatifs : dus à une irritation de la vessie, il s'agit le plus fréquemment de la pollakiurie (augmentation de la fréquence des besoins d'uriner)
- les troubles obstructifs : dus au rétrécissement de l'urètre, il s'agit de la dysurie (difficultés à uriner) et la mauvaise vidange de l'urètre.

L'interrogatoire du patient permet au praticien de déterminer le score symptomatique, IPSS (*International Prostatic Symptom Score*) reflétant la gêne occasionnée par les troubles urinaires et orientant sur le traitement à mettre en place. Ce dernier peut aller de la seule surveillance à la prise de médicament ou l'intervention chirurgicale. Malgré une évolution de la maladie généralement favorable, des complications peuvent survenir. Les difficultés à vidanger complètement la vessie sont susceptibles d'engendrer des infections urinaires avec ou sans prostatite associée. De plus, la complication majeure reste la rétention aigüe d'urine pouvant provoquer si elle devient chronique, une distension de la vessie.

c. Histologie et Traitements

L'HBP est une hyperplasie adénofibromateuse qui implique la partie glandulaire (adénome), les fibres conjonctives (fibrome) et les fibres musculaires (myome) dans des proportions variables d'un individu à l'autre (Figure 5B). Les altérations observées montrent une inflammation chronique avec infiltration lymphocytaire et une hyperplasie à la fois des cellules stromales et épithéliales conduisant à l'hypertrophie et à l'apparition des symptômes.

Si la qualité de vie du patient est altérée de manière trop importante, deux stratégies thérapeutiques peuvent être mises en place ; le traitement médicamenteux et chirurgical.

1) Le traitement médicamenteux

La phytothérapie : Des médicaments obtenus à partir d'extraits de plantes tels que le Tadénan® provenant d'un extrait de prunier d'Afrique, le *Pygeum africanum* et le Permixon® provenant d'un extrait de palmier nain, le *Serenoa repens* sont capables d'inhiber la 5 α -réductases de type II ce qui bloque la transformation de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), son métabolite actif permettant la diminution du volume prostatique (Bayne et al., 2000; Ishani et al., 2000).

Les inhibiteurs de la 5 α -reductase de type I et/ou II: Le dutasteride (Avodart®) (Frye et al., 1998) ou le finastéride (Chibroproscar®) (Gormley et al., 1992) uniquement pour la 5 α -reductase type II permettent une réduction de volume de la prostate par diminution de la conversion de la testostérone en DHT, ligand de AR dans la prostate.

Les α -1-bloquants: La tamulosine (Omix®) ou l'alfuzosine (Xatral®) ont pour effet de relâcher les fibres musculaires lisses de la prostate et du col de la vessie pour faciliter la miction.

2) *Le traitement chirurgical*

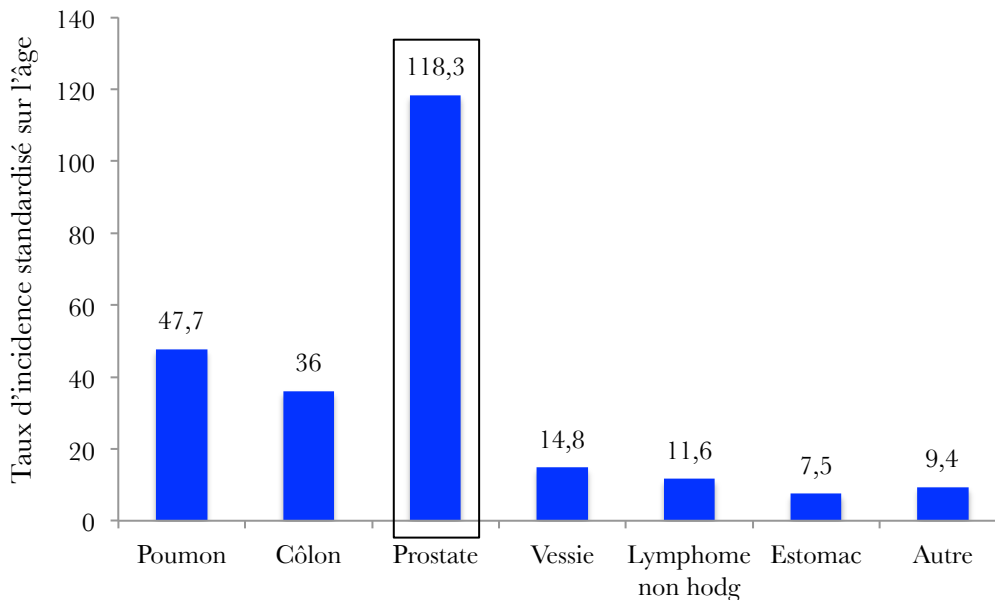
Cette voie thérapeutique qui est obligatoire dans les cas de troubles urinaires sévères et lorsque les médicaments sont inefficaces, peut se présenter sous deux formes :

La résection trans-urétrale (RTUP) utilisée pour 90 % des patients, consiste à raboter par endoscopie l'adénome au niveau de l'urètre pour permettre une amélioration du débit urinaire (Yoo and Cho, 2012).

L'incision (ou taille vésicale) est préconisée lorsque le volume de la prostate est très important et consiste à retirer l'adénome.

Depuis 2006, la thérapie par radiofréquence vise à chauffer la prostate à 100 °C grâce à des ondes focalisées pour provoquer une nécrose de l'adénome. L'utilisation de lasers est également renforcée.

A)



B)

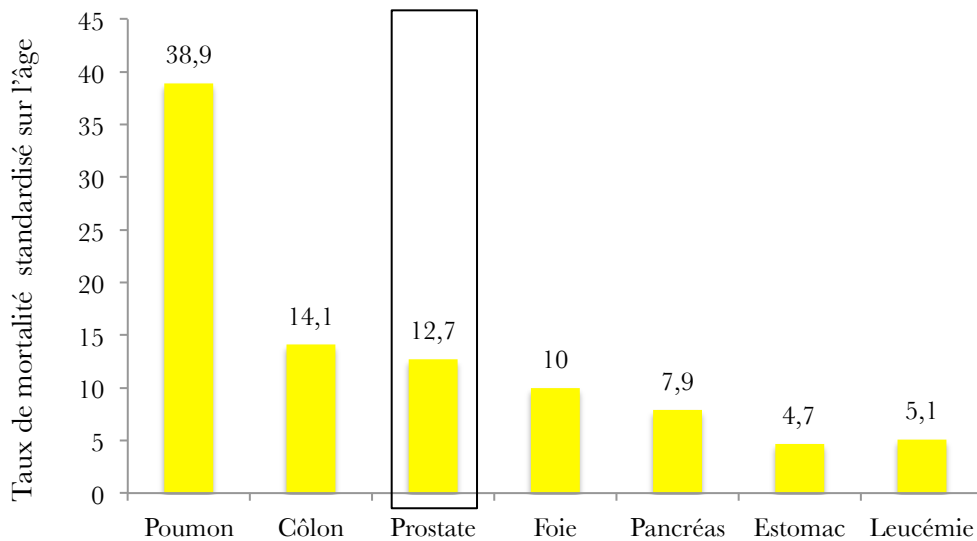


Figure 6 : Statistiques du cancer en France

A) Représentation des taux d'incidence standardisé avec l'âge pour 100 000 des localisations majeures de tumeurs en France. **B)** Taux de mortalité standardisé avec l'âge pour 100 000 des localisations majeures de tumeurs en France. Ces chiffres sont issus du site Globocan IARC 2008 d'après le Rapport d'orientation de la Haute Autorité de Santé.

II. Cancer de la prostate

1. Epidémiologie et facteurs de risque

En France, le cancer de la prostate est le premier en terme d'incidence et la 3^{ème} cause de décès par cancer chez l'Homme (Haute Autorité de Santé, 2012) (Figure 6). L'incidence entre 1980 et 2005 n'a cessé d'augmenter ce qui s'explique par le vieillissement de la population et l'évolution des méthodes de diagnostic avec la généralisation du dosage du PSA (*Prostate Specific Antigen*) comme test de dépistage (Belot et al., 2008).

De nombreuses études mettent en avant la complexité des mécanismes responsables de l'initiation et de la progression du cancer de la prostate. Cependant, plusieurs facteurs de risque liés à l'âge, à la génétique et à l'environnement sont associés à ce cancer.

A L'âge

Le risque de cancer de la prostate augmente significativement avec l'âge. Ainsi, les hommes de moins de 50 ans ont un faible risque d'être diagnostiqués (- de 0,5 % des cas incidents) alors que les taux peuvent atteindre 1 211,8 pour 100 000 entre 75 et 79 ans puis diminuer ensuite. L'âge moyen de diagnostic varie autour de 71 ans (Haute Autorité de Santé, 2012). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'importance du vieillissement dans la mise en place de cette pathologie. D'une part, la diminution progressive du taux d'androgènes avec l'âge induirait des dérégulations moléculaires au niveau des cellules épithéliales menant à la tumorigénèse (Algarté-Génin et al., 2004). D'autre part, l'augmentation du stress oxydant est responsable de cassures de l'ADN provoquant des mutations et favorisant le développement tumoral (Bostwick et al., 2004a).

B Les facteurs génétiques

Même si 85 % des cancers de la prostate sont sporadiques, les antécédents familiaux semblent avoir un impact sur le risque relatif de développer un cancer puisque les hommes ayant un parent du 1^{er} degré (père ou frère) atteint ont une augmentation de ce risque de 2 à 3,5 fois (Whittemore et al., 1995). Depuis, plusieurs études ont montré un regroupement familial de cancer de la prostate dû à une héritabilité de gènes à susceptibilité tumorale, certains avec une

forte pénétrance alors que d'autres montrent un polymorphisme ou une pénétrance plus faible.

Historiquement, le premier locus identifié correspond à HPC1 (*Hereditary Prostate Cancer locus-1*) dont l'allèle candidat est *RNase L* (*Ribonuclease L*) (Smith et al., 1996; Wiklund et al., 2004). Les mutations et délétions au niveau de ce locus sont associées à l'apparition précoce du phénotype tumoral, l'agressivité et la capacité métastatique chez les patients (Simard et al., 2003).

Certains gènes semblent plus fréquemment liés aux cancers familiaux. Ainsi, des polymorphismes de *ELaC2* (*Ela C homolog 2*) codant pour une hydrolase sont retrouvés dans des familles (Rebbeck et al., 2000). Des délétions dans les gènes *RNase L* et *MSR1* (*Macrophage Scavenger Receptor 1*) codant pour des acteurs impliqués dans la réponse aux infections sont associées au risque héréditaire de cancer de la prostate (Rennert et al., 2002; Xu et al., 2002). Par ailleurs, des gènes tels que *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*) et *NBS1* codant pour des acteurs du contrôle du cycle cellulaire appartiennent également aux gènes de susceptibilité héritée pour le cancer de la prostate (Cybulski et al., 2004a, 2004b)

Une mutation germinale dans *BRCA2* (*BReast CAncer*) peut augmenter le risque de cancer de la prostate et causer environ 5 % des cas retrouvés chez les hommes de moins de 55 ans (Edwards and Eeles, 2004). De la même manière, les mutations germinales dans *BRCA1* prédisposent les hommes au cancer de la prostate qui peut se déclarer précocément (Thompson and Easton, 2002).

Plusieurs études ont montré un polymorphisme de gènes tels que le *récepteur des androgènes*, la *5 α -réductase de type II* et la *stéroïde hydroxylase* stimulant le métabolisme des androgènes (Kopper and Tímár, 2005).

L'appartenance ethnique peut également être associée à un risque plus élevé de cancer de la prostate. Des études épidémiologiques ont montré une augmentation de l'incidence de cancers dans les populations noires africaines et caraïbéennes en comparaison avec les populations caucasiennes (Jack et al., 2007).

Une des hypothèses proposées est la présence d'un variant génétique de type microsatellite associé avec le cancer, trouvé sur le chromosome 8q24 avec une incidence plus élevée dans les populations afro-américaines (Amundadottir et al., 2006). De manière générale, les différences d'incidence liées à l'origine ethnique reflètent l'influence de plusieurs paramètres tels que la génétique, l'environnement et les moyens de diagnostic (Bostwick et al., 2004a).

C Le mode de vie

Les études conduites sur les populations immigrantes suggèrent que des facteurs exogènes seraient impliqués dans l'étiologie du cancer puisque le risque dû à l'appartenance ethnique est modulé avec les mouvements géographiques (Winter et al., 1999).

a. L'alimentation

Nous avons choisi de nous focaliser sur le lien entre les lipides et la carcinogenèse prostatique. Plusieurs études épidémiologiques montrent que les taux d'incidence du cancer de la prostate sont plus élevés aux Etats-Unis par rapport aux pays asiatiques (Haas et al., 2008). L'alimentation riche en lipides des pays occidentaux semble être un facteur prépondérant (Watanabe et al., 2000).

Parmi les différentes classes de lipides, les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique qui diffèrent entre eux par la longueur de leur chaîne carbonée (de 4 à 28 carbones) et par le type de liaison réunissant leurs atomes de carbone les définissant comme saturés (liaisons simples) ou insaturés (au moins une double liaison). Les acides gras sont retrouvés dans l'alimentation au niveau des graisses animales et végétales, les huiles ou les cires. Ils sont stockés sous forme de triglycérides majoritairement dans les adipocytes du tissu adipeux et servent de réserve énergétique. Ils ont également un rôle structural puisqu'ils rentrent dans la composition des phospholipides, constituants importants des membranes biologiques. Même s'ils sont principalement apportés par l'alimentation, les cellules humaines peuvent synthétiser *de novo* la quasi-totalité des acides gras. D'un point de vue épidémiologique, la présence d'acide palmitique (C16 :0) et l'absence d'acide stéarique (C18 :0), deux acides gras saturés sont associées aux cancers de la prostate de bas grade (Souidi et al., 2004). De plus, l'acide myristique (C14 :0) est associé aux cancers de haut grade ce qui montre l'implication des acides gras saturés tout au long de la progression tumorale.

Les acides gras poly-insaturés retrouvés chez l'Homme proviennent de l'alimentation. En effet, les cellules humaines ne peuvent pas synthétiser les acides linoléique (oméga 6) et linoléique (oméga 3). Or un lien a été montré entre l'acide linoléique (oméga 6) et les cancers de prostate de haut grade (Crowe et al., 2008). A l'inverse, l'acide linoléique (oméga 3) est associé à une diminution du risque de développer un cancer de la prostate (Chavarro et al., 2008).

Le cholestérol est quant à lui, retrouvé dans les produits d'origine animale comme les fromages, le jaune d'œuf, les viandes bovine et porcine mais peut également être synthétisé *de*

novus. Le lien entre cholestérol et cancer de la prostate sera abordé plus précisément dans le chapitre IV.

b. Les agents environnementaux

La mise en cause d'agents environnementaux dans l'augmentation du risque de cancer est complexe car elle nécessite de tenir compte du produit, de la dose utilisée et du temps d'exposition. Néanmoins, l'exposition à certains pesticides tels que le bromure de méthyl (alkylant), le dithiothréitol (DTT) ou l'heptachlore est associée à une augmentation de ce risque (Alavanja et al., 2003). Le même effet délétère est observé pour les perturbateurs endocriniens ayant des activités œstrogéniques comme le diéthylstilbestrol (DES) et ceux retrouvés dans les produits agricoles et industriels (Driscoll and Taylor, 1980). Des expériences réalisées chez des rongeurs exposés au DES montrent un développement d'hyperplasie, d'une dysplasie sévère assimilée à de la néoplasie intra-épithéliale signant donc les premières étapes d'un développement tumoral et reliant ce perturbateur endocrinien à la carcinogenèse prostatique (Prins et al., 2001). L'exposition au cadmium, utilisé dans certains colorants et plastiques industriels, est également corrélée avec une augmentation du risque de cancer (Ogunlewe and Osegbe, 1989; Elghany et al., 1990).

2. Symptôme et diagnostic

Le cancer de la prostate est asymptomatique jusqu'à des stades relativement avancés où il pourra entraîner une rétention d'urine, une hématurie (sang dans les urines), une impuissance sexuelle ou des dysfonctionnements d'autres organes en cas de métastases.

Les signes d'appel du cancer de la prostate sont un toucher rectal anormal et un dosage anormalement élevé de PSA. La manière la plus courante pour obtenir des échantillons est la biopsie transrectale. Le diagnostic est ensuite confirmé par des examens histopathologiques et cytologiques des glandes (Haute Autorité de Santé, 2012).

La complication la plus sévère après la biopsie est l'infection du tractus urogénital voire la septicémie.

A Les biomarqueurs sériques

L'introduction des biomarqueurs sériques a révolutionné le diagnostic et la prise en charge du patient.

La PAP (*Prostatic Acid Phosphatase*) est une phosphatase acide retrouvée dans le tissu prostatique et le fluide séminal (Kutscher, W Wollbergs, H, 1935; Pal et al., 2012). Une étude a montré que les niveaux de PAP sériques sont élevés dans les cancers de la prostate avancés et métastatiques (Gutman, EB et al., 1936; Pal et al., 2012). Cependant, plusieurs inconvénients ont remis en cause l'efficacité de ce marqueur pour le diagnostic. En effet, la PAP est sécrétée par les cellules saines du pancréas, de l'estomac, du foie ou des reins et des niveaux élevés de PAP peuvent être détectés dans d'autres pathologies comme les tumeurs malignes du rectum, du sang et de l'os (Jöbsis et al., 1981; Sobin et al., 1986). Par ailleurs, les taux de PAP peuvent être augmentés après manipulation de la prostate (touché rectal, biopsie, chirurgie) et dans les pathologies bénignes de la prostate telles que les prostatites ou l'HBP. Ces limites expliquent pourquoi l'utilisation du PSA comme marqueur prostatique l'a supplantée (Stamey et al., 1987).

Le PSA est une glycoprotéine androgéno-régulée à activité sérine-protéase codée par le gène *KLK3* (*human kallikrein 3*). La protéine PSA est initialement synthétisée en un pré-peptide clivé en un pro-peptide inactif sécrété. Une fois dans la lumière des acini prostatiques, ce pro-peptide est tronqué pour produire le PSA actif qui favorise la mobilité des spermatozoïdes. Depuis que la mesure du taux sérique de PSA est utilisée, de nombreux cas de cancer de la prostate ont été détectés en particulier les formes localisées (Cooperberg et al., 2003). Une valeur supérieure à 4 ng/ml est généralement considérée comme anormale. Cependant, il est important de noter que ce taux peut être augmenté dans des conditions de non malignité prostatique et ne permet pas de différencier les formes agressives des formes indolentes de la maladie (Thompson et al., 2004). Une méta-analyse a montré que la mesure du PSA ne semble pas voir d'effet significatif sur la mortalité due au cancer de la prostate (Djulgovic et al., 2010). Cependant, mesuré à un âge précoce, le PSA peut permettre de déterminer les personnes risquant de développer un cancer de la prostate (Lilja et al., 2007).

La hK2 (*human glandular Kallikrein 2*) est également une enzyme à activité sérine-protéase, qui comme PSA appartient à la famille des kallikréines. Une élévation des quantités de hK2 combinée avec un fort niveau de PSA sérique permet de prédire plus efficacement qu'avec le PSA seul, les cancers de la prostate qui vont être détectés par biopsie, les maladies extra-capsulaires et les rechutes suite au traitement (Steuber et al., 2006).

B Les biomarqueurs histologiques

L' α -Méthylacyl Coenzyme A Racémase (AMACR) est une enzyme mitochondriale surexprimée dans le cancer de la prostate par rapport aux tissus d'HBP (Xu et al., 2000). La détection de l'AMACR par immunohistochimie est devenue une pratique courante pour le diagnostic puisqu'elle est caractérisée par une grande sensibilité et spécificité (Sreekumar et al., 2004). Par ailleurs, ce marquage est souvent couplé au marquage de la protéine p63 permettant de détecter les cellules basales. Ce marquage p63 est perdu dans les échantillons tumoraux (Molinié et al., 2005).

Les EPCA-1 et EPCA-2 (*Early Prostate Cancer Antigen*) sont des protéines surexprimées dans les tissus malins (Getzenberg et al., 1991) et leur marquage peut être détecté plusieurs années avant le développement du cancer (Dhir et al., 2004).

Les marqueurs PSA et PAP peuvent également être détectés par des techniques histologiques (Molinié et al., 2005).

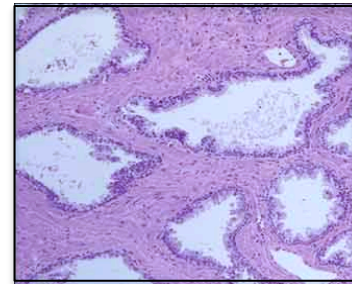
C Les biomarqueurs urinaires

L'urine, en continuité directe avec la lumière prostatique, peut être enrichie en biomarqueurs de cellules tumorales prostatiques. Des protéines, ADN et ARN issus des cellules malignes ont été identifiés dans l'urine avec plus ou moins de succès. A l'heure actuelle, les moyens mis en place se focalisent sur les ARNs.

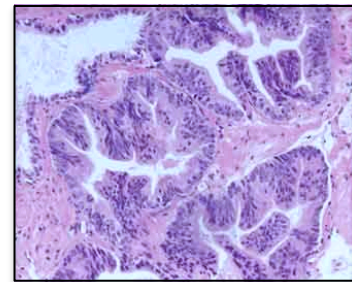
PCA3 (*Prostate Cancer Antigen 3*) est un ARNm non codant spécifique de la prostate et fortement exprimé par les cellules cancéreuses (De Kok et al., 2002). Une étude a montré que *PCA3* est surexprimé dans 94,6 % des échantillons de cancer de la prostate à un taux 66 fois supérieur aux conditions de tissus prostatiques sains et non-prostatiques (Hessels et al., 2003). Un test urinaire pour *PCA3* est disponible dans le commerce (Progensa *PCA3* ; Geneprobe, San Diego, CA) où les niveaux de transcrits *PCA3* sont mesurés puis normalisés à ceux de PSA rendant ce test hautement informatif et reproductible (Haese et al., 2008; Sokoll et al., 2008). L'utilisation de *PCA3* comme marqueur a montré une association avec la progression tumorale et notamment la rupture de la capsule (Haese et al., 2008; Nakanishi et al., 2008; Whitman et al., 2008). Une étude récente place ce marqueur comme ayant une plus grande valeur diagnostique que le simple dosage du PSA ce qui fait de lui un marqueur prometteur (Roobol et al., 2010).



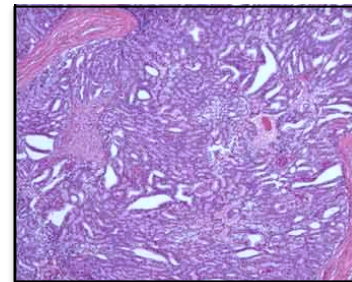
Épithélium normal



Néoplasie intra-épithéliale (PIN)



Carcinome in situ



Métastase

Invasion métastatique

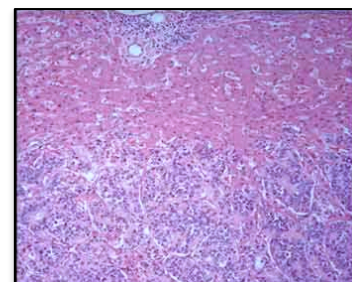


Figure 7 : Description des différentes étapes de progression du cancer de la prostate.

Le cancer de la prostate se développe à partir de l'épithélium et se caractérise par plusieurs stades d'évolution. Les cellules épithéliales prolifèrent de façon incontrôlée à l'intérieur du compartiment luminal entraînant la formation de néoplasies intra-épithéliales (PIN). Après s'être détachées de la lame basale, les cellules proliférantes envahissent le compartiment stromal ce qui caractérise l'étape de carcinome *in situ*. Enfin, les cellules tumorales peuvent évoluer vers des stades plus agressifs où elles seront capables de coloniser d'autres tissus pour former des tumeurs secondaires ou métastases. Modifié d'après Abate-Shen *et al.*, 2000 et Tomlins *et al.*, 2006.

Les fusions de gènes de type TMPRSS-ETS (*TransMembrane PRotease Serine 2-E-Twenty Six*) qui seront abordées plus en détails dans le Chapitre III 1. sont impliquées dans environ 50 % des échantillons de tumeurs prostatiques confirmant leur spécificité pour ce cancer (Scheble et al., 2010). Plusieurs études montrent qu'il est possible de détecter dans des échantillons urinaires, les transcrits de ces fusions dans environ 35 % des cas avec une spécificité de quasiment 100% (Hessels et al., 2007; Rostad et al., 2009; Tomlins et al., 2011). Même si la sensibilité de ces tests est relativement faible par rapport aux autres marqueurs, ils sont hautement spécifiques et permettent de détecter préférentiellement les tumeurs agressives (Salami et al., 2011).

EN2 (*Engrailed 2*) est un facteur de transcription dont la séquence peptidique de l'homéodomaine peut se lier au promoteur de gènes cibles pour exercer son action régulatrice sur leur transcription. L'expression d'EN2 est régulée positivement dans les cellules tumorales prostatiques (LNCaP, DU145 et PC-3) en comparaison avec des cellules prostatiques saines et son inhibition par siRNA conduit à une baisse de la croissance cellulaire (Bose et al., 2008). Des tests urinaires ont été mis en place pour détecter les niveaux d'EN2 avec une sensibilité de 66 % et une spécificité de 90 % (Morgan et al., 2011).

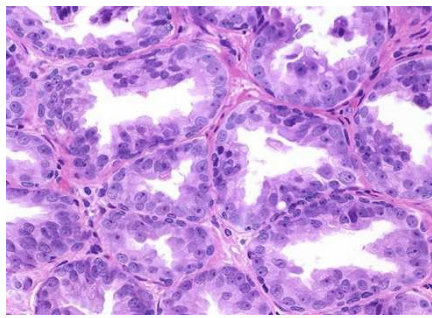
En plus de son utilisation comme marqueur sérique, plusieurs groupes ont cherché à détecter l'AMACR dans les urines. Ainsi, les taux de son ARNm ont été quantifiés par RT-qPCR puis normalisés aux niveaux de PSA ce qui a permis de prédire un cancer de la prostate dans 70 % des patients soulignant bien son potentiel diagnostique (Zielie et al., 2004).

3. Les étapes de la carcinogenèse prostatique et classification

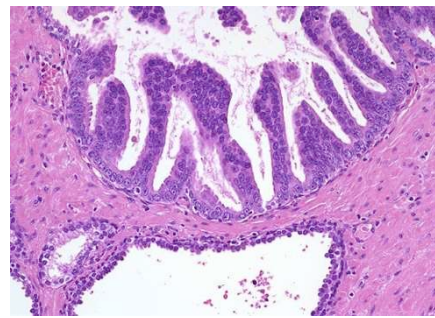
Le cancer de la prostate est un adénocarcinome se développant majoritairement (85 % des cas) au niveau de la zone périphérique de cet organe. La mise en place et la progression de ce cancer se déroulent en différentes étapes : l'atrophie inflammatoire, la néoplasie intra-épithéliale, le carcinome puis l'invasion métastatique (Figure 7).

A L'atrophie inflammatoire proliférative (PIA)

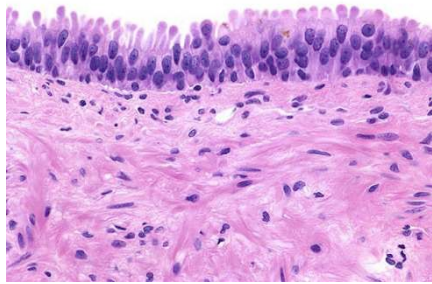
Elle est décrite comme une prolifération de l'épithélium glandulaire avec l'apparence morphologique d'une atrophie associée à une inflammation (Ruska et al., 1998). Concernant les lésions, une prolifération des cellules épithéliales est retrouvée ainsi que des cellules inflammatoires telles que des mononucléaires et/ou des polynucléaires neutrophiles à la fois dans le compartiment épithélial et stromal, et une atrophie stromale avec une fibrose plus ou



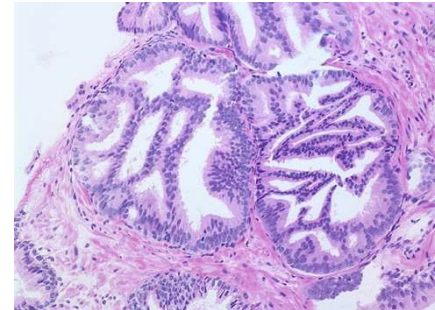
En touffe



Micropapillaire



Plate



Cribiforme

Figure 8 : Phénotype histologique des différents types de néoplasies intra-épithéliales.

L'architecture des PIN est regroupée autour des 4 formes majeures suivantes: en touffe, micropapillaire, plate et cribiforme.

<http://www.webpathology.com>

moins importante. Cette étape inflammatoire est proposée comme étant une réponse proliférative aux dommages environnementaux comme l'inflammation et le stress oxydant chez l'homme âgé. Son implication dans la cinétique de carcinogenèse prostatique est cependant très controversée. Ainsi, elle correspondrait à une étape très précoce voire sans rapport avec le cancer (Tomlins et al., 2007). De plus, certaines des signatures moléculaires de la transformation néoplasique sont retrouvées dans cette étape (Joshua et al., 2008).

B La néoplasie intra-épithéliale ou PIN

Il s'agit des lésions présumées initiatrices de la carcinogenèse prostatique. La plupart des altérations observées au cours de la progression tumorale se mettraient en place durant la transition entre l'épithélium sain et la néoplasie intra-épithéliale (Tomlins et al., 2007). Nous aborderons ces modifications génétiques dans le chapitre III. Au niveau des cellules prostatiques, l'étape de néoplasie intra-épithéliale (PIN : *Prostatic Intra-epithelial Neoplasia*) se caractérise par une désorganisation de l'épithélium prostatique avec l'apparition de nucléole proéminent, d'un élargissement du noyau et d'une augmentation de la densité du cytoplasme. L'architecture des PIN est regroupée autour de 4 formes majeures qui n'influent pas sur le pronostic : en touffe, micropapillaire, cribiforme et plate (Figure 8) (Abate-Shen and Shen, 2000; Bostwick et al., 2004b). Ces PIN peuvent être classées en fonction de leurs caractéristiques histologiques et cytologiques en lésions de bas grade (LGPIN : *low grade*) ou de haut grade (HGPIN : *high grade*) (Joniau et al., 2005).

C Le carcinome

Le carcinome présente des altérations semblables aux HGPIN notamment concernant les marqueurs de différenciation et les anomalies chromosomiques. Contrairement aux HGPIN, l'étape de carcinome se caractérise par une rupture de la lame basale. Les cellules épithéliales basales et lumbales présentent une prolifération fortement accrue ce qui se traduit par une augmentation des sécrétions et donc des marqueurs de diagnostic comme le PSA. Lorsqu'elles deviennent plus agressives, les cellules cancéreuses vont envahir le tissu de soutien ainsi que les acini adjacents et les organes voisins (vésicules séminales et vessie) (Wittekind et al., 2002).

A)

T		Tumeur primitive
TX		Tumeur primitive non évaluée
T0		Tumeur non retrouvée
T1		Tumeur non palpable et non visible à l'imagerie.
	• T1a	Moins de 5 % du tissu réséqué
	• T1b	Plus de 5 % du tissu réséqué
	• T1c	Découverte sur biopsie en raison d'un PSA élevé
T2		Tumeur limitée à la prostate
	• T2a	Atteinte de moins de 50 % d'un lobe
	• T2b	Atteinte de plus de 50 % d'un lobe
	• T2c	Atteinte des deux lobes
T3		Extension au-delà de la capsule
	• T3a	Extension extra-capsulaire uni ou bi-latérale
	• T3b	Extension aux vésicules séminales uni ou bi-latérale
T4		Tumeur fixée atteignant d'autres structures que les vésicules séminales
N		Ganglions régionaux
NX		Ganglions régionaux non évalués
N0		Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1		Atteinte ganglionnaire(s) régionale(s)
N1M1		Métastase ganglionnaire de moins de 0,2 cm
M		Métastases à distance
MX		Métastases à distance non évaluées
M0		Absence de métastases à distance
M1		Métastases à distance
	• M1a	Atteinte de ganglions non régionaux
	• M1b	Atteinte osseuse
	• M1c	Autres sites

B)

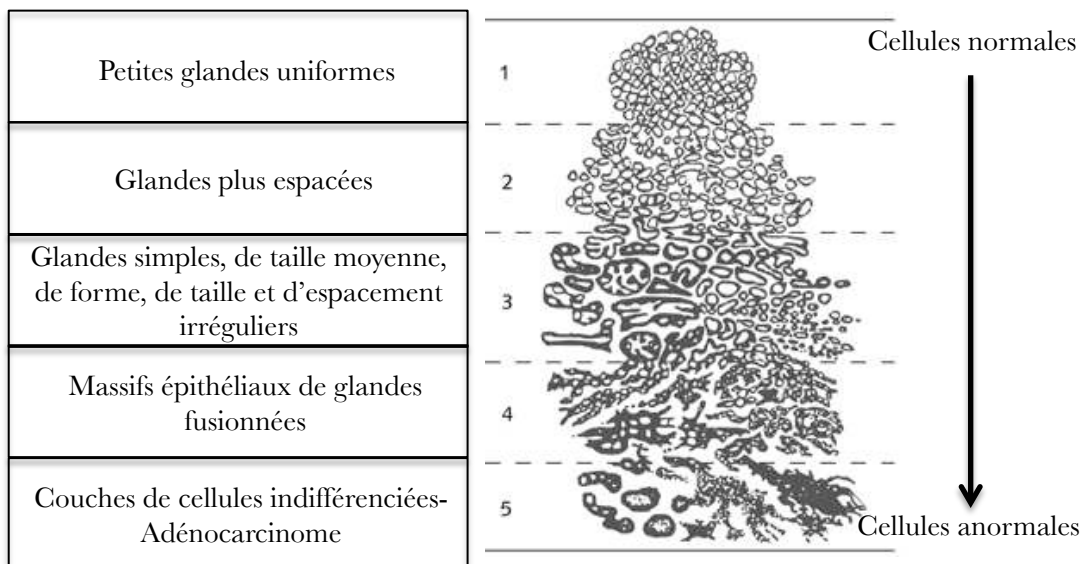


Figure 9 : Classification des tumeurs prostatiques.

A) Classification TNM d'après le rapport d'orientation de la Haute Autorité de Santé. **B)** Vue schématique de l'histologie prostatique à cinq grades différents selon la classification de Gleason avec les caractéristiques principales associées à ces grades.

D Le cancer métastatique

La progression s'oriente vers la formation de métastases et est caractérisée par une perte d'adhérence des cellules entre elles et avec la matrice extra-cellulaire conduisant à une dissémination des cellules cancéreuses dans les systèmes sanguins et lymphatiques. Ces métastases sont principalement retrouvées au niveau des ganglions lymphatiques, des os et du cerveau (Tantivejkul et al., 2004; Salvati et al., 2005; Zeng et al., 2005).

E La classification TMN

La classification TNM est un système international permettant de classer tous les cancers selon leur expansion anatomique. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour *node*) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est suivie d'un chiffre correspondant à des critères et permettant de caractériser précisément l'envahissement tumoral (Salomon et al., 2010) (Figure 9A).

F Le score de Gleason

Il s'agit du système le plus couramment utilisé pour grader l'adénocarcinome de la prostate (Gleason and Mellinger, 1974). Ce système est basé sur l'analyse histologique décrivant un score entre 2 et 10, avec 2 étant le moins agressif et 10 le plus agressif. Ce score est la somme des 2 profils histologiques les plus courants (grades 1-5) de la croissance tumorale (Figure 9B). Cette classification permet de séparer les tumeurs en cancers de bas grade de malignité (de 2 à 4), de grade intermédiaire (de 5 à 7) et de haut grade (de 8 à 10).

4. Traitement

Lorsque le diagnostic est confirmé, le choix de la stratégie thérapeutique se base sur la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie ou la surveillance active selon l'âge du patient, les caractéristiques de la tumeur et les pathologies associées (Institut National du Cancer, 2010) (Figure 10).

La surveillance active est possible lorsque le stade de la maladie est relativement précoce. L'évolution de la maladie sera alors contrôlée par un toucher rectal et un dosage du PSA tous

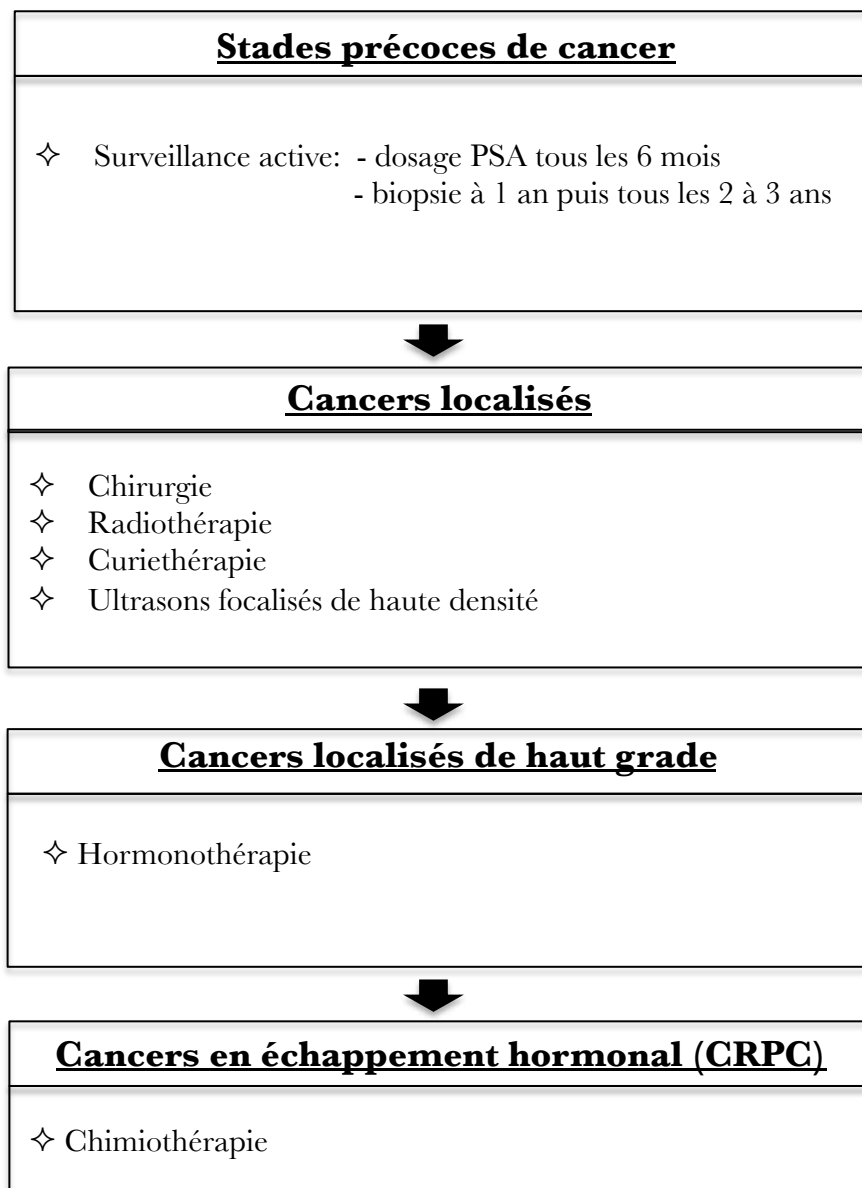


Figure 10 : Traitements du cancer de la prostate.

Représentation schématique des différents traitements utilisés en fonction de l'avancée du cancer de la prostate.

les 6 mois, une biopsie à 1 an puis tous les 2 à 3 ans jusqu'aux premiers signes de progression tumorale. La mise en œuvre de traitements curatifs sera alors lancée.

Parmi ces traitements, on distingue (Figure 10) :

A La chirurgie

La prostatectomie totale est le traitement chirurgical curatif appliqué en cas de cancer localisé. Cette intervention, réalisée le plus souvent au travers d'une incision abdominale au-dessus du pubis ou par coelioscopie ou incision du périnée, consiste en l'ablation de la prostate et des vésicules séminales.

B La radiothérapie externe

Après un repérage radiographique de la prostate, cette technique vise à cibler préférentiellement les cellules tumorales à l'aide de radiations ionisantes. Les rayons entraînent la mort des cellules malignes en bloquant leur multiplication. C'est le traitement de référence des cancers localisés de bas grade ou de grade intermédiaire. Il est associé à l'hormonothérapie pour les cancers localisés de haut grade ou localement avancés. Les principaux effets secondaires de la radiothérapie sont des rougeurs de la peau et une inflammation de la vessie et de l'urètre.

C La curiethérapie

Cette technique nécessite un guidage échographique pour implanter dans la prostate soit de façon permanente des grains d'iode 125 radioactifs soit temporairement de l'iridium 192. Les radiations émises par ces substances provoquent la mort des cellules avoisinantes. La portée de ces implants est faible ce qui permet de protéger les tissus voisins (vessie, rectum). La curiethérapie est indiquée majoritairement en cas de cancer localisé de bas grade. Les effets secondaires associés sont l'apparition d'ecchymoses et de saignements au niveau du lieu d'insertion des implants, des troubles urinaires (inflammation, hématurie, rétention d'urine) et plus tardivement des troubles de l'érection (30 % des cas).

D Les ultrasons focalisés de haute densité ou HIFU (*High Intensity Focused Ultrasound*, Ablaterm®)

Il s'agit d'une technique récente et qui consiste à focaliser des faisceaux d'ultrasons de haute intensité dans la prostate *via* une sonde endorectale pour obtenir un effet d'ablation thermique. Ce traitement peut être proposé en cas de cancer localisé de bas grade et lorsque la radiothérapie n'a pas eu d'effet.

Les principaux effets secondaires provoqués par ces traitements curatifs des cancers localisés sont des troubles urinaires et de l'érection.

E L'hormonothérapie

Le cancer de la prostate est fortement androgéno-dépendant, c'est-à-dire que la progression tumorale va dépendre des androgènes testiculaires (testostérone) mais aussi de ceux produits par la prostate issus de la conversion de la DHEA (déhydroépiandrostérone) ou de l'androstènedione surrénalienne. L'hormonothérapie est donc centrée sur le blocage de la production et de l'action des androgènes. Associée à la radiothérapie, il s'agit du traitement de référence des cancers de la prostate localisés de haut grade ou localement avancés. Lorsque les ganglions sont atteints et que des métastases ont été détectées, l'hormonothérapie est utilisée pour une longue durée (Institut National du Cancer, 2010).

a. L'ablation des testicules

Cette intervention chirurgicale vise à supprimer la source de testostérone produite par les testicules. Cette ablation permet une diminution de 90 à 95 % de la quantité de testostérone retrouvée dans le corps et entraîne une régression rapide de la tumeur prostatique.

b. Les traitements médicamenteux

1) *Les analogues ou antagonistes de la LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)*

La LHRH est une hormone sécrétée de manière pulsatile par l'hypothalamus en direction de l'hypophyse antérieure qui va ensuite libérer la LH (*Luteinizing Hormone*). Celle-ci est responsable de la production de la testostérone au niveau testiculaire. L'utilisation d'analogues de la LHRH tels que le Leuprolides® (leuproréline) ou Goserelin® stimule de manière constante l'hypophyse ce qui entraîne la diminution du nombre de récepteurs de LHRH et

donc de la production de LH. Ces analogues montrent une efficacité comparable à la castration chimique (Denis, 1998) et à l'œstrogène de synthèse, le diéthylstilbestrol (The Leuprolide Study Group, 1984). Les antagonistes de la LHRH comme le dégarelix (Firmagon®) permettent la diminution des taux de testostérone et du PSA circulants (Boccon-Gibod et al., 2009).

2) *Les anti-androgènes*

Les plus courants, flutamide (Eulexin®), bicalutamide (Casodex®), nilutamide (Nilandron®), entrent en compétition avec la testostérone ou la DHT pour la fixation sur AR (Klotz, 2006). L'acétate de cyprotérone (CPA), analogue de l'hydroxyprogestérone, est un stéroïde qui bloque l'interaction des androgènes avec AR (Torri and Floriani, 2005). Ces anti-androgènes sont le plus souvent administrés en complément des analogues de LHRH.

Parmi les effets secondaires les plus communément associés à l'hormonothérapie, sont retrouvés les bouffées de chaleur, des troubles de l'érection, la baisse de la libido et l'irritabilité.

Néanmoins, les bénéfices de l'hormonothérapie ne perdurent pas après 30 mois de traitement (Russell and Khatri, 2006). Les cellules tumorales deviennent alors pharmaco-résistantes et le cancer devient alors un CRPC (*Castration-Resistant Prostate Cancer*).

F La chimiothérapie

Traitement systémique, la chimiothérapie permet de cibler les cellules tumorales quelle que soit leur localisation et d'agir sur leurs mécanismes de prolifération. Elle est ainsi le traitement de référence des cancers métastatiques hormono-résistants ou CRPC. Les médicaments utilisés et la fréquence de traitement sont adaptés à chaque individu selon les caractéristiques du cancer et la tolérance au traitement. Le docétaxel (Taxotère®) permet un blocage de la mitose alors que le mitoxantrone (Novantrone®) est un intercalant de l'ADN. Pour limiter leurs effets indésirables, ces molécules sont très souvent associées à un anti-inflammatoire glucocorticoïde, la prednisone (Pred Forte®).

III. Les modèles murins de cancer prostatique

Les études *in vitro* réalisées sur des lignées tumorales humaines comme les DU-145, les PC-3 et les LNCaP ont permis de caractériser les mécanismes intra-cellulaires impliqués dans la progression tumorale mais ne permettent pas de tenir compte des signaux paracrines du microenvironnement (Sobel and Sadar, 2005). De plus, le cancer de la prostate ne dérive pas d'un seul foyer de cellules mais bien de manière multifocale pour 60 à 90 % des patients (Andreoiu and Cheng, 2010).

Les manipulations du génome murin sont utilisées pour modéliser la carcinogénèse prostatique, de l'initiation jusqu'aux métastases.

1. Les bases moléculaires

De nombreux arguments bibliographiques montrent que le développement du cancer de la prostate est dû à des altérations génétiques provoquant l'activation d'oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Gurel et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que 50 % des cancers de la prostate présentent des fusions de gènes (Morris et al., 2008). Ainsi, les tumeurs peuvent être classées en fonction des altérations génétiques détectées et des signatures chromosomiques. Ces données suggèrent que le cancer de la prostate dont les mécanismes moléculaires étaient jusqu'à présent mal compris pourrait être classé en sous-groupes homogènes identifiables grâce à des critères moléculaires et ainsi être ciblé de manière plus efficace en thérapie.

A Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (onco-suppresseur)

Il existe deux classes de gènes mutés avec une pénétrance élevée dans les cancers : les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs (pour revue; Weinberg, 1994). Les oncogènes vont promouvoir le cancer alors que les suppresseurs de tumeurs inhibent le développement et la progression tumorale. Généralement, les oncogènes sont activés par des mutations dominantes qui exacerbent la fonction de la protéine codée par ce gène. Ainsi, les proto-oncogènes (forme non mutée de l'oncogène) restent quiescents quand ils sont exprimés de manière endogène mais les mutations gain de fonction ou les surexpressions de ces gènes *via*

une régulation aberrante des contrôles cellulaires peuvent conférer aux cellules une viabilité ou des avantages prolifératifs (Stehelin et al., 1976).

L'inactivation des suppresseurs de tumeurs dans les cancers est expliquée par l'hypothèse des deux « hits » établie pour le gène RB (*RetinoBlastoma*) (Knudson, 1971). Ainsi, les patients avec des cas héréditaires de rétinoblastome présentent une copie mutée de RB héritée ce qui correspond au premier « hit ». Si la fonction du deuxième allèle est altérée soit par une nouvelle mutation soit par une perte d'hétérozygotie (*LOH*; *Loss Of Heterozygosity*), c'est le second « hit », permettant alors à la tumeur de se développer. Cette théorie des deux « hits » a permis l'identification d'un grand nombre de gènes suppresseurs de tumeur qui peuvent être regroupés dans deux classes différentes. D'une part, certains ont pour rôle de freiner la prolifération et donc d'inhiber la croissance tumorale ce qui inclut les régulateurs négatifs des voies de survie tels que PTEN ou les inhibiteurs du cycle cellulaire comme RB. D'autre part, certains empêchent ou réparent les dommages à l'ADN diminuant ainsi le taux de mutations comme *Tp53*.

Les modèles animaux que nous détaillerons par la suite ont permis de préciser l'impact des gènes suppresseurs de tumeur sur la carcinogenèse prostatique en introduisant notamment la notion d'haplo-insuffisance c'est-à-dire l'importance du dosage allélique moins restrictif que la théorie des deux « hits » (Berger and Pandolfi, 2011). En effet, dans de nombreux cas pour certains gènes suppresseurs de tumeur, la perte d'un allèle est fonctionnellement importante selon le contexte ou la perte d'autres gènes avec lesquels ils peuvent coopérer.

B Les fusions de gènes

L'implication de ces altérations génétiques dans le développement des cancers en fait un axe très important de la recherche fondamentale. Un gène de fusion est un gène hybride formé à partir de deux gènes distincts. Ce réarrangement peut être le résultat de translocation, de délétion interstitielle ou de l'inversion chromosomique. D'une part, des éléments promoteurs sont situés à proximité d'un proto-oncogène ce qui va entraîner l'expression de l'oncogène. D'autre part, la fusion de gènes permet de créer une nouvelle fonction ou une fonction altérée. Une translocation génétique aberrante générant une fusion des gènes codant la sérine protéase androgéno-régulée sécrétée par les cellules épithéliales prostatiques, *TMPRSS2* (*TransMembrane PRotease Serine 2*) et le gène codant un membre de la famille des facteurs de transcription ETS (*E-Twenty Six*) parmi lesquels on retrouve *ERG*, *ETV1*, *ETV4*, *FLI1* (Tomlins et al., 2005, 2006). La région traduite de *TMPRSS2-ERG* est uniquement codée par

le gène *ERG* ce qui produit une protéine *ERG* tronquée sous contrôle d'une stimulation androgénique *via* le promoteur de *TMPRSS2* (Clark et al., 2007). Les fusions *TMPRSS2-ERG* sont détectées dans 40 à 80 % des cas puis *TMPRSS2-ETV2* dans 20 % des cas (Cai et al., 2007). Les fusions de gènes sont retrouvées dans 60 à 70 % des cancers de la prostate localisés. Alors que peu de fusions sont détectées dans les néoplasies de bas grade (*LGPIN*), elles sont présentes dans 25 % des néoplasies de haut grade (*HGPIN*) (Cerveira et al., 2006; Clark et al., 2007).

2. Modèle MPR (*Mouse Prostate Reconstitution*)

Le principe repose sur la greffe du sinus urogénital de fœtus murin de 16 jours sous la capsule rénale d'une souris mâle adulte ce qui provoque le développement d'une prostate mature. Par exemple, l'utilisation d'un rétrovirus recombinant permet d'introduire les oncogènes *Ras* et/ou *Myc* au niveau des parties mésenchymateuses et épithéliales du sinus urogénital. Un adénocarcinome de la prostate est détecté dans 90 % des animaux lorsque les deux oncogènes sont utilisés. L'introduction de *Ras* seul induit une dysplasie alors que *Myc* provoque une hyperplasie épithéliale focale. Ce modèle a permis la compréhension de l'impact de l'environnement puisque si l'épithélium est infecté par les deux oncogènes, 80 % des animaux développent un carcinome alors que lorsque le mésenchyme seul est touché, tous les animaux présentent une dysplasie mais aucun cas de cancer (Thompson et al., 1991, 1993, 1995). Ce modèle a également permis d'étudier l'implication d'acteurs moléculaires dans la carcinogenèse prostatique. Ainsi, l'utilisation du sinus urogénital de souris *Tp53*^{-/-} a montré la présence de cancer de la prostate dans 100 % des cas avec des métastases dans 95 % des cas ce qui suggère un rôle prépondérant de *p53* dans la progression du cancer (Eastham et al., 1995).

3. Les modèles d'invalidation de suppresseurs de tumeurs

A Méthodes de transgénèse utilisées

a) Les invalidations au niveau germinale

Les mutations provoquant une haplo-insuffisance des suppresseurs de tumeur sont fréquemment retrouvées dans plusieurs cancers humains ce qui entraîne une prolifération incontrôlée (Berger and Pandolfi, 2011). Ces mutations peuvent être recrées dans des

organismes modèles permettant d'étudier plus précisément les mécanismes moléculaires mis en jeu. La création de modèles d'inactivation repose ainsi sur la modification au niveau germinale d'un domaine génique essentiel pour la fonctionnalité de la protéine. Nous aborderons des modèles murins ayant contribué à la compréhension des mécanismes de carcinogenèse prostatique.

b) Les inactivations conditionnelles

Elle permet d'étudier des gènes dont l'inactivation au niveau de la lignée germinale est létale (Chaible et al., 2010). Les gènes impliqués dans le développement d'organes vitaux doivent être inactivés de manière spécifique dans les tissus cibles pour étudier leur rôle dans les étapes post-embryonnaires. La recombinaison Cre est une enzyme isolée à partir du phage P1 qui catalyse une recombinaison spécifique du site au niveau de gènes flanqués (*floxed*) de part et d'autre de séquences de 34 paires de bases nommées sites loxP (Abremski and Hoess, 1984). Dans les modèles murins, la recombinaison Cre est utilisée comme transgène sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tissu cible. L'activité du promoteur est contrôlée par des facteurs de transcription exprimés dans le tissu d'intérêt à un stade spécifique du développement (Wu et al., 2001). Pour cibler efficacement la délétion de gènes au niveau prostatique, des séquences promotrices sont utilisées à partir de gènes endogènes de la prostate.

Le promoteur du gène de la probasine de rat (PB -426 +28) a été très utilisé (Greenberg et al., 1994). Deux sites consensus de liaison de AR à l'intérieur du promoteur (-236 à -223 et -140 à -117) nommés ARR (*Androgen Response Region*) sont requis pour une activité optimale du promoteur (Kasper, 2005). Les analyses de gènes rapporteurs montrent des niveaux élevés de probasine dans tous les lobes de la prostate murine en utilisant ces sites consensus (Gingrich et al., 1996). Un promoteur plus long de 12 Kb (promoteur -11500/+28 large PB (LPB)) permet une expression significativement plus élevée du transgène au niveau des cellules épithéliales luminales (Yan et al., 1997). L'ajout de 2 ARR au promoteur LPB permet de créer un nouveau promoteur dont la spécificité sera plus élevée encore pour la prostate : ARR2PB. Ce promoteur est utilisé pour cibler l'expression de la Cre (PB-Cre4) avec une grande spécificité dans les cellules luminales épithéliales (Wu et al., 2001). Par ailleurs, une portion du promoteur du PSA humain a été également utilisé pour exprimer la Cre dans les prostates murines (Abdulkadir et al., 2002).

Plusieurs méthodes ont été mises en place afin de placer la recombinaison Cre sous le contrôle d'un promoteur inductible. Une recombinaison MerCreMer sous contrôle d'un promoteur

probasine inducible au tamoxifen a été créée. Dans cette construction, l'expression du transgène est induite suite à des injections intra-péritonéales de tamoxifen qui est un modulateur du récepteur des oestrogènes permettant des niveaux élevés de recombinaison spécifique du tissu (Birbach et al., 2009). Une autre étude a développé un vecteur viral plaçant la Cre sous contrôle d'un promoteur viral injecté au niveau des canaux prostatiques de souris floxées pour les gènes d'intérêt et démontrant un taux élevé de recombinaison (Leow et al., 2005).

B Les invalidations du gène suppresseur de tumeur *Pten*

PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), second gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers (Stokoe, 2001), se situe au niveau de la portion chromosomique 10q23 qui est fréquemment délétée dans le cancer de la prostate (Li et al., 1997).

A ce jour, 4 mécanismes mènent à l'inactivation de *PTEN* dans le cancer chez l'Homme : la délétion chromosomique ou la perte d'hétérozygotie, les mutations somatiques, l'oxydation (Covey et al., 2007) et des modifications épigénétiques comme la méthylation du promoteur. Par ailleurs, des mutations de *PTEN* peuvent conférer en cas de cancer de la prostate des résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie mais également augmenter le taux de récurrences après prostatectomie (Anai et al., 2006; Bedolla et al., 2007; Priulla et al., 2007). Des études mettent en avant le rôle de *PTEN* dans la progression tumorale vers l'androgéno-indépendance et le potentiel métastatique (Shen et al., 2007).

a. *Pten* est une phosphatase inhibitrice de la voie PI3K

La Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) et ses cibles AKT/PKB sont des molécules de signalisation importante et des facteurs de survie clés impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'apoptose et donc de la carcinogenèse. Les membres de la famille PI3K sont regroupés en quatre classes en fonction de leur structure et de la spécificité du substrat *in vitro*. En effet, les classes I à III ciblent les lipides phosphorylés alors qu'il s'agit des protéines phosphorylées pour la classe IV. Parmi ces classes, la classe I est la plus associée avec le cancer et est composée d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa. Le rôle de la PI3K est de phosphoryler une série de phospholipides membranaires tels que PtdIns(4)P (*Phosphatidylinositol Phosphate*) et PtdIns(4)P2 permettant de

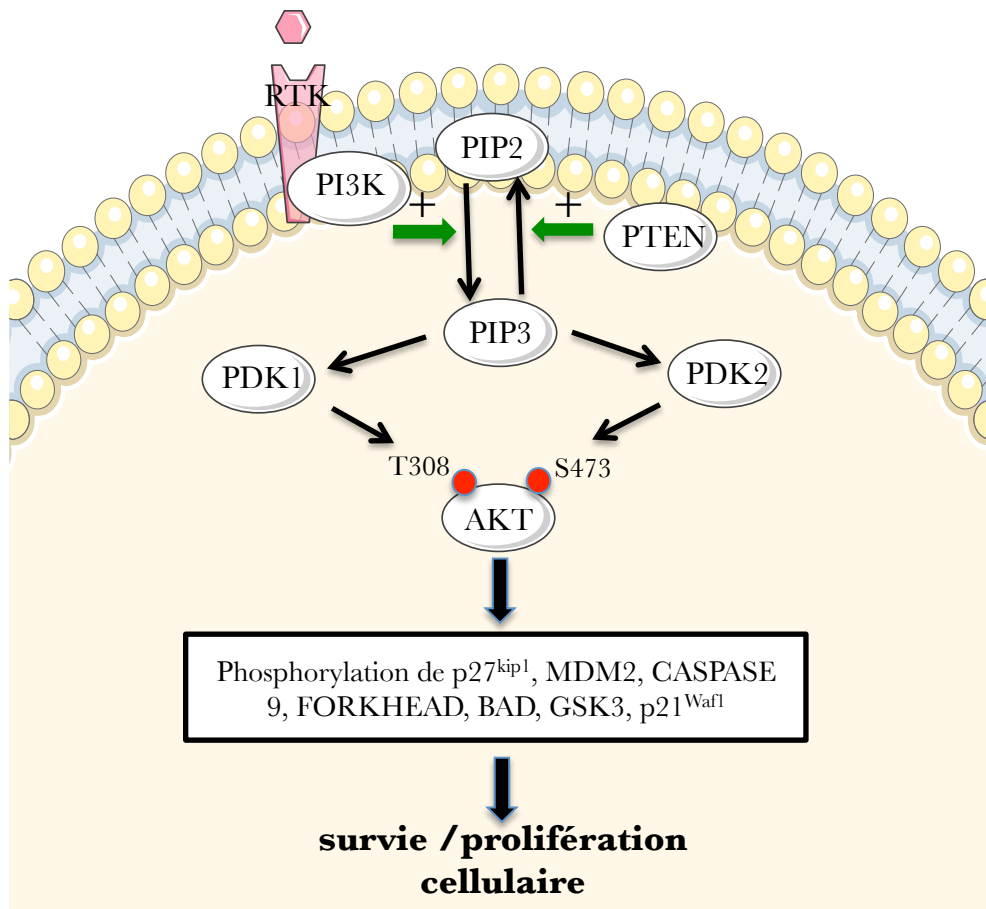


Figure 11 : Mécanisme d'action conduisant à l'activation de la kinase AKT et son implication dans les voies de survie et de prolifération cellulaire.

En réponse à des signaux extracellulaires tels que des facteurs de croissance, les récepteurs tyrosine kinase (RTK) entraînent une cascade de phosphorylation intracellulaire mettant en jeu la PI3Kinase (PI3K) qui phosphoryle l'inositol diphosphate en inositol triphosphate. La phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) se charge de la réaction inverse. Ensuite, les kinases PDK1 et 2 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*) activent AKT par phosphorylation conduisant à la stimulation de la survie et de la prolifération cellulaire en modulant par phosphorylation l'action de facteurs clés dans ces mécanismes. Les points rouges représentent des groupements phosphates.

former les messagers secondaires PtdIns(3,4)P₂ et PdtIns(3,4,5)P₃. Trois types d'effecteurs peuvent activer la PI3K : les récepteurs aux facteurs de croissance tels que IGF-R (*Insulin Growth Factor-Receptor*) ou PDGF-R (*Platelet Derived Growth Factor-Receptor*) ; les phosphoprotéines telles que IRS-1/2 (*Insulin Receptor Substrate 1/2*), Gab 1/2 (*Grb 2-associated binder 1/2*) ou l'oncogène Ras (*cellular murine sarcoma virus oncogene homolog*) (McCubrey et al., 2007). La plupart du temps, la PI3K est activée par la fixation d'un ligand à son récepteur entraînant l'association de la sous-unité régulatrice p85 avec les résidus tyrosine phosphorylés sur le récepteur *via* un domaine SH2 (*Src-Homology2*). La sous-unité catalytique p110 transfère alors le groupement phosphate au niveau des phospholipides membranaires et plus spécifiquement le PtdIns (3,4,5)P₃ qui va à son tour, attirer des kinases initiant ainsi la cascade de signalisation (Toker and Cantley, 1997).

En aval de la PI3K, AKT/PKB (*Protein Kinase B*) est une kinase présentant des similarités avec les PKA et C. Chez les mammifères, il existe trois membres AKT1, AKT2 et AKT3 codés par trois gènes distincts. La protéine AKT contient un domaine amino-terminal de type PH (*Pleckstrin Homology*) permettant de diriger la protéine vers la membrane, lieu de son activation (Franke et al., 1997). Dans sa région centrale, AKT possède un large domaine kinase et est composée au niveau de sa région carboxy-terminale de régions hydrophobes, riche en proline (Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991). L'activation d'AKT dépend essentiellement de la phosphorylation de 2 résidus ; la sérine 473 et la thréonine 308. Lorsque ces 2 résidus sont phosphorylés, l'activation est optimale. Les PDKs (*Phosphatidylinositol-Dependent Kinases*) sont responsables de cette activation puisque PDK1 phosphoryle la thréonine 308 et PDK2 la sérine 473. L'identité de PDK2 est controversée car des arguments suggèrent que la phosphorylation de la thréonine 308 provoquerait l'autophosphorylation de la S473 tandis que d'autres postulent que PDK2 est en fait une ILK (*Integrin-Linked Kinase*) (Delcommenne et al., 1998; Toker and Newton, 2000). AKT peut également être phosphorylée par la protéine RICTOR appartenant au complexe mTOR retrouvé en aval d'AKT (Steelman et al., 2008). Par ailleurs, AKT peut être déphosphorylée par la p70S6K qui est également en aval d'AKT dans la cascade de signalisation (Martelli et al., 2007). Lorsqu'elle est activée, AKT quitte la membrane pour phosphoryler les substrats intracellulaires. AKT peut ainsi transloquer dans le noyau où elle pourra agir sur l'activité d'un grand nombre de régulateurs transcriptionnels (Andjelković et al., 1997). Les facteurs de transcription CREB (*Cyclic-AMP Response Element Binding protein*), E2F, NFκB et Forkhead sont des substrats direct ou indirect d'AKT et vont promouvoir la prolifération cellulaire ou la survie (Figure 11). En plus des facteurs de transcription, AKT peut agir sur des molécules

pour affecter la survie telles que la caspase-9, le facteur pro-apoptotique BAD et la GSK-3 β (*Glycogen-Synthase kinase-3 β*). Lorsque ces cibles sont phosphorylées par AKT, elles peuvent être soit activées, soit inactivées mais le but est de promouvoir la survie de la cellule.

Les produits des réactions de la voie PI3K sont déphosphorylés par deux types de phosphatases, PTEN et SHIP-1/2 (*SH2-domain-containing Inositol Phosphatase*). PTEN exerce une activité de phosphatase lipidique sur le PtdInsP3 provoquant l'inhibition de la voie de survie PI3K (Foufelle et al., 2005). Par ailleurs, PTEN possède également une activité de phosphatase protéique sur des substrats tels que FAK (*Focal Adhesion Kinase*), la protéine d'échange SHC (*Src Homology 2 domain Containing*) et les régulateurs transcriptionnels ETS-2 et Sp1 (Weng et al., 2002; Kang-Park et al., 2003). La protéine PTEN possède 4 domaines structuraux. Au niveau amino-terminal sont retrouvés les domaines phosphatases lipidiques et protéiques. Puis le domaine C2 est responsable de la liaison lipidique ainsi que de la localisation membranaire. Ensuite les 2 domaines PEST (riche en proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T)) régulent la stabilité de la protéine. Enfin, PTEN possède un domaine PDZ qui facilite les interactions protéines-protéines. Plusieurs études ont montré que les mutations au sein du domaine phosphatase rendent la protéine inactive (Maehama and Dixon, 1998; Myers et al., 1998; Maier et al., 1999).

b. Fonctions de PTEN indépendantes de la voie PI3K

En plus de son lien avec AKT, PTEN s'associe directement avec p53 pour en augmenter la stabilité, le niveau protéique et l'activité transcriptionnelle (Blanco-Aparicio et al., 2007). De la même manière, PTEN régule l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par son activité phosphatase en diminuant les niveaux d'accumulation notamment nucléaires de la Cycline D1 (Radu et al., 2003).

Par ailleurs, la forme nucléaire de PTEN joue un rôle crucial dans le maintien de la stabilité chromosomique. En effet, la perte de PTEN entraîne une augmentation des cassures centromériques et des cassures doubles brins (Shen et al., 2007). Cette même étude met en évidence que PTEN est associée aux centromères par son interaction avec la protéine CENP-C (*CENtrome re Protein C*) et module la réparation des cassures doubles brins en régulant la protéine Rad51.

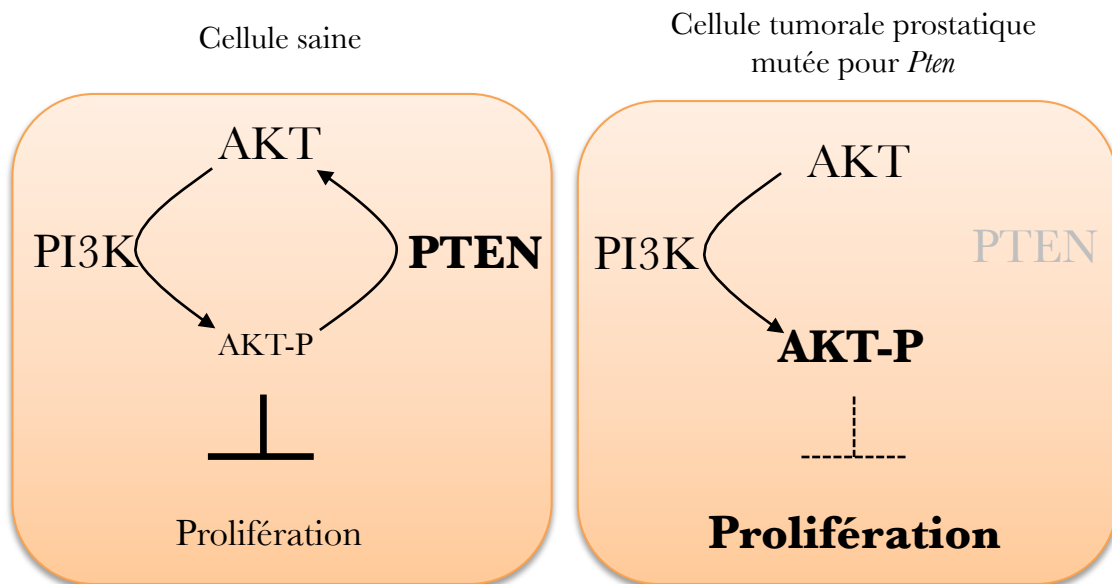


Figure 12 : Mécanisme d'action conduisant à l'activation de la kinase AKT et son implication dans les voies de survie et de prolifération cellulaire.

La présence de PTEN dans les cellules saines limite l'activation d'AKT ce qui va freiner la prolifération. A l'inverse, l'inactivation de *PTEN* dans les cellules tumorales prostatiques entraîne l'activation de la voie PI3K/AKT ce qui va promouvoir la survie et la prolifération cellulaire.

c. Invalidation de *Pten*

Même si le modèle *Pten*^{-/-} total est létal au stade embryonnaire, les souris *Pten*^{+/-} sont viables. Elles présentent au niveau prostatique, une augmentation de la prolifération épithéliale et des néoplasies de bas grade ce qui suggère que la perte d'un seul allèle est suffisante pour induire un développement tumoral mais pas pour la mise en place de métastases (Podsypanina et al., 1999; Di Cristofano et al., 2001) (Figure 12). Le modèle MPAKT (*Murine Prostate restricted AKT kinase transgenic mice*) surexprimant AKT sous contrôle d'un promoteur probasine a été généré pour déterminer l'impact d'une activation constitutive d'AKT sur la transformation des cellules épithéliales et la progression du cancer de la prostate (Majumder et al., 2003). Le phénotype histologique de ces souris est très proche des souris *Pten*^{+/-} totales confirmant bien que les effets dépendant de PTEN sont bien relayés par la kinase AKT.

Les souris PB-Cre4 x *Pten*^{loxp/loxp}

Le modèle *PB-Cre4* x *Pten*^{loxp/loxp} issu du croisement de souris *PB-Cre4* avec des souris *Pten*^{loxp/loxp} permet l'inactivation du gène *Pten* spécifiquement au niveau de la prostate. Ces souris *PB-Cre4* x *Pten*^{loxp/loxp} seront nommées *Pten*^{-/-} pour la suite du manuscrit. Cette perte d'expression n'est détectée qu'au niveau des cellules épithéliales prostatiques et entraîne une activation constitutive et permanente d'AKT et donc une stimulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Wang et al., 2003). Ces souris développent les différentes étapes du cancer humain à une cinétique connue c'est-à-dire de l'hyperplasie (4 semaines), de la néoplasie intra-épithéliale (6 semaines), du carcinome invasif (9 semaines) jusqu'aux métastases (entre 12 et 29 semaines) au niveau des ganglions lymphatiques et des poumons (Wang et al., 2003). Les androgènes ont un rôle prépondérant dans le développement et la fonction de la glande prostatique normale ainsi que dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. Les souris *Pten*^{-/-}, castrées à 16 semaines lorsqu'elles présentent un adénocarcinome invasif montrent entre 3 et 6 jours après castration une amélioration du phénotype prostatique (Wang et al., 2003). En effet, le volume des prostates est diminué et l'apoptose est augmentée. Cependant, après 6 jours, l'apoptose diminue à nouveau ce qui indique que les cellules tumorales s'adaptent aux conditions et augmentent leur survie. Cette situation mime la mise en place des CRPC chez l'Homme ce qui fait de ces souris un bon modèle d'étude des mécanismes mis en jeu dans la résistance aux traitements anti-hormonaux (Wang et al., 2003). Une étude récente a montré que les cellules tumorales des animaux *Pten*^{-/-} sont sensibles à la castration dès l'âge de 2 semaines mais qu'elles peuvent compenser la privation androgénique

et promouvoir la prolifération ce qui confirme les données de Wang et ses collaborateurs, montrant que la recombinaison Cre a été activée avant 2 semaines (Mulholland et al., 2011).

Dans les cellules non tumorales, le suppresseur de tumeur PTEN a un rôle antagoniste de la PI3K en déphosphorylant les produits lipidiques générés par l'activité PI3K (Vazquez and Sellers, 2000). Cependant dans les cellules tumorales, la baisse de l'activité PTEN entraîne une dérégulation de la voie PI3K avec une activation constitutive des cibles en aval telles que AKT. Après la phosphorylation au niveau des résidus thréonine 308 et sérine 473, AKT activée va promouvoir la survie et la croissance cellulaire. Une augmentation du marquage immunohistochimique d'AKT est détectée dans environ 53 % des carcinomes prostatiques primaires (Sun et al., 2001). De plus, le complexe mTORC2 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 2*) composé notamment de la protéine RICTOR est capable d'activer AKT en phosphorylant la sérine 473. Des croisements avec des souris *Pten*^{+/-} ; *Rictor*^{+/-} montrent ainsi une augmentation de la survie chez ces animaux par rapport aux *Pten*^{+/-} témoignant de l'importance de la présence de la protéine RICTOR et donc de l'activation d'AKT pour le développement tumoral prostatique induit par la perte de *Pten* chez la souris (Guertin et al., 2009).

L'onco-suppresseur NKX3.1 (que nous allons détailler par la suite) joue un rôle important dans l'initiation du cancer causée par la perte de *Pten* puisque la perte de ces deux gènes suppresseurs de tumeur entraîne une aggravation du phénotype prostatique (Kim et al., 2002b). Il a été montré que lorsque PTEN est présent, il stimule transcriptionnellement *Nkx3.1*. Or NKX3.1 va stabiliser la protéine p53 en recrutant HDAC1 qui maintient p53 dans un complexe avec MDM2 et ainsi une limitation de la prolifération (Lei et al., 2006).

D'autres modèles murins d'inactivation conditionnelle de *Pten* ont été mis au point. Les souris *Pten*^{loxP/loxP} ont été croisées avec des souris MMTV-Cre (*Mouse Mammary Tumor Virus-Cre*) (Backman et al., 2004). Ces souris développent des néoplasies intra-épithéliales de haut grade à partir de 2 semaines avec une augmentation de la prolifération et du nombre de cellules basales et lumbales. La différence avec le modèle *PB-Cre4* vient du fait que le promoteur probasine est régulé par les androgènes alors que la transcription du promoteur MMTV peut être induite par les glucocorticoïdes aussi bien que par les androgènes ce qui augmente donc le potentiel de recombinaison de ce promoteur (Cato et al., 1987). Les souris *PSA-Cre x Pten*^{loxP/loxP} montrent un développement tumoral progressif incluant une hyperplasie et une néoplasie intra-épithéliale de bas grade de 4 à 5 mois, une néoplasie de haut grade entre 7 et 9 mois et un carcinome invasif de 10 à 14 mois (Ma et al., 2005). Plus récemment, deux équipes ont

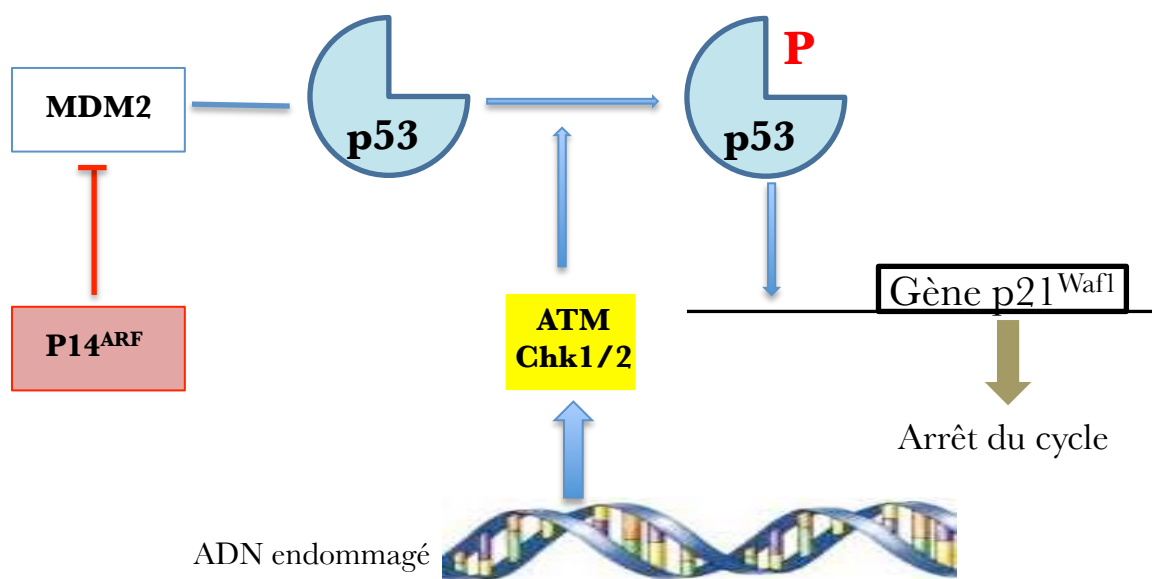


Figure 13 : Mécanisme d'activation de p53

En réponse aux dommages de l'ADN, la kinase ATM active p53 par phosphorylation ce qui stimule le gène p21^{Waf1} codant un inhibiteur du cycle cellulaire. p14^{ARF} peut quant à elle inhiber MDM2 qui participe à la dégradation de p53.

généralisé des modèles murins pour lesquels la délétion de *Pten* est contrôlée au niveau temporel grâce à l'utilisation de souris *Pten^{loxP/loxP}* croisées avec des souris contenant une Cre inducible au tamoxifène sous contrôle des promoteurs *Probasine* ou *PSA* (Luchman et al., 2008; Ratnacaram et al., 2008). De la même manière que les modèles détaillés précédemment, ces souris invalidées pour *Pten* présentent des lésions de type néoplasies intra-épithéliales progressant vers l'adénocarcinome invasif.

C Invalidation d'autres suppresseurs de tumeur

Plusieurs études menées sur des modèles de souris transgéniques montrent que des délétions monoalléliques ou bialléliques de suppresseurs de tumeur tels que *Nkx3.1*, *p27^{KIP1}* et *Tp53* coopèrent avec la perte de *PTEEN* pour favoriser le développement tumoral.

a. L'onco-suppresseur p53

La protéine p53 joue un rôle fondamental dans la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN et au stress oncogénique. Les dommages de l'ADN mobilisent la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et les kinases Chek1/2 (*Checkpoint kinase*) activant ainsi p53 par phosphorylation. Ceci entraîne la stimulation de p21^{Waf1} inhibant l'activité des complexes cyclines-CDK2 ou CDK4 stoppant ainsi la progression du cycle cellulaire. Une voie alternative est celle mettant en jeu de p14^{ARF} qui agit en bloquant MDM2 qui lui-même dégrade p53 (Figure 13) (Tao and Levine, 1999). La perte du chromosome 17p incluant le locus du gène *TP53* codant pour p53 est retrouvée dans les stades avancés et métastatiques de cancers de la prostate. De plus, des mutations perte de fonction de *TP53* sont détectées fréquemment lors de la progression tumorale et sont plus rares dans les stades précoces suggérant ainsi que la perte de fonction de p53 est un événement plutôt tardif de la carcinogenèse prostatique (Effert et al., 1993; Navone et al., 1993). Pour autant le gène *TP53* est retrouvé muté dans plus de 50 % des tumeurs démontrant ainsi qu'il occupe une place importante dans le développement de la maladie.

b. La protéine RB

La voie mettant en jeu la protéine RB a pour rôle la régulation de la progression des cellules de la phase G1 vers la phase S. La phosphorylation inactivatrice de RB (pRB) provoque la

prolifération cellulaire puisqu'elle libère le facteur de transcription E2F qui va activer la transcription des gènes codant les facteurs d'initiation de la réplication de l'ADN. L'inactivation de RB dans les cancers, qui est un événement fréquent, peut être due à une perte allélique, des mutations et une diminution de l'accumulation protéique (Tricoli et al., 1996; Gao et al., 1997; Latil et al., 1999; Hanahan and Weinberg, 2000).

c. L'onco-suppresseur à homéodomaine NKX3.1 (*NK homeobox 3.1*)

NKX3.1 est un gène à homéodomaine, spécifiquement exprimé dans la prostate. Son inactivation dans le cancer de la prostate est le résultat soit d'une délétion, soit de l'hyperméthylation de son promoteur (Asatiani et al., 2005). Le marquage immunohistochimique NKX3.1 est significativement diminué dans les lésions PIA et PIN par rapport à l'épithélium normal (Bethel et al., 2006). Dans les stades plus avancés de cancer, l'expression de *NKX3.1* est associée aux délétions 8p suggérant que les délétions génétiques seraient plus importantes dans la progression de la maladie alors que la diminution d'expression de NKX3.1 est plus importante pour les stades d'initiation. Des études récentes ont indiqué que les gènes à homéodomaine requis pour l'organogenèse de la prostate pourraient contribuer à la carcinogenèse. Ainsi, lorsque l'on surexprime le gène *NKX3.1* dans les lignées de cancer de la prostate humaine PC-3 et de rat AT6, une diminution de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale dans des souris nude xéno greffées est observée (Kim et al., 2002a). Les souris *Nkx3.1*^{-/-} possédant deux allèles mutants de ce gène ont été générées par recombinaison homologue et présentent au niveau prostatique une diminution du nombre de canaux montrant le rôle de Nkx3.1 dans la morphogenèse de branchement. De plus, une hyperplasie est constatée chez ces souris après 2 mois suivie d'une dysplasie après 10 mois (Schneider et al., 2000). Un phénotype similaire est observé dans les souris *PSA-CRE x Nkx3.1^{loxP/loxP}* où *Nkx3.1* est invalidé conditionnellement dans la prostate (Abdulkadir et al., 2002). Les données apportées par ces modèles ont permis de mettre en évidence le rôle de *Nkx3.1* comme gène suppresseur de tumeur dans la prostate dont la perte participe à l'initiation du développement tumoral.

d. L'inhibiteur du cycle p27^{KIP1}

Une des cibles de la voie PI3K, la protéine p27^{KIP1}, constitue un régulateur négatif clé de la transition G1/S. En effet, elle est inhibée transcriptionnellement quand la voie est activée

(Alkarain and Slingerland, 2004). Lorsque la prostate est normale le gène *CDKN1B* codant p27^{KIP1} et la protéine p27^{KIP1} sont abondamment retrouvés alors que durant le développement tumoral, les niveaux protéiques de p27^{KIP1} sont quasiment indétectables (Cordon-Cardo et al., 1998). Le modèle murin *Cdkn1b*^{-/-} a été développé pour mimer la perte d'accumulation de p27^{KIP1} qui, chez l'homme, est corrélée à un mauvais pronostic d'évolution du cancer de la prostate. Cependant, malgré une prolifération augmentée, ces souris présentent un phénotype ne progressant pas au-delà de l'hyperplasie ce qui montre que la perte de *Cdkn1b*, à elle seule, n'est pas suffisante pour induire un développement tumoral (Cordon-Cardo et al., 1998).

La protéine SKP2 se lie à p27^{KIP1} phosphorylée pour cibler sa poly-ubiquitinylation et donc sa dégradation (Shim et al., 2003). En effet, SKP2 est un membre de la famille des protéines F-box constituant une des quatre sous-unités du complexe protéique ubiquitine ligase SCF (*SKP-Cullin-F-box*) dont le rôle majeur est l'ubiquitinylation de protéines notamment impliquées dans le cycle cellulaire et destinées à la dégradation protéasomale.

Dans le modèle *ARR2PB-SKP2*, la protéine SKP2 est accumulée entraînant donc la dégradation de p27^{KIP1} ce qui provoque l'apparition de néoplasies intra-épithéliales de haut grade suggérant que SKP2 peut jouer un rôle plus important pour promouvoir les étapes précoces du cancer de la prostate à travers d'autres cibles impliquées dans la carcinogenèse que p27^{KIP1} (Shim et al., 2003).

D Modèles bigéniques

La carcinogenèse prostatique humaine n'est pas le résultat d'un seul évènement génétique. Elle met en jeu l'activation de plusieurs oncogènes et la perte de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur. Afin de mimer au mieux la pathologie humaine, des modèles murins bigéniques ont été développés.

NKX3.1 et *CDKN1B* sont des gènes suppresseurs de tumeur haploinsuffisants et la perte d'un seul allèle n'est pas suffisante pour induire le développement d'hyperplasie et de néoplasies intra-épithéliales (Di Cristofano et al., 2001; Abdulkadir et al., 2002; Kim et al., 2002a, 2002b; Abate-Shen et al., 2003; Gao et al., 2004; Gary et al., 2004). En revanche, la perte d'un ou deux allèles de *NKX3.1* ou *CDKN1B* combinée avec la perte de *Pten* permet une activation de manière synergique de la voie PI3K/AKT ainsi que la formation de HGPIN et donc de la tumorigenèse prostatique.

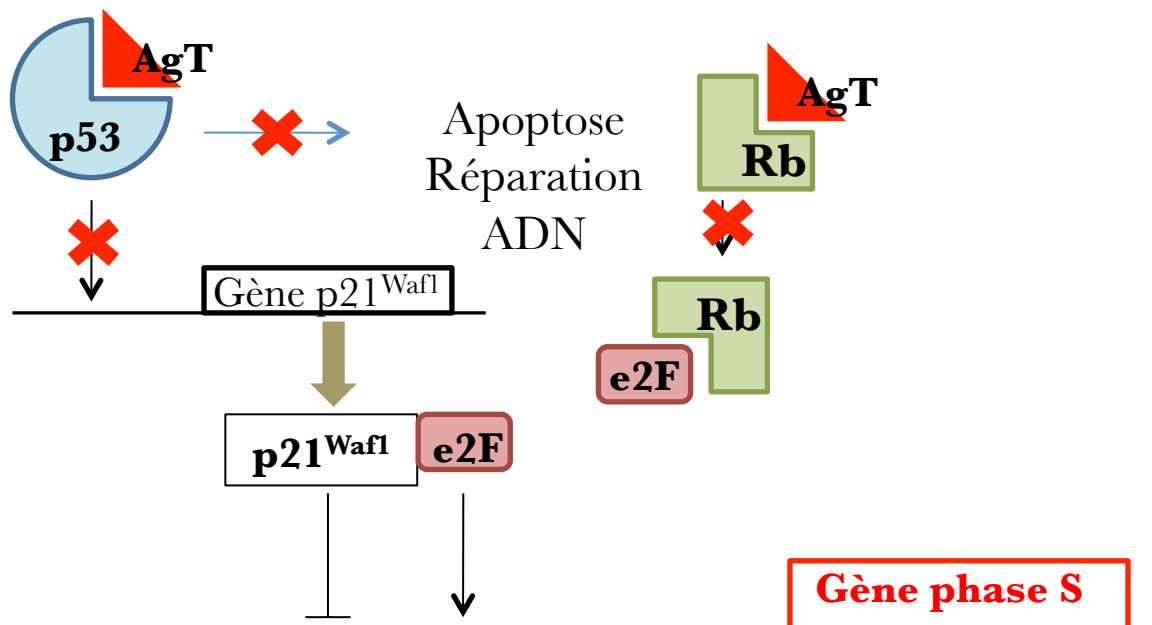


Figure 14 : Mécanisme d'action de l'antigène grand T

L'antigène grand T (AgT) séquestre les protéines p53 et Rb ce qui conduit à une activation du cycle cellulaire, en diminuant l'effet de p21^{Waf1} et en augmentant l'activité de e2F.

De la même manière, les études concernant l'ablation d'un ou deux allèles de *Tp53* et/ou *Pten* au niveau de la prostate ont montré que les souris *Tp53*^{+/-} ou *Tp53*^{-/-} ne développent pas de néoplasie alors que 50 % des *Pten*^{-/-}; *Tp53*^{-/-} développent un carcinome invasif à 10 semaines devenant léthal à 7 mois (Chen et al., 2005).

Il est intéressant de noter qu'une inactivation homozygote spécifique au niveau de la prostate de *RB* ou *Tp53* ne provoque pas plus que de la néoplasie alors que les souris *Tp53*^{-/-}; *Rb*^{-/-} développent des tumeurs évoluant rapidement pouvant métastaser au niveau des ganglions lymphatiques, poumons, foie et glandes surrénales (Zhou et al., 2006).

E Les modèles murins utilisant le SV40

Un lien direct entre le *Simian Virus 40* (SV40) et le cancer de la prostate n'a jamais été montré. Cependant, des particules de SV40 auraient pu être introduites dans la population humaine par une contamination du vaccin contre la poliomyélite entre 1955 et 1963 (Barbanti-Brodano et al., 2004). Parmi les protéines produites par le SV40, les plus étudiées sont l'antigène grand T et petit t. La fonction principale de l'antigène T est de séquestrer p53 et RB ce qui va entraîner une stimulation du cycle cellulaire et promouvoir l'immortalisation et la transformation des cellules (Figure 14) (DeCaprio et al., 1988; Pipas and Levine, 2001; Asamoto et al., 2002). L'antigène t n'induit pas la transformation à proprement parler mais stimule des signaux la facilitant tels que l'inhibition de la sérine-thréonine phosphatase PP2A (*Protein Phosphatase 2 Alpha*) permettant d'une part, l'activation constitutive de la voie Wnt (*Wingless iNTegration site*) et donc la prolifération cellulaire et d'autre part, une perte de polarité des cellules augmentant ainsi leur capacité d'invasion (Asamoto et al., 2002).

a. Le modèle LADY (*Large T Transgenic Mouse Model*)

Ce modèle est basé sur l'utilisation de l'antigène T sous contrôle du promoteur long de la probasine (Kasper et al., 1998; Masumori et al., 2001). Plusieurs lignées ont été obtenues. La lignée 12T-7f présente plusieurs lésions contenant des clusters de cellules allongées à noyaux hypercondensés intercalées entre des cellules épithéliales normales. Entre 8 et 9 semaines, la totalité de l'épithélium glandulaire exprime le transgène ce qui stimule une progression des lésions vers des altérations proches des LGPIN jusqu'aux hauts grades. Les études de castration et à l'inverse de traitement androgénique ont montré que ces tumeurs restent androgéno-dépendantes (Kasper et al., 1998). La lignée 12T-10 progresse jusqu'aux

métastases au niveau des ganglions lymphatiques, du foie, des poumons, de la rate, des reins et occasionnellement des os (Masumori et al., 2001). Ces métastases sont détectées chez 40 % des animaux âgés de 6 mois et se généralisent chez 88 % des animaux de 9 à 12 mois au niveau des ganglions lymphatiques, du foie et des poumons.

Ces animaux sont des phénotypes des animaux *Tp53*^{-/-}; *Rb*^{-/-} démontrant *in vivo* que l'effet de l'antigène grand T est lié à l'inhibition de l'action de ces deux acteurs.

b. Le modèle TRAMP (*TRansgenic Adenocarcinome of the Mouse Prostate*)

Ce modèle associe les antigènes T et t du virus SV40 au promoteur de la probasine (-426/+28) de rat pour cibler l'expression du transgène dans l'épithélium prostatique (Greenberg et al., 1995). Les animaux présentent dès 8 à 12 semaines des lésions de type néoplasies intra-épithéliales (PIN) de bas à haut grade, puis à partir de 12 semaines, un carcinome invasif. 100 % des animaux ont des métastases pulmonaires ou ganglionnaires après 28 semaines (Greenberg et al., 1995; Gingrich et al., 1997). Des métastases au niveau des ganglions lymphatiques, des poumons, des os et des reins ressemblent à celles retrouvées chez l'Homme (Jeet et al., 2010). De manière intéressante, ce modèle présente de fortes similarités histologiques et moléculaires avec les étapes initiatrices du cancer humain (Klein, 2005). De plus, une perte d'hétérozygotie de *Pten* dans les souris TRAMP diminue significativement l'espérance de vie des souris démontrant que l'implication de *Pten* dans la carcinogenèse prostatique dépend d'autres acteurs que p53 et Rb (Greenberg et al., 1995).

F Modèles murins mettant en jeu des oncogènes

L'altération de différents oncogènes comme les éléments de la signalisation des facteurs de croissance erbB2 et des effecteurs en aval comme PI3K/AKT, RAS, MYC est fréquemment associée au cancer de la prostate.

ErbB2 (encore appelé HER-2/Neu), membre de la famille d'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), est un marqueur candidat du diagnostic précoce du cancer de la prostate puisque son amplification et sa surexpression sont détectées dans les tumeurs prostatiques humaines corrélant avec un grade élevé de tumeur et la présence de métastases (Kuhn et al., 1993; Ross et al., 1993; Ow et al., 1995). Les souris *PB-erbB2* développent des lésions prostatiques de type PIN à 12 mois pouvant dans 50 % des cas évoluer en néoplasies de haut grade mais ne progressant pas jusqu'à l'adénocarcinome à 18 mois (Casimiro et al., 2007). De plus, lorsque

Modèle murin	Phénotype prostatique
<i>Tp53</i> ^{-/-}	Pas de phénotype
<i>pRb</i> ^{-/-}	Pas de phénotype
<i>Pten</i> ^{+/-}	Dysplasie
<i>Cdkn1b</i> ^{-/-}	Légère hyperplasie
<i>Nkx3.1</i> ^{-/-}	Hyperplasie et dysplasie
<i>PSA.Cre;NKX3.1loxP/loxP</i>	Hyperplasie et dysplasie
<i>TMPRSS2-ERG</i>	PIN
<i>PB-Hras</i>	LGPIN
<i>MAKT</i>	LGPIN
<i>Pten</i> ^{+/-} ; <i>Erg</i> ⁺	HGPIN et carcinome
<i>ARR2PB-SKP2</i>	LGPIN et HGPIN
<i>MMTV-Cre;PtenloxP/loxP</i>	HGPIN et carcinome invasif
<i>Pten</i> ^{+/-} ; <i>Cdkn1b</i> ^{-/-}	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>Pten</i> ^{+/-} ; <i>NKX3.1</i> ^{-/-}	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>PB-erbB2</i>	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>LADY 12T7</i>	LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>ARR2PB-myc-PAI</i>	HGPIN et carcinome invasif
<i>LADY 12T10</i>	LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>Pten</i> ^{-/-} ; <i>Tp53</i> ^{-/-}	Carcinome invasif léthal
<i>PSA-Cre;PtenloxP/loxP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN et carcinome invasif
<i>PB-Cre4;PtenloxP/loxP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>Pten</i> ^{+/-} ; <i>TRAMP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase
<i>Tp53</i> ^{-/-} ; <i>Rb</i> ^{-/-}	Carcinome invasif et métastase
<i>TRAMP</i>	Hyperplasie, LGPIN, HGPIN, carcinome invasif et métastase

Figure 15 : Tableau récapitulatif des modèles murins de cancer de la prostate.

LGPIN (*Low Grade Prostatic Intra-epithelial Neoplasia*) et HGPIN (*High Grade Prostatic Intra-epithelial Neoplasia*) correspondent respectivement aux étapes de néoplasie intra-épithéliale de bas et de haut grade.

ces souris *PB-erbB2* présentent la perte d'un allèle *Pten*, on constate la formation d'un adénocarcinome prostatique à 8 mois dans 15 % des cas. Cette accélération est due à une activation de la voie PI3K et notamment *via* mTOR/p70S6K ainsi qu'à une augmentation d'expression des gènes *Cyclin D1* et *PCNA* (Rodriguez et al., 2009).

L'oncogène *c-Myc* est un facteur de transcription appartenant à la famille des bHLHZ (*basic Helix-Loop-Helix-leucine Zipper*), capable de contrôler la transcription lorsqu'il se dimérise avec d'autres membres de cette famille. Il induit la prolifération et est considéré comme un acteur des processus de carcinogenèse (Nasi et al., 2001). L'expression de *c-Myc* est élevée dans les échantillons issus de biopsies d'adénocarcinome et a été étudiée pour déterminer son rôle dans la progression tumorale (Fleming et al., 1986). La surexpression de *c-Myc* dans un modèle murin sous contrôle du promoteur de la probasine (*ARR2PB-myc-PAI*) entraîne la formation de néoplasies intra-épithéliales de haut grade évoluant en carcinome invasif entre 3 et 6 mois démontrant ainsi son rôle oncogénique (Ellwood-Yen et al., 2003).

Dans 5 à 30 % des cas de cancer de la prostate, des mutations sont détectées au niveau des membres de la familles des oncogènes RAS (*RAt Sarcoma*) qui sont des petites protéines G impliquées dans la prolifération cellulaire (Jeet et al., 2010). L'expression ciblée de la forme activée d'un de ces membres, *H-ras* (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), sous contrôle du promoteur minimal de la probasine du rat provoque la formation de néoplasies de bas grade (Scherl et al., 2004).

G Modèles transgéniques basés sur les fusions de gènes

Des souris transgéniques exprimant la fusion entre le gène androgéno-régulé *TMPRSS2* et le gène *ERG* ont été développées (détaillées dans le Chapitre III-1. B). Malgré l'apparition de néoplasies intra-épithéliales entre 12 et 14 semaines, aucune progression n'est observée suggérant ainsi que les fusions géniques *TMPRSS2-ERG* seules ne suffisent pas pour induire un carcinome (Tomlins et al., 2008). De manière intéressante, les cas de cancer de la prostate présentant un réarrangement *TMPRSS2-ERG* sont associés à la perte de *PTEN*. La surexpression transgénique de *ERG* dans le tissu prostatique de souris montre ainsi une accélération de la progression des néoplasies intra-épithéliales de haut grade vers l'adénocarcinome dès 6 mois en contexte d'hétérozygotie de *Pten* (Carver et al., 2009). Ces données impliquent que, lorsque *Pten* est haplo-insuffisant, il coopère avec l'expression aberrante d'*ERG* pour accélérer l'initiation et la progression vers l'adénocarcinome prostatique.

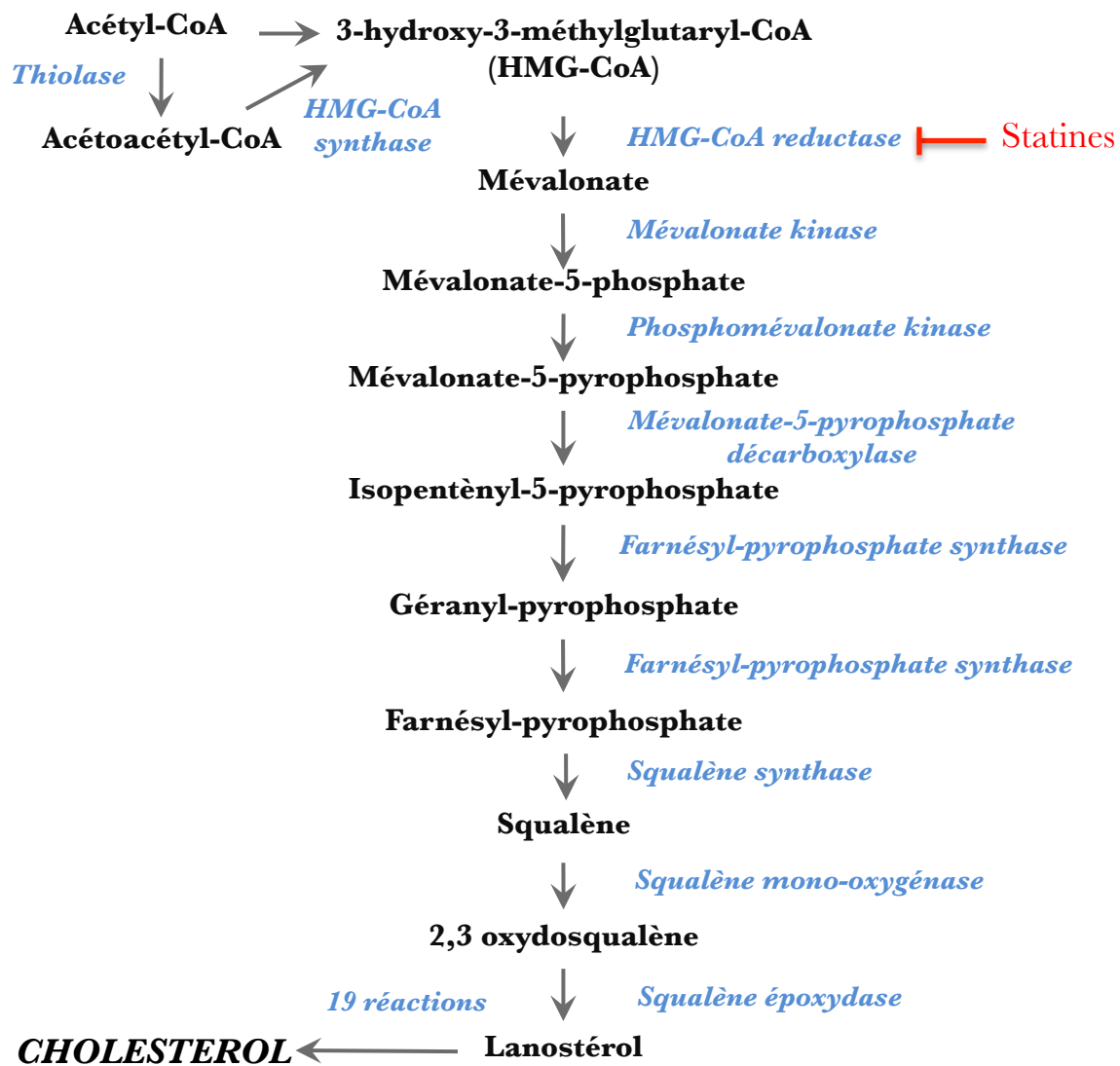


Figure 16 : Synthèse *de novo* du cholestérol.

Représentation des différentes réactions de la voie du mévalonate avec les enzymes impliquées (en bleues). Les statines inhibent la réaction enzymatique effectuée par l'HMGCoA-reductase.

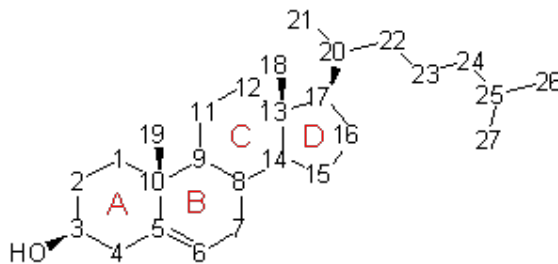


Figure 17 : Structure du cholestérol.

Représentation de la structure du cholestérol avec la numérotation des atomes de carbones et les noyaux cyclo-pentano-phénanthrénique (noté A, B, C et D).

Le phénotype prostatique de l'ensemble des modèles murins décrits précédemment est présenté dans la Figure 15.

IV. Le cholestérol et le cancer de la prostate

1. Homéostasie et Métabolisme du cholestérol

A Synthèse *de novo*

Chez les mammifères, le cholestérol amené aux cellules provient d'une part de l'alimentation et d'autre part de la synthèse *de novo*. La quantité de cholestérol alimentaire étant limitée, le reste du cholestérol nécessaire pour le bon fonctionnement des cellules est apporté majoritairement par la synthèse *de novo*. Quasiment toutes les cellules de l'organisme disposent de la machinerie nécessaire à la synthèse de cholestérol (Dietschy et al., 1993).

Le cholestérol est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et du cytoplasme à partir de l'acétyl-CoA par la voie du mévalonate (Bloch, 1965; Goldstein and Brown, 1990) (Figure 16). Dix-huit unités d'acétyl-CoA contenant trente-six carbones sont utilisées pour synthétiser une molécule de cholestérol contenant vingt-sept atomes de carbones, quarante-six atomes d'hydrogènes et un atome d'oxygène (Figure 17). L'enzyme limitante de cette voie est l'HMG-CoA Reductase qui catalyse la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate (Rodwell et al., 1976). C'est cette étape qui est ciblée par les médicaments hypocholestérolémiants comme les statines (Jasińska et al., 2007). Plus récemment, la squalène mono-oxygénase, qui catalyse les premières étapes d'oxygénation de la synthèse de cholestérol, a été suggérée comme un second point de contrôle (Gill et al., 2011).

Dans les premières étapes de la synthèse de cholestérol, le squalène est converti en lanostérol à partir duquel le cholestérol va être obtenu en 19 étapes impliquant neuf enzymes différentes. Les dernières étapes se divisent en deux voies pouvant utiliser le lathostérol et le 7-déhydrocholestérol (voie Kandutsch-Russell) ou le desmostérol (voie Bloch) (Kandutsch and Russell, 1960; Bloch, 1992). Ces voies partagent les mêmes étapes enzymatiques mais diffèrent au stade où la liaison C-24 est réduite.

Lorsque la synthèse est réalisée, le cholestérol ainsi que certains précurseurs comme le lathostérol et le desmostérol quittent le RE. Le cholestérol est alors ciblé à la membrane plasmique par des mécanismes non-vésiculaires *via* des protéines de transfert de lipides dans le

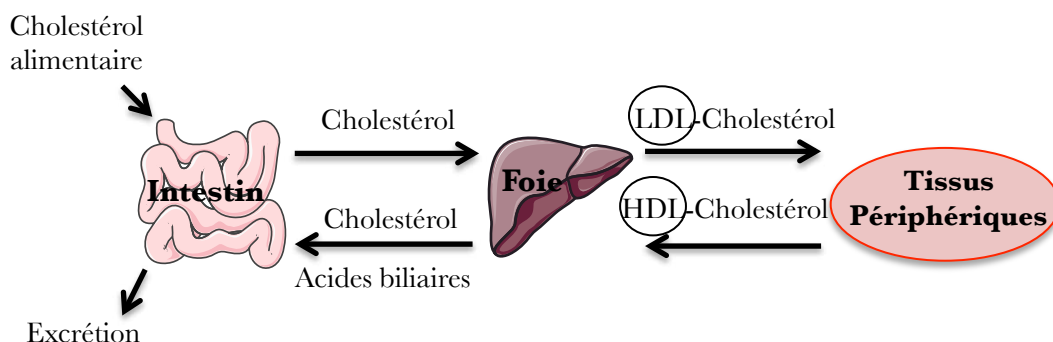
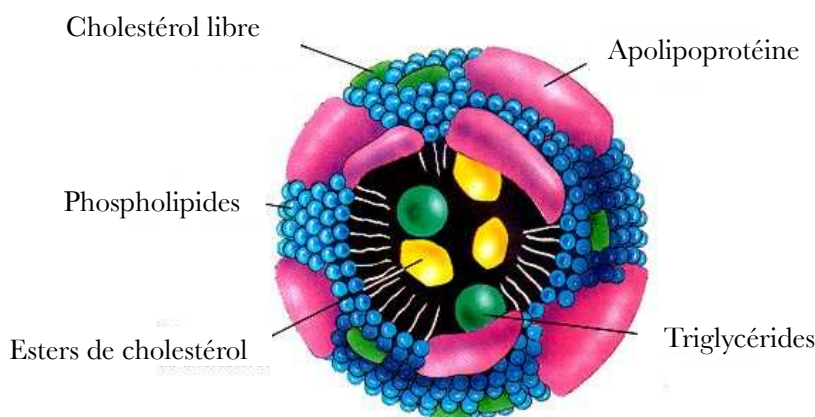


Figure 18 : Représentation simplifiée de la circulation du cholestérol dans l'organisme.

Le cholestérol provenant de l'alimentation est absorbé au niveau de l'intestin, exporté vers le foie qui le redistribue aux tissus périphériques dans les lipoprotéines de faible densité (LDL). Le transport inverse correspond à l'élimination du cholestérol des tissus périphériques vers le foie dans les lipoprotéines de haute densité (HDL) puis le foie le convertit en acides biliaires déversés au niveau de l'intestin pour leur excrétion.

A)



B)

	Fraction lipidique (% du poids)					Apolipoprotéines majeures
	Densité	TG	C	EC	PL	
Chylomicrons	< 0,94	86-94	0,5-1	1-3	3-8	A1, A2, A4, B48
VLDL	0,94-1,006	55-65	6-8	12-14	12-18	B100, C1, C2, C3
LDL	1,006-1,063	8-12	5-10	33-40	20-25	B100
HDL	1,063-1,210	3-6	3-5	14-18	20-30	A1, A2, C1, C2, C3

Figure 19 : Structure et composition des lipoprotéines.

A) Représentation schématique d'une lipoprotéine et de ses composants. **B)** Tableau indiquant la densité des principales lipoprotéines: VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Protein*) et HDL (*High Density Lipoprotein*). Les proportions relatives en triglycérides (TG), cholestérol (C), esters de cholestérol (EC) et phospholipides (PL) ainsi que les apolipoprotéines majeures qui les composent sont indiquées.

cytosol ce qui le rend disponible aux accepteurs extra-cellulaires. Cependant, le cholestérol peut accéder à d'autres sites comme les endosomes (Baumann et al., 2005). Pour empêcher une accumulation plasmatique et membranaire de cholestérol libre, ce dernier est converti en esters de cholestérol (EC) par l'enzyme acyl-CoA acyl-transférase 1 et 2 (ACAT) (Chang et al., 1997). Les esters de cholestérol sont stockés dans des gouttelles lipidiques cytoplasmiques et peuvent être libérés par l'enzyme CEH (*Cholesterol Ester Hydrolase*). Ce cycle cholestérol estérifié/libre est rapide et permet au cholestérol libre d'être amené à d'autres compartiments intra-cellulaires (Brown and Goldstein, 1980).

B Influx du cholestérol

Le cholestérol alimentaire est transporté dans un premier temps de l'intestin grêle vers le foie qui va ensuite le redistribuer vers les autres organes (Figure 18). Pour les longues distances, les entérocytes et hépatocytes emballent le cholestérol et les esters de cholestérol dans des lipoprotéines, particules sphériques complexes classées en fonction de leur taille et de leur composition (Figure 19) (Grundy, 1983). Ces lipoprotéines sont constituées d'un cœur apolaire de triglycérides et d'esters de cholestérol, entouré par une couche de cholestérol, de phospholipides et d'apoprotéines jouant un rôle structural et métabolique important. Le cholestérol alimentaire est absorbé par les entérocytes de l'intestin grêle où il sera regroupé avec les triglycérides dans des lipoprotéines appelées chylomicrons. Ces chylomicrons rejoignent ensuite la circulation lymphatique intestinale puis la circulation sanguine. Les protéines ApoC-II qu'ils contiennent permettent leur reconnaissance par la LPL (*LipoProtein Lipase*) qui va hydrolyser les triglycérides. Les acides gras libérés gagnent d'une part, les tissus sous-jacents et d'autre part, des structures de type HDL (*High Density Lipoprotein*) naissantes ou encore nommées pré- β -HDL composées de phospholipides, cholestérol et apolipoprotéines comme ApoC et ApoA. Le reste des chylomicrons (*remnants*) enrichis en ApoB48 et E, cholestérol et reste de triglycérides, est pris en charge par les hépatocytes *via* leur récepteur aux ApoE. En retour, ces hépatocytes sont le siège de la synthèse des VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), particules de transport des triglycérides et des esters de cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Ces VLDL sont dégradées au niveau plasmatique par un mécanisme semblable aux chylomicrons puisque la lipoprotéine lipase (LPL) reconnaît les ApoC-II, hydrolyse les triglycérides ce qui provoque un départ des ApoC. Des structures enrichies en Apo-B100 et E se forment avec les esters de cholestérol et des triglycérides restants. Il s'agit des IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*) ou β -VLDL hépatiques pouvant être dégradées soit

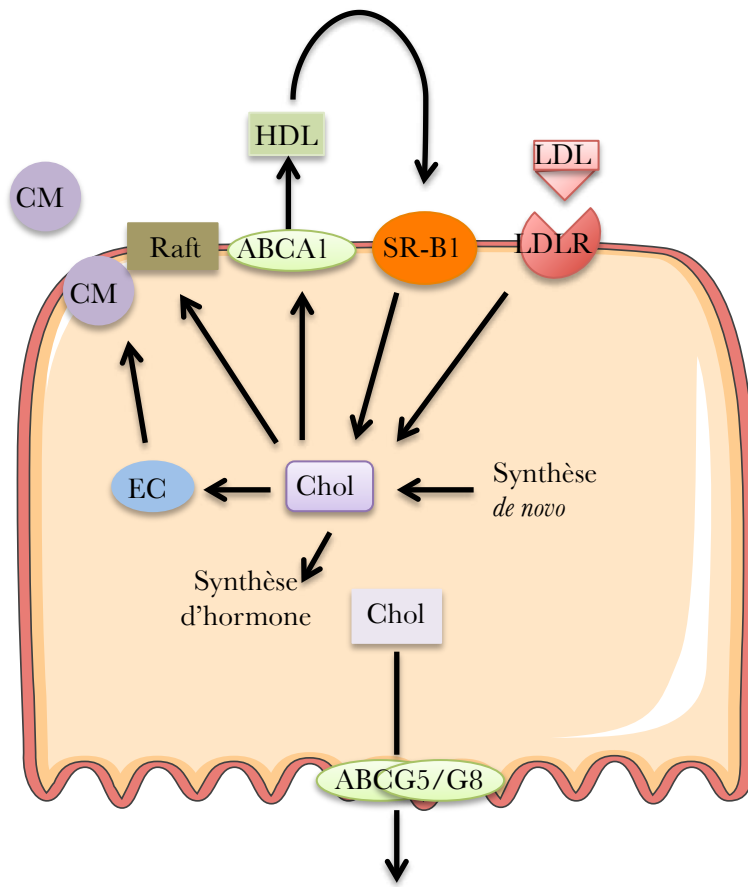


Figure 20 : Internalisation et devenir du cholestérol dans une cellule. Les LDL (*Low Density Lipoprotein*) sont reconnues par leur récepteur LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*) puis internalisées dans la cellule par endocytose. Dans les lysosomes, les LDL sont dégradées pour libérer le cholestérol libre (Chol) qui peut être stocké sous forme d'esters de cholestérol (EC) transportés dans les chylomicrons (CM) rejoignant la circulation lymphatique. Le cholestérol libre peut rigidifier la membrane plasmique et les *rafts*. Il peut également être utilisé pour la synthèse d'hormones ou être redirigé vers le foie sous forme de HDL (*High Density Lipoprotein*) après export vers le milieu extracellulaire par les cassettes d'efflux ABC.

dans le foie après internalisation *via* la reconnaissance par les récepteurs B/E ou LDLR (*Low Density Lipoprotein Receptor*), soit dans la circulation *via* la lipase hépatique ce qui permet la transformation des IDL en LDL (*Low Density Lipoprotein*). Ces LDL représentent la part de lipoprotéine la plus importante apportant le cholestérol aux tissus périphériques. Le captage des LDL se fait par une voie classique d'endocytose au niveau du récepteur aux LDL (LDLR) par reconnaissance d'ApoB100 (Brown and Goldstein, 1976) (Figure 20). L'ensemble LDL/LDLR est internalisé par endocytose *via* des vésicules contenant de la clathrine et transporté aux compartiments acides où les esters de cholestérol sont hydrolysés par la lipase acide (Brown and Goldstein, 1986). Le LDLR se dissocie des LDL au niveau de l'endosome précoce en raison du pH plus faible, et est recyclé au niveau de la membrane plasmique par des mécanismes vésiculaires qui dépendent des petites protéines G telles que Rab8 et Rab11 (Hölttä-Vuori et al., 2002; Linder et al., 2007). Le contenu non-recyclé de l'endosome précoce, c'est-à-dire le cholestérol, est ensuite pris en charge par l'endosome tardif puis redirigé vers d'autres membranes plasmiques, le RE et la mitochondrie. Deux protéines NPC1 et 2 (*Niemann-Pick Type C*) ont un rôle dans l'exclusion du cholestérol de l'endosome tardif. NPC2, protéine soluble de petite taille accepte le cholestérol au niveau de la lumière de l'endosome tardif et le dirige vers NPC1, protéine membranaire qui aide à son transfert hors de l'endosome (Wang et al., 2010a). Des mécanismes vésiculaires peuvent également sortir le cholestérol de l'endosome mettant en jeu Rab7 et Rab9 (Lebrand et al., 2002; Ganley and Pfeffer, 2006).

C Transport intra-cellulaire

Le cholestérol est transporté dans la cellule par des mouvements membranaires mettant en jeu des transports vésiculaires ou non (Maxfield and Wüstner, 2002). Du fait de l'insolubilité du cholestérol, le transport non-vésiculaire est médié par des transporteurs diffusibles avec des cavités hydrophobes pour lier et protéger le cholestérol du cytosol. Le cholestérol peut également diffuser d'une membrane à une autre (Soccio and Breslow, 2004). Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport du cholestérol au sein de la cellule : la SCP-2 (*Sterol Carrier Protein 2*), la cavéoline, les ORP (*Oxysterol-binding protein-Related Proteins*) et les START (*STeroidogenic Acute Regulatory protein-related lipid Transport*) (Soccio and Breslow, 2003).

SCP-2 est une petite protéine soluble de transfert lipidique capable de transporter les stérols ainsi que d'autres lipides entre les membranes *in vitro* (Gallegos et al., 2001). Plusieurs études

montrent que la modulation de cette protéine entraîne des désordres dans les mouvements de cholestérol soulignant donc son importance (Prinz, 2007).

Les cavéolines sont des protéines membranaires s'associant avec le cholestérol et les sphingolipides et créant une invagination interne de la membrane. Les cavéolines formeraient des complexes de chaperonnes avec le cholestérol et ces particules lipidiques permettraient le transport du cholestérol dans la cellule (Uittenbogaard et al., 1998).

Les membres de la famille des ORP ont été initialement identifiés comme récepteurs du 25-hydroxycholestérol et participant à la prise en charge du cholestérol dans l'endosome (Kandutsch and Shown, 1981; Wang et al., 2002). ORP9 se lie au cholestérol et le transporte entre les membranes et pourrait jouer un rôle dans le transport du cholestérol entre le RE et l'appareil de Golgi (Ngo and Ridgway, 2009). ORP-4S s'associe avec les filaments intermédiaires et sa surexpression diminue l'estérification du cholestérol issu des LDL (Wang et al., 2002). ORP-1L est localisé au niveau de la surface de l'endosome tardif et stimule l'activité d'un rapporteur LXR (*Liver X Receptor*) quand il est surexprimé (Johansson et al., 2003). Plus récemment, il a été montré que ORP5 joue un rôle dans le transport non-vésiculaire depuis l'endosome tardif jusqu'au réticulum endoplasmique (Du et al., 2011).

La famille des protéines contenant des domaines START peut lier les lipides et jouer un rôle important dans les mouvements intra-cellulaires. Elles sont localisées dans le cytoplasme ou ancrées dans la membrane ou encore dans le noyau (Ponting and Aravind, 1999). StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory*) appartient à cette famille et est requis pour le transfert du cholestérol de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie (Bose et al., 2002). D'autres protéines à domaines START joueraient un rôle dans le transport intra-cellulaire du cholestérol mais leur rôle exact reste à déterminer (Stocco, 2001).

D Efflux du cholestérol

Éliminer le cholestérol est impératif pour le contrôle de son homéostasie et permet d'éviter une accumulation excessive de cholestérol dans les cellules. Puisque les cellules ne sont pas capables de métaboliser le cholestérol, les excès doivent être enlevés et transportés au niveau du foie pour être réutilisés et excrétés. Ce mécanisme est nommé transport inverse du cholestérol (Glomset, 1973). Les HDL sont les accepteurs majeurs du cholestérol extracellulaire provenant des tissus extra-hépatiques et sont inversement corrélés avec le risque de maladie cardiovasculaire athérosclérotique (Cuchel and Rader, 2006). Elles sont de forme discoïdale composée de phospholipides, de cholestérol et d'apolipoprotéines variables. Ainsi,

le foie sécrète des HDL constituées d'ApoE alors que dans la circulation les HDL produites à partir de la dégradation des chylomicrons et VLDL contiennent ApoA-I et ApoC (Figure 19). L'excès cellulaire de cholestérol est éliminé par des mécanismes de diffusion ou d'inclusion dans les apolipoprotéines (Oram and Yokoyama, 1996; Yokoyama, 1998, 2000).

Lors de la diffusion passive, l'élimination de cholestérol est médiée par l'échange de cholestérol entre la membrane cellulaire et l'HDL (Figure 20). Plusieurs facteurs semblent impliqués dans ce processus tels que les compartiments membranaires enrichis en cholestérol et la structure des HDL. L'enzyme LCAT (*Lecithin-Cholesterol AcylTransferase*) participe également à ce processus (Yokoyama, 2000). La LCAT est retrouvée à la surface des lipoprotéines (HDL) et convertit le cholestérol libre en esters en transférant des acides gras de la phosphatidylcholine au cholestérol non estérifié (Jonas, 2000). Les esters de cholestérol sont alors séquestrés au sein des lipoprotéines et transportés au foie et aux tissus stéroïdogéniques où ils sont sélectivement importés par le SR-B1 (*Scavenger Receptor Class B type I*) (Ji et al., 1997). Cependant, le rôle de la LCAT est controversé puisque d'une part, la surexpression de la LCAT chez la souris n'entraîne pas d'augmentation du transport reverse et d'autre part, le transport reverse est maintenu en cas de perte de la LCAT (Calabresi et al., 2009; Tanigawa et al., 2009). Une grande quantité d'esters de cholestérol qui sont formés dans les HDL est également transférée aux TRL (*Triglyceride Rich Lipoprotein*) par la CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*). Les restes de cette protéine sont convertis en LDL et sont éliminés par la voie du LDLR ou directement au niveau du foie où ils seront excrétés dans la bile (Linsel-Nitschke and Tall, 2005). Au niveau hépatique, les deux transporteurs, ABCG5 et ABCG8 appartenant à la sous-famille G des *ATP-Binding Cassettes* fonctionnent en hétérodimères pour permettre l'excrétion du cholestérol dans la bile (Figure 20).

Un autre mécanisme pour éliminer le cholestérol est médié en grande partie par ApoA-I, composé majeur des HDL qui permet la formation des HDL avec les phospholipides et le cholestérol (Yokoyama, 2006). ABCA1 est à l'origine de la formation des HDL et correspond à la première étape du transport inverse du cholestérol (Tall et al., 2008). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'efflux de cholestérol médié par ABCA1. D'une part, plusieurs études ont suggéré un rôle des endosomes tardifs et des lysosomes dans l'efflux médié par ABCA1 mais le mécanisme n'est pas encore élucidé (Haidar et al., 2006). D'autre part, ApoA-I forme des complexes avec les phospholipides et le cholestérol au niveau de la membrane plasmique ce qui est également médié par ABCA1 (Vaughan and Oram, 2003; Vedhachalam et al., 2007; Nandi et al., 2009). Une petite quantité d'ApoA-I se lie à ABCA1 ce qui augmente la translocation des phospholipides et donc la tension au sein de la

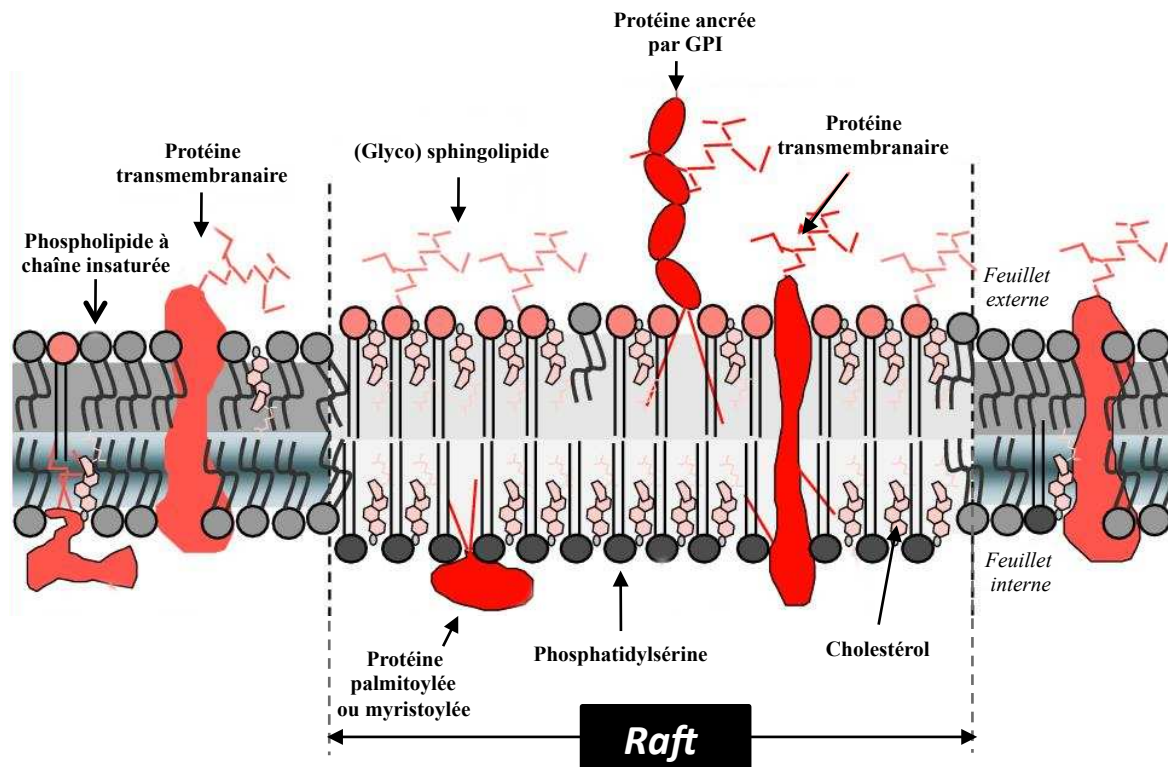


Figure 21 : Représentation schématique d'un raft lipidique au niveau de la membrane plasmique.

Schéma de l'organisation d'un radeau (*raft*) lipidique caractérisé par sa richesse en (glyco)sphingolipides et cholestérol où sont associées certaines protéines de surface.

<http://www.jle.com>

membrane (Vedhachalam et al., 2007). Cette tension est évacuée grâce au repliement et à la création de domaines lipidiques exo-vesiculés qui vont promouvoir la liaison d'ApoA-I. En plus de ApoA-I, ce mode de transport lipidique concerne une grande variété d'apolipoprotéines, ApoA-II, ApoE, ApoC et ApoA-IV (Remaley et al., 2001). Alors qu'ABCA1 est le facteur prédominant pour l'efflux de cholestérol vers ApoA-I et la formation des pre- β -HDL, d'autres facteurs tels que la LCAT et les transporteurs ABCG1 et ABCG4 sont nécessaires pour la maturation des HDL (Van der Velde, 2010). Après la formation des pre- β -HDL, ils doivent recevoir des lipides. Il a été montré que les hétérodimères ABCA1/ABCG1 et ABCG1/ABCG4 vont médier de manière synergique l'efflux de cholestérol vers les HDL (Gelissen et al., 2006; Vaughan and Oram, 2006).

E Fonctions cellulaires du cholestérol

Composant majeur des membranes cellulaires, le cholestérol s'intercale entre les phospholipides et permet de diminuer la perméabilité membranaire envers les molécules hydrosolubles. De plus, les radeaux lipidiques (*rafts*) ou encore nommés DRM (*Detergent-Resistant Membrane domain*) ou DIG (*Detergent-Insoluble Glycolipidenriched complexes*) sont des microdomaines enrichis en cholestérol et sphingolipides (Hooper, 1999; Freeman and Solomon, 2004) (Figure 21). Lorsque plusieurs *rafts* se regroupent pour former des domaines plus étendus, on parle de coalescence de *rafts*. Ce mécanisme témoigne du rôle des domaines lipidiques dans la transduction des signaux intra-cellulaires. AKT peut être phosphorylée et donc activée au niveau de ces domaines pour stimuler les processus de survie et de croissance cellulaire témoignant de leur intérêt dans un contexte tumoral. Nous aborderons le lien entre *rafts* et cancer dans le paragraphe 3C. En outre, le cholestérol synthétisé *de novo* ainsi que ses précurseurs sont impliqués dans de nombreuses voies cellulaires ou développementales. Les isoprénoïdes et les stérols intermédiaires post-squalènes sont des molécules précurseurs notamment pour le dolichol, le coenzyme Q, l'isopentenyl-tRNA et l'hème *a*. Enfin, le cholestérol sert de précurseur pour des métabolites tels que les acides biliaires, les stéroïdes et les vitamines liposolubles (Goedeke and Fernández-Hernando, 2012).

2. Régulation de l'homéostasie du cholestérol

Elle repose à la fois sur la gestion de la synthèse *de novo*, l'influx, le stockage et l'élimination du cholestérol. La voie SREBP-2 permet d'une part d'augmenter les quantités de cholestérol

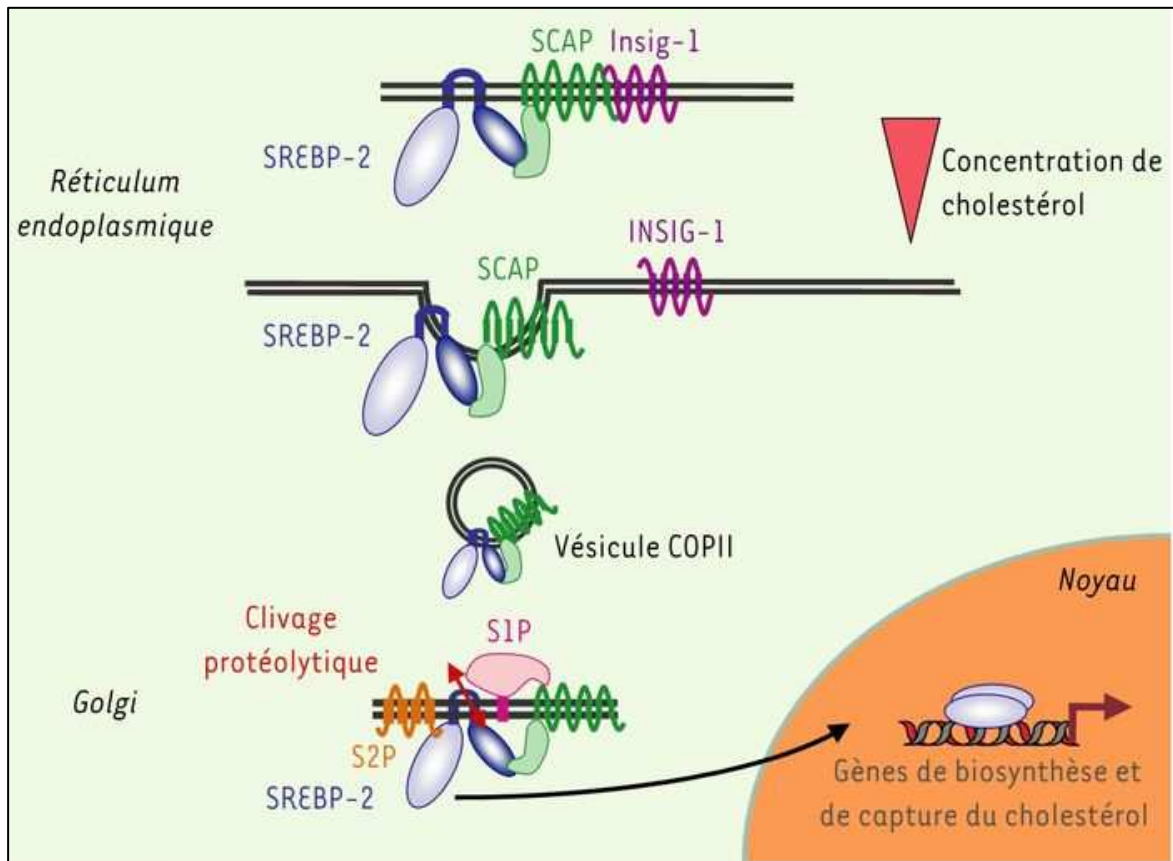


Figure 22 : Le mécanisme d'action des SREBP. En l'absence de stérol, dès sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, SREBP s'associe aux protéines SCAP. Ces dernières contactent des protéines COP-II, permettant au complexe SREBP/SCAP de migrer vers l'appareil de Golgi dans des vésicules bordées 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 INISG empêche la formation des complexes SCAP/COP-II, séquestrant SREBP dans le réticulum endoplasmique. D'après Foufelle et al., 2005.

intra-cellulaire notamment par son action stimulatrice du captage et de la synthèse *de novo* du cholestérol. A l'inverse, les facteurs de transcription LXR (*Liver X Receptors*) ont un rôle hypocholestérolémiant en stimulant l'efflux et inhibant la synthèse et le captage de cholestérol.

A La voie SREBP-2

Les SREBPs (*Sterol Response Element Binding Protein*) appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH-Zip et activent une variété de gènes requis pour le stockage et la synthèse de cholestérol, d'acides gras, de triglycérides et de phospholipides (Brown and Goldstein, 1997; Horton and Shimomura, 1999; Horton et al., 2002). Chez les mammifères, il y a trois isoformes : SREBP-1a et SREBP-1c codées par le gène *Srebf-1* et SREBP-2 codé par *Srebf-2* (Brown and Goldstein, 1997). Les facteurs de transcription SREBPs diffèrent dans leur spécificité tissulaire, leur sélectivité envers leurs gènes cibles et le potentiel relatif de leur domaine de transactivation. Alors que SREBP-1a est un activateur potentiel de tous les gènes sensibles aux SREBPs, SREBP-1c active préférentiellement la transcription de gènes impliqués dans la synthèse des acides gras. SREBP-2 active les gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol (Foufelle et al., 2005) (Figure 22).

Les SREBPs sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs attachés en épingle à cheveux à la membrane du RE (Hua et al., 1993; Duncan et al., 1997). Après leur traduction, les SREBPs se lient à SCAP (*SREBP Cleavage-Activating Protein*), une protéine transmembranaire servant de protéine d'accompagnement et de senseur de stérols (Yang et al., 2002). Chez les mammifères, la sortie du RE est contrôlée par la liaison de SCAP à INSIG (*INSulin Induced Gene*) (Radhakrishnan et al., 2007; Sun et al., 2007). Cette protéine d'ancrage du RE se lie au domaine de reconnaissance des stérols de SCAP et empêche le complexe SCAP/SREBP d'entrer dans la voie du trafic ER-Golgi dépendant de COPII. Les trois SREBPs sont contrôlés par un mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par les produits en aval de la voie de biosynthèse du cholestérol (Osborne, 2000). Quand les niveaux de cholestérol intracellulaires sont bas, l'interaction SCAP/INSIG est interrompue permettant à SCAP d'interagir avec le complexe COPII (*COat ProteinII*) et délivre SREBP-2 au Golgi où il est clivé par deux protéases membranaires S1P (*Site-1 Protease*) et S2P (*Site-2 Protease*) (Goldstein et al., 2006). Ces clivages séquentiels relarguent le fragment actif N-terminal de la membrane pour qu'il transloque au noyau et active l'expression de gènes liés au cholestérol tels que *HMGCoA Reductase* et *LDLR* (*Low Density Lipoprotein Receptor*) (Espenshade, 2006). En condition enrichie en stérols, SREBP2 est retenu dans le RE par le complexe SCAP/INSIG et ne peut plus être pris

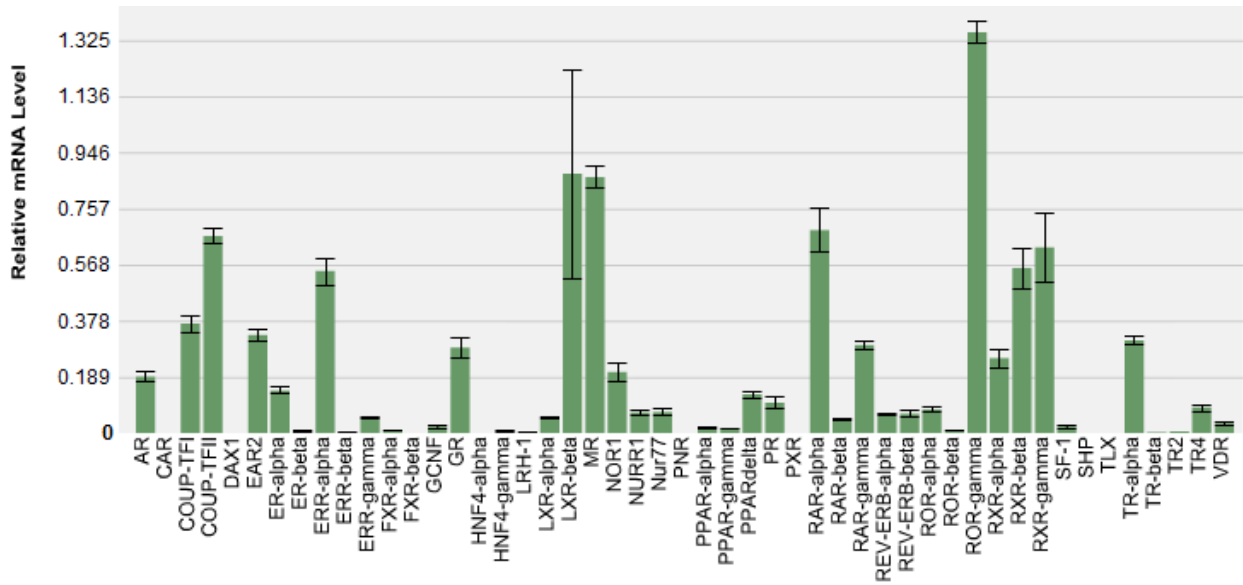


Figure 23 : Expression des récepteurs nucléaires dans la prostate de souris.
<http://www.nursa.org/>

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

Figure 24 : Classification fonctionnelle des récepteurs nucléaires. Les récepteurs sont classés en fonction de leur capacité à fixer un ligand. En couleur sont représentés ceux pour lesquels un ligand est connu ; les récepteurs orphelins pour lesquels aucun ligand physiologique n'est connu sont représentés en noir. Les 48 récepteurs nucléaires humains sont présentés, ainsi que le récepteur EcR (*Ecdysone Receptor*) isolé chez les insectes. Adapté d'après Chawla *et al.*, 2001.

en charge par les protéases dans le Golgi. Ceci empêche SREBP2 inactif d'entrer dans le noyau et le captage ainsi que la synthèse de cholestérol diminuent (Brown and Goldstein, 1999; Goldstein et al., 2002).

En plus des modifications de leur activité, les SREBPs sont régulés de manière transcriptionnelle et post-transcriptionnelle en fonction de l'isoforme. SREBP-2 et SREBP-1c sont sujets à différentes formes de régulation transcriptionnelle alors que SREBP-1a est constitutivement exprimé à de faible dose dans le foie et la plupart des tissus chez les mammifères (Eberlé et al., 2004). SREBP-2 et 1c sont régulés par les SRE (*Sterol Response Elements*) dans leur région promotrice. En présence de stérols, les SREBPs nucléaires activent l'expression de leur propre gène. Le promoteur SREBP-1c est régulé par d'autres facteurs tels que l'insuline et les oxystérols (Repa et al., 2000; Hegarty et al., 2005). Par ailleurs, des modifications post-transcriptionnelles peuvent affecter l'activité des SREBPs. Les SREBPs nucléaires sont modifiés par ubiquitinylation et sont sujets à des dégradations par le protéasome 26 S (Hirano et al., 2001). SREBP-1 et SREBP-2 peuvent aussi être modifiés par SUMO-1 qui est montré comme réprimant l'activité transcriptionnelle (Hirano et al., 2003). De manière alternative, l'acétylation de SREBP-1a et 1c au niveau des résidus lysine par l'activateur transcriptionnel p300, peut augmenter la stabilité de ces facteurs de transcription (Eberlé et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que la sirtuine 1 (SIRT1), une désacétylase NAD⁺ dépendante, joue un rôle critique dans le contrôle de l'activité des SREBPs. Ainsi, SIRT1 inhibe SREBP en le désacétylant résultant en son ubiquitinylation et la déstabilisation de la protéine ce qui inhibe l'expression de ses gènes cibles (Walker et al., 2010).

B Les LXRs

a. Généralités sur les récepteurs nucléaires

Ce sont des facteurs de transcription potentiellement activables par un signal généralement de nature lipophile. Chez l'Homme ou la souris, 48 récepteurs nucléaires ont été identifiés et regroupés en 7 sous-familles définies d'après une classification phylogénétique (Laudet, 1997). La plupart de ces récepteurs est exprimée au niveau de la prostate (Figure 23).

D'un point de vue fonctionnel, trois classes de récepteurs nucléaires peuvent être définies : les récepteurs endocriniens avec un ligand de forte affinité, les récepteurs nucléaires orphelins « adoptés » avec un ligand de faible affinité et les récepteurs nucléaires orphelins pour lesquels aucun ligand n'a été identifié à ce jour (Chawla et al., 2001) (Figure 24).

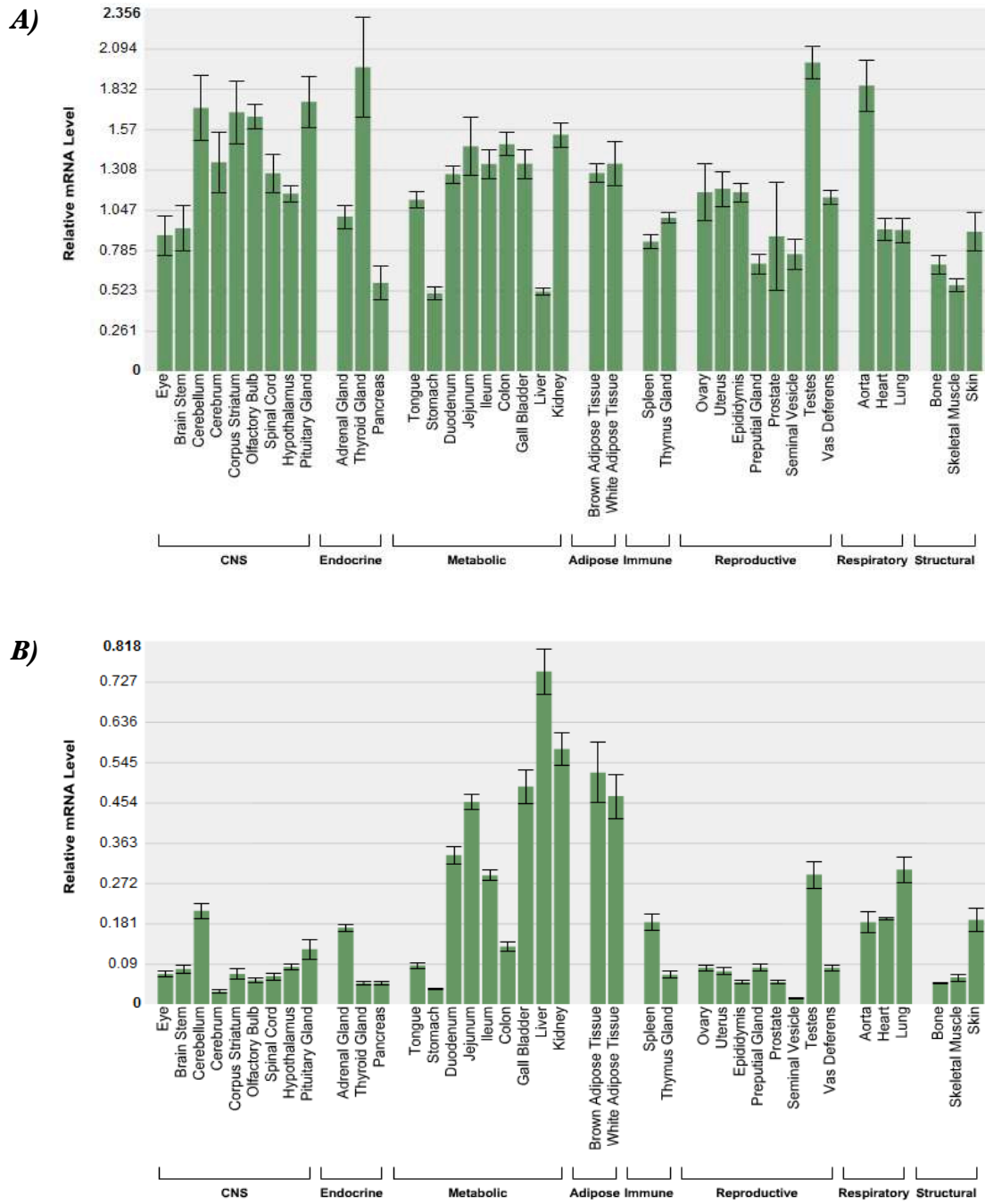


Figure 25 : Expression de *Lxrβ* (A) et *Lxra* (B) chez la souris
 D'après A.J. Bookout et D.J. Mangelsdorf (<http://www.nursa.org/>).

Les récepteurs endocriniens ont pour ligands les hormones stéroïdes synthétisées à partir du cholestérol et dont la nature dépend du 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. En absence de ligand, ces récepteurs sont complexés à des protéines chaperonnes de type HSP (*Heat Shock Protein*) ce qui les maintient dans un état inactif. La fixation du ligand, directement ou après transformation enzymatique, provoque le départ des protéines HSP, la translocation nucléaire du récepteur et sa dimérisation. Le dimère ainsi formé se fixe au niveau de ses éléments de réponse spécifiques pour induire la transcription de ses gènes cibles.

Les récepteurs des hormones non-stéroïdiennes sont en permanence fixés sur leurs éléments de réponse dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. En absence de ligand, des co-répresseurs permettent le maintien de la chromatine dans un état non-permissif vis-à-vis de la transcription des gènes cibles. La fixation du ligand sur son récepteur induit l'initiation de la transcription. Ces récepteurs peuvent agir sous forme d'homodimère, d'hétérodimère avec leur partenaire obligatoire RXR (*Retinoid X Receptor*) (ce qui est le cas des LXRs), ou de monomère.

Les récepteurs orphelins sont des protéines dont la structure présente une forte identité avec les autres récepteurs nucléaires mais dont les ligands naturels n'ont pas encore été identifiés. Ainsi, SF-1 et DAX-1 ont des actions antagonistes impliquées dans le développement embryonnaire et le maintien des fonctions testiculaires, ovariennes et surrénaliennes (Val et al., 2003; Iyer and McCabe, 2004). Le récepteur SHP (*Short Heterodimeric Partner*) est un récepteur nucléaire atypique dépourvu de domaine de liaison à l'ADN, principalement connu pour sa fonction hépatique de contrôle des acides biliaires et de l'homéostasie testiculaire (Goodwin et al., 2000; Volle et al., 2007a, 2009)

b. Structure et Mécanisme d'action des LXRs

Il existe deux isoformes LXR α (NR1H3) et LXR β (NR1H2) issus de deux gènes distincts localisés respectivement chez l'Homme sur les chromosomes 11p11.2 et 19q13.3 et chez la souris sur les chromosomes 2 et 7 (Shinar et al., 1994; Song et al., 1994; Willy et al., 1995). LXR β est exprimé de manière ubiquiste alors que LXR α est retrouvé préférentiellement au niveau des organes présentant un fort métabolisme lipidique comme le foie, l'intestin, le tissu adipeux, la rate et les tissus stéroïdogènes (Figure 25) (www.nursa.org).

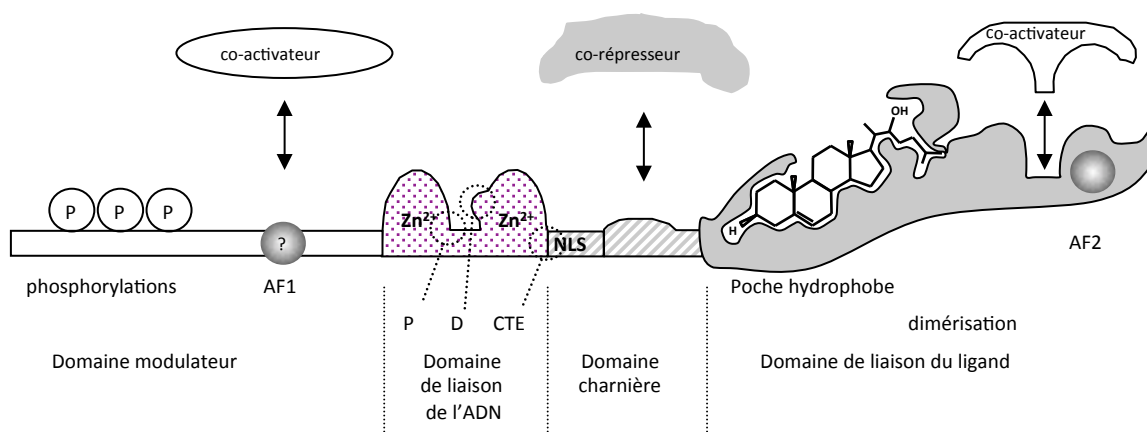


Figure 26 : Structure schématique des récepteurs nucléaires

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

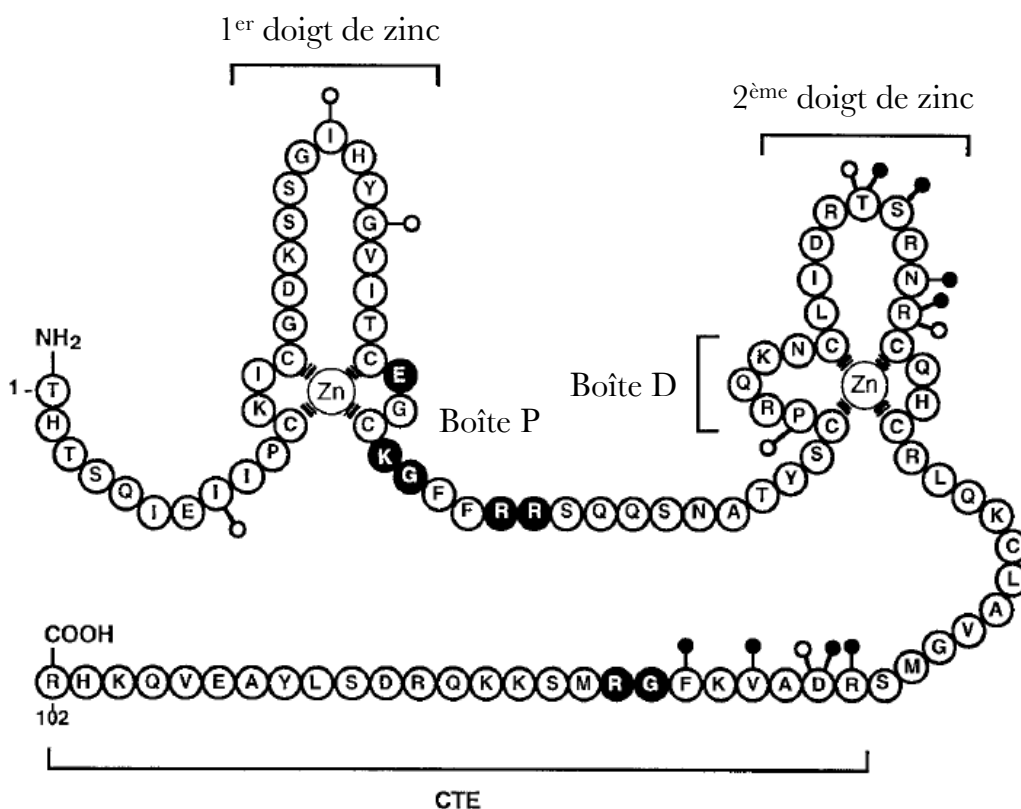


Figure 27 : Représentation schématique de la structure du domaine de liaison à l'ADN (DBD) d'un récepteur nucléaire

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

De manière commune avec un grand nombre de récepteurs nucléaires, quatre domaines fonctionnels ont été identifiés (Viennois et al., 2011) (Figure 26) :

- En partie amino-terminale (domaine A/B), la fonction activatrice AF1 (*Activating Fonction 1*) correspond au lieu de recrutement des co-activateurs indépendamment de la présence du ligand.

- Le domaine de liaison de l'ADN ou DBD (*DNA Binding Domain* ; domaine C) est formé d'un motif à deux doigts de zinc de type C₂C₂ impliqué dans la reconnaissance des éléments de réponse et la formation de l'hétérodimère. Au niveau du premier doigt de zinc, on distingue la boîte P qui permet la reconnaissance du demi-site de l'élément de réponse ayant pour séquence canonique AGA/GTCA (Aumais et al., 1996). Une boîte D est située au niveau du second doigt de zinc et permet la dimérisation du récepteur et la stabilisation de l'interaction ADN-récepteur (Figure 27).

- Le domaine charnière (domaine D) relie le DBD au LBD (*Ligand Binding Domain*) et pourrait réaliser une rotation de 180° lorsque l'hétérodimère de récepteur reconnaît des séquences particulières des éléments de réponse telles que les DR (*Direct Repeat*) ou IR (*Inverted Repeat*). Les co-répresseurs comme N-Cor (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) ou SMRT (*Silencing Mediator for RAR and Tr*) se fixent au niveau de ce domaine pour maintenir la transcription inactive (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995).

- En partie carboxy-terminale, le domaine de liaison du ligand (LBD ; domaine E/F) est constitué d'une poche hydrophobe où le ligand peut se fixer. La présence d'une fonction activatrice (AF2) au niveau de l'hélice 12 permet le recrutement de co-activateurs en présence du ligand (Bourguet et al., 1995). En effet, l'arrivée du ligand entraîne un changement de position de l'hélice 12 qui ferme la poche hydrophobe et fait ressortir la fonction AF2. Enfin, les récepteurs nucléaires agissant sous forme de dimères sont liés au niveau de ce LBD (Mangelsdorf and Evans, 1995).

Par ailleurs, même si les deux isoformes des LXRs peuvent se lier sous forme de monomère sur quelques promoteurs, ils se lient de manière canonique à différentes isoformes du récepteur de l'acide rétinoïque *9-cis* RXR : RXR α (NR2B1), RXR β (NR2B2), RXR γ (NR2B3) (Repa and Mangelsdorf, 2000; Tamura et al., 2000; Morello et al., 2005).

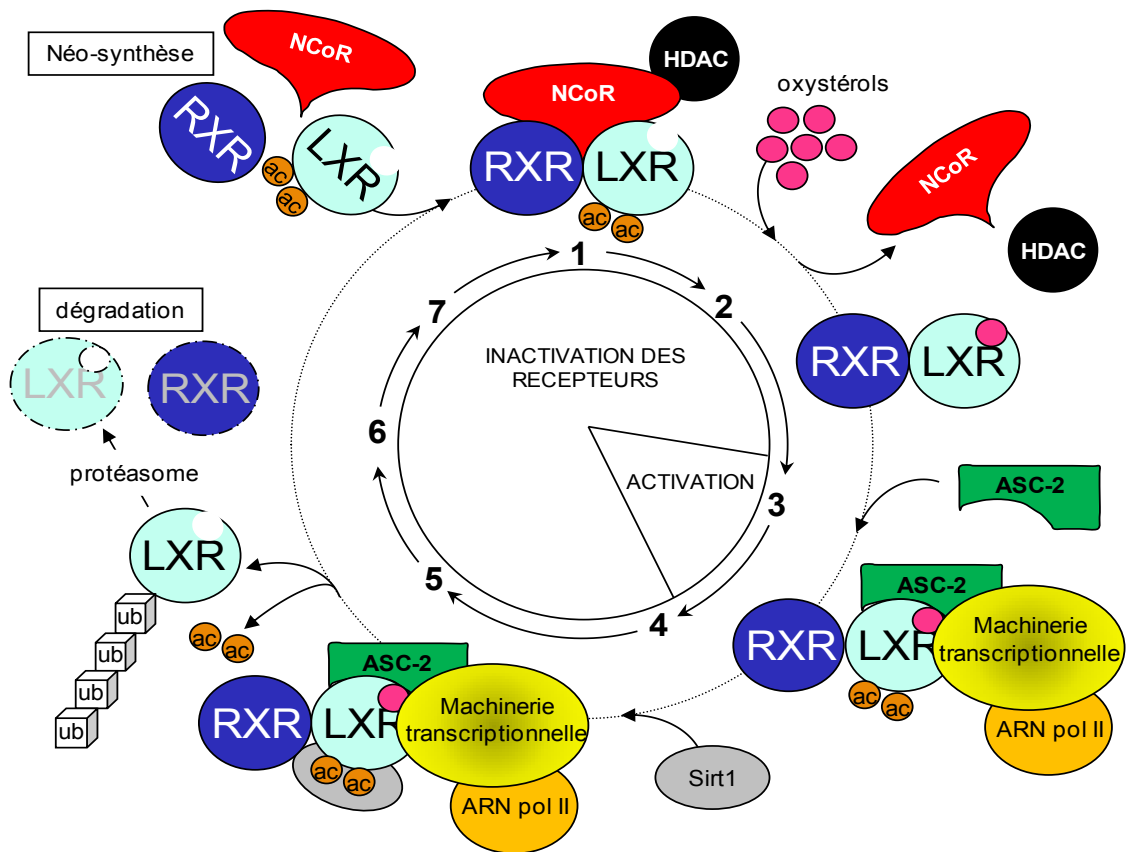


Figure 28 : Représentation schématique du cycle d'activation/inhibition de l'hétérodimère LXR/RXR

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

L'hétérodimère LXR/RXR est constitutivement lié au promoteur de ses gènes cibles au niveau de séquences particulières LXRE (*LXR response Element*) dont le motif le plus courant est le DR4 composé de deux séquences AGGTCA séparées par quatre nucléotides (Chawla et al., 2001). En absence de ligand, l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère est inhibée par des répresseurs. La liaison du ligand induit des modifications au niveau du domaine carboxy-terminal relarguant les co-répresseurs et piégeant le ligand dans la poche hydrophobe, ce qui renforce la fixation de co-activateurs rendant la chromatine dans un état permissif. Ensuite, la machinerie transcriptionnelle est recrutée permettant la transcription des gènes cibles. Les modifications post-traductionnelles (désacétylation, ubiquitinylation, SUMOylation, phosphorylations) peuvent moduler l'activité transcriptionnelle LXR-RXR (Viennois et al., 2012b) (Figure 28).

c. Ligands

1) Naturels

Les oxystérols, molécules retrouvées largement dans la nature (Schroepfer, 2000), exercent de nombreuses propriétés biologiques de l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol à l'inhibition de la réplication cellulaire et l'induction de l'apoptose (Viennois et al., 2011) faisant ainsi de ces molécules, des cibles thérapeutiques potentielles dans le cancer.

La source principale d'oxystérols est le cholestérol. Ces molécules peuvent être produites soit par l'attaque du cholestérol par des espèces oxygénées réactives (7-céto-cholestérol et 7 β -hydroxy-cholestérol), soit par des réactions enzymatiques spécifiques (24(S)-hydroxy-cholestérol, 25-hydroxy-cholestérol et 27-hydroxy-cholestérol). La nature des oxystérols dépend de leur lieu de synthèse. En effet, le 22(R)-hydroxy-cholestérol est retrouvé préférentiellement dans les tissus stéroïdogènes, le 24(S)-hydroxy-cholestérol encore appelé cérébrostérol dans le cerveau et le plasma, le 24(S),25-époxy-cholestérol dans le foie et le 27-hydroxy-cholestérol dans les macrophages et le plasma.

Même si les oxystérols peuvent activer *in vitro* d'autres récepteurs nucléaires tels que FXR α (*Farnesoid Receptor*) (NR1H4) et ROR (*RAR related Orphan Receptor*) (NR1F1-3), des analyses *in vivo* démontrent que certaines de ces molécules oxygénées sont les ligands véritables des LXR α et β (Houck et al., 2004; Chen et al., 2007; Wang et al., 2010b). Les oxystérols présentant une forte affinité pour LXR α sont les 22(R)-hydroxy-cholestérol, 20(S)-hydroxy-cholestérol, 24(S)-hydroxy-cholestérol, 7 α -hydroxy-cholestérol et 27-hydroxy-cholestérol (Janowski et al., 1996). Les 24-céto-cholestérol, 25-hydroxy-cholestérol et 24(S),25-époxy-cholestérol sont des

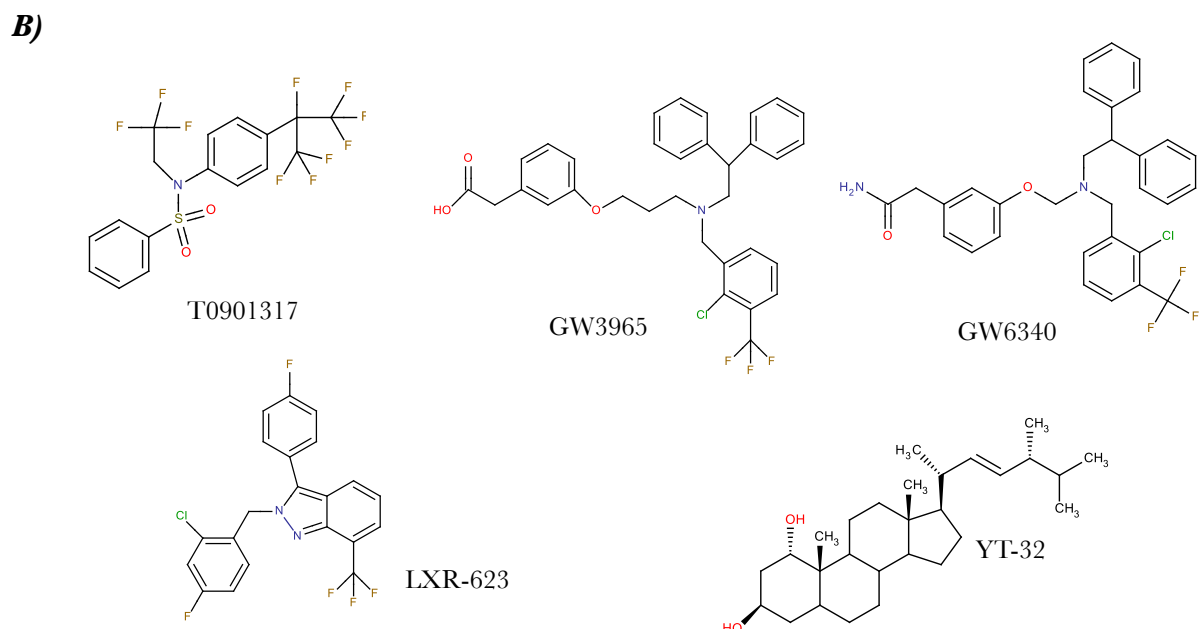
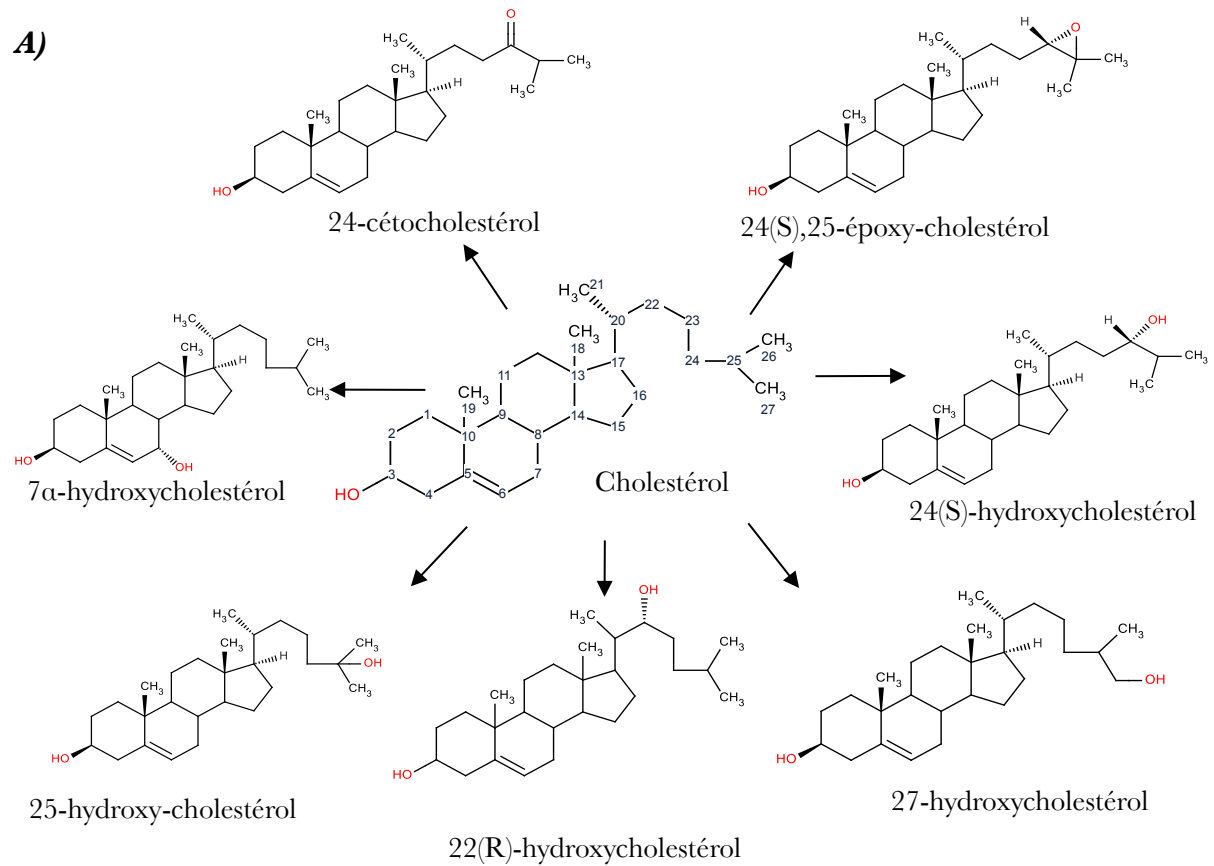


Figure 29 : Ligands agonistes naturels et synthétiques des LXRs.

A) Ligands agonistes naturels (oxystérols). La structure chimique du cholestérol est représentée et les atomes de carbone sont numérotés. Le nom de chaque oxystérol dépend de la position des groupements hydroxyl. **B)** Ligands agonistes synthétiques. D'après Viennois et al., 2012.

activateurs de grande affinité pour les deux isoformes (Lehmann et al., 1997) (Figure 29A). Par ailleurs, en plus des oxystérols, d'autres molécules dérivées du cholestérol, des acides biliaires ou encore de composés isolés à partir de plantes peuvent activer les LXR_s mais nous ne les détaillerons pas dans ce manuscrit. (Pour revue voir Viennois et al., 2012b).

2) Synthétiques

De manière intéressante, la découverte du rôle hypocholestérolémiant des LXR_s, a entraîné la recherche de nouveaux ligands pour les LXR_s par de nombreuses compagnies pharmaceutiques (Peet et al., 1998; Li et al., 2010). Cependant, puisque l'activation des LXR_s conduit à une hypertriglycémie, l'utilisation de ces agonistes en thérapie humaine reste ainsi très limitée.

Parmi les composés disponibles, le T0901317 reste le plus fréquemment utilisé dans les études fondamentales sur les LXR_s. Cependant, sa spécificité n'est pas totale puisqu'il est capable d'activer les récepteurs PXR (*Pregnane X Receptor*) et FXR à des concentrations élevées (Houck et al., 2004; Shenoy et al., 2004; Mitro et al., 2007). La compagnie GSK (GlaxoSmithKline) a identifié le GW3965 qui présente une forte activité agoniste pour LXR_α et β et une plus grande spécificité (Mitro et al., 2007). Plus récemment, GSK a développé un composé proche du GW3965, le GW6340 exerçant son activité agoniste des LXR_s dans l'intestin *via* l'activation des gènes cibles *ABCA1*, *ABCG5* et *ABCG8* sans effet sur les triglycérides hépatiques (Yasuda et al., 2010). De même, le (22E)-ergost-22-ène-1 α ,2 β diol (YT-32) est un agoniste prometteur du fait de sa spécificité du tissu intestinal (Kaneko et al., 2003) (Figure 29B).

Le premier agoniste des LXR_s testé en phase I d'essai clinique est le composé Wyeth, LXR-623 (DiBlasio-Smith et al., 2008; Katz et al., 2009). L'administration de ce composé à des volontaires sains a montré une stimulation des gènes cibles des LXR_s impliqués dans le transport inverse du cholestérol au niveau des macrophages sans induction de la synthèse des triglycérides. Ces résultats encourageants étaient cependant accompagnés d'effets secondaires au niveau du système nerveux central.

d. Rôle des LXR_s dans l'homéostasie du cholestérol

C'est l'étude phénotypique de souris transgéniques invalidées pour les deux isoformes qui a permis d'identifier les fonctions physiologiques associées aux LXR_s et notamment leur rôle de senseurs de cholestérol (Peet et al., 1998; Mouzat et al., 2009a).

Lorsque les oxystérols cellulaires s'accumulent en réponse à une augmentation des quantités de cholestérol, les LXR α induisent la transcription des gènes cibles dont les protéines visent à protéger les cellules d'une surcharge en cholestérol.

L'activation des LXR α régule la synthèse d'acides biliaires, le métabolisme et l'excrétion, le transport inverse du cholestérol, sa biosynthèse et son absorption/excrétion dans l'intestin.

1) Les LXR α et acides biliaires : synthèse, métabolisme et excrétion

La voie d'élimination principale du cholestérol de l'organisme est la sécrétion et la synthèse d'acides biliaires. La voie classique de synthèse des acides biliaires est initiée par la 7 α -hydroxylation du cholestérol catalysée par l'enzyme limitante CYP7A1 (*Cytochrome P450 cholesterol 7 α -hydroxylase*) (Russell and Setchell, 1992). Chez les rongeurs, *Cyp7A1* est un gène cible de LXR α via un LXRE présent dans son promoteur ce qui signifie que ces animaux peuvent convertir le cholestérol en acides biliaires de manière dépendante de LXR α (Peet et al., 1998). Ainsi, les rongeurs peuvent-ils s'adapter très rapidement à un régime riche en cholestérol en le convertissant en acides biliaires. Les études sur les souris invalidées pour les deux isoformes des LXR α ont montré que seuls les animaux *Lxr α -/-* présentent une augmentation du taux d'ester de cholestérol dans le foie lorsqu'ils sont nourris avec un régime enrichi en cholestérol puisqu'il n'y a plus d'induction de *Cyp7A1* (Alberti et al., 2001). En revanche, un traitement avec un agoniste des LXR α entraîne une inhibition de l'expression de *CYP7A1* en culture d'hépatocytes primaires humains (Lu et al., 2000; Goodwin et al., 2003). Cette répression est due en partie à l'absence de LXRE dans le promoteur du gène *CYP7A1* et à une induction de *SHP*, dont la protéine a un effet répressif sur *CYP7A1* via LRH1 (*Liver Receptor Homolog 1*) (Goodwin et al., 2000).

Les LXR α jouent également un rôle dans le catabolisme des acides biliaires. En effet, l'activation dépendante du ligand de LXR α provoque la stimulation du gène *UGT1A3* (*UDP Glucuronosyltransférase 1 family, polypeptide A3*) (Barbier et al., 2009). UGT1A3 est une des enzymes les plus actives pour la glucurono-conjugaison des acides biliaires qui permet leur élimination sous forme de métabolites urinaires. Par ce mécanisme, LXR α semble donc faciliter l'élimination définitive du cholestérol sous forme d'acides biliaires glucuronidés.

L'excrétion du cholestérol libre dans la bile est une autre possibilité pour éliminer les excès de cholestérol du foie. ABCG5 et ABCG8, responsables de ce transport, sont ainsi tous deux régulés par les LXR α démontrant l'implication de ces récepteurs dans ce mécanisme d'excrétion (Berge et al., 2000; Repa et al., 2002).

2) Les LXR α s et le transport inverse du cholestérol

Les LXR α s exercent un rôle critique dans le transport inverse du cholestérol en régulant l'expression de plusieurs gènes tels que *ABCA1*, *ABCG1*, *ApoE* et *PLTP* (*PhosphoLipid Transfer Protein*). L'activation des LXR α s induit l'efflux de l'excès de cholestérol des tissus périphériques et a un potentiel anti-athérogénique caractérisé par une inhibition de la progression voire même la régression des lésions d'athérosclérose chez les souris (Joseph et al., 2002b; Levin et al., 2005; Naik et al., 2006).

ABCA1 est un gène cible des LXR α s dont la protéine permet le transport de phospholipides et de cholestérol vers les apolipoprotéines stabilisant les HDL ce qui correspond donc à la première étape du transport inverse (Costet et al., 2000; Repa and Mangelsdorf, 2000). Des études réalisées sur des souris invalidées pour *ABCA1* ont montré que les *ABCA1* hépatiques et intestinaux contribuent respectivement à 80 % et 20% de la formation d'HDL (Timmins et al., 2005; Brunham et al., 2006).

L'expression du gène *ABCG1* est également induite par l'activation des LXR α s *via* ses LXREs (Kennedy et al., 2001; Sabol et al., 2005). L'étude des souris *Abcg1*^{-/-} a montré que cette protéine jouait un rôle important dans l'efflux de cholestérol (Kennedy et al., 2005). Une synergie d'action est proposée entre *ABCA1* et *ABCG1* où *ABCA1* permet d'enrichir de lipides des particules servant d'accepteurs pour l'efflux de cholestérol médié par *ABCG1* (Gelissen et al., 2006).

ApoE est une cible transcriptionnelle des LXR α s (Laffitte et al., 2001). La sécrétion d'ApoE permet l'incorporation de cholestérol dans des HDL et les souris *ApoE*^{-/-} développent de l'athérosclérose ce qui fait de cette protéine, un acteur important de cette pathologie (Reddick et al., 1994).

Enfin, l'activation des LXR α s régule l'expression de *PLTP* au niveau du foie et des macrophages (Laffitte et al., 2003b). La *PLTP* facilite d'une part, le transfert de phospholipides et de cholestérol depuis des lipoprotéines riches en triglycérides dans les HDL et d'autre part, la conversion des HDL en pré- β -HDL accepteurs de cholestérol périphériques dont la présence stimule l'efflux (Lee et al., 2003).

3) Les LXR α s et la synthèse *de novo*

LXR α régule négativement deux gènes *FDFT1* (*Squalene synthase*) et *CYP51A1* (*lanosterol 14 α -demethylase*) codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol (Wang et al., 2008). Des LXREs ont été identifiés dans les promoteurs de ces deux gènes montrant que LXR α aurait un rôle inhibiteur de la synthèse *de novo* du cholestérol.

4) *Les LXRs et le captage de cholestérol*

La majorité du cholestérol plasmatique est transportée dans les LDL qui sont captées par la voie du LDLR. Or les LXRs jouent un rôle dans le captage de cholestérol par son action sur le gène cible *IDOL* (*Inducible Degradation Of the LDLR*) (Zelcer et al., 2009). En effet, *IDOL* est une E3 ligase qui ubiquitinye LDLR au niveau du domaine cytoplasmique entraînant par conséquent sa dégradation protéosomale. L'activation des LXRs stimule donc la dégradation de LDLR ce qui permet une diminution du captage de cholestérol.

5) *Les LXRs et l'absorption intestinale de cholestérol*

L'activation des LXRs implique une réduction de l'absorption intestinale du cholestérol par son action régulatrice sur plusieurs gènes tels que *ABCG5* et *ABCG8* et *NPC1L1* (*Niemann-Pick C1-like 1*).

ABCG5 et *ABCG8*, dont l'expression génique apicale est stimulée par les LXRs seraient impliqués dans l'excrétion intestinale du cholestérol absorbé dans la lumière intestinale (Brown and Yu, 2009).

NPC1L1 est retrouvé dans l'intestin grêle et requis pour l'absorption intestinale de cholestérol (Altmann et al., 2004). L'activation des LXRs régule négativement l'expression de *NPC1L1* à la fois chez l'Homme et la souris (Duval et al., 2006).

6) *Autres fonctions physiologiques des LXRs*

En plus de leur rôle dans l'homéostasie du cholestérol, les LXRs sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques que nous allons aborder brièvement : l'homéostasie lipidique et glucidique, l'immunité et la stéroïdogénèse. (Pour revue, lire Viennois et al., 2011).

i. Le métabolisme des acides gras

L'activation des LXRs entraîne une augmentation de l'expression de *Srebf-1c* dont le produit favorise la synthèse des acides gras (Repa et al., 2000). Une analyse du promoteur murin de ce gène a montré des sites de liaisons pour l'hétérodimère RXR-LXR ce qui fait de *Srebf-1c*, un gène cible des LXRs. De la même manière, les LXRs stimulent l'expression de gènes codant les enzymes essentielles du métabolisme des acides gras, *FASN* (*Fatty Acid Synthase*), *ACACA* (*Acetyl CoA Carboxylase Alpha*) et *SCD1* (*Stearoyl-CoA Desaturase 1*) (Schultz et al., 2000; Joseph et al., 2002a; Talukdar and Hillgartner, 2006).

Les LXR_s exercent donc un effet hypertriglycéridémiant qui s'avère être un obstacle à l'utilisation pharmacologique d'agonistes.

ii. Le métabolisme glucidique

ChREBP (*Carbohydrate Response Element Binding Protein*) est un régulateur central de l'homéostasie des lipides et du glucose dans le foie. Lorsque la concentration de glucose intracellulaire est faible, ChREBP est localisé dans le cytoplasme (Dentin et al., 2006). Lorsque la concentration de glucose augmente, ChREBP est déphosphorylé ce qui lui permet de rentrer dans le noyau et d'activer ses gènes cibles par fixation sur ses éléments de réponse (ChRE). Ce facteur peut ainsi stimuler la lipogenèse hépatique en activant l'expression de *Fasn* et *Acaca* (Cha and Repa, 2007). Deux LXRE fonctionnels ont été identifiés dans le promoteur du gène *MLXIPL* (*Max Like protein X Interacting Protein-Like*) codant pour ChREBP ce qui en fait une cible transcriptionnelle directe de LXR α . En effet, *in vivo*, l'activation des LXR_s par le T0901317 stimule l'expression hépatique de *MLXIPL* (Cha and Repa, 2007). Toutefois, l'induction des gènes cibles hépatiques de ChREBP par un régime riche en glucides est conservée chez les souris invalidées pour les LXR_s suggérant que l'activation de ces gènes est indépendante de l'action des LXR_s (Denechaud et al., 2008).

Les LXR_s ont également été montrés comme ayant un rôle hypoglycémiant *via* l'inhibition de gènes de la gluconéogenèse tels que *PCK* (*Phospho-Enol-Pyruvate-CarboxyKinase*), *FBP* (*Fructose-1,6-biphosphatase*), *G6P* (*Glucose-6-Phosphatase*) et l'induction du transporteur du glucose, GLUT4 (*GLUcose Transporter 4*) stimulant ainsi l'entrée du glucose dans les adipocytes (Laffitte et al., 2003a).

iii. L'immunité

L'action anti-inflammatoire des LXR_s a été décrite dans les macrophages où l'utilisation de l'agoniste GW3965 provoque une diminution de médiateurs inflammatoires tels que iNOS (*Nitric Oxide Synthase*), COX-2 (CycloOxygénase-2) et IL-6 (InterLeukine-6) induits par une infection bactérienne ou des lipopolysaccharides (Joseph et al., 2003). De même, la cytokine pro-inflammatoire, l'ostéopontine est inhibée en réponse à une activation des LXR_s dans les macrophages en culture ou en modèle murins (Ogawa et al., 2005). Par ailleurs, l'activation des LXR_s par le GW3965 entraîne une régression des lésions athérosclérotiques chez des animaux modèles de cette pathologie démontrant ainsi un effet anti-athérogène de ces récepteurs (Joseph et al., 2002b). Des interactions entre les LXR_s et la signalisation TLR (*Toll-Like Receptor*) ont été décrites. En effet, une baisse de l'activité des LXR_s sur la transcription de

gènes cibles tels que *Abca1* est observée suite à l'activation de TLR3 et TLR4 lors d'une infection microbienne (Castrillo et al., 2003). Le métabolisme du cholestérol est ainsi modifié dans les macrophages ce qui favorise leur transformation en cellules spumeuses. De plus, le récepteur nucléaire Rev-erb α exerçant une action inhibitrice sur TLR4 est une cible directe des LXR α dans les macrophages humains en culture (Fontaine et al., 2008).

iv. L'homéostasie des tissus stéroïdogènes et des organes cibles des stéroïdes

L'activation des LXR α régule la synthèse des hormones stéroïdiennes *in vivo* via l'activation de gènes clés de ces synthèses comme *Star* et *HSD3B* (*3 β -Hydroxy Steroid Dehydrogenase*) au niveau surrénalien, testiculaire et ovarien (Cummins et al., 2006; Volle and Lobaccaro, 2007; Mouzat et al., 2009b). Les LXR α sont également impliqués dans le maintien de la structure de l'épididyme, de l'utérus, de l'ovaire et du testicule (Mouzat et al., 2007, 2009b; Saez et al., 2007; Volle et al., 2007b). En effet, l'ablation génique des LXR α conduit à des perturbations fonctionnelles de ces organes dont l'origine est probablement en rapport avec un dérèglement de l'homéostasie lipidique dans ces tissus.

e. LXR α et β , deux acteurs majeurs de la physiologie et la pathologie prostatique

Malgré les nombreuses fonctions physiologiques décrites jusqu'à présent pour les deux isoformes des LXR α dans de nombreux tissus, leur rôle dans la prostate reste peu connu (Faulds et al., 2010; Calkin and Tontonoz, 2012). Des analyses *in vivo* sur des souris invalidées pour les LXR α et *ex vivo* sur des lignées cellulaires établies de cancer de la prostate ont pu mettre en évidence des propriétés des LXR α dans la prostate. Une activation pharmacologique des LXR α par le ligand synthétique T0901317 induit ainsi une accumulation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 responsables de l'efflux de cholestérol (Chuu et al., 2006; Pommier et al., 2010). En plus de cette action courante, la stimulation des LXR α par le T0901317 diminue le pourcentage des cellules LNCaP en phase S et augmente le pourcentage de cellules en phase G1, en supprimant l'accumulation de la protéine SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) qui en retour favorise la dégradation de p27^{KIP1}, inhibiteur du cycle cellulaire (Fukuchi et al., 2004c). En parallèle du blocage de la prolifération, les LXR α stimulent l'apoptose des cellules LNCaP en altérant la signalisation des *rafts* lipidiques par une diminution du contenu membranaire de cholestérol et une réduction de la fraction phosphorylée d'AKT associée avec ces *rafts* (Pommier et al., 2010). Ces effets anti-prolifératif et pro-apoptotique des agonistes des LXR α ont également été montrés *in vivo* en utilisant des

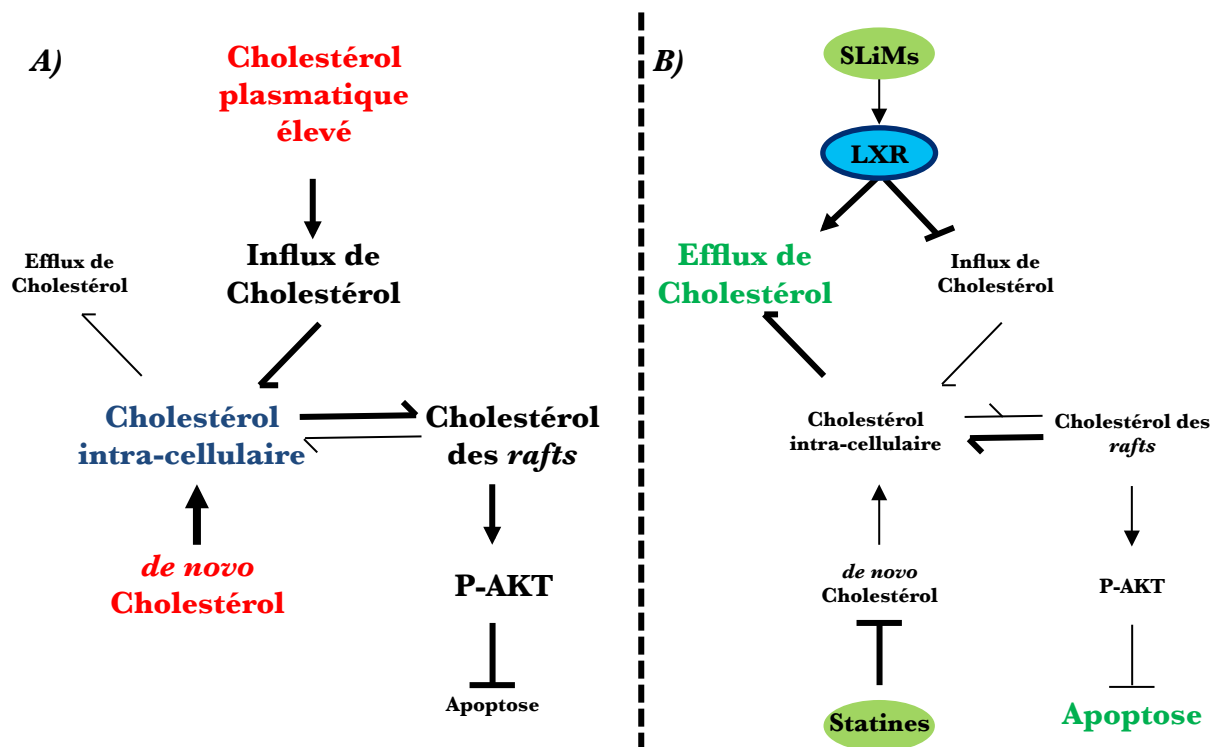


Figure 30 : Représentation schématique du rôle du cholestérol dans la carcinogénèse prostatique et effet de l'activation des LXRs.

A) Les niveaux de cholestérol plasmatique élevés stimulent l'influx, ce qui augmente la quantité de cholestérol intra-cellulaire. Le cholestérol s'accumule dans les membranes au niveau des *rafts* lipidiques ce qui permet aux facteurs de croissance d'accéder à leurs récepteurs et notamment l'activation de la voie de survie AKT. **B)** L'activation des LXRs induit la production des cassettes *ATP-binding-cassette* (ABC) impliquées dans l'efflux de cholestérol, ce qui diminue le niveau de cholestérol intra-cellulaire et la coalescence des *rafts*. Ceci diminue l'ancrage des récepteurs de croissance à la membrane induisant ainsi une inhibition de la prolifération et une augmentation de l'apoptose. En parallèle, les statines exercent un rôle d'inhibition de la synthèse *de novo* de cholestérol. D'après Dufour et al., 2012.

souris athymiques xéno greffées avec les LNCaP et gavées avec le T0901317 (Fukuchi et al., 2004c; Pommier et al., 2010). Ces études ont donc mis en évidence le potentiel pharmacologique de l'activation des LXRs pour permettre la stimulation de l'apoptose et/ou la diminution de la prolifération des tumeurs prostatiques (Figure 30). De manière intéressante, l'activation de AR dans les cellules LNCaP entraîne une inhibition de l'expression d'*ABCA1* uniquement en présence des LXRs (Fukuchi et al., 2004a). Cette action inhibitrice des androgènes sur les LXRs pourrait être due à une compétition entre AR et LXR dans le recrutement de co-activateurs dans les cellules LNCaP (Krycer and Brown, 2011).

Par ailleurs, LXR α semble exercer un rôle crucial dans l'homéostasie de la prostate ventrale puisque les souris déficientes pour cette isoforme présentent une hypertrophie du compartiment stromal associé à l'activation de la voie de TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) et à des cellules épithéliales proliférantes (Kim et al., 2009). De plus, nous avons montré que LXR α contrôle l'accumulation de la protéine SBP (*Spermin Binding Protein*) fortement androgéno-régulée. La génération de prostates chimériques recombinantes met en évidence l'implication de LXR α dans l'établissement des interactions épithélium-mésenchyme dans la prostate (Viennois et al., 2012a).

3. Cholestérol et cancer de la prostate

A Le cholestérol : un facteur de risque

Plusieurs arguments bibliographiques permettent d'associer les taux de cholestérol élevés au risque de développer un cancer de la prostate et notamment de haut grade (Roy et al., 2011; Dufour et al., 2012).

Ainsi des études soulignent qu'un fort taux de cholestérol sous forme de LDL est associé à une augmentation de 60 % du risque de cancer de la prostate alors qu'un taux circulant faible (< 200 mg/dL) est associé à une baisse du risque de développer un cancer de la prostate agressif (Magura et al., 2008; Platz et al., 2009; Mondul et al., 2010; Shafique et al., 2012). De plus, il a été montré que la mortalité est plus élevée dans une population avec des niveaux élevés de cholestérol (Huxley, 2007; Batty et al., 2011).

B Les statines et le cancer

Inversement, l'utilisation d'agents hypocholestérolémiants tels que les statines semblent limiter le risque de cancer associé au cholestérol.

a. Généralités sur les statines

Les statines sont des inhibiteurs de l'HMGCoA reductase utilisés pour réprimer la synthèse de cholestérol. La baisse du cholestérol hépatique est compensée par la synthèse de LDLR pour prélever le cholestérol de la circulation ce qui entraîne une baisse des niveaux plasmatiques de cholestérol (Ma et al., 1986). Certaines statines comme la pravastatine semblent inhiber préférentiellement la synthèse de cholestérol dans le foie et l'intestin alors que d'autres comme la lovastatine exercent leur effet inhibiteur sur tous les organes (Endo et al., 1977; Tsujita et al., 1986; Parker et al., 1990). Ces différences peuvent s'expliquer par des variations du captage du cholestérol causées par une sensibilité au pH, une liaison des protéines plasmatiques, une activité métabolique et une amélioration de l'activité des transporteurs pour l'influx et l'efflux.

Bien que hautement efficaces, les statines ne produisent pas les effets désirés sur un certain nombre de patients et peuvent causer de sévères effets secondaires tels que des myalgies et des myopathies en réprimant des acteurs impliqués dans les modifications post-traductionnelles des protéines (Mastaglia, 2010; Mullen et al., 2010). Les statines plus récentes telles que la pitavastatine présenteraient une incidence réduite de ces effets secondaires (Corsini and Ceska, 2011).

Par ailleurs, des efforts sont faits pour développer des inhibiteurs à d'autres niveaux de la voie de biosynthèse du cholestérol. Ainsi, les inhibiteurs de la squalène synthase permettent de prévenir l'impact des statines sur les modifications post-traductionnelles des protéines tout en diminuant la synthèse de cholestérol (Wasko et al., 2011).

b. Statines et cancer de la prostate

Les statines dont l'utilisation première visait à traiter les pathologies cardio-vasculaires, ont montré un effet bénéfique sur la réduction de l'incidence du cancer de la prostate (Shannon et al., 2005; Boudreau et al., 2010). Puisque les statines inhibent une des premières étapes de la synthèse de cholestérol, elles vont réguler négativement des molécules intermédiaires de cette

synthèse. Or une majorité des produits de la voie de biosynthèse est nécessaire pour des fonctions cellulaires fondamentales telles que l'intégrité des membranes, la signalisation cellulaire, la synthèse protéique et la progression du cycle cellulaire (Chan et al., 2003). Plusieurs arguments épidémiologiques sont en faveur d'une association positive entre statines et réduction du risque de cancer de la prostate (Roy et al., 2011). Une étude cas-témoins ainsi qu'une étude de cohorte rapportent une diminution de ce risque pour les utilisateurs de statines en comparaison avec ceux qui n'en consomment pas (Shannon et al., 2005; Flick et al., 2007).

Par ailleurs, le traitement par des statines retarde la croissance tumorale sur des souris allogreffées par une lignée cellulaire de tumeur mammaire (Alonso et al., 1998). De plus, l'ajout de statines sur des lignées cellulaires tumorales prostatiques montre des effets anti-prolifératifs (Ukomadu and Dutta, 2003).

Ainsi, une diminution de la synthèse de cholestérol hépatique et périphérique pourrait-elle être associée à une baisse du risque de cancer de la prostate et de l'agressivité des tumeurs dans les stades avancés de cancers.

C Action du cholestérol en contexte tumoral

Il est connu depuis des décennies que le cholestérol a un rôle prépondérant dans la prolifération des cellules animales et que sa synthèse est étroitement synchronisée à la progression du cycle cellulaire. Une réduction des niveaux de cholestérol suite au blocage de sa synthèse induit un arrêt de croissance cellulaire (Pelton et al., 2012).

Les tumeurs sont enrichies en cristaux de nature lipidique et les zones atteintes d'HBP présentent une augmentation de cholestérol suggérant un rôle de ce lipide dans un contexte pathologique (White, 1909; Swyer, 1942). Par la suite, l'accumulation de cholestérol a été retrouvée dans d'autres types de cancers comme les tumeurs gastro-intestinales, pulmonaires ou rénales. Les cellules cancéreuses ont une croissance rapide et un métabolisme élevé ce qui requiert une telle quantité de cholestérol que les taux circulants en sont diminués. Ce constat montre donc qu'un faible taux de cholestérol plasmatique est un effet dû au cancer et non une cause (Solomon and Freeman, 2011).

Différents mécanismes ont été mis en évidence : une augmentation du captage du cholestérol circulant dans les leucémies et les tumeurs mammaires (Graziani et al., 2002; Tatidis et al., 2002), associée à la perte des mécanismes régulateurs de l'expression du récepteur des LDL dans les cellules prostatiques (Chen and Hughes-Fulford, 2001) et une augmentation de

l'expression des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol telles que l'HMGCoA reductase au niveau du colon (Caruso et al., 1999). L'ensemble de ces observations favorise la disponibilité intra-cellulaire du cholestérol au cours du développement tumoral.

Par ailleurs, la présence de cholestérol dans les *rafts* lipidiques pourrait être une des voies moléculaires reliant le cholestérol à la tumorigenèse. En effet, deux types de *rafts* lipidiques peuvent être impliqués dans le cancer (Patra, 2008). Les « *Cer-rafts* » sont des domaines enrichis avec des céramides, sphingomyélines et protéines comme FAS (ou Apo-1 ; *Apoptosis antigen-1*), FASL (*FAS Ligand*) et DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) dont le rôle principal est d'induire l'apoptose. A l'inverse, les « *Chol-rafts* » sont riches en cholestérol, sphingomyéline, gangliosides et en protéines telles que les cavéolines, CD44 et les membres de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase qui permettent de réguler l'homéostasie cellulaire. De manière intéressante, il a été montré que les « *Chol-rafts* » peuvent favoriser la transformation maligne des cellules, la progression tumorale, l'angiogenèse et les métastases. Par son rôle de stimulation de la coalescence des *rafts*, le cholestérol participe à l'augmentation de taille de la plateforme de signalisation (Freeman and Solomon, 2011). En effet, plusieurs études ont montré que des protéines critiques pour la croissance et la survie tumorale sont régulées par les *rafts* lipidiques et que des altérations du cholestérol membranaire affectent le signal transmis par ces molécules. En effet, une sous-population de récepteurs à l'EGF (EGFR) est plus active et plus phosphorylée à l'intérieur des *rafts* lipidiques dans les cellules tumorales prostatiques et la voie EGFR peut être régulée lorsque le cholestérol est ciblé (Zhuang et al., 2002; Freeman et al., 2007). Des souris xénotreffées avec des cellules LNCaP qui, par définition, ne possèdent pas les deux gènes *CAVEOLINE* et *PTEN*, présentent une augmentation de la phosphorylation d'AKT ce qui va donc promouvoir leur survie lorsqu'elles sont nourries avec un régime enrichi en cholestérol. En revanche, la simvastatine diminue la phosphorylation d'AKT induite par les *rafts* (Zhuang et al., 2005). Enfin, les souris TRAMP, modèle de cancer de la prostate nourries avec un régime riche en cholestérol présentent une aggravation du phénotype tumoral c'est-à-dire une augmentation du volume de la tumeur, de leur incidence et de l'apparition de métastases pulmonaires. Histologiquement, ces souris ont une augmentation de la prolifération, de l'angiogenèse et de l'expression de *SRBI* (Llaverias et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que le cholestérol exerce un rôle important *in vivo* dans les voies physiologiques mais également dans la carcinogenèse prostatique.

V. Présentation du projet de recherche

En France, le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'Homme en terme de diagnostic et représente la 3^{ème} cause de décès par cancer dans la population masculine (Haute Autorité de Santé, 2012). Parmi les nombreux facteurs de risque, des études épidémiologiques ont mis en évidence l'association entre un régime alimentaire riche en cholestérol et le développement de ce type de cancer. La forte incidence du cancer de la prostate dans les pays occidentaux peut être expliquée en partie par l'alimentation riche en lipides et notamment en cholestérol (Watanabe et al., 2000). En effet, une hypercholestérolémie semble associée à une augmentation du risque de cancer de la prostate (Magura et al., 2008). A l'inverse, la prise de statines, inhibitrices de la synthèse de cholestérol est associée à une diminution du risque de développer un cancer agressif de la prostate (Roy et al., 2011). Cependant, le rôle causal du cholestérol dans la promotion du cancer de la prostate reste difficile à appréhender par des études épidémiologiques.

Les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β sont identifiés comme d'importants régulateurs du métabolisme du cholestérol. L'utilisation d'agonistes pharmacologiques des LXRs (comme le T0901317) sur des cellules tumorales prostatiques humaines en culture a un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique (Fukuchi et al., 2004c; Pommier et al., 2010). L'activation des LXRs augmente également la quantité des transporteurs ABCA1 et ABCG1 permettant l'efflux de cholestérol (Fukuchi et al., 2004b; Pommier et al., 2010). *In vivo*, l'administration orale de T0901317 à des souris immunodéficientes xéno greffées par des cellules LNCaP ralentit la croissance tumorale (Pommier et al., 2010). Par ailleurs, ces travaux antérieurs de l'équipe ont montré qu'il était possible de réguler négativement la phosphorylation d'AKT dans les *rafts* lipidiques des cellules LNCaP en activant les LXRs (Pommier et al., 2010). L'ajout de cholestérol exogène a annulé ces effets, démontrant ainsi que le cholestérol est un modulateur clé dans ce processus. De manière intéressante, l'activation des LXRs exerce un effet anti-prolifératif sur d'autres cancers tels que le sein (Vedin et al., 2009), les ovaires (Rough et al., 2010) et le colon (Uno et al., 2009) et induit l'apoptose de lignées cellulaires de glioblastomes en inhibant les cibles EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR (Guo et al., 2011).

L'ensemble de ces données suggère que les LXRs sont des acteurs modulateurs de la prolifération et de l'apoptose des cellules tumorales.

Dans ce cadre, les objectifs de ma thèse étaient d'évaluer : **1) l'effet de l'absence des LXRs sur des cellules épithéliales prostatiques murines ; 2) les effets d'un**

**régime enrichi en cholestérol dans le développement du cancer de la prostate ;
3) le rôle protecteur ou non des LXR α dans les processus de carcinogène
prostatique.**

**1) Quel est l'effet de l'absence des LXR α sur des cellules épithéliales
prostatiques murines (Article 1) ?**

Les données de la littérature suggèrent que les LXR α sont des acteurs pouvant moduler la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales prostatiques et que ce rôle pourrait impliquer leur capacité à limiter la concentration intra-cellulaire de cholestérol. Nous avons ainsi dérivé des cellules épithéliales à partir de prostate dorsale (MPECs) de souris sauvages ou *Lxr α β ^{-/-}* ce qui nous donne la possibilité d'étudier l'impact moléculaire de la perte des LXR α sur des cellules épithéliales normales. Les résultats obtenus indiquent que l'activation des LXR α entraîne une diminution de la prolifération uniquement dans les cellules sauvages, Nous montrons donc que : 1) les LXR α exercent leur effet inhibiteur du cycle cellulaire sur des cellules épithéliales prostatiques saines en mettant en jeu les voies AKT et/ou MAPK et 2) les cellules MPECs sont un modèle pertinent pour étudier les mécanismes moléculaires reliant les LXR α au cycle cellulaire.

**2) Quels sont les effets d'un régime enrichi en cholestérol dans le
développement du cancer de la prostate (Article 2) ?**

Nous avons caractérisé le phénotype prostatique des souris *Lxr α β ^{-/-}* nourries avec un régime enrichi en cholestérol. Ces animaux présentent les premiers signes d'un développement tumoral caractérisé par une hyperplasie épithéliale due à une hyperprolifération ainsi qu'une diminution d'expression de certains gènes suppresseurs de tumeur. L'absence de phénotype prostatique dans les souris sauvages nourries avec le régime enrichi en cholestérol montre que la présence des LXR α s'oppose à l'accumulation de cholestérol et prévient l'initiation du développement tumoral. Les LXR α semblent donc exercer un rôle protecteur lors d'une exposition à des quantités importantes de cholestérol au sein de la prostate.

**3) Les LXR α sont-ils ciblés par les processus de carcinogène
prostatique (Projet 3) ?**

Il n'existe aucune donnée *in vivo* concernant les LXR α et l'effet de leurs ligands sur des modèles transgéniques de cancer de la prostate. Nous avons choisi d'utiliser les souris *PBcre4 x Pten^{loxP/loxP}* (*Pten^{-/-}*) (Wu et al., 2001; Lesche et al., 2002). Ces animaux présentent une

inactivation du gène suppresseur de tumeur *Pten* spécifiquement au niveau de l'épithélium prostatique et constituent le modèle transgénique le plus proche de la pathologie humaine (Wang et al., 2003) (modèle détaillé dans le Chapitre III 3 B c).

Nous avons réalisé une étude cinétique de l'apparition des lésions tumorales dans les lobes prostatiques des souris *Pten*^{-/-} à 8, 11 et 20 semaines. L'apparition de PIN de bas grade est observée dès 8 semaines et de haut grade à partir de 11 semaines. De manière intéressante, nous avons pu montrer une mobilisation de la voie des LXRs au cours de la carcinogénèse prostatique. Il pourrait s'agir d'un mécanisme de défense de la cellule utilisé pour contrer l'augmentation massive de cholestérol intra-cellulaire. Nous nous sommes ensuite demandé quel serait l'effet d'une modulation pharmacologique des LXRs sur la carcinogénèse prostatique. D'une part, nous avons pu montrer que la voie des LXRs ne répond plus à un traitement par l'agoniste T0901317 dans les souris *Pten*^{-/-} suggérant qu'elle est activée de manière constitutive. D'autre part, nous avons mis en place une lignée murine *Pten*^{-/-} *Lxra*^β^{-/-}. Les résultats préliminaires montrent une augmentation de la prolifération voire une progression tumorale accélérée par rapport aux animaux *Pten*^{-/-} confirmant ainsi le rôle protecteur des LXRs dans la prostate.

RÉSULTATS

Article 1 :

Lack of Liver X Receptors leads to cell proliferation in a model of mouse dorsal prostate epithelial cell. PLOS ONE 2013.

Présentation du contexte scientifique

Des études soulignent l'implication des récepteurs nucléaires LXR_s dans plusieurs pathologies prostatiques telles que l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) et le cancer (Chuu et al., 2007; Viennois et al., 2011). Les souris *Lxrα*^{-/-} présentent un phénotype proche de l'HBP caractérisé par un élargissement du lobe ventral et une activité hyper-sécrétrice de l'épithélium (Kim et al., 2009; Viennois et al., 2012). L'utilisation d'agonistes pharmacologiques des LXR_s comme le T0901317 provoque une diminution de la prolifération et une induction de l'apoptose des cellules tumorales prostatiques humaines (Fukuchi et al., 2004b; Pommier et al., 2010). *In vivo*, l'administration orale de T0901317 à des souris immunodéficientes xéno greffées par des cellules LNCaP ralentit la croissance tumorale (Chuu et al., 2006). L'activation des LXR_s entraîne une augmentation de l'expression des gènes codant les transporteurs *ABCA1* et *ABCG1* impliqués dans l'efflux de cholestérol (Fukuchi et al., 2004a; Pommier et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que les LXR_s sont des acteurs pouvant moduler la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales prostatiques et que le rôle pourrait impliquer leur capacité à limiter la concentration intracellulaire de cholestérol.

La caractérisation précise des mécanismes moléculaires est souvent complexe sur un organe entier. La disponibilité de cellules en culture permet de simplifier cette approche ; c'est pourquoi nous avons dérivé des cellules épithéliales du lobe prostatique dorsal (MPECs) de souris sauvages ou *Lxrαβ*^{-/-}. Nous avons souhaité répondre aux questions suivantes :

- 1) Quel est le rôle physiologique des LXR_s sur des cellules prostatiques non-tumorales ?
- 2) Les LXR_s contrôlent-ils le cycle cellulaire dans les cellules prostatiques non-tumorales ?
- 3) Les cellules MPECs sont-elles un bon modèle pour l'étude du rôle des LXR_s dans la prostate ?

Lack of Liver X Receptors Leads to Cell Proliferation in a Model of Mouse Dorsal Prostate Epithelial Cell

Julie Dufour^{1,2,3,4}, Aurélien Pommier^{1,2,3,4}, Georges Alves^{1,2,3,4}, Hugues De Boussac^{1,2,3,4}, Corinne Lours-Calet^{1,2,3,4}, David H. Volle^{1,2,3,4}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{1,2,3,4}, Silvère Baron^{1,2,3,4*}

1 Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement (GRéD), Clermont-Ferrand, France, 2 CNRS, UMR 6293, GRéD, Aubiere, France, 3 INSERM, UMR 1103, GRéD, Aubiere, France, 4 Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Recent studies underline the implication of Liver X Receptors (LXRs) in several prostate diseases such as benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer. In order to understand the molecular mechanisms involved, we derived epithelial cells from dorsal prostate (MPECs) of wild type (WT) or *Lxrαβ*^{-/-} mice. In the WT MPECs, our results show that LXR activation reduces proliferation and correlates with the modification of the AKT-survival pathway. Moreover, LXRs regulate lipid homeostasis with the regulation of *Abca1*, *Abcg1* and *Idol*, and, in a lesser extent, *Srebp1*, *Fas* and *Acc*. Conversely cells derived from *Lxrαβ*^{-/-} mice show a higher basal phosphorylation and consequently activation of the survival/proliferation transduction pathways AKT and MAPK. Altogether, our data point out that the cell model we developed allows deciphering the molecular mechanisms inducing the cell cycle arrest. Besides, we show that activated LXRs regulate AKT and MAPK transduction pathways and demonstrate that LXRs could be good pharmacological targets in prostate disease such as cancer.

Citation: Dufour J, Pommier A, Alves G, De Boussac H, Lours-Calet C, et al. (2013) Lack of Liver X Receptors Leads to Cell Proliferation in a Model of Mouse Dorsal Prostate Epithelial Cell. PLoS ONE 8(3): e58876. doi:10.1371/journal.pone.0058876

Editor: Makoto Makishima, Nihon University School of Medicine, Japan

Received: November 14, 2012; **Accepted:** February 7, 2013; **Published:** March 12, 2013

Copyright: © 2013 Dufour et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by research grants from Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Allier committee), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and Cancéropôle Lyon Rhône-alpes Auvergne (CLARA). A. Pommier and J. Dufour were funded by MNERT and ARC grants. G. Alves was funded by Région Auvergne program. H. De Boussac was funded by Région Auvergne "Nouveau Chercheur" program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: J-M Lobaccaro is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

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

Introduction

Patient cohorts and human cancer cell lines give suitable biological samples to identify genetic defects correlated with disease but are still limited to investigate the molecular mechanisms involved. *In vivo* mouse models of prostate cancer represent a powerful tool to complement these human studies. A second advantage is that mice provide the possibility to derive long-term cell culture system genetically engineered. Hence, we have developed a useful cell culture system of prostatic epithelial cells (MPECs) from wild-type (WT) and transgenic mice with genetic ablation of both isoforms of the Liver X Receptor (*Lxr*). *LXRα* (NR1H3) and *β* (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily and act as ligand-inducible transcription factors when heterodimerized with the Retinoid X Receptor (RXR, NR2B1 to B3). LXRs are involved in numerous physiological regulations such as cholesterol, fatty acids and glucose homeostasis, steroidogenesis and immunity [1,2]. Various studies have highlighted the therapeutic potential of LXR agonists in the treatment of prostate diseases such as benign prostatic hyperplasia (BPH) [3,4] and prostate cancer [5,6]. Indeed, LXR agonists like T0901317 slow down proliferation of various prostate cancer cell lines and decrease growth of prostate cancer cells in xenografted nude mice [7–9]. This lower proliferation of human prostatic cancer cell line LNCaP is characterized by a reduced amount of cells in S phase

correlated with an accumulation of SKP2, a kinase involved in the degradation of cell cycle inhibitors. This cell cycle regulation was proposed to be connected with cholesterol homeostasis through LXR-regulated expression of the cholesterol transporter ABCA1 that supports cholesterol efflux [10]. Additionally, LXR activation by the synthetic ligand T0901317 results in a decrease of cell survival. The lowering of cellular cholesterol induced by the cholesterol transporter ABCG1 accumulation leads to a reduction in lipid raft size inactivating the AKT pathway and consequently limiting cell survival ability [9]. These previous studies demonstrated a putative combined anti-proliferative and pro-apoptotic effect of LXR activation in prostate cancer cell lines, suggesting a protective role of these nuclear receptors in this cancer *via* their effects on the cell cycle and apoptosis balance [11].

Even if prostate is anatomically different between human and mouse since the rodent prostate is divided into distinct lobes whereas three zones are found in human [12], transcriptional analyses linked the mouse dorsolateral lobe to the human peripheral zone which develops cancer [13].

Here, we present an original prostate epithelial cell model derived from the dorsal lobe of WT or *Lxrαβ*^{-/-} mice. This new cell models allowed deciphering the role of LXRs on cell cycle regulation.

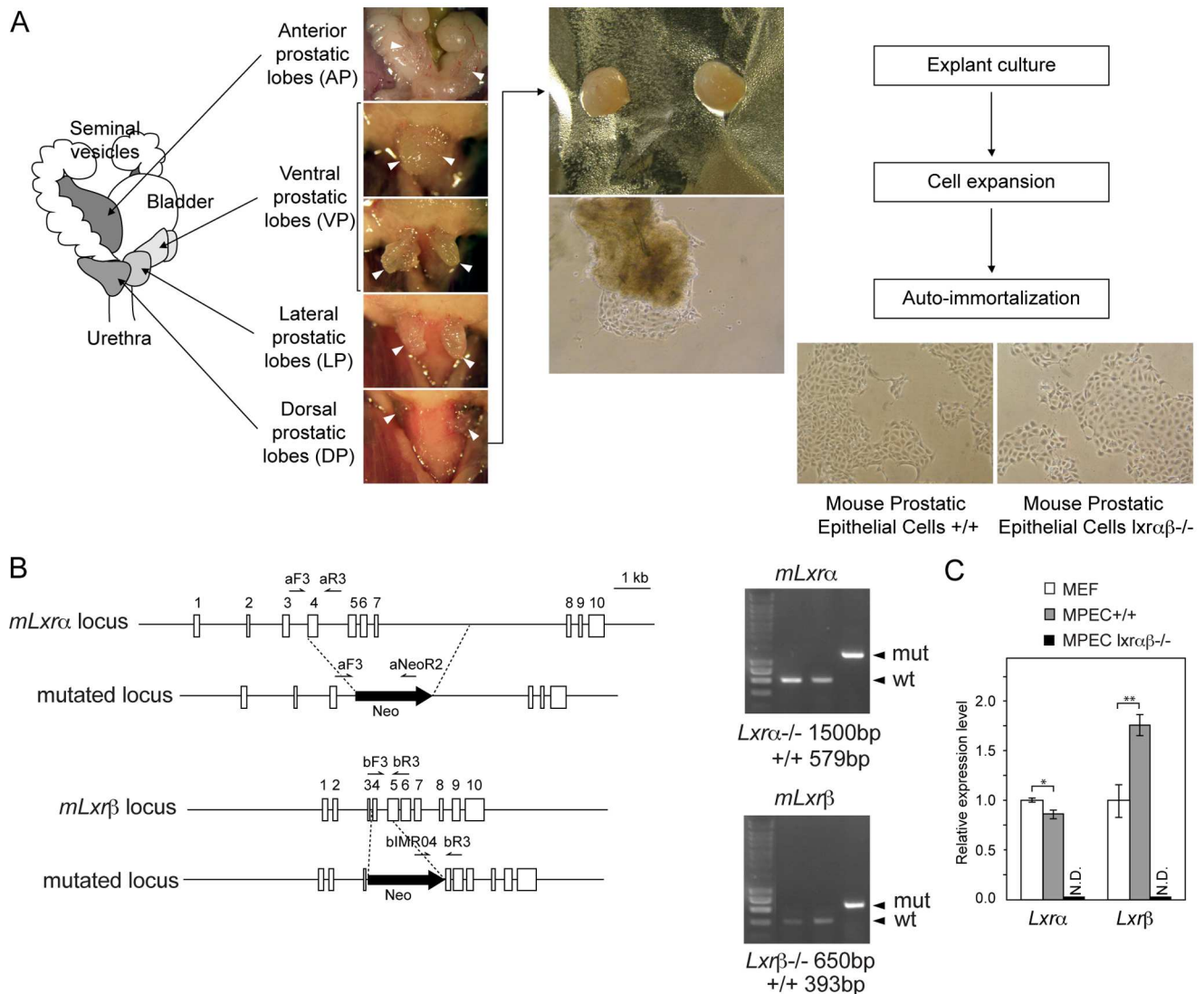


Figure 1. Establishment of WT and $Lxra\beta^{-/-}$ MPECs from dorsal prostate. (A) Schematic mouse prostate lobe representation (left panel). Dissected prostate sample pictures during necropsy (middle panel) and explant migration/primary epithelial cell culture (right panel). (B) Schematic representation of $Lxra$ and $Lxr\beta$ wild type and recombinant genomic loci. Primer $\alpha F3$, $\alpha R3$, NeoR2 and $\beta F3$, $\beta R3$, IMR04 respectively used to genotype $Lxra$ and $Lxr\beta$ are depicted (previously described [24], D.J. Mangelsdorf personal communication). PCR analysis of WT and $Lxra\beta^{-/-}$ MPEC genomic DNA Lane 1: WT mouse embryonic fibroblasts (MEF); lane 2, WT MPECs; lane 3, $Lxra\beta^{-/-}$ MPECs. (C) qPCR analysis of $Lxra$ (*nr1h3*) and $Lxr\beta$ (*nr1h2*) accumulation in MPECs and MEFs, (N.D. not detectable). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in Student's *t* test. Error bars represent mean \pm SEM. (qPCR analysis results from 4 independent experiments and was normalized using *36b4* gene). doi:10.1371/journal.pone.0058876.g001

Materials and Methods

Mouse Prostate Epithelial Cells (MPECs) Establishment

$Lxra$ and $Lxr\beta$ double knockout mice ($Lxra\beta^{-/-}$) and their wild-type controls 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. They were fed *ad libitum* with water and Global-diet 2016S (Harlan, Gannat, France). This study was carried out in strict accordance with the recommendations of French national standards and policies (D 63 104 19). Mice were killed by cervical dislocation and prostates harvested during necropsy in order to use in cell culture systems. The protocol was approved by local ethic committee - Permit Number: CE21-11 / CE75-12 (CEMEEA - Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne, <https://www1.clermont.inra.fr/>

cemeaa). The culture procedure was derived from that one used to develop the mouse vas deferens epithelial cells [14]. Briefly, mouse prostate epithelial cells (MPECs) were harvested from the dorsal prostate lobes from 20 to 30 day old mice, wild type (WT) or lacking both LXRs ($Lxra\beta^{-/-}$), and transferred onto cell culture inserts (BD Falcon TM, Fontenay-sous-Bois, France) coated with a thin layer of extracellular matrix gel (Sigma Aldrich, L'isle d'Abeau, France). Cells were cultured in complete medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F12 (50:50; Invitrogen, Oslo, Norway) supplemented with 0.5% fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France), cholera toxin (10 ng/ml), epidermal growth factor (5 ng/ml), penicillin and streptomycin (100 μ g/ml), insulin (5 μ g/ml), transferrin (10 μ g/ml), L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), ethanolamine (0.6 μ g/ml), cAMP (25 μ g/ml), selenium (17.3 ng/ml) and hydrocortisone (10 nM)]

at 37°C in a humidified air 5% CO₂ incubator. The extracellular matrix gel was set by incubation at 37°C for 30 min. All the chemicals were from Sigma Aldrich unless indicated. Growth medium was changed every 2 days. Upon confluence, cells were re-plated in the same conditions at split ratio 1:2 until they survived senescence, typically after six passages. After this point, cells were transferred onto 100 mm culture dishes every 3-4 days at a 1:5 to 1:10 split ratio.

Genotyping

Lxrα and *Lxrβ* loci with the neo cassette as well as the location of the primers are indicated on Fig. 1B. Primers used (kind gift from D.J. Mangeldorf, Dallas, TX) are for *Lxrα* forward primer αF3:5'-ATGGAGAATGCCTAGCTAGG-3' and two reverse primers, αR3:5'-TCTCACTACGTAGCTCTTGG-3' and NeoR2:5'-AAGAAGTTCGTAAGAAGGCGA-3'; for *Lxrβ* two forward primers βF3:5'-CCTTTTCTCCCTGACACCG-3' and IMRO4:5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' and a reverse primer βR3:5'-GCATCCATCTGGCAGGTTTC-3'. An example of PCR genotyping is shown in Fig. 1C. Presence of *Lxrα* and *Lxrβ* wild-type loci is characterized by a fragment of 579 and 393 bp, respectively; recombined *Lxrα* and *Lxrβ* loci show a fragment of 1500 and 650 bp, respectively.

Reagents

22(R)-hydroxycholesterol and GW3965 were purchased from Sigma-Aldrich and T0901317 from Cayman Chemical (Montigny-le-Bretonneux, France). All ligands used in cell culture were diluted in DMSO. PD98059 (CAS 167869-21-8) was purchased from Millipore (Billerica, MA, USA) and LY-294002 (ST-420-0025) from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France).

Cell Culture and Treatment

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured in DMEM supplemented with L-glutamine (2 mM) and penicillin streptomycin (100 µg/ml). MPECs were trypsinized and seeded at 3×10⁵ cells in 10 mm culture dishes. After 16h cells were starved for 24h in a minimal medium DMEM-F12 (50:50, Invitrogen) supplemented with L-glutamine (2 mM) and penicillin streptomycin (100 µg/ml) and then with the same medium containing DMSO, T0901317, GW3965 or 22(R)-hydroxycholesterol for 48h. Cells were harvested and protein or RNA extraction, or flow cytometry analyses were performed.

MTT Assay

MTT assay was performed according to manufacturer instructions (Sigma Aldrich). Briefly, cells were washed in PBS. MTT reagent (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, M 2128, Sigma Aldrich) was added and incubated at 37°C for 3 hrs. After MTT reagent removal, MTT solvent (10 % Triton 100X and 0.1 N HCL in anhydrous isopropanol) was added. Absorbance was determined in a Microwell plate reader (Model 680, Biorad, Marnes-La-Coquette, France).

Flow Cytometry Analysis

Cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in RNase A (500 µg/ml), propidium iodide (50 µg/ml) solution and kept 1h at 4°C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter fluorescence-activated cell sorter. At least 15,000 events were measured for each sample.

Quantitative PCR

mRNA were extracted using the NucleoSpinRNAII kit (Macherey Nagel EURL, Hoerd, France). cDNA was synthesized with 200U of Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Promega), 5 pmol of random primers (Promega), 40 U RNAsin (Promega) and 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate. Quantitative PCR was performed on a Mastercycler ep Realplex (Eppendorf, LePecq, France) using MESA GREEN quantitative PCR masterMix Plus for SYBR (Eurogentec, Angers, France). Primer sequences are *mLxrα* Fw: 5'-AGGAGTGTGACTTCGCAAA-3', *mLxrα* Rev: 5'-CTCTTCTTGGCGCTTCAGTTT-3'; *mLxrβ* Fw: 5'-AAGCAGGTGCCAGGGTCT-3', *mLxrβ* Rev: 5'-TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT-3'; *mTenascin* Fw: 5'-GTCGTCTGGACACCAGGCC-3', *mTenascin* Rev: 5'-CAGGGCCGGCATAGCCTTCG-3'; *mSnail* Fw: 5'-GTAA-CAAGGATACCTCAGC-3', *mSnail* Rev: 5'-CTGGTATCTCTTACATCCG-3'; *mCk8* Fw: 5'-GGTGTCCGGGGCATCACAGC-3', *mCk8* Rev: 5'-CTGCCGGCGGAGTTGTTGA; *mE-cadherin* Fw: 5'-ACGTCCATGTGTGACTGTG-3', *mE-cadherin* Rev: 5'-AGGAGCAGCAGGATCAGAATC-3'; *mAbca1* Fw: 5'-GGAGCTGGGAAGTCAACAAC-3', *mAbca1* Rev: 5'-ACATGCTCTCTCCCGTCAG-3'; *mAbcg1* Fw: 5'-GCTGTGCGTTTTGTGCTGTT-3', *mAbcg1* Rev: 5'-TGCAGCTC-CAATCAGTAGTCTAA-3'; *mIdol* Fw: 5'-AGCGCCCTC-TACCGAGCCAT-3', *mIdol* Rev: 5'-CGCCAAGTGGCCCTT-CAGGT-3'; *mSrebp1* Fw: 5'-GCCTGTACAGCGTGGCTGGG-3', *mSrebp1* Rev: 5'-TCTCCGTCAGCTGCCCTGG-3'; *mAcc* Fw: 5'-ACTTCCCGACCAAGGACTTTG-3', *mAcc* Rev: 5'-ACAGTGGAGCTAGAATTGGAC-3'; *mFas* Fw: 5'-CCCCAACCTGAGATCCCA-3', *mFas* Rev: 5'-TTGATGCCACGTTGCC-3'; *m36b4* Fw: 5'-GTCAGTGTGCCAGCTCAGAA-3', *m36b4* Rev: 5'-TCAATGGTGCCTCTGGAGAT-3'.

Western Blot Analysis

Proteins were extracted in Hepes 20 mM, NaCl 0.42 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM and NP40 1% supplemented with PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich), Complete 1X (Roche Diagnostics, Meylan, France), NaF 0.1 mM, Na₃VO₄ 0.1mM and 0.5 mM DTT (Sigma-Aldrich). Lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 15000 g. Total proteins were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-ECL membrane (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against either human ABCA1 (NB400-105, Novus Biologicals, Littleton, USA), βActin (A2066, Sigma Aldrich), p42/44 (MS670, Sigma-Aldrich), AKT (#9272, Cell Signaling, Danvers, MA), PhosphoS473-AKT (#2118-1, Epitomics, Burlingame, USA), PhosphoT308-AKT (#2965, Cell Signaling), Gsk3β (#9315, Cell Signaling), PhosphoGSK3β (#9336, Cell Signaling), Pten (#9559, Cell Signaling), Bad (#9292, Cell Signaling), PhosphoBad (#4366S, Cell Signaling), Srebp1 (MS-1207-P, ThermoScientific, Brebières, France), Phospho-p42/44 (#4370, Cell Signaling), CK18 (H-80) (SC-28264, Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA), PSCA (SC-28819, Santa-Cruz), p21 (SC-397, Santa-Cruz), p27 (SC-528, Santa-Cruz), CyclinE (SC-481, Santa-Cruz), cdk4 (SC-260, Santa-Cruz), CyclinD1 (SC-718, Santa-Cruz), Cdk2 (SC-163, Santa-Cruz), α-Tubulin (T6074, Sigma Aldrich). One hour incubation was done with peroxidase conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse (P.A.R.I.S, Compiègne, France) and detection performed using a Western Lightning System kit (PerkinElmer, Villebon sur Yvette, France).

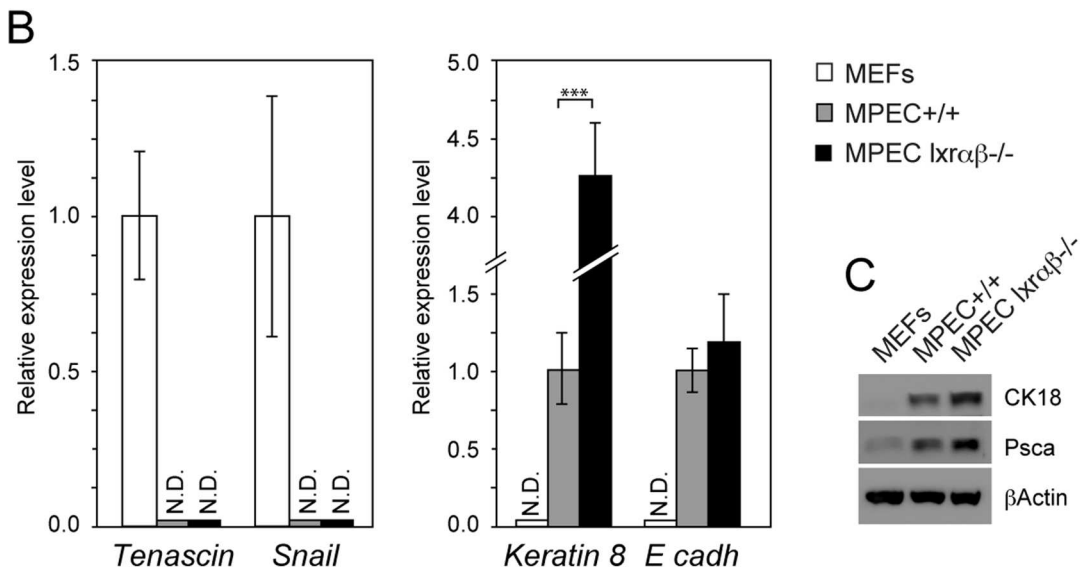
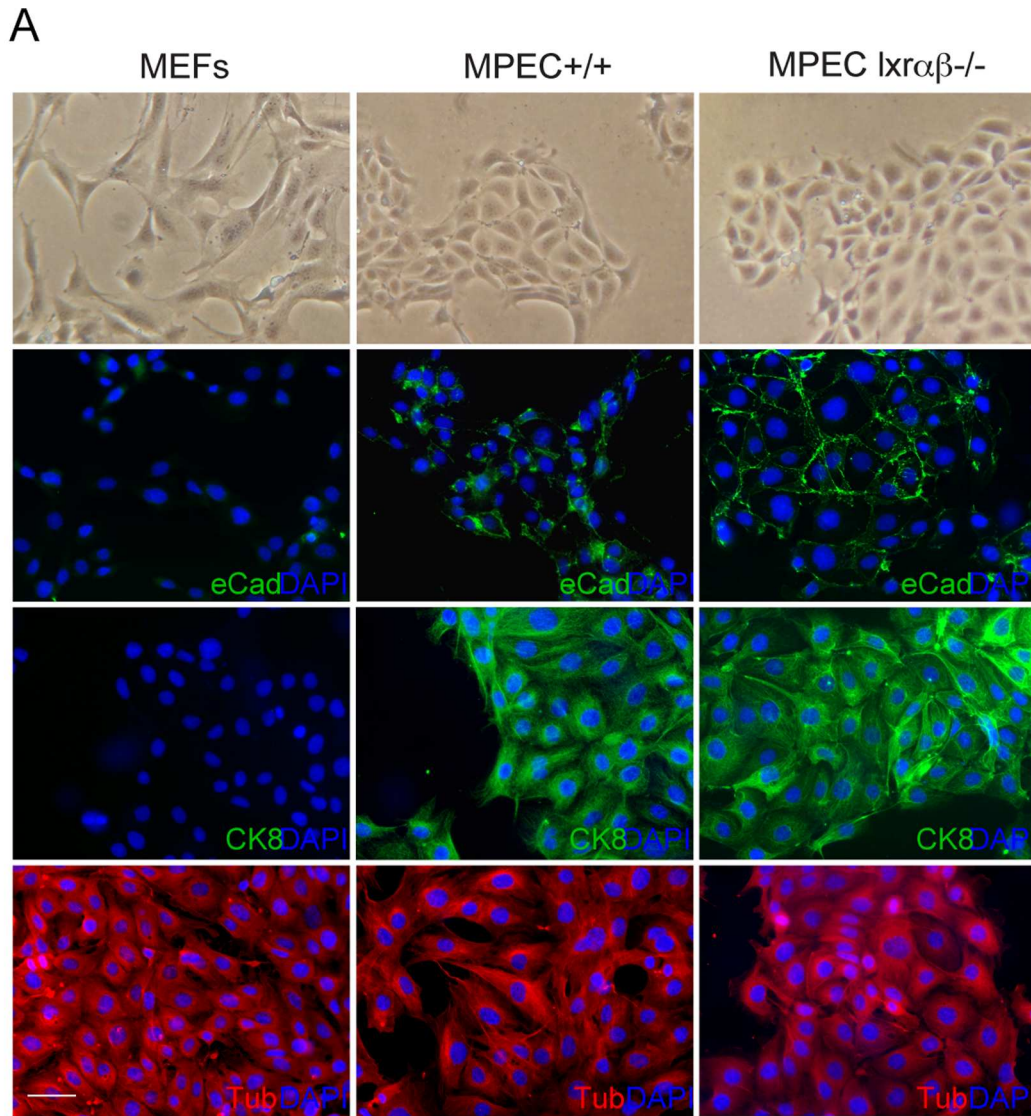


Figure 2. Analysis of stromal and epithelial markers in WT or *Lxrαβ*^{-/-} MPECs. (A) WT and *Lxrαβ*^{-/-} MPECs and WT MEFs were immunostained using anti-E-cadherin (E-Cad), anti-Cytokeratin8 (CK8) and anti- α Tubulin (Tub) antibodies. Scale bar 100 μ m. (B) mRNA relative levels of *Tenascin*, *Snail*, *Keratin 8* and *E-cadh* were measured in WT MEFs, WT (+/+) and *Lxrαβ*^{-/-} MPECs by qPCR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ in Student's *t* test. Error bars represent mean \pm SEM. (qPCR analysis results from 3 independent experiments and was normalized using *36b4* gene) (C) Western blot analysis was performed on WT MEFs, WT (+/+) and *Lxrαβ*^{-/-} MPECs using CK8, Pcsa antibodies. β Actin was used as a loading control. doi:10.1371/journal.pone.0058876.g002

Cell Immunofluorescence

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in PBS Triton X-100 0.1%. Detections were performed using anti-CK8 (Covance, Princeton, NJ), anti-Ecadherin (Sigma Aldrich), anti- β tubulin (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France), anti-PhosphoS473-AKT (Epitomics) and revealed with Alexa 488-conjugated anti-rabbit and Alexa 555-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Invitrogen). Slides were mounted with PBS/glycerol and were visualized with a Carl Zeiss Axiocam digital camera on a Zeiss Axioplan 2 microscope.

Lipid Analysis

After permeabilisation with triton-X100 10%, lipid staining was performed using Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) as already described [15].

Statistical Analysis

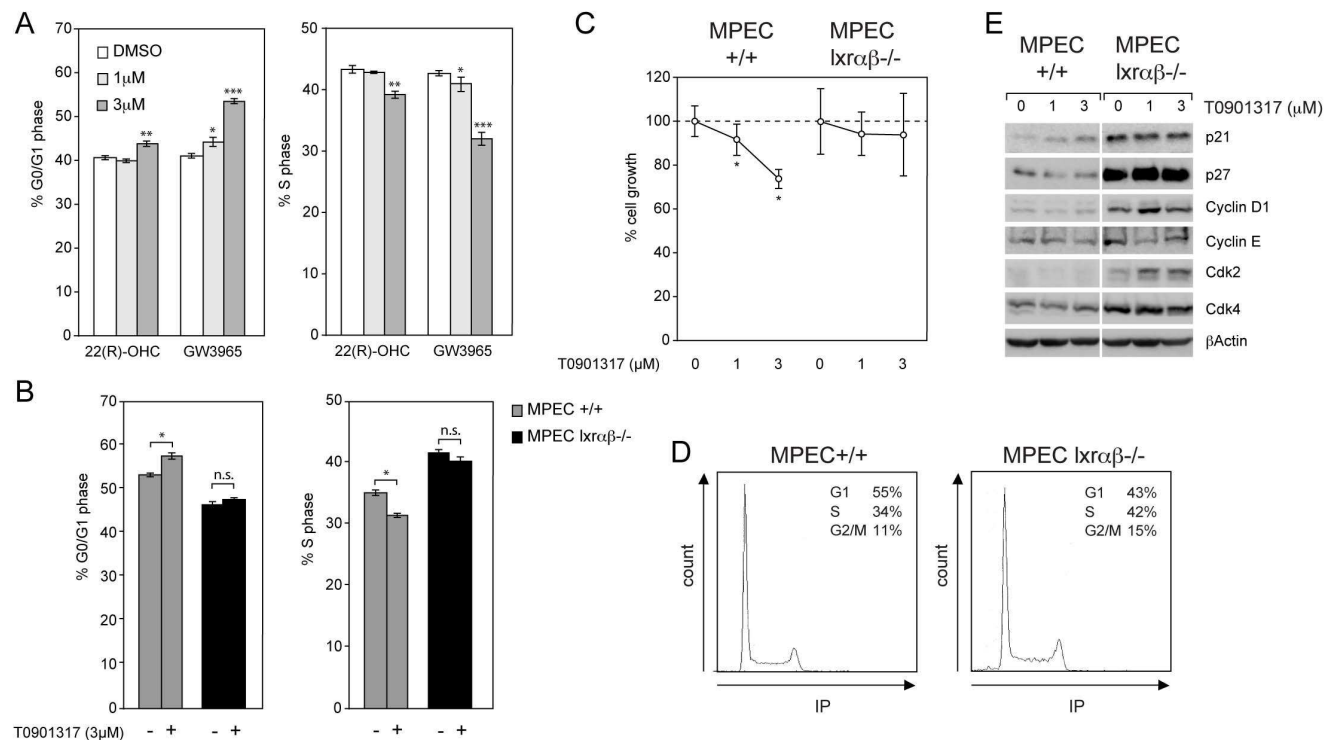
Values are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were performed using a two-tailed Student's *t* test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Establishment of MPECs from Mouse Dorsal Prostate Lobe Explant

To generate MPEC culture, dorsal prostate lobes were dissected from wild-type (WT) and *Lxrαβ*^{-/-} mice (Fig. 1A). Prostate samples were minced and seeded onto ECM-coated plates in epithelial specific defined-medium (procedure details were recapitulated in *Methods* section). Cells migrated from the explant and culture was maintained until auto-immortalization of epithelial cells. Upon immortalization, cell genotypes were checked by PCR (Fig. 1B), and *Lxrα* and *Lxrβ* transcript accumulations were determined and compared to WT MEFs (Fig. 1C). It appears that *Lxrα* slightly shows similar levels between MPECs and MEFs, while *Lxrβ* is more accumulated in MPECs than in MEFs. As expected, both messengers were undetectable in *Lxr*^{-/-} MPECs.

Once cultured, MPECs formed islands and displayed typical cobblestone features of epithelial cells compared to spindle shape of MEFs (Fig. 2A). In order to check for contamination of the culture by stromal fibroblasts, stromal and epithelial differentiation markers were investigated. Absence of both *Tenascin* and *Snail* expressions avoid potential contamination by mesenchymal cells



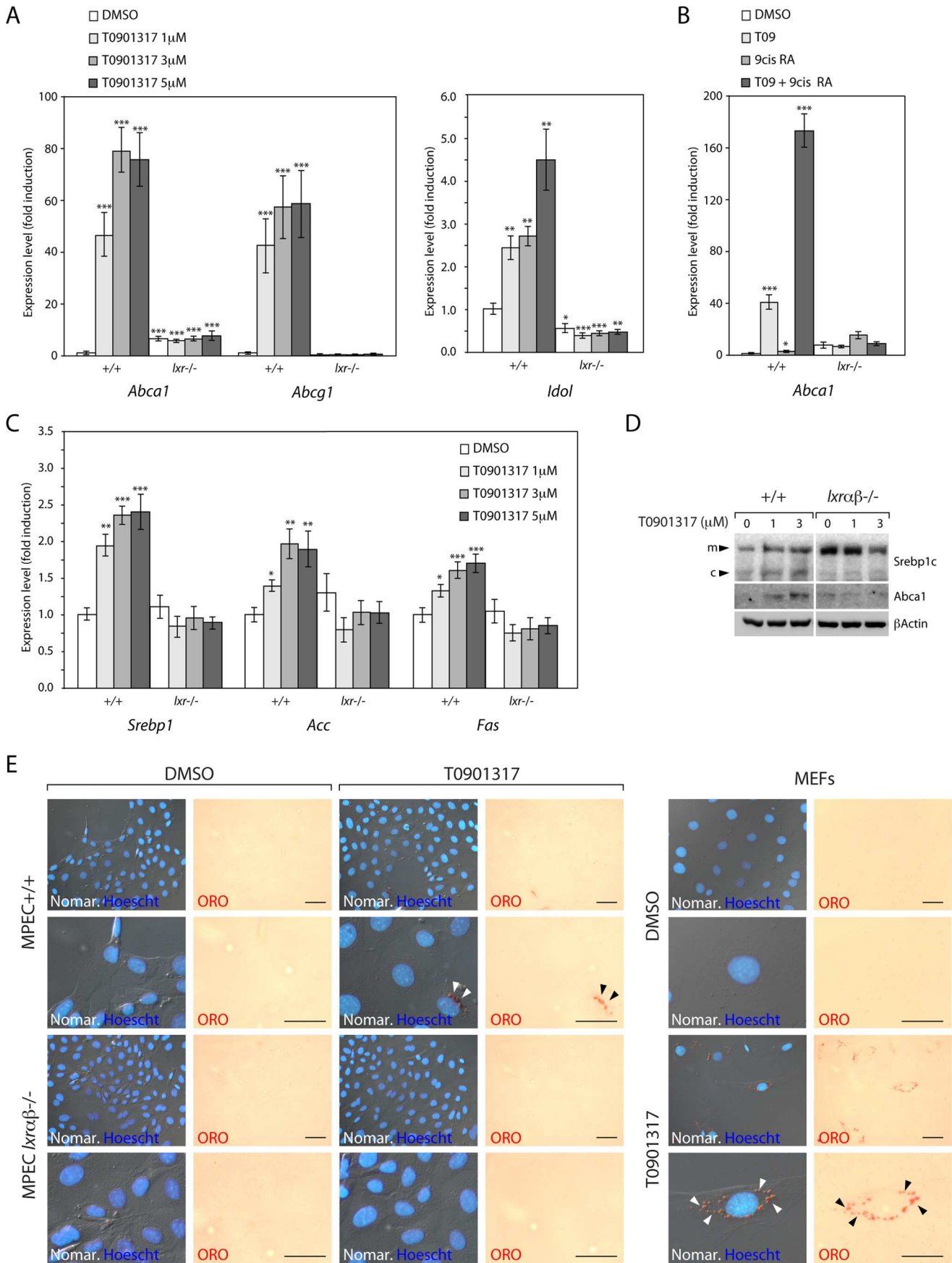


Figure 4. LXRs control expression of genes involved in cholesterol homeostasis and fatty acid synthesis in MPECs. (A) qPCR analysis of *Abca1*, *Abcg1* and *Idol* levels in WT (+/+) and *Lxr α β* ^{-/-} (*lxr*^{-/-}) MPECs after DMSO (vehicle) or T0901317 stimulation (B) Effect of 9-*cis* retinoic acid and/or T0901317 stimulation on *Abca1* accumulation levels in WT (+/+) and *Lxr α β* ^{-/-} (*lxr*^{-/-}) MPECs (C) qPCR analysis of *Srebp1c*, *Acc*, and *Fas* levels in WT (+/+) and *Lxr α β* ^{-/-} (*lxr*^{-/-}) MPECs after DMSO (vehicle) or T0901317 stimulation. (qPCR analysis results from 4 independent experiments and was normalized using *36b4* gene). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 in Student's *t* test. Error bars represent mean \pm SEM. (D) Western blot analysis was performed on WT (+/+) or *Lxr α β* ^{-/-} MPECs using *Srebp1c*, *Abca1* and β -Actin antibodies. (E) Oil-Red O staining (ORO) and Normarski/Dapi of WT (+/+) and *Lxr α β* ^{-/-} MPECs, or WT MEFs, treated for 48h with DMSO (vehicle) or T0901317 (1 μ M). Head arrows indicate lipid droplets. Scale bars 100 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0058876.g004

(Fig. 2B). Immunofluorescence and qPCR detection of specific markers *E-cadherin* and *Cytokeratin 8* confirmed the epithelial origin of the culture (Fig. 2A,B), and as expected these markers were absent in MEFs. The epithelial characteristics of the MPECs were strengthened by accumulation of CK18 and PSCA proteins (Fig. 2C). We concluded that MPECs could be considered as a good tool to study the physiological role of LXRs in epithelial cells from dorsal prostate.

LXRs Control Cell Proliferation in MPECs

LXR agonists have been previously described to exert anti-proliferative activities [16]. Thus, we investigated the effect of *Lxr*-ablation in MPECs. Treatments with various concentrations of 22R-hydroxycholesterol, a natural LXR-ligand, or GW3965, a synthetic LXR-ligand, on WT MPECs result in a dose-dependent accumulation of cells in G0/G1 phases and conversely a decrease of the percentage of cells in S phase (Fig. 3A). These observations show that the effect of the ligands on cell cycle is also visible in non-cancerous cells and is rather an intrinsic property of prostate epithelial cells. The effect of T0901317 (synthetic LXR ligand) was analyzed on *Lxr α β* ^{-/-} MPECs and, as expected, had no effect on cell cycle (Fig. 3B) and proliferation (Fig. 3C). Interestingly, *Lxr α β* ^{-/-} MPECs exhibit a higher basal proliferation (Fig. 3B and D). LXRs are thus regulators of cell cycle, which correlates with Cyclin D1 and Cdk2 protein accumulation (Fig. 3E). While GW3965 or T0901317 treatment decreases proliferation in WT MPECs, these ligands have no effect on *Lxr α β* ^{-/-} MPECs (Fig. 3B). It could thus be concluded that GW3965 or T0901317 cell cycle inhibition is strictly LXR-dependent in MPECs, without potential interferences with other nuclear receptors. Interestingly, although T0901317 induction increased p21 cell-cycle inhibitor accumulation in WT MPECs that is consistent with proliferation decrease, *Lxr α β* ^{-/-} MPECs reached a high and constitutive level of p21 that contrasts with the high proliferative rate (Fig. 3E). Paradoxically, p21 targets Cdk2/4, CyclinD1 and CyclinE were increased in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs indicating that driving forces leading to proliferation overcome p21 regulation. Concomitantly to p21 deregulation in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs, p27, initially identified as a downstream target of LXR activation in LNCaP cells [7], exhibit a strong accumulation as well. As observed in prostate cancer PTEN-null mice model, we postulated that p21 and p27 accumulation level in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs could result from a defensive mechanism to counterbalance the proliferation increase due to the combined lack of *Lxr α* and *Lxr β* [17].

LXRs and Lipid Homeostasis in MPECs

As LXRs are transcription factors involved in cholesterol and fatty acids metabolism regulation, we have analyzed the effects of LXRs on these metabolic pathways. WT and *Lxr α β* ^{-/-} MPECs were treated with increasing amounts of T0901317 and expression of well-known LXR target genes was analyzed by qPCR. As expected, WT MPECs displayed increased accumulation of *Abca1* and *Abcg1*, encoding cholesterol transporters, after LXR activation

(Fig. 4A, left). A higher basal level of *Abca1* was observed in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs, as already described [18]. Conversely, no increased accumulation of *Abca1* and *Abcg1* was seen in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs. *Idol* whose product controls the degradation of LDL-receptor (LDLR) is induced by T0901317 (Fig. 4A, right), indicating that the LXR target genes involved in cholesterol homeostasis are inducible in MPECs. Co-stimulation of LXR/RXR heterodimer by T0901317 and 9-*cis* retinoic acid reproduces the canonical synergistic transcriptional activation of *Abca1* expression (Fig. 4B), thus demonstrating that LXR-signaling pathway is fully functional in immortalized MPECs. Interestingly, LXR-target genes involved in fatty acid synthesis such as *Srebp1c*, *Acc* and *Fas* showed a modest but significant increase in their expression when LXRs are activated in WT MPECs (fold range induction $\times 1.7$ to $\times 2.4$) (Fig. 4C). These findings were correlated with western blot analyses in which WT MPECs displayed increased protein accumulation of ABCA1 and the non-cleaved form of SREBP1c in response to T0901317, conversely to what was observed in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs (Fig. 4D). Altogether, expression profiles of genes involved in lipogenesis postulate for a tenuous storage of triglycerides in MPECs in response to LXR activation. Oil red-O staining confirm that point since a few number of cells exhibits lipid droplets filling (Fig. 4E) in WT MPECs compared to MEFs treated with T0901317 (Fig. 4F). These results show that in WT MPECs, LXRs can be efficiently activated and subsequently reproduces canonical LXR mediated lipid metabolism regulation.

LXRs are Connected to AKT and MAPK Transduction Pathways

Previous studies showed that LXR activation could impact transduction pathways such as PI3K/AKT signaling in human prostatic cancer cell lines [9]. To examine whether such regulation was still present in MPECs, we monitored various protein accumulations and/or phosphorylations involved in this transduction pathway. Both AKT phosphorylation of Serine 473 (pAKT S473) and Threonine 308 (pAKT T308) are sensitive to T0901317 or 22(R)-hydroxycholesterol treatment, as described in LNCaP cells (Fig. 5A,B). As expected this sensitivity was not seen in *Lxr*-deficient cells (Fig. 5A,B). However it has been puzzling to observe that AKT phosphorylation level was basally found substantially higher (Fig. 5A,B) and insensitive to IGF-I (Fig. 5C and data not shown) in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs. In order to investigate whether AKT phosphorylation modifications induced by LXR stimulation or ablation was relevant, we monitored phosphorylation levels of GSK3 β and Bad, two known downstream targets of AKT. As expected, both proteins exhibited a decreased phosphorylation in WT MPECs treated with T0901317 or 22(R)-hydroxycholesterol and a strong increased of basal phosphorylation in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs (Fig. 5A). These results were paralleled by immunofluorescence detection of phosphorylated AKT. Indeed a similar membrane staining to those observed in LNCaP cells [9] could be seen. This signal was lost in WT MPECs incubated with T0901317, but remained persistent in *Lxr α β* ^{-/-} MPECs

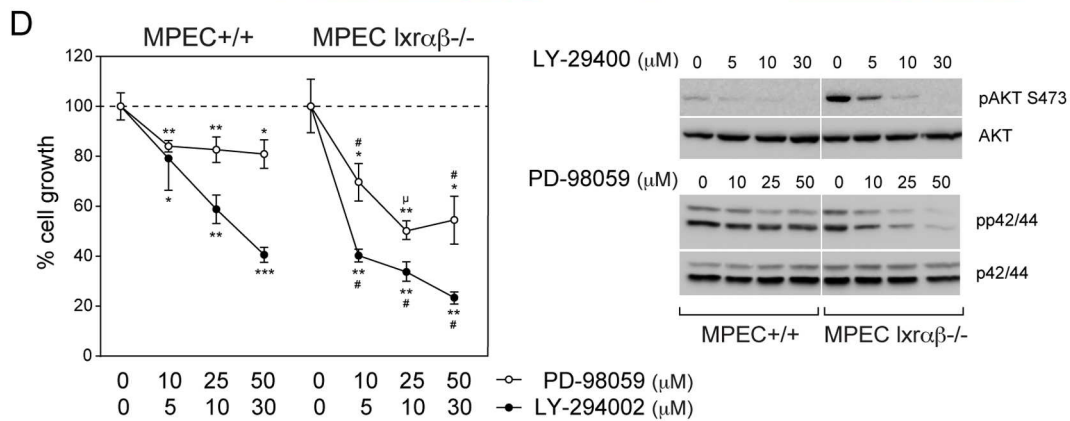
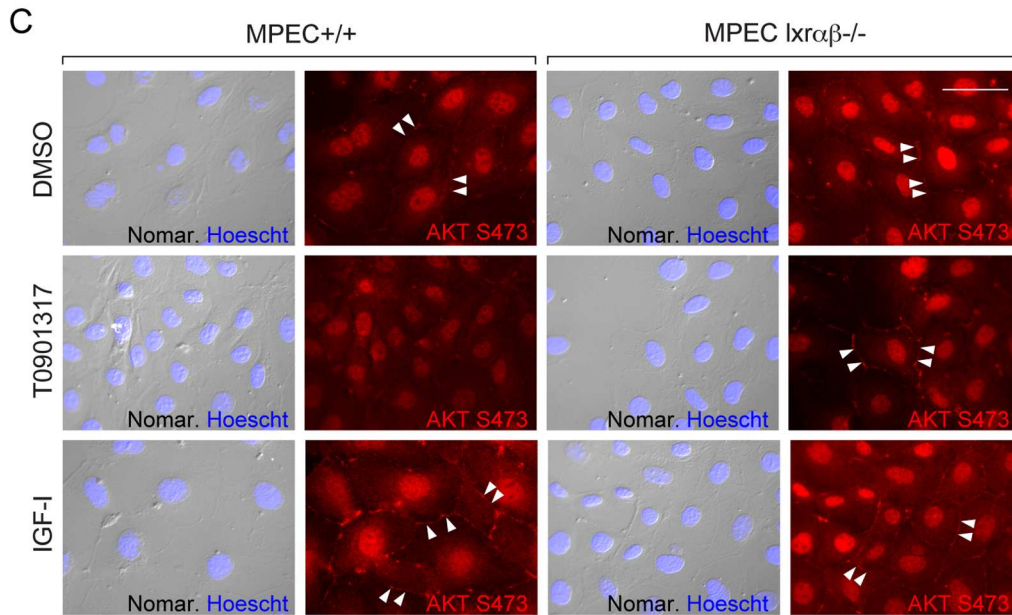
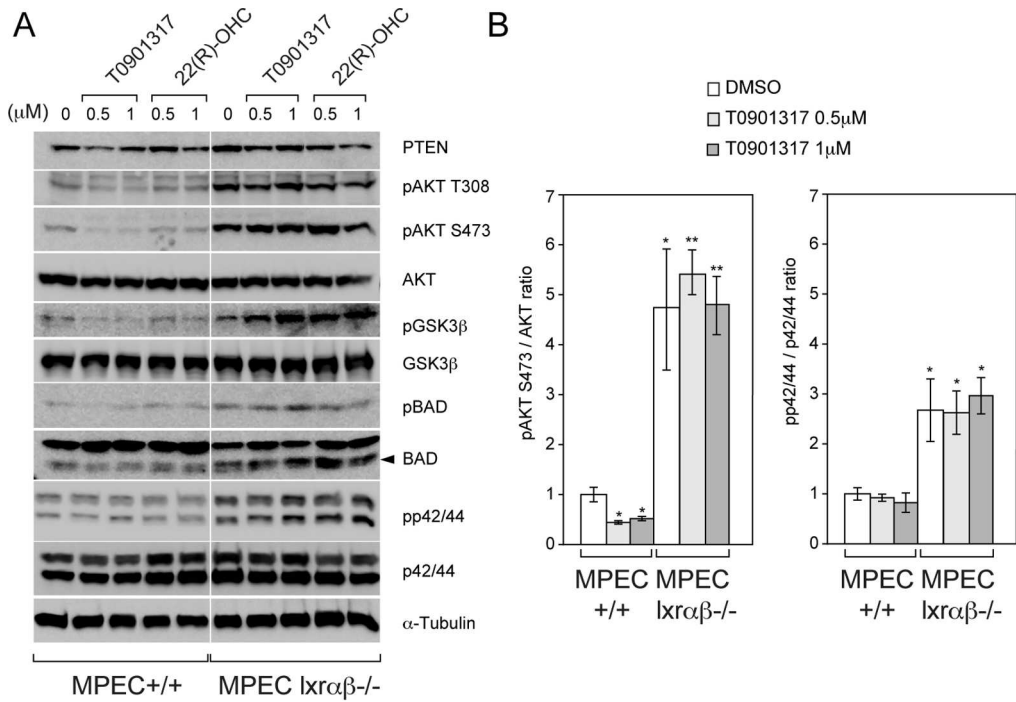


Figure 5. LXRs are necessary to warrant proper transduction pathway activities. (A) Western blot analysis was performed on WT (+/+) or *Lxrαβ*^{-/-} MPECs, treated with DMSO (vehicle), T0901317 or 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)-OHC), using antibodies against PTEN, pAKT S473, pAKT T308, AKT, pGSK3β, GSK3β, pBAD, BAD, pp42/44, p42/44 and α-Tubulin as a loading control. (B) Quantification of pAKT S473 / AKT and pp42/44 / p42/44 ratios of WT (+/+) or *Lxrαβ*^{-/-} MPECs, treated with DMSO (vehicle) or T0901317 (N = 3). (C) WT (+/+) and *Lxrαβ*^{-/-} MPECs were treated with DMSO (vehicle), T0901317 (1 μM) or IGF-1 (50 ng/ml) as a control and immunofluorescence was observed by microscopy using pAKT S473 antibody (nuclear staining is nonspecific). Scale bars 100 μm. (D) MTT assays were performed on WT (+/+) or *Lxrαβ*^{-/-} MPECs, treated with DMSO (vehicle), LY-294002 (5, 10, 30 μM) or PD-98059 (10, 25, 50 μM) inhibitors. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 in Student's *t* test vs. DMSO treatment, # p<0.01, μ p<0.001 in Student's *t* test vs. WT (+/+) MPECs. Error bars represent mean ± SEM. N = 3. Treatment efficiency was checked by western blot using antibodies against, pAKT S473, AKT, pp42/44 and p42/44.
doi:10.1371/journal.pone.0058876.g005

whatever the conditions. Abnormal transduction signaling in *Lxrαβ*^{-/-} MPECs is not restricted to AKT pathway as phosphorylation forms of MAPK (pp42/pp44) were also basally found highly accumulated in these cells (Fig. 5A,B). These observations on PI3K/AKT and MAPK transduction pathway deregulations suggest that they could sustain proliferation activity and act as mediators of the LXR effects. Indeed, incubation of WT and *Lxrαβ*^{-/-} MPECs in a medium supplemented with increasing amounts of pharmacological inhibitors of PI3-Kinase (LY-294002) or MEK (PD-98059) leads to a strong inhibition of cell growth. Consistent with the deregulated activity of AKT and MAPK in *Lxrαβ*^{-/-} compared to WT MPECs, *Lxrαβ*^{-/-} cells exhibit a higher sensitivity to both LY-294002 and PD-98059 treatments in MTT assays (Fig. 5D). Taken together, these results provide evidences that LXRs are important regulators of PI3K/AKT and MAPK transduction pathways, two central crossroads that mediate cell cycle control in MPECs.

Discussion

This study characterizes MPECs derived from WT and *Lxrαβ*^{-/-} mice. Our results indicate that LXRs are necessary to restrain cell cycle in non-cancerous prostate cells. Moreover, various LXR agonists, *e.g.* T0901317, GW3965 and 22(R)-hydroxycholesterol, clearly exert an anti-proliferative effect through LXRs, excluding the involvement of other nuclear receptors in the process we identified in MPECs. Molecular links between LXR target genes and proliferation process remains however to be elucidated. In the present study, we show that LXRs have a crucial role in the regulation of genes involved in cholesterol homeostasis and in a lesser extent in fatty acid synthesis in MPECs. Finally, we show that LXRs modulate AKT and MAPK phosphorylation accumulation, making them potential mediators of LXRs in the control of cell cycle.

LXRs were shown to modulate cell proliferation when they are activated by synthetic or natural ligands in prostate tumor cell lines [7]. Nevertheless, several studies questioned the specificity of the ligands used. Thus, some of these ligands have been proposed to interfere with distinct nuclear receptors [19]. In *Lxrαβ*^{-/-} MPECs, none of the tested LXR ligands (T0901317, GW3965) displayed modulation of proliferation, demonstrating that LXRs are involved in the control of cell cycle in this context.

The results raise the question of the link between LXRs and the cell cycle effectors. Fukuchi *et al.* suggested ABCA1 to be a key-

regulator of the cell cycle in response to LXR-activation in LNCaP cells [10] and suspected that cholesterol efflux is of major importance in this context. Consistent with these previous observations, LXR-target genes involved in cholesterol homeostasis (*e.g.* *Abca1*, *Abcg1* and *Idol*) were found up-regulated in WT MPECs in response to LXR ligands. These facts indicate that MPECs are responsive to cholesterol network homeostasis such as efflux/uptake activities. To date, various studies identified fatty acid metabolism as a crossing point in prostate tumor cell lines that is tightly associated to cell growth and proliferation [20–22]. Indeed, inhibition of acetyl CoA carboxylase (ACC) by Soraphen A efficiently blocks the proliferation of LNCaP cells, showing that tumor cell growth is dependent of fatty acid synthesis [23]. In MPECs, *Srebp1*, *Fas* and *Acc* display a significant but modest induction. Accordingly, the weak neutral lipid accumulation of MPECs (Fig. 5B) correlated the fact that induction of the fatty acid synthesis gene program is poorly sensitive to LXR regulation in these cells. Furthermore, the present work suggests that the capacity of LXRs to modulate cell cycle in MPECs is mostly dependent of their regulation of cholesterol homeostasis.

Unexpectedly, we observed a higher basal phosphorylation of AKT in MPECs lacking LXRs. It could be postulated that AKT signaling perturbation is a consequence of cholesterol metabolism alteration in *Lxrαβ*^{-/-} MPECs. This hypothesis is consistent with the previous study demonstrating that LXRs control AKT phosphorylation levels in a raft-dependent manner in LNCaP cells [9].

Altogether, we show that LXRs *per se* modulate cell cycle in non-cancerous epithelial cell model. *Lxrαβ*^{-/-} MPECs provide thus a powerful tool to investigate intrinsic connections between oxysterols, cholesterol metabolism and cell proliferation.

Acknowledgments

We warmly thank Dr. Michèle Manin (GReD) for her relevant advices and tremendous work on development of primary cell cultures over the years. C. Puchol and P. Mazuel for animal facilities. Pathology analysis was performed on the @nipath Clermont facility.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JD AP DHV JMAL SB. Performed the experiments: JD AP GA HDB JMAL SB. Analyzed the data: JD AP GA HDB CL DHV JMAL SB. Wrote the paper: JD JMAL SB.

References

- Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K (2010) Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* 10: 692–697. doi:10.1016/j.coph.2010.07.003.
- Calkin AC, Tontonoz P (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 213–224. doi:10.1038/nrm3312.
- Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA (2009) Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 558–563.
- Viennois E, Esposito T, Dufour J, Pommier A, Fabre S, et al. (2012) Lxrα regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* 153: 3211–3223. doi:10.1210/en.2011-1996.
- Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S (2007) Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci* 14: 543–553.
- Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, et al. (2011) Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15: 219–232. doi:10.1517/14728222.2011.547853.

7. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S (2004) Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64: 7686–7689.
8. Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, et al. (2006) Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 66: 6482–6486.
9. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, et al. (2010) Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29: 2712–2723.
10. Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Hsu S, Ko AL, et al. (2004) Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64: 7682–7685.
11. Dufour J, Viennois E, De Boussac H, Baron S, Lobaccaro J-M (2012) Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Current opinion in pharmacology*. 12(6): 724-8. doi: 10.1016/j.coph.2012.06.012.
12. Shappell SB, Thomas GV, Roberts RL, Herbert R, Ittmann MM, et al. (2004) Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res* 64: 2270–2305.
13. Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ (2005) Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280: 36442–36451.
14. Manin M, Veysièrè G, Cheyvalier D, Chevalier M, Lecher P, et al. (1992) In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 131: 2378–2386.
15. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, et al. (2006) Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116: 1902–1912.
16. Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro J-M, et al. (2012) Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol Cell Endocrinol* 351: 129–141. doi:10.1016/j.mce.2011.08.036.
17. Ding Z, Wu C-J, Chu GC, Xiao Y, Ho D, et al. (2011) SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470: 269–273. doi:10.1038/nature09677.
18. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, et al. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289: 1524–1529.
19. Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E (2007) T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* 581: 1721–1726.
20. Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G (1996) Control of LNCaP proliferation and differentiation: actions and interactions of androgens, 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol, all-trans retinoic acid, 9-cis retinoic acid, and phenylacetate. *Prostate* 28: 182–194.
21. Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, et al. (2001) Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* 47: 102–110.
22. Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, et al. (2003) Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 1: 707–715.
23. Beckers A, Organe S, Timmermans L, Scheys K, Peeters A, et al. (2007) Chemical inhibition of acetyl-CoA carboxylase induces growth arrest and cytotoxicity selectively in cancer cells. *Cancer Res* 67: 8180–8187.
24. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, et al. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93: 693–704.

Conclusion Article 1

Au cours de cette étude, nous avons pu caractériser les cellules MPECs dérivées à partir des lobes dorsaux de souris sauvages et de souris *Lxra* β ^{-/-}.

Nous avons montré que l'activation des LXRs exerce une action inhibitrice sur le cycle cellulaire de cellules prostatiques non-tumorales. L'utilisation de plusieurs ligands des LXRs reproduit ces effets uniquement dans les cellules sauvages confirmant que la présence des LXRs est nécessaire. Par ailleurs, dans ces cellules MPECs, les LXRs contrôlent l'homéostasie du cholestérol en régulant ses gènes cibles *Abca1*, *Abcg1* et *Idol*. De manière intéressante, les LXRs semblent réguler plus faiblement l'homéostasie des acides gras, dans ces cellules. Par ailleurs, nous avons montré que les voies AKT et MAPK apparaissent comme des médiateurs dans l'effet des LXRs sur le cycle cellulaire.

Les cellules MPECs sont donc un bon modèle pour décrypter les mécanismes moléculaires reliant les LXRs à ces voies de survie.

Article 2 :

Liver X Receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. Accepted PLoS Genetics.

Projet 3 :

Role of LXRs in prostate carcinogenesis in Pten^{-/-} mice (En cours de rédaction).

Présentation du contexte scientifique

Plusieurs études épidémiologiques ont mis en évidence l'association entre un taux élevé de cholestérol et le risque de développer un cancer de la prostate (Magura et al., 2008; Shafique et al., 2012). Depuis longtemps, il est connu que les tumeurs accumulent du cholestérol (White, 1909; Swyer, 1942). Cette augmentation des quantités de cholestérol intra-cellulaire peut être expliquée par des altérations du captage du cholestérol, *via* la perte de la régulation de la voie du LDLR, et de la synthèse *de novo*, *via* la stimulation de l'expression d'enzymes de cette synthèse (Caruso et al., 1999; Chen and Hughes-Fulford, 2001). De plus, l'exposition des souris TRAMP, 20 semaines à un régime enrichi en cholestérol induit une accélération du développement tumoral prostatique (Llaverias et al., 2010). Le volume tumoral est plus élevé en contexte enrichi en cholestérol ainsi que la fréquence de métastases pulmonaires. Ce même régime utilisé sur des souris xéno greffées avec des cellules LNCaP entraîne une augmentation significative de l'incidence et du volume tumoral 6 semaines après l'injection des cellules, démontrant l'effet délétère du cholestérol sur la prostate (Zhuang et al., 2005).

L'utilisation de statines, molécules inhibitrices de la synthèse *de novo* de cholestérol, chez des patients présentant une hypercholestérolémie familiale a montré une baisse du risque de cancer de la prostate et de l'agressivité des tumeurs (Graaf et al., 2004; Shannon et al., 2005; Roy et al., 2011). De plus, des souris allogreffées par une lignée tumorale mammaire F3II issues de carcinome mammaire murin présentent un ralentissement de la croissance tumorale lorsqu'elles sont traitées avec la lovastatine (Alonso et al., 1998). Une autre statine, la mévastatine, est également capable d'inhiber la prolifération de cellules tumorales prostatiques PC-3 en culture en régulant négativement l'activité de CDK2 (Ukomadu and Dutta, 2003).

L'ensemble de ces données suggère que la variation de la quantité de cholestérol intra-cellulaire est un facteur important dans le processus de la progression de la carcinogenèse prostatique.

Considérant le rôle fondamental des LXR_s dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol, notre travail a eu pour but de répondre aux questions suivantes :

- 1) Les LXR_s peuvent-ils être protecteurs contre une augmentation de l'apport en cholestérol ?
- 2) Dans un modèle murin de cancer de la prostate invalidé pour *Pten*, qu'en est-il des niveaux d'expression des LXR_s et de leurs gènes cibles ?
- 3) Quelle est l'influence de la modulation des LXR_s dans la progression tumorale des souris *Pten*^{-/-} ?

Liver X receptors protects from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice.

Aurélien J. C. Pommier^{*,†,‡,§}, Julie Dufour^{*,†,‡,§}, Georges Alves^{*,†,‡,§}, Emilie Viennois^{*,†,‡,§}, Hugues De Bousac^{*,†,‡,§}, Amalia Trousson^{*,†,‡,§}, David H. Volle^{*,†,‡,§}, Françoise Caira^{*,†,‡,§}, Pierre Val^{*,†,‡}, Philippe Arnaud^{*,†,‡}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{*,†,‡,§} and Silvère Baron^{*,†,‡,§}

^{*}Clermont université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F63000 CLERMONT-FERRAND, France [†]CNRS, UMR 6293, GReD, F-63177 AUBIERE, France [‡]INSERM, UMR 1103, GReD, F-63177 AUBIERE, France [§]Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

LXR (Liver X Receptors) act as "sensor" proteins that regulate cholesterol uptake, storage and efflux. LXR signaling is known to influence proliferation of different cell types including human prostatic carcinoma (PCa) cell lines. The present study shows that deletion of LXR in mouse fed a high cholesterol diet recapitulates initial steps of prostate cancer (PCa) development. Elevation of circulating cholesterol in LXR null mice results in aberrant cholesterol ester accumulation and prostatic intra-epithelial neoplasia. This phenotype is linked with increased expression of the histone methyl transferase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), which results in the down-regulation of the tumor suppressors *Msmb* and *Nkx3.1* through increased methylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27) on their promoter regions. Altogether, our data provide a novel link between LXR, cholesterol homeostasis and epigenetic control of tumor suppressor genes expression.

Prostate cancer | liver X receptor | cholesterol accumulation | EZH2

Introduction

LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily and bind to naturally occurring oxidized forms of cholesterol, known as oxysterols (1–3). These receptors heterodimerize with RXR (Retinoid X receptor) and stimulate various targeted gene expression, among them, genes encoding proteins in charge of cholesterol efflux, storage and uptake. Deletion of these receptors in mouse has been previously associated with the development of benign prostatic hyperplasia (BPH) lesions in ventral prostates (4, 5). These findings enlighten the role of LXR in prostate homeostasis. However, BPH and prostate cancer (PCa) appear in distinct region of the prostate and rely on distinct etiologies (ref). Therefore, nothing is known about PCa and LXR *in vivo*. Consistent with a potential role in prostate tumor formation, LXR have been reported to modulate proliferation (6, 7) and survival (8) of human prostatic cells in culture and xenograft models. In these models, inhibition of proliferation through LXR activation was inversely correlated with expression of the ATP-binding cassette A1 (*Abca1*) and G1 (*Abcg1*), known target genes of LXR, which are involved in cholesterol efflux (9). These observations suggested that the tumor suppressive activity of LXR on human PCa cell lines could result from their capacity to limit intracellular cholesterol concentration. This notion was supported *in vivo* by exposition of the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate (TRAMP) model, which carries a transgene encoding the SV40 large T antigen driven by the probasin promoter, to a high cholesterol diet. In TRAMP mice, this diet led to an acceleration of prostate tumor development (10). A similar diet also increased aggressiveness of tumors generated by LNCaP cells in xenograft experiments (11). On the basis of these observations, we hypothesized that LXR, through control of cholesterol metabolism, could act as "gatekeepers" preventing prostate tumor development. Thus we investigated the consequence of LXR ablation in the dorsal prostates of mice fed a high cholesterol diet.

Results

Development of Prostatic Intra-epithelial Neoplasia in Prostates of LXR Knockout Mice.

Under a standard diet, dorsolateral prostates of LXR mutant mice were indistinguishable from their wild-type (WT) counterparts, as shown by H&E staining (Fig. 1Aa and e) and Ki67 IHC (Fig. 1Ab and f). In order to increase circulating cholesterol levels, WT and knockout mice were fed a standard or a hypercholesterolemic diet, as previously described (11, 12). This cholesterol surge had no effect on the gross histology of WT dorsolateral prostates (Fig. 1Ac). In contrast, analysis of LXR mutant prostates revealed a disorganization of the epithelial layer, which was reminiscent of PIN grade II (13) (Fig. 1Ag), characterized by the formation of cribriform and tufting patterns. Nuclei were enlarged and displayed prominent nucleoli (Fig. 1Ai). The PIN status of the lesions was confirmed by an increased proliferation as demonstrated by Ki67 staining (Fig. 1Ah, B) and *Cyclin D1* and *D2* overexpression (Fig. 1C). The PIN phenotype was restricted to the dorsolateral prostate [Fig. S1A,B] and was dependent on the ablation of both *Lxr α* and *Lxr β* . Indeed, single knockout prostates were comparable with WT glands in terms of histology and proliferation [Fig. S1C,D].

Increased Turnover of Epithelial Cells in LXR Mutant Mice.

The identity of proliferative cells was determined by immunofluorescence analyses using markers for prostatic cell subtypes. To identify proliferative cells within the different prostatic compartments, we performed double staining of PCNA with CK18 (luminal cells), p63 (basal cells) or SMA (stromal smooth muscle cells). Most PCNA+ cells were positive for CK18 (Fig. 2Aa, b, and c) and were surrounded by p63+ epithelial basal cells (Fig. 2Ad, e and f). Occasionally, p63+;PCNA+ cells were observed (data not shown) indicating that all the epithelial lineage could be targeted by proliferation in LXR null mice, fed a high cholesterol diet. PCNA+ cells were exclusively localized inside the epithelium delineated by smooth muscle actin (SMA) staining (Fig. 2Ag, h and i). PCNA+ or Ki67+ cells were not observed in the stroma (data not shown). Altogether, these results indicated that proliferation was restricted to the epithelial compartment. This was consistent with previous observations in the ventral prostate lobes of LXR mutant mice (4). Presence

Reserved for Publication Footnotes

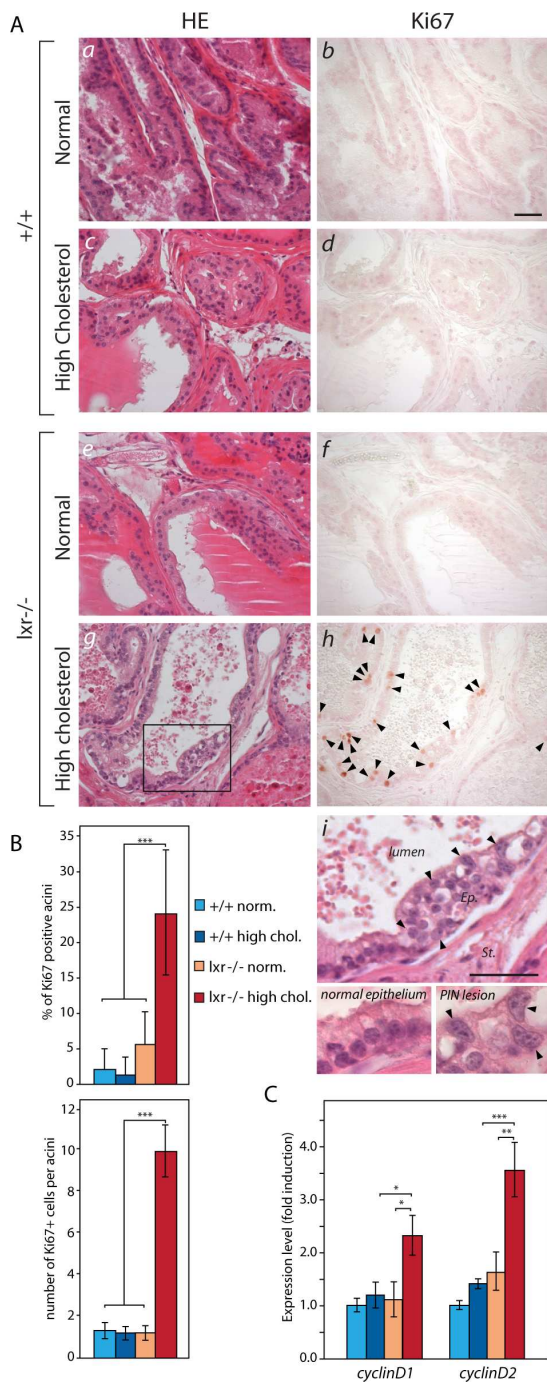


Fig. 1. High cholesterol diet induces proliferation in LXR mutant mouse prostate. (A) Histological sections of dorsal prostate lobes of 5 month-old WT (a,b,c,d) and LXR null mice (e,f,g,h) fed normal or high cholesterol diet were analyzed after H&E staining (Left) or Ki67 IHC (Right). Arrowheads point Ki67-positive cells. Higher magnification pictures of the prostatic epithelium of LXR null mice fed a high cholesterol diet revealed abnormal features (i). Arrowheads indicate atypical cells with enlarged nuclei and prominent nucleoli which represent typical signs of PIN (Scale bars = 50µm). (B) IHC for Ki67 was quantified by counting the percentage of prostatic acini with proliferative cells and the average Ki67+ cell number in proliferative acini (N=6 per group). (C) qPCR analysis of *CyclinD1* and *CyclinD2* expression (N=9/13 per group). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 in Student's *t* test. Error bars represent the ± mean SEM.

of abnormal proliferation in the epithelium suggested that cell renewal could be deregulated. TUNEL staining showed increased

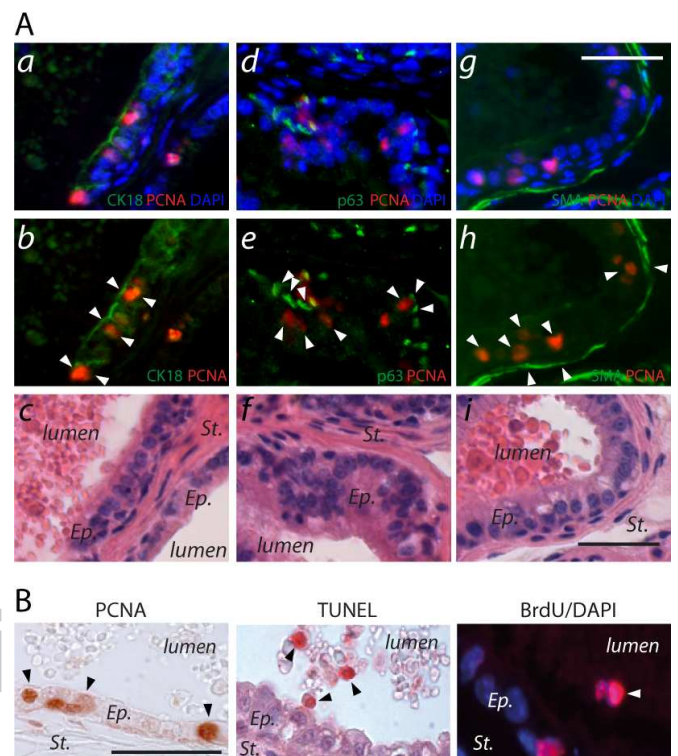


Fig. 2. LXR null mice exhibit aberrant epithelial cells renewal. (A) Proliferative cells in LXR knockout prostates under high cholesterol condition were identified by double-IHC with antibodies directed against PCNA and markers specific for smooth muscle (SMA - smooth muscle actin), luminal epithelial cells (CK18) and basal cells (p63). Ep: Epithelium, St: Stroma (Scale bar = 10µm). (B) PCNA immunodetection (proliferation), TUNEL staining (apoptotic nuclei) and BrdU immunodetection (cumulative proliferation) were performed on dorsal prostates of LXR null mice under high cholesterol condition (Scale bar = 10µm). Arrowheads located regions of interest.

apoptosis in the epithelium and identified delaminating apoptotic cells inside the lumen (Fig. 2B). BrdU+ cells were also present inside prostatic ducts, suggesting that proliferative cells could detach into the lumen (Fig. 2B). Altogether, these observations suggested that the epithelium of LXR null mice presented both increased proliferation and apoptosis that resulted in increased cell turnover.

Cholesterol Metabolism Is Altered in LXR Knockout Mouse Prostate Fed a High Cholesterol Diet.

LXR are essential regulators of lipid metabolism. However, there were no major differences in circulating cholesterol levels in LXR knockout mice when compared with WT [Fig. S2A]. Therefore, we speculated that the PIN phenotype resulted from deregulated lipid metabolism within the prostate. Indeed LXR knockout prostates accumulated large amounts of Oil-Red-O staining under high cholesterol condition, consistent with neutral lipids accumulation (Fig. 3A). Quantitative analyses revealed a significant accumulation of cholesterol esters in LXR mutant mice fed a standard diet, which was largely amplified when mice were fed the hypercholesterolemic diet. This was also associated with an increase in free cholesterol (Fig. 3B). Intra-prostatic triglycerides concentration was not altered and lipogenesis was even inhibited in LXR knockout prostates compared with WT [Fig. S2B]. This suggested that neutral lipids accumulation in the prostate of LXR knockout mice, resulted from a deregulation of cholesterol transport in prostatic cells. Indeed, expression of *Abca1*, the transporter in charge of cholesterol efflux, was decreased both at the mRNA and protein levels in LXR knockout prostates (Fig. 3C,D) [Fig. S2C]. Conversely, LDLR

273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340

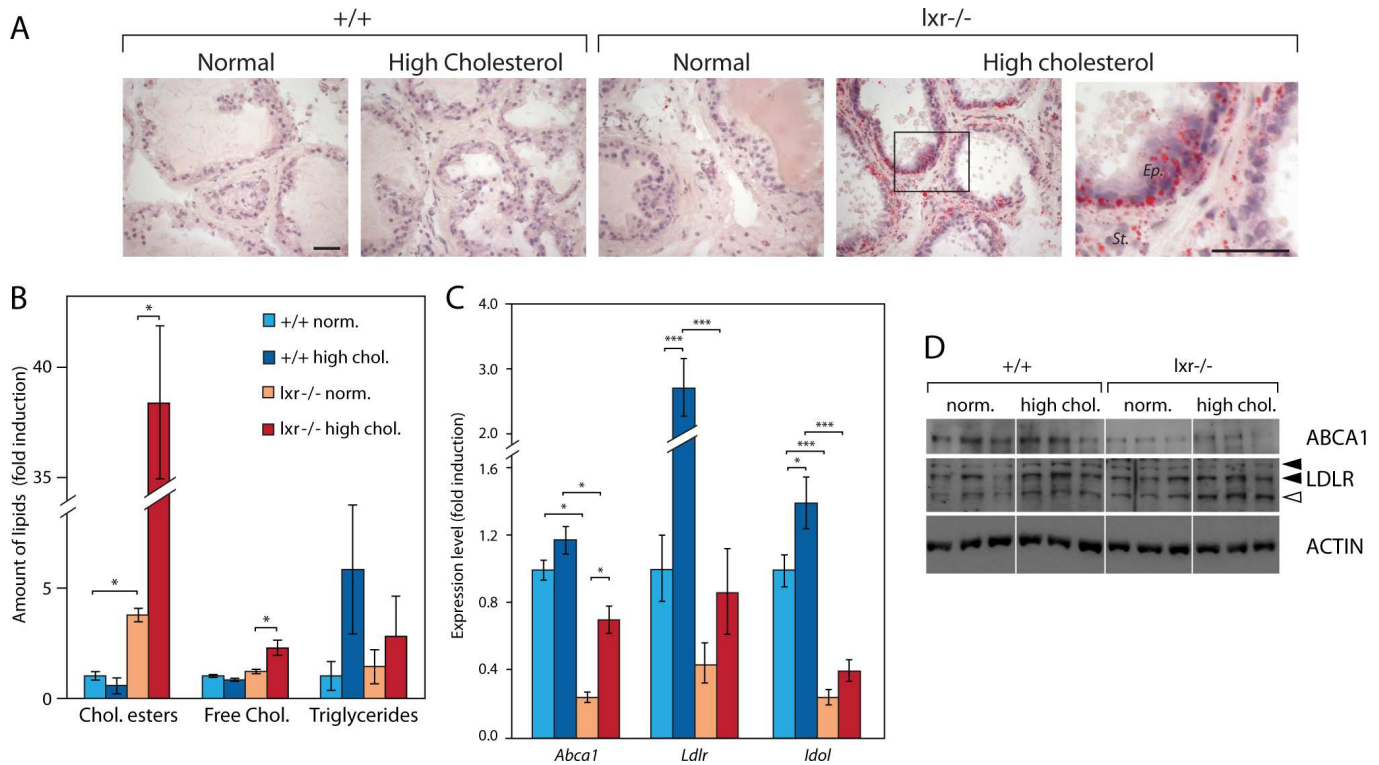


Fig. 3. Prostates of LXR mutant mice accumulate cholesterol esters through inappropriate LXR target genes regulation. (A) Neutral lipids accumulation was observed after Oil-Red-O staining (ORO) (Scale bars = 50µm). (B) Cholesterol esters, free cholesterol and triglycerides were quantified by thin layer chromatography (N=3 per group). (C) *abca1*, *ldlr* and *idol* transcript levels were determined by qPCR (N=9/13 per group). (D) Total protein lysates of WT and LXR null mice under normal or high cholesterol diet were analyzed by western blotting with antibodies against ABCA1, LDLR and ACTIN as a loading control. * p<0.05, *** p<0.001 in Student's *t* test. Error bars represent the ± mean SEM.

protein accumulation was increased by LXR ablation (Fig. 3D, white arrow) [Fig. S2C], even though *Ldlr* mRNA accumulation was decreased (Fig. 3C). This was correlated with a decreased expression of the LXR target gene *idol* (Fig. 3C), which catalyzes the ubiquitination and the subsequent degradation of LDLR (14). Therefore, aberrant cholesterol ester accumulation in LXR deficient prostatic cells, resulted from both increased uptake and decreased efflux.

Prostatic Gene Expression Signature of LXR Mutant Mice Fed a High Cholesterol Diet.

Our data showed that control of cholesterol homeostasis by LXR is crucial to restrain epithelial cell proliferation in the prostate. In order to determine key molecular events resulting from elevation of cholesterol in the prostate, we designed microarray experiments. We compared prostatic gene expression from WT and LXR mutant mice in normal and high dietary cholesterol conditions (Fig. 4A). The highest number of deregulated genes was observed when WT and LXR knockout mice were exposed to high circulating cholesterol levels, again emphasizing the central role of cholesterol in the establishment of the phenotype (Fig. 4A) [Fig. S3]. We then focused on the genes involved in the establishment of the PIN phenotype by selecting genes that were deregulated in both arrays 3 (*lxr-/-* normal vs. *lxr-/-* high chol.) and 4 (*+/+* high chol. vs. *lxr-/-* high chol.) and by subtracting genes that were deregulated in both arrays 1 (*+/+* normal vs. *+/+* high chol.) and 2 (*lxr-/-* normal vs. *+/+* normal). This resulted in a list of 463 genes [Dataset. S1], 253 up and 210 down (Fig. 4B). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was used to investigate potential biological processes that underlay the PIN phenotype of LXR mutant mice [Fig. S4]. The second most significantly enriched gene-categories was 'cancer', which was associated with a large list of 146 genes [Dataset. S2]. More than 50% of these 146 genes were also deregulated in a mouse model of prostate

cancer resulting from PTEN deletion in prostatic epithelium (15) (data not shown). This strongly suggested that the PIN lesions observed in LXR knockout mice in the high cholesterol condition were genuine pre-cancerous alterations. Interestingly, this analysis showed down-regulation of two well described prostatic tumor suppressor genes *Nkx3.1* and *Msb*, which was further confirmed by qPCR analysis (Fig. 4C). *Nkx3.1* and *msmb* promoters have recently been demonstrated to be targets of the histone methyl transferase EZH2 that represses gene expression through H3K27 trimethylation. qPCR and western blot analyses showed that *Ezh2* was specifically overexpressed in LXR knockout prostates when animals were fed a high cholesterol diet (Fig. 4C) [Fig. S5A]. Immunohistochemistry further confirmed overaccumulation of EZH2 in proliferative PCNA+ cells in LXR knockout prostates in the high cholesterol condition (Fig. 4D). This suggested that the effect of cholesterol on the development of PIN was dependent on down-regulation of *Nkx3.1* and *Msb*, resulting from EZH2-mediated repression of their promoters. Indeed, ChIP analyses confirmed that both *Nkx3.1* and *Msb* promoters were significantly trimethylated on H3K27 in the prostates of LXR null-mice fed a high cholesterol diet (Fig. 4E) [Fig. S5B,C]. To further confirm the potential link between LXR and EZH2 expression, we performed a retrospective study of publicly available DNA microarray data of human Pca cohorts, with Oncomine. These analyses showed that *LXRβ* expression was significantly down-regulated in prostate carcinomas and that this down-regulation was associated with increased *EZH2* expression (Fig. 4F). Therefore, the connection between LXR, cholesterol homeostasis and EZH2 expression that we uncovered in mouse, could also be relevant for the development of human Pca.

341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408

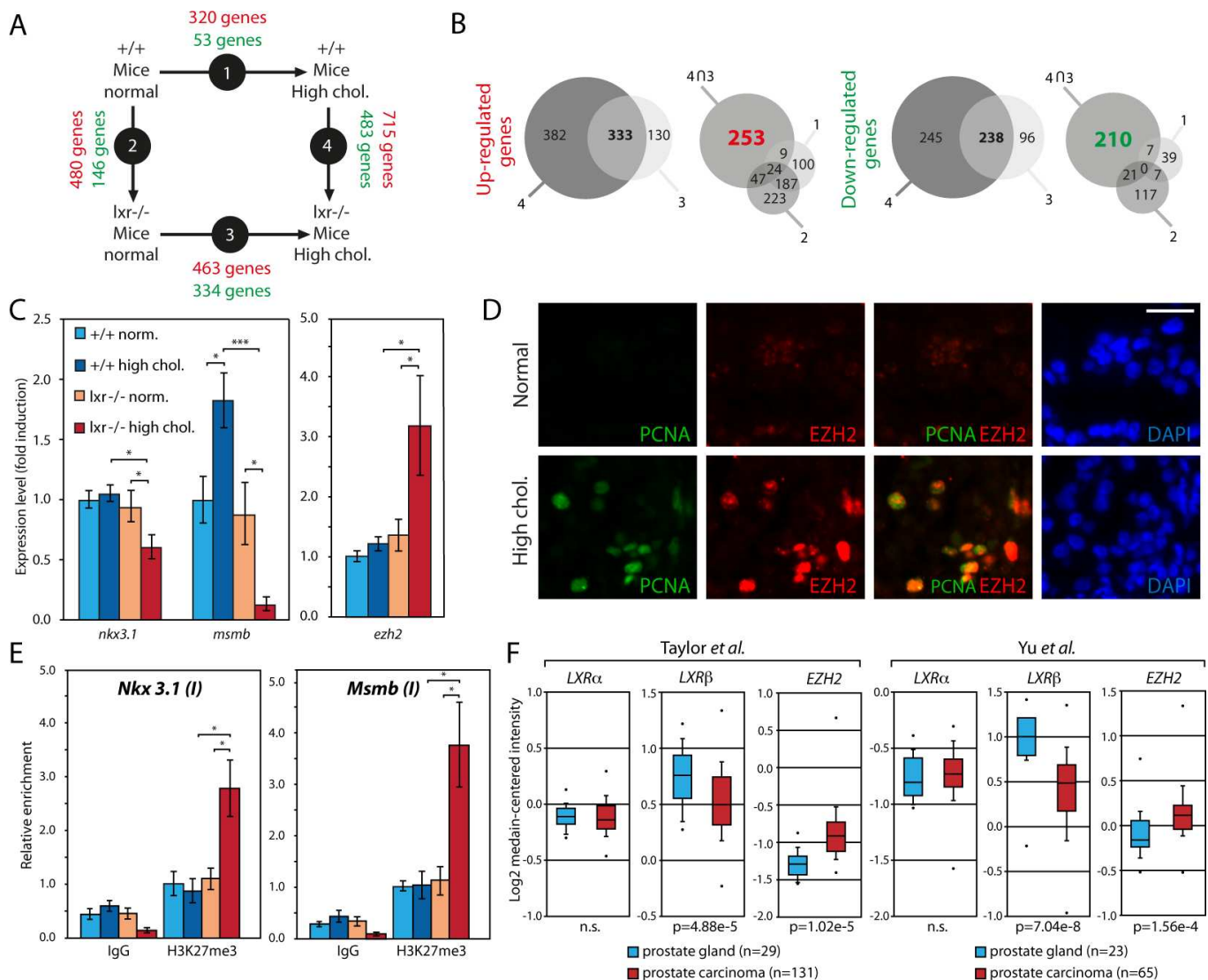


Fig. 4. Disruption of cholesterol homeostasis induces the repression of *Nkx3.1* and *Msmb* tumor suppressor genes and upregulation of the *Ezh2* histone methyltransferase gene. (A) Experimental design of gene expression profiling studies. (B) Venn diagram analysis was used to isolate genes associated with PIN development in LXR null mice under high cholesterol diet: genes deregulated on both arrays 3 and 4 were selected and genes deregulated in arrays 1 and 2 were further subtracted from this list. This method allowed extraction of 463 genes (253 up- and 210 down-regulated). (C) *Nkx3.1*, *Msmb* and *Ezh2* expression levels were analyzed by qPCR (N=9/13 per group). (D) Immunofluorescence analyses were carried out on LXR null mice under normal or high cholesterol diet using antibodies directed against PCNA and EZH2 (Scale bar = 5 μm). (E) ChIP analysis using antibodies raised against trimethylated H3K27 vs. negative control IgG (N=3/6 per group). Histograms show relative enrichment values (bound/input) on chromatin obtained from WT and LXR null mice under normal or high cholesterol diet. Loci 1 of *Nkx3.1* and *Msmb* have been shown. (F) Oncoprint boxed plot analysis (<http://www.oncoPrint.org>) of *LXRα*, *LXRβ* and *EZH2* expression levels between in healthy prostate glands and human PCa in datasets referenced (18) and (17) (n.s. ; non significant). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 in Student's *t* test. Error bars represent the ± mean SEM.

Discussion

Previous analyses of LXR null mice have shown the development of a BPH-like phenotype in the ventral lobe of the prostate (4, 5). However in patients, BPH arises in the periurethral and transition zones distinct from the peripheral zone from which cancer emerge. Therefore, to date the putative role of LXR in PCa had been postulated on the basis of studies performed on tumor cell lines (6–9). Here we show for the first time that LXR ablation results in the development of PIN in the dorsal prostate, which is the most similar lobe to human peripheral prostate, the area in human from which the majority of cancerous lesions occurs (15). Consistent with previously published data (4), this phenotype is not observed under normal dietary conditions. Indeed, in our model, PIN development is associated with a high cholesterol diet, which results in prominent intra-prostatic accumulation of

cholesterol ester (x38). Cholesterol has been extensively associated with prostate malignancy (16). We therefore hypothesize that the massive cholesterol ester storage is a major contributor to the appearance of the PIN phenotype. Interestingly, abnormal cholesterol storage was also observed in LXR mutant mice fed a standard diet, albeit to a lesser extent (x4). Absence of PIN development in this condition, even in 18 month-old animals (data not shown) suggests that cholesterol accumulation needs to be tipped over a threshold to become deleterious. It is therefore tempting to speculate that in patients, the combination of metabolic disease and/or high cholesterol diet with abnormal LXR activity may favor prostate cancer development by increasing cholesterol accumulation beyond this threshold. Consistent with this idea, we show decreased expression of *LXRβ* in prostatic carcinomas compared with normal prostate (17, 18). Numerous

545 *in vivo* and *ex vivo* studies have shown the sensitivity of already
546 transformed tumor cells to variations in cholesterol supply and
547 *de novo* synthesis (8, 11, 16, 19). Our data goes one step further
548 by showing that LXR ablation and the subsequent accumulation
549 of cholesterol may in fact initiate neoplastic development in the
550 prostate.
551

552 The molecular mechanism by which LXR control cell cycle in
553 human prostatic tumor cell lines is still poorly understood. LXR
554 activation has been shown to slow down the cell cycle through
555 accumulation of the p27 cell cycle inhibitor and Skp2 down-
556 regulation in LNCaP cells (6). RNA interference demonstrated
557 that part of this antiproliferative effect was supported by LXR
558 themselves (20). Interestingly, aberrant proliferation observed in
559 LXR null mice fed a high cholesterol diet was found in only
560 24% of the acini (Fig. 1B). These findings indicate that the
561 cellular context of one particular epithelial cell plays an essential
562 role in cell cycle deregulation and in the development of PIN
563 lesions. It is therefore very likely that the prostatic phenotype
564 of LXR-null mice is not only dependent on an epithelial cell-
565 autonomous effect of LXR ablation. This hypothesis is supported
566 by our previous observation that LXR were required to establish
567 a cellular dialogue between stromal and epithelial compartments
568 in ventral prostate (5).
569

570 One interesting observation of our study, is the correlation
571 between increased cholesterol accumulation and increased expres-
572 sion of *Ezh2*. Overexpression of *EZH2* is associated with ag-
573 gressive prostate carcinomas in patients (21) and has been shown
574 to control prostate cell proliferation through epigenetic silencing
575 of the tumor suppressors *NKX3.1* and *MSMB* (22, 23). Here, we
576 show that the combination of LXR ablation and high cholesterol
577 diet is associated with decreased *Nkx3.1* and *Msmb* expression,
578 which is correlated with an increase in the H3K27me3 mark on
579 their promoter regions. It is therefore tempting to speculate that
580 some of the oncogenic effects of cholesterol accumulation in the
581 context of LXR ablation is mediated by up-regulation of *EZH2*-
582 mediated gene silencing. How this is achieved is still unclear.
583 However, two scenarios could account for such a mechanism. In
584 the first scenario, deregulation of *Ezh2* expression could be trig-
585 gered in an epithelial cell-autonomous fashion as lipids (PUFA)
586 have been already identified in such a process (24). However,
587 the underlying molecular mechanisms remain unknown as the
588 promoter sequences of *Ezh2* are still poorly characterized (22).
589 In the second scenario, *Ezh2* overexpression could result from
590 alterations in the recruitment of a specific epithelial cell
591 compartment. *EZH2* is not a canonical stem/progenitor marker in the
592 prostate but has been involved in cancer stem cell maintenance
593 in various diseases (25, 26). In human prostate, a minor subgroup
594 of "stem" cells (CD44+, Oct4+) expresses *EZH2* and has been
595 proposed to represent a cell reservoir for prostatic adenocarci-
596 noma initiation (27). Consequently, increased expression of *Ezh2*
597 in LXR null mice could result from expansion of a progenitor
598 epithelial cell population. The effect of LXR ablation and chole-
599 sterol accumulation on epigenetic processes is likely to extend
600 beyond *EZH2*. Indeed, we show increased expression of *Uhrf1*
601 in correlation with *Ezh2* accumulation in LXR mutant mouse
602 prostates, under high cholesterol condition [Fig. S5D]. This is
603 consistent with reports of a positive correlation between these
604 two factors in human prostate tumors. UHRF1 acts with Suv39H1
605 and DNA methyltransferases to alter histone H3K9 methylation,
606 acetylation and DNA methylation to epigenetically repress target
607 genes. Furthermore, UHRF1 and *EZH2* have been proposed
608 to synergistically promote inactivation of oncosuppressor genes,
609 among which *Nkx3.1* and *Msmb* (28), in tumor cells. Altogether,
610 our results show that LXR act as a "gate keeper" in mouse
611 prostate to prevent cholesterol accumulation and subsequent PIN
612 development. Our findings further suggest that the metabolic

status of the prostate can govern epigenetic processes involved
in prostate cancer progression.

Methods

Animals. *Lxra* and *Lxrβ* double knockout mice and their wild-type controls (29, 30) were maintained on a mixed strain background (C57BL/6:129Sv) and housed according to local ethical regulations. Mice were fed *ad libitum* a normal mouse chow (Global-diet 2016S) until 5 months of age. Mice were then fed either a normal or hypercholesterolemic diet (Teklad diet number 88051; Harlan, Gannat, France) for 5 weeks. Animals were sacrificed, blood plasma was collected and prostates were dissected. For histological analysis, prostates were either embedded in NEG 50 (Thermo Scientific, Kalamagoo, MI, USA) or fixed in an alcohol / formaldehyde 37% and acetic acid mixture (7.5:2:0.5; v/v) before embedding in paraffin for histological analysis. For lipid, protein and RNA extractions, prostates were snap-frozen in liquid nitrogen. All animals were maintained in a controlled environment and animal care was conducted in compliance with the national standards and policies (C 63 014.19). The Regional Ethics Committee approved all experiments.

Staining, Immunohistochemistry, Immunofluorescence and TUNEL. Prostate tissues were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, paraffin-embedded, sectioned and stained with hematoxylin and eosin according to a standard protocol. For immunohistochemistry, paraffin sections were dewaxed, rehydrated, unmasked using 0.1M citrate buffer (pH 6.0) and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber. Primary antibodies were: PCNA (FL-261) sc-7907 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), *EZH2* (AC22) #3147 (Cell signaling, Montigny-Le Bretonneux, France), BrdU (Roche diagnostic, Meylan, France), p63:69241A (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), Cytokeratin 18 (H-80) sc-28264 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Actin A2066 (Sigma-Aldrich). Detections were performed alternatively using the NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) or Alexa 488 conjugated anti-mouse IgG / Alexa 555 conjugated anti-rabbit IgG (Invitrogen). Cell nuclei were stained using Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) at 1 mg/ml.

Apoptotic nuclei were visualized through a TUNEL reaction relying on terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT; Euromedex, Souffelweyersheim, France) and biotin-11-dUTP (Euromedex), dATP (Promega, Charbonnière, France). Positive nuclei were revealed by addition of extravidin-coupled alkaline phosphatase and FastRed TR/Naphthol AS-MX substrate (Sigma-Aldrich). Nuclei were counterstained with Mayer hematoxylin solution. Cross-sectional areas of the prostate were photographed using a Zeiss Axioplan fluorescence microscope and the Axiovision 4.2 software (Carl Zeiss Vision GmbH, Le Pecq, France). Lipid stainings were performed on cryosections with Oil-Red-O (Sigma-Aldrich) as previously described (32).

Transcriptomic and Pathway Analyses. Microarray study is detailed in *SI Text*.

Real-Time PCR. Total RNAs were isolated as described above. cDNAs were synthesized with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Promega) and random hexamer primers (Promega) according to the manufacturer's instructions. cDNA templates were amplified by MESA GREEN MasterMix Plus for SYBR® Assay (Eurogentec, Seraing, Belgium) using an iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Primer sequences are listed in supporting information. qPCR results were normalized alternatively using *36b4* or *18S* as a standard.

Lipids. Lipid samples from prostate tissues were extracted by the *Folch* method as previously described (8) and analyzed on high-performance thin layer chromatography (TLC) plates.

Western Blot. Proteins were extracted in Hepes 20 mM, NaCl 0.42 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM and NP40 1% supplemented with PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich), Complete 1X (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), NaF 0.1 mM and Na₂VO₃ 0.1 mM (Sigma-Aldrich). For western blot, 40 µg of protein lysate were separated by SDS PAGE and were incubated with antibodies against Actin A2066 (Sigma-Aldrich), ABCA1 NB400-105 (Novus, Littleton, CO), *EZH2* (AC22) #3147 (Cell Signaling, Montigny-Le Bretonneux, France) and LDLR 10007665 (Cayman Chemical).

Chromatin Immunoprecipitation. Chromatin preparation from dorsolateral prostate and for immunoprecipitation has been described previously (3). Immunoprecipitation was performed using Anti-trimethyl Histone H3 (Lys27) #ABE44 (Millipore, Billerica, MA) and negative control IgG #Kch-504-250 (Diagenode, Liège, Belgium). Primers used for qPCR analysis are listed in *SI Text*.

Statistics. qPCR data, lipids assays and Ki67-staining parameters are expressed as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed with a two-tailed Student's *t* test.

Acknowledgements.

We are grateful to Dr. David Rouquié (Bayer CropScience, Sophia Antipolis, France) for his help with microarray analysis and gene clustering. We thank J.P. Saru and A. De Haze for technical assistance with molecular biology, C. Puchol and S. Plantade for animal facilities. Pathology analysis was performed on the @nipath Clermont facility. This study was supported by research grants from Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Allier committee), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas, Association pour la Recherche con-

681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748

tre le Cancer (ARC) and Cancéropôle Lyon Rhône-alpes Auvergne (CLARA). A. Pommier and J. Dufour were funded by MNERT grants and E. Viennois by a grant from FEDER - Région Auvergne. G. Alves was funded by Région Au-

1. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17:985-93.
2. Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-50.
3. Viennois E et al. (2011) Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15:219-32.
4. Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA (2009) Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:558-63.
5. Viennois E et al. (2012) Lxr α regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* 153:3211-3223.
6. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S (2004) Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7686-9.
7. Chuu CP et al. (2006) Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 66:6482-6.
8. Pommier AJ et al. (2010) Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29:2712-23.
9. Fukuchi J et al. (2004) Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7682-5.
10. Llavrias G et al. (2011) Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol* 178:402-12.
11. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR (2005) Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 115:959-68.
12. Joyce CW et al. (2002) The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:407-412.
13. Park JH et al. (2002) Prostatic intraepithelial neoplasia in genetically engineered mice. *Am J Pathol* 161:727-35.
14. Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P (2009) LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325:100-4.
15. Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ (2005) Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280:36442-51.
16. Freeman MR, Solomon KR (2004) Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 91:54-69.
17. Yu YP et al. (2004) Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol* 22:2790-2799.
18. Taylor BS et al. (2010) Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*

vergne program. H. De Boussac was funded by Région Auvergne "Nouveau Chercheur" program.

- 18:11-22.
19. Chen Y, Hughes-Fulford M (2001) Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 91:41-5.
20. Lee JH et al. (2008) Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149:3778-88.
21. Varambally S et al. (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419:624-629.
22. Kunderfranco P et al. (2010) ETS transcription factors control transcription of EZH2 and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene Nkx3.1 in prostate cancer. *PLoS One* 5:e10547.
23. Beke L, Nuytten M, Van Eynde A, Beullens M, Bollen M (2007) The gene encoding the prostatic tumor suppressor PSP94 is a target for repression by the Polycomb group protein EZH2. *Oncogene* 26:4590-5.
24. Dimri M, Bommi PV, Sahasrabudhe AA, Khandekar JD, Dimri GP (2010) Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids suppress expression of EZH2 in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 31:489-95.
25. Rizzo S et al. (2011) Ovarian cancer stem cell-like side populations are enriched following chemotherapy and overexpress EZH2. *Mol Cancer Ther* 10:325-335.
26. Suvà M-L et al. (2009) EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res* 69:9211-9218.
27. Ugoikov AV, Eisengart LJ, Luan C, Yang XJ (2011) Expression analysis of putative stem cell markers in human benign and malignant prostate. *Prostate* 71:18-25.
28. Babbio F et al. (2012) The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330138> [Accessed July 17, 2012].
29. Peet DJ et al. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704.
30. Repa JJ et al. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289:1524-9.
31. Repa JJ et al. (2000) Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem* 275:39685-92.
32. Volle DH et al. (2007) Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21:1014-27.

749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816

Conclusion Article 2

Les souris *Lxra* β ^{-/-} nourries avec un régime enrichi en cholestérol, présentent un phénotype de néoplasie intra-épithéliale associé à une perte de la régulation de l'homéostasie des lipides et une accumulation de cholestérol intra-cellulaire.

Les résultats démontrent que ce phénotype est dû à une hyperprolifération du compartiment épithélial et à un dérèglement de l'expression de gènes clés du cycle cellulaire (*Cycline D1* et *Cycline D2*) et de gènes suppresseurs de tumeur (*Nkx3.1* et *Msmb*). La diminution d'expression de *Nkx3.1* et *Msmb* est corrélée avec une augmentation des marques de méthylation répressives H3K27me3 sur leur promoteur qui pourraient être causées par l'histone méthyltransférase Ezh2 dont l'accumulation est augmentée dans les souris *Lxra* β ^{-/-} nourries avec un régime enrichi en cholestérol.

Ces données montrent qu'une surcharge en cholestérol associée à la perte des LXR β peut initier les premières étapes du développement tumoral. A l'inverse, lorsque les LXR β sont présents, les premières étapes du développement tumoral sont absentes. Ces données suggèrent le rôle protecteur des LXR β dans le cas d'hypercholestérolémie.

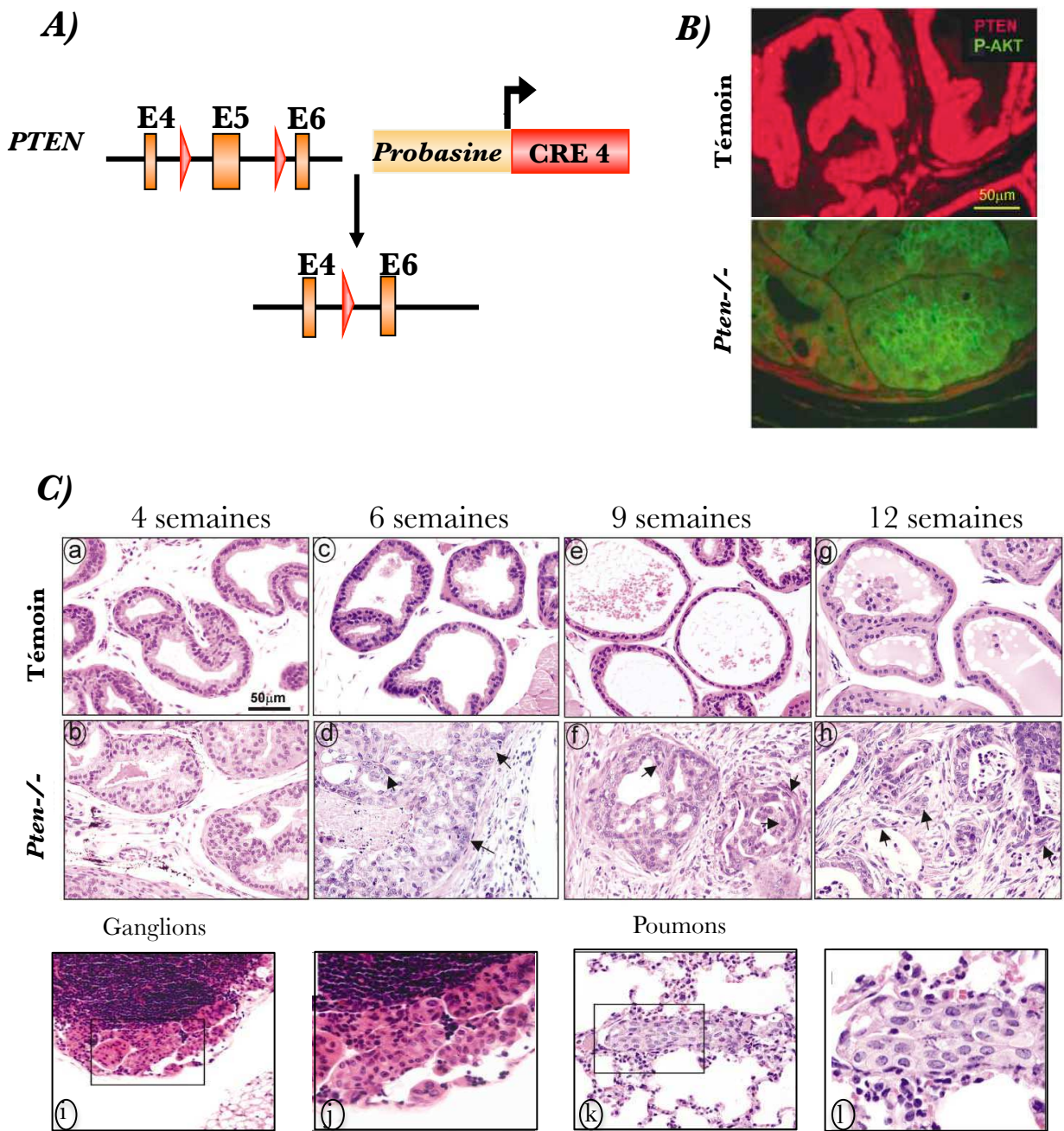


Figure 31 : Caractérisation de la carcinogénèse prostatique des souris *Pten*^{-/-} (Wang *et al.*, 2003).

A) Les sites loxP sont insérés de part et d'autre de l'exon 5 du gène *Pten*. La recombinase Cre exprimée sous contrôle du promoteur *Probasine* permet l'excision de l'exon 5 conduisant à l'inactivation de *Pten*. **B)** Le marquage par immunofluorescence de Pten (en rouge) est retrouvé dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques dans la prostate antérieure témoin mais est perdu dans la prostate *Pten*^{-/-}. A l'inverse, le marquage P-AKT (en vert) est détecté dans la prostate *Pten*^{-/-} mais pas dans la prostate témoin. **C)** Coloration hématoxyline-éosine du lobe dorso-latéral montrant dans les souris *Pten*^{-/-} une hyperplasie à 4 semaines (comparer *a* et *b*), une PIN à 6 semaines (comparer *c* à *d*) progressant en carcinome invasif à partir de 9 semaines (comparer *e* et *g* à *f* et *h*). *i* et *j* montrent une invasion ganglionnaire et *k* et *l* une métastase pulmonaire.

Projet 3:

La modulation des LXR influence-t-elle la carcinogénèse prostatique ? (En cours de rédaction)

L'inactivation des LXRs conduit, lorsque les animaux sont nourris avec un régime riche en cholestérol, au développement de néoplasies intra-épithéliales (Article 2). Les données obtenues par le laboratoire, ainsi que d'autres équipes, montrent que les LXRs sont connectés au cycle cellulaire (Article 1; Fukuchi et al., 2004; Pommier et al., 2010). Dans cette optique, nous nous sommes posés la question du rôle des LXRs au cours de la carcinogénèse prostatique. Nous avons donc analysé l'activité et l'expression des LXRs dans le modèle murin *PBCre4 ; PtenloxP/loxP*. Les souris invalidées pour *Pten* seront nommées *Pten*^{-/-} par la suite.

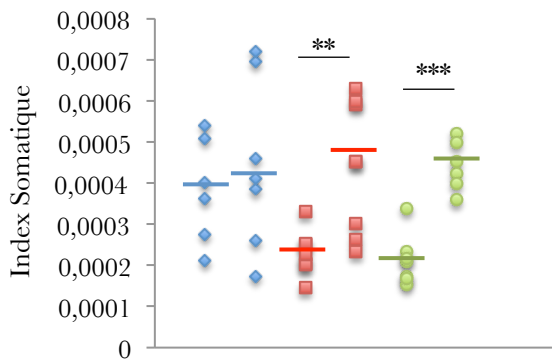
Dans un premier temps, nous avons mis en place au laboratoire le modèle murin *Pten*^{-/-} pour lequel l'inactivation de *Pten* est spécifique des cellules épithéliales prostatiques (Wang et al., 2003). En effet, des sites loxP ont été insérés de part et d'autre de l'exon 5 du gène *Pten* (Figure 31A). La recombinase Cre sous contrôle du promoteur *Probasine* va exciser cet exon et donc inactiver *Pten*. L'augmentation du marquage AKT-phosphorylé confirme la perte de Pten qui ne peut plus inhiber la production de PtdIns (3,4,5)P3 (Figure 31B). Ces animaux présentent pour tous les lobes prostatiques les différents stades de la carcinogénèse prostatique décrits chez l'homme (Figure 31C). A 4 semaines, une hyperplasie multifocale apparaît puis des néoplasies intra-épithéliales à 6 semaines. Au niveau histologique, ces néoplasies se caractérisent par une prolifération de cellules épithéliales atypiques avec des noyaux élargis, irréguliers et des nucléoles proéminents à l'intérieur des acini formant des couches de formes variées, en touffe, cribiforme ou micropapillaire. Par la suite, ces souris développent un adénocarcinome à partir de 9 semaines avec une invasion stromale des cellules malignes. Enfin, entre 12 et 29 semaines, 5 des 11 animaux ont présenté une invasion métastatique des ganglions lymphatiques et 3 sur 11 des métastases pulmonaires (Figure 31C).

Caractérisation des animaux *PBCre4 x Pten^{loxP/loxP}* (ou *Pten*^{-/-})

Avant de pouvoir étudier l'expression et l'activité des LXRs au cours de la carcinogénèse prostatique, nous avons voulu caractériser ces animaux *Pten*^{-/-}. Nous avons choisi d'étudier des animaux de différents âges (8, 11 et 20 semaines) de manière à encadrer la cinétique décrite précédemment (Figure 33A).

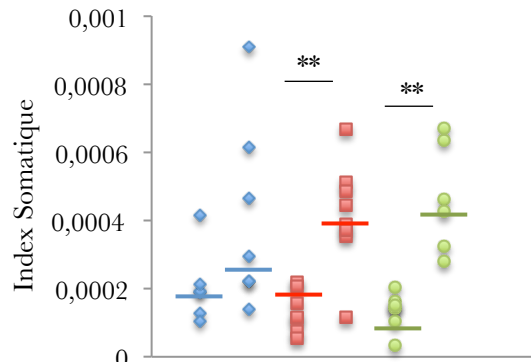
Un des premiers marqueurs de carcinogénèse étudié chez ces animaux est le poids des prostates rapporté au poids de l'animal. Nous pouvons ainsi constater une augmentation

Prostate Ventrale



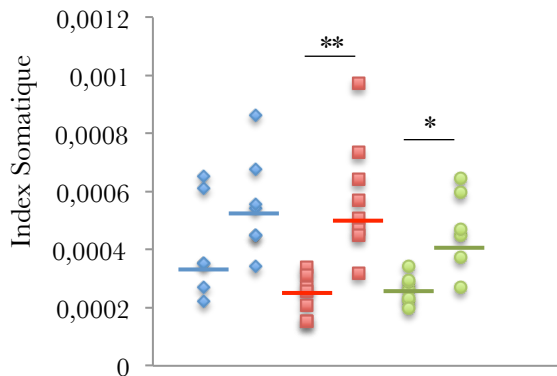
Génotype	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}
Age	8 sem		11 sem		20 sem	

Prostate Latérale



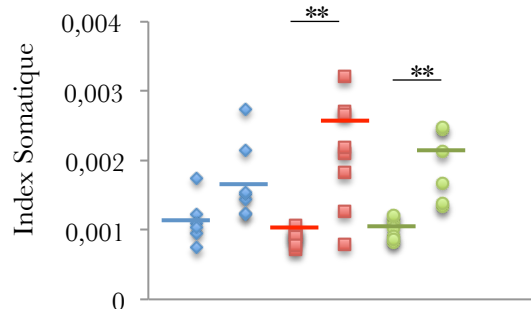
Génotype	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}
Age	8 sem		11 sem		20 sem	

Prostate Dorsale



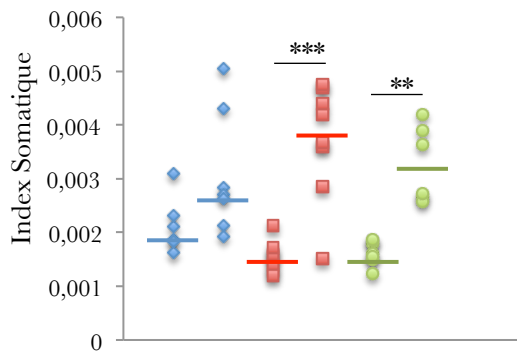
Génotype	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}
Age	8 sem		11 sem		20 sem	

Prostate Antérieure



Génotype	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}
Age	8 sem		11 sem		20 sem	

Prostate Totale



Génotype	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}	T	<i>Pten</i> ^{-/-}
Age	8 sem		11 sem		20 sem	

Figure 32 : Le poids des lobes prostatiques *Pten*^{-/-} est augmenté significativement dès 11 semaines.

Les différents lobes prostatiques (ventraux, latéraux, dorsaux et antérieurs) ont été pesés sur des animaux témoins et *Pten*^{-/-} de 8, 11 et 20 semaines et leur poids a été rapporté au poids total de l'animal (n= 6-8). La barre représente la médiane. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

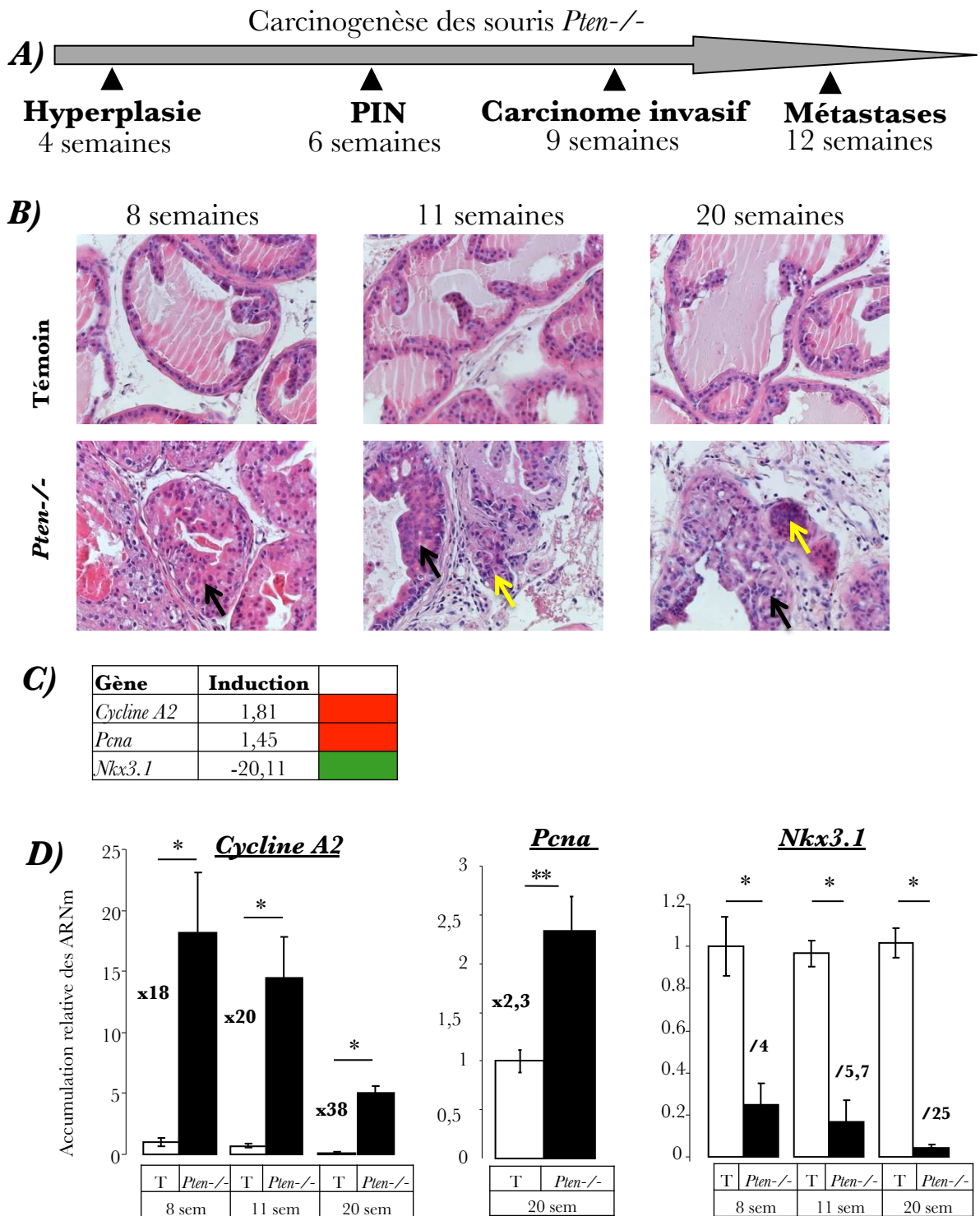


Figure 33 : Caractérisation de la carcinogénèse prostatique des souris *Pten*^{-/-}.

A) Schéma de la cinétique de carcinogénèse prostatique des souris *Pten*^{-/-} de Wang *et al.*, 2003. **B)** Coloration hématoxyline-éosine de prostates dorsales de souris témoins et *Pten*^{-/-} de 8, 11 et 20 semaines. Des lésions néoplasiques (flèche noire) sont détectées dans les animaux *Pten*^{-/-} dès 8 semaines puis des zones d'invasion (flèche jaune) à partir de 11 semaines. **C)** Profils transcriptomiques des souris *Pten*^{-/-} de Wang *et al.*, 2003. **D)** Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes *Nkx3.1*, *Pcna* et *Cycline A2* dans les souris témoins (T) et *Pten*^{-/-} de 8, 11 et 20 semaines. La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

significative des poids de tous les lobes prostatiques chez les animaux *Pten*^{-/-} dès 11 semaines (Figure 32). Etant donné que la recombinaison dépendante de la Cre se fait dans tous les lobes dès la naissance et que le poids évolue de la même manière pour tous, les résultats représentés se focaliseront sur le lobe dorsal pour les analyses histologiques ou dorso-latéral pour les analyses moléculaires (Mulholland et al., 2011). Le lobe dorsal est le plus proche notamment au niveau du transcriptome de la zone périphérique qui chez l'homme est la zone où se développe 85 % des cancers (Berquin et al., 2005).

Une coloration hématoxyline-éosine nous permet d'apprécier la morphologie des prostates dorsales des animaux (Figure 33B). Dès 8 semaines, l'épithélium prostatique est déstructuré chez les animaux *Pten*^{-/-} par rapport aux témoins. En effet, une augmentation du nombre de cellules est constatée avec des foyers de néoplasies intra-épithéliales caractérisés par des masses de cellules avec un noyau élargi et irrégulier et des nucléoles proéminents. A partir de 11 semaines, chez les animaux *Pten*^{-/-}, ces foyers de néoplasies sont plus fréquents et les premiers signes de carcinome invasif sont visibles. Enfin à 20 semaines, le carcinome invasif est installé. Nous avons ensuite réalisé des analyses par RT-qPCR afin de confirmer les observations histologiques. Le choix des gènes dont nous avons étudié l'expression s'est basé sur l'analyse transcriptomique réalisée par Wang *et al.*, 2003 (Figure 33C). L'accumulation des marqueurs de prolifération est augmentée de manière significative dans les animaux *Pten*^{-/-} à 8, 11 et 20 semaines pour la *Cycline A2*, et à 20 semaines pour *Pcna* (Figure 33D). En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène suppresseur de tumeur *Nkx3.1*. En effet, il a été montré que *Nkx3.1* coopérait avec *Pten* en stabilisant p53 pour limiter la prolifération mais que lorsque *Pten* est absent, l'expression de *Nkx3.1* s'effondre (Lei et al., 2006). Effectivement, entre 8 et 20 semaines, l'expression de *Nkx3.1* est fortement diminuée dans les souris *Pten*^{-/-} (Figure 33D).

L'ensemble de ces résultats confirme la présence de néoplasies intra-épithéliales dès 8 semaines et d'un début d'invasion à partir de 11 semaines progressant vers le carcinome à 20 semaines.

Les acteurs de la voie des LXR sont-ils modifiés dans les souris *Pten*^{-/-} ?

Afin d'étudier d'éventuelles variations des taux des LXRs et des modifications de leur activité transcriptionnelle en contexte d'inactivation de *Pten*, nous avons analysé par RT-qPCR, l'expression des acteurs principaux de la voie des LXRs dans la prostate dorso-latérale (Figure 34). L'expression de *Lxrα* n'est pas modifiée entre les animaux témoins et les animaux *Pten*^{-/-} quelque soit l'âge. En revanche, celle de *Lxrβ* est augmentée de manière significative chez les

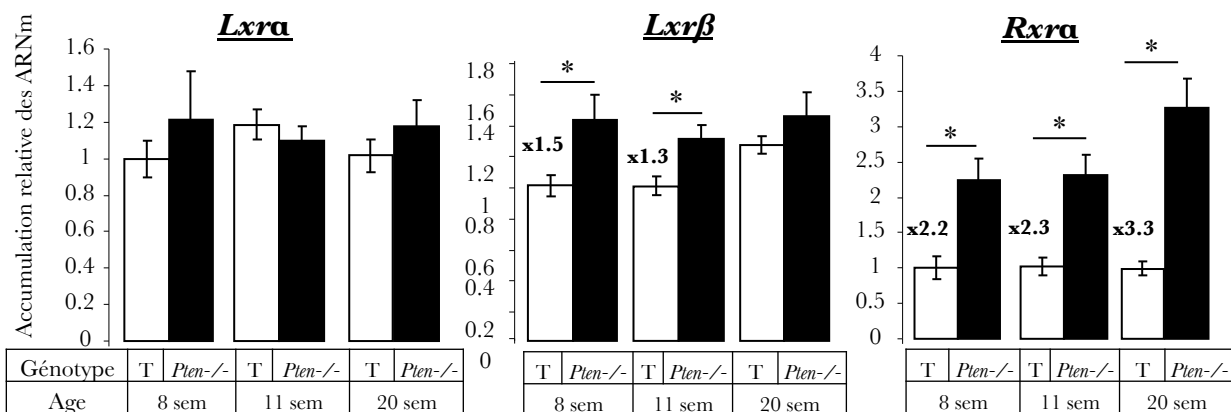
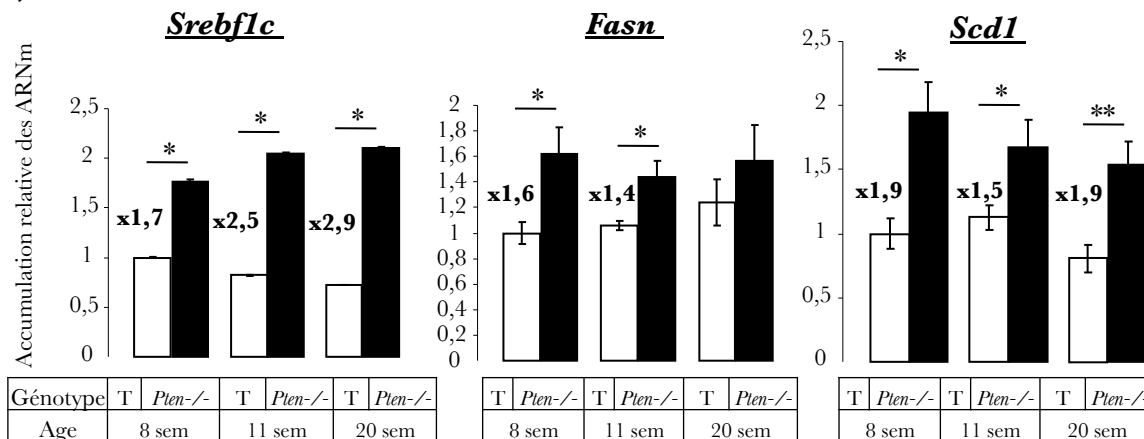


Figure 34 : Etude de l'accumulation des acteurs de la voie des LXRs.

Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes *Lxra*, *Lxrβ* et *Rxra* dans les prostates des souris témoins (T) et *Pten*^{-/-} de 8, 11 et 20 semaines. La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

A)



B)

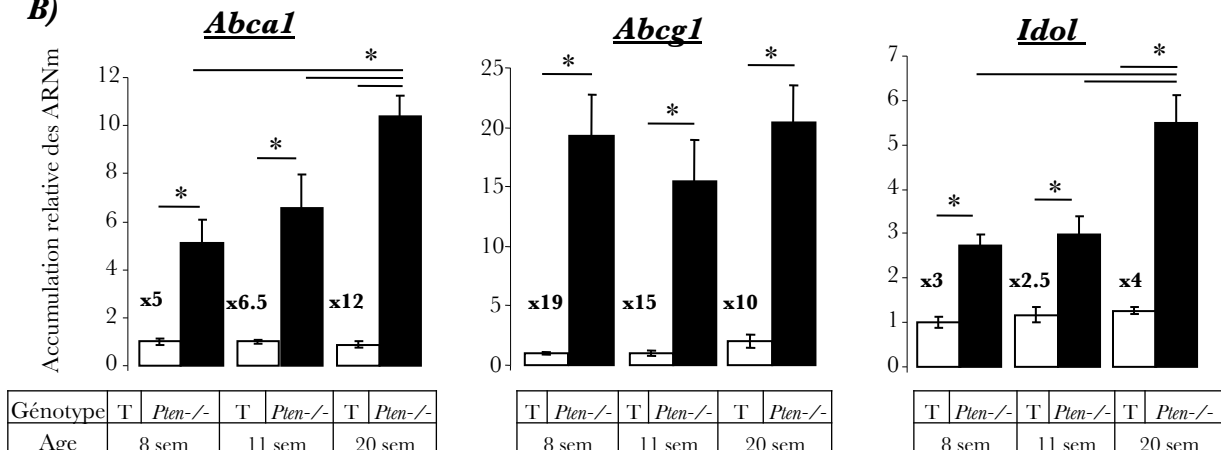


Figure 35 : Etude de l'accumulation des gènes cibles des LXRs.

Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes cibles des LXRs impliqués dans l'homéostasie des lipides **A)** *Srebf1c*, *Fasn* et *Scd1* et du cholestérol **B)** *Abca1*, *Abcg1* et *Idol* dans les souris témoins et *Pten*^{-/-} de 8, 11 et 20 semaines. La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

animaux *Pten*^{-/-} à 8 et 11 semaines. Les LXRs pour être fonctionnels doivent s'hétérodimériser avec RXR. Or il a été montré que les souris invalidées pour *Rxra* dans la prostate présentaient des néoplasies alors que l'invalidation de *Rxrβ* et γ n'engendre pas de phénotype ce qui suggère un rôle majeur de l'isoforme α dans la physiologie prostatique (Huang et al., 2002). Nous avons constaté une augmentation significative de l'expression de *Rxra* dans les souris *Pten*^{-/-} à 8, 11 et 20 semaines (Figure 34).

Les acteurs majeurs de la voie des LXRs sont présents et *Lxrβ* et *Rxra* sont activés transcriptionnellement dans les prostates tumorales des souris *Pten*^{-/-} suggérant un ciblage de la voie LXR au cours de la carcinogenèse induite par l'invalidation de *Pten*.

L'expression des gènes cibles des LXRs est-elle modifiée ?

Cette observation peut paraître paradoxale car nous avons montré que les LXRs ont un effet inhibiteur sur le cycle cellulaire. Nous avons étudié l'impact de la perte de *Pten* sur l'expression des gènes cibles de la voie de signalisation LXR/RXR. L'accumulation de *Srebf-1c* et *Scd-1* est augmentée significativement chez les animaux *Pten*^{-/-} à 8, 11 et 20 semaines et celle de *Fasn* suit la même tendance à 8 et 11 semaines (Figure 35A). Nous avons ensuite choisi de nous intéresser plus particulièrement aux gènes cibles impliqués dans l'homéostasie du cholestérol puisqu'ils semblent être liés au rôle des LXRs sur le cycle cellulaire démontré jusqu'à présent dans la prostate (Figure 35B). D'une part, l'accumulation des transporteurs *Abca1* et *Abcg1*, dont les protéines permettent l'efflux du cholestérol intra-cellulaire, est augmentée chez les animaux *Pten*^{-/-}. D'autre part, *Idol* qui stimule la dégradation de LDLR voit son expression également augmentée dans les prostates tumorales des animaux *Pten*^{-/-}. Ces résultats suggèrent que la signalisation des LXRs, visant la diminution des quantités de cholestérol, est activée.

La synthèse de cholestérol est-elle modifiée dans les souris *Pten*^{-/-} ?

Nous nous sommes ensuite demandés quelle était l'origine de l'activation des LXRs dans les souris *Pten*^{-/-}. Il a été montré que le cholestérol s'accumule dans les tumeurs solides et notamment dans la prostate. Une partie du cholestérol conduit à la production d'oxystérols dans la cellule ce qui induit entre autre l'activation des LXRs et permet un contrôle de l'homéostasie lipidique. Il existe trois sources d'augmentation du cholestérol intra-cellulaire, le captage et la synthèse *de novo* accrus et l'utilisation des réserves de cholestérol. Tout d'abord, nous avons analysé par RT-qPCR trois acteurs de la voie de biosynthèse du cholestérol (Figure 36). SREBP2 est un facteur de transcription qui contrôle l'expression d'acteurs codant

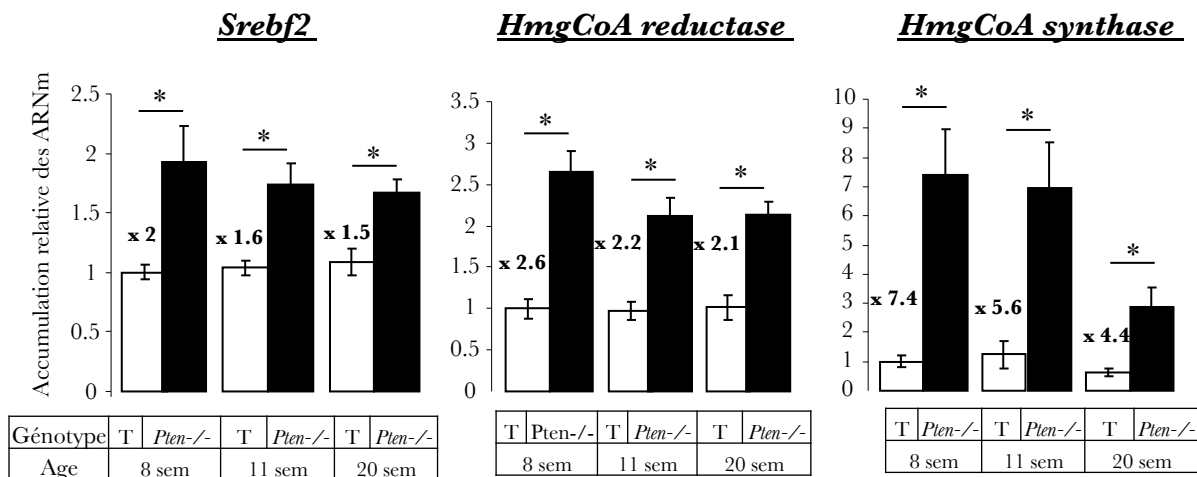


Figure 36 : Etude de l'expression de gènes clés de la synthèse *de novo*.

Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes de la voie de biosynthèse du cholestérol, *Srebf2*, *HmgCoA reductase* et *HmgCoA synthase* dans les souris témoins (T) et *Pten*^{-/-} de 8, 11 et 20 semaines. La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

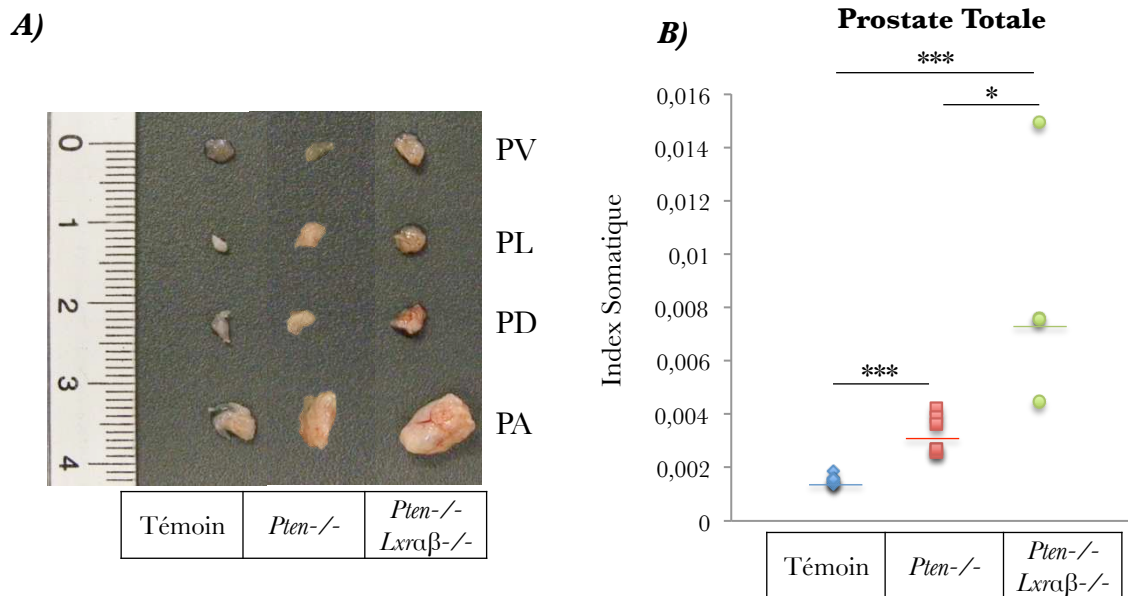


Figure 37 : Phénotype des prostates des animaux *Pten*^{-/-}*Lxraβ*^{-/-}

A) Comparaison macroscopique des lobes prostatiques (PV: Prostate Ventrale; PL: Prostate Latérale; PD: Prostate Dorsale et PA: Prostate Antérieure) des souris témoin, *Pten*^{-/-}, *Pten*^{-/-}*Lxraβ*^{-/-} de 20 semaines **B)** Les différents lobes prostatiques (ventral, latéral, dorsal et antérieur) ont été pesés sur des animaux témoins, *Pten*^{-/-}, *Pten*^{-/-}*Lxraβ*^{-/-} de 20 semaines (n=4) et leurs poids ont été additionnés et rapportés au poids total de l'animal (n= 6-8). La barre représente la médiane. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

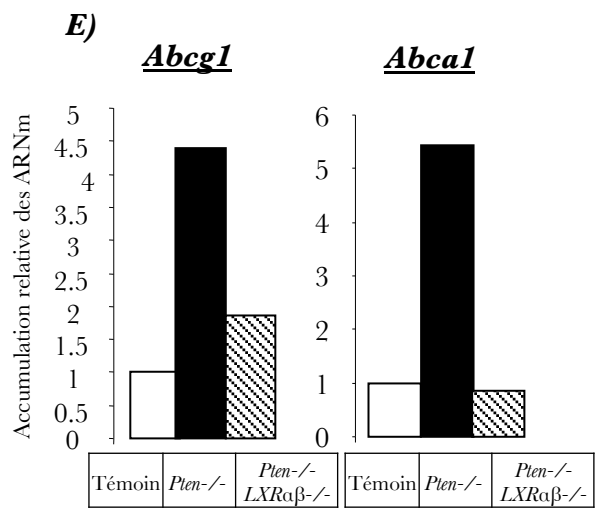
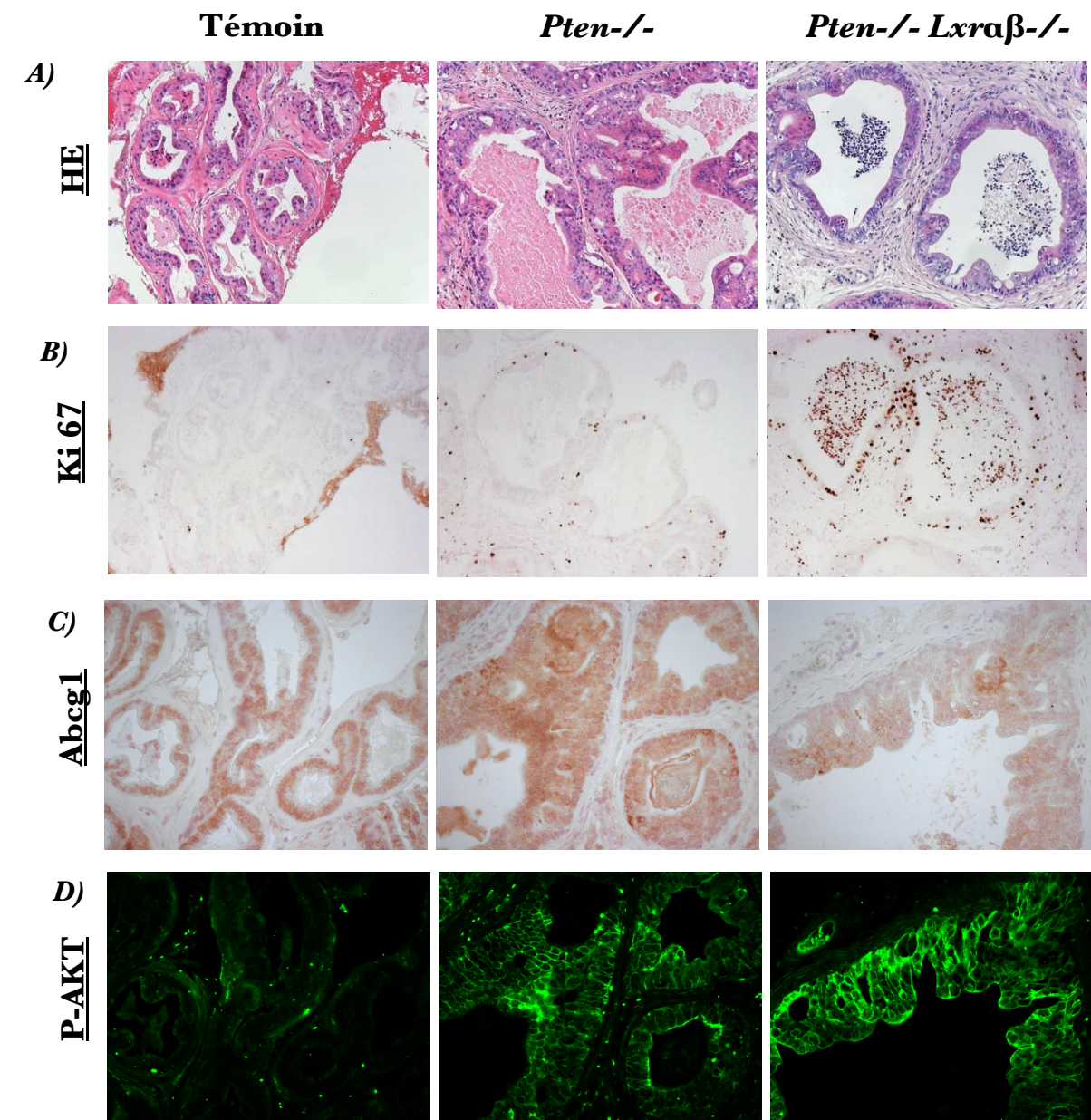


Figure 38 : Analyse histologique des prostates des animaux *Pten*^{-/-}/*Lxraβ*^{-/-}
A) Coloration hématoxyline-éosine (HE) des souris témoins, *Pten*^{-/-}, *Pten*^{-/-}/*Lxraβ*^{-/-}. **B)** Le marquage histochimique Ki67 est augmenté dans les souris *Pten*^{-/-} et *Pten*^{-/-}/*Lxraβ*^{-/-}. **C)** Le marquage histochimique contre *Abcg1* est augmenté dans les souris *Pten*^{-/-} et est diminué dans les souris *Pten*^{-/-}/*Lxraβ*^{-/-}. **D)** Le marquage immunofluorescent d' AKT phosphorylé (P-AKT) est augmenté dans les souris *Pten*^{-/-} et *Pten*^{-/-}/*Lxraβ*^{-/-}. **E)** Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes *Abcg1* et *Abca1* (n=1). La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*.

les gènes de la synthèse *de novo* de cholestérol comme l'*HMG-CoA Reductase* et l'*HMG-CoA Synthase*. Ces trois acteurs présentent une augmentation de leur accumulation dans les prostates tumorales des souris *Pten*^{-/-} (Figure 36). Ces résultats sont en faveur d'une synthèse augmentée de cholestérol en contexte *Pten*^{-/-}. Par ailleurs, une coloration à l'huile rouge d'une prostate dorsale témoin ou ou *Pten*^{-/-} de 20 semaines n'a pas montré d'accumulation de lipides neutres ce qui suggère que le cholestérol produit n'est pas stocké sous forme d'ester (Données non montrées). L'hypothèse que nous pouvons formuler est qu'une partie de ce cholestérol produit en grande quantité est transformé en oxystérols qui vont ensuite activer la signalisation LXR ce qui expliquerait l'augmentation d'expression des gènes cibles LXRs comme *Abca1* et *Abcg1*.

Quel est le rôle des LXRs dans la carcinogénèse prostatique des souris *Pten*^{-/-} ?

Pour répondre à cette question, nous avons voulu étudier l'impact des pertes combinées des LXRs et de PTEN en croisant les souris *Lxra*β^{-/-} avec les souris *Pten*^{-/-}. L'étude du poids des lobes prostatiques montre une augmentation dans les animaux *Pten*^{-/-} et *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} par rapport aux animaux témoins (Figure 37A et B). Une augmentation significative du poids des lobes dorsaux et antérieurs est constatée chez les animaux *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} par rapport aux animaux *Pten*^{-/-}. Des analyses histologiques montrent une altération plus importante de l'épithélium des souris *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} (Figure 38A). En effet, on constate la présence de masses de cellules. Cependant, à la différence des animaux *Pten*^{-/-}, des vacuoles sont visibles au niveau de l'épithélium et des cellules sont accumulées au centre de la lumière de la glande. Les données antérieures montrent que les LXRs agissent comme des régulateurs négatifs du cycle cellulaire. Nous avons donc étudié la prolifération grâce à une expérience d'immunohistochimie pour détecter Ki67. Comme attendu, une augmentation du marquage Ki67 dans les souris *Pten*^{-/-} par rapport aux souris témoins est observée (Figure 38B). Les animaux *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} présentent une augmentation importante du nombre de cellules Ki67+. Par ailleurs, une analyse immunohistochimique de ABCG1 a été réalisée sur les prostates des souris *Pten*^{-/-} (Figure 38C). Le marquage ABCG1 est fortement diminué dans les souris *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} démontrant ainsi que les modulations observées de ce transporteur dans les souris *Pten*^{-/-} sont bien dépendantes des LXRs. Ce résultat a été confirmé en qPCR où les accumulations de *Abcg1* et *Abca1* sont abolies dans les souris *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} (Figure 38E). L'ensemble de ces résultats montre que les dérégulations d'expression d'*Abca1* et *Abcg1* observées en contexte d'inactivation de *Pten* sont bien dépendantes des LXRs.

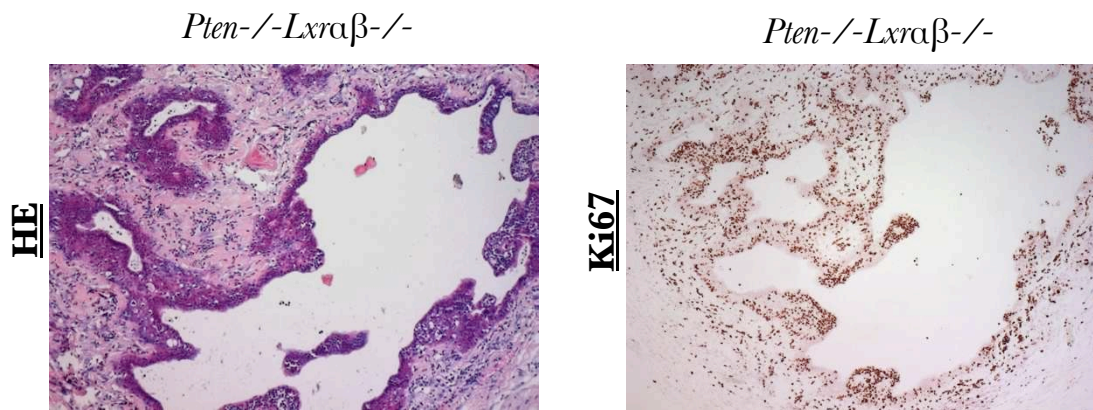


Figure 39 : Analyse anatomique et pathologique d'une masse accolée au lobe antérieure d'une souris *Pten-/-Lxraβ-/-*. Coloration hématoxyline-éosine (HE) et marquage immunohistochimique de Ki67. Cette masse est constituée de cellules proliférantes.

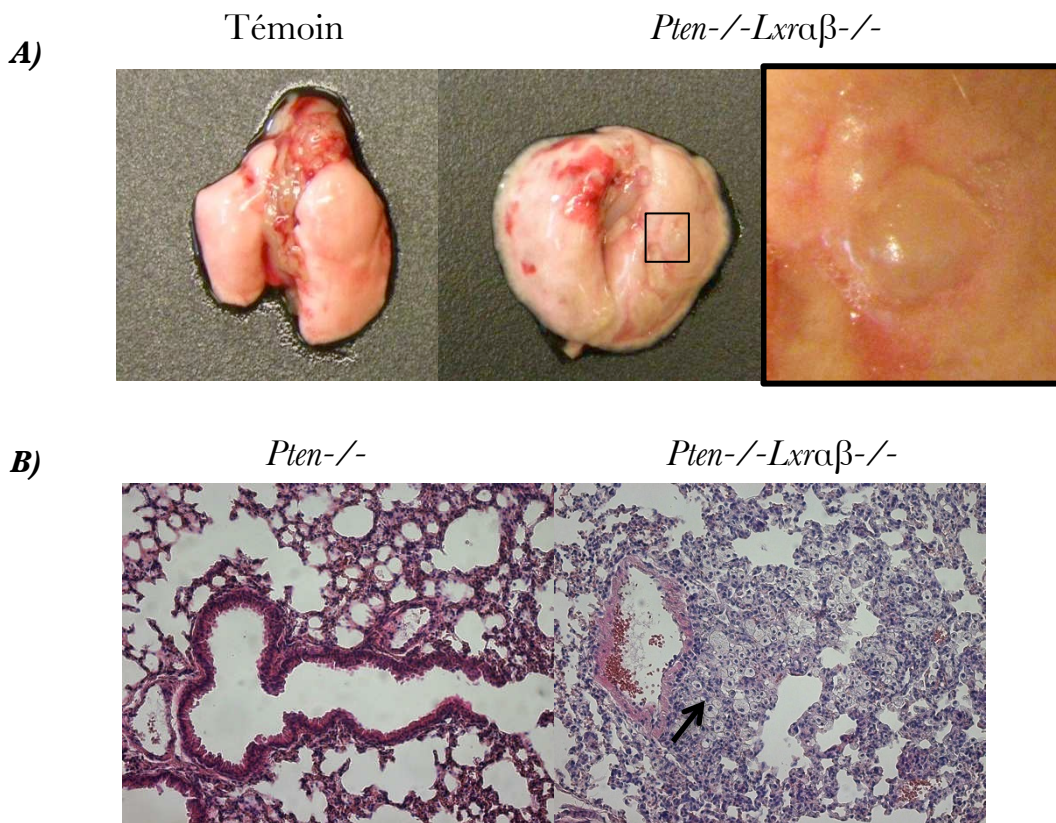


Figure 40 : Les poumons des souris *Pten-/-Lxraβ-/-* semble présenter des métastases.

A) Vue macroscopique des poumons des souris témoins et *Pten-/-Lxraβ-/-* de 20 semaines avec un agrandissement d'une métastase potentielle. **B)** Coloration hématoxyline-éosine de ces poumons. Présence de cellules atypiques (flèche) dans les poumons des souris *Pten-/-Lxraβ-/-*.

Nous avons ensuite réalisé des expériences d'immunohistochimie montrant que les souris *Pten*^{-/-} présentent une phosphorylation plus importante d'AKT que les souris témoins (Figure 38D). De manière intéressante, la phosphorylation d'AKT semble être plus marquée encore dans les souris *Pten*^{-/-} *Lxra*^β^{-/-} suggérant donc que la perte des LXR^s entraîne une activation de la voie de survie AKT. Ces données sont à confirmer par *western blot* mais sont néanmoins en accord avec les résultats obtenus sur les cellules MPECs (Article 1) et les résultats antérieurs de l'équipe (Pommier et al., 2010).

Les résultats obtenus avec le marquage Ki67 sur les lobes dorsaux, même s'ils doivent être quantifiés, semblent témoigner d'une prolifération plus importante dans les prostates des animaux *Pten*^{-/-} *Lxra*^β^{-/-}. La même tendance à l'augmentation du marquage Ki67 est observée dans les prostates antérieures des souris (données non montrées) avec la présence d'une masse au niveau de ce lobe. La coloration hématoxyline-éosine de cette masse montre une structure atypique et hyperproliférante comme en témoigne le marquage Ki67 caractéristique d'un carcinome invasif fortement développé (Figure 39).

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux ganglions et poumons de ces animaux puisqu'ils sont le siège privilégié de métastases chez les animaux *Pten*^{-/-}. Nous n'avons pas encore réalisé d'analyses histologiques sur les ganglions. Cependant, nous avons observé chez tous les animaux *Pten*^{-/-} *Lxra*^β^{-/-} de possibles métastases pulmonaires (Figure 40A). La coloration hématoxyline-éosine des poumons d'animaux *Pten*^{-/-} *Lxra*^β^{-/-} a montré la présence de cellules atypiques (Figure 40B). Cependant, il est nécessaire de confirmer l'existence de métastases par des analyses d'immunohistochimie avec des marqueurs prostatiques pour vérifier l'origine tissulaire de ces cellules.

L'ensemble de ces données préliminaires semble montrer que la perte des LXR^s dans un contexte d'inactivation de *Pten* entraîne une aggravation du phénotype tumoral caractérisée par une hyperprolifération.

Quel est l'effet de l'activation des LXR^s sur la carcinogénèse prostatique des souris *Pten*^{-/-} ?

Nous avons vu précédemment que la voie des LXR^s semble être activée quand *Pten* est absent. Nous avons voulu voir l'effet d'une activation pharmacologique chronique des LXR^s dans les souris *Pten*^{-/-}. Nous avons ainsi traité des souris témoins et *Pten*^{-/-} de 20 semaines avec le T0901317, ligand synthétique des LXR^s, pendant 1 mois.

Des études par RT-qPCR, nous ont permis de valider le traitement puisque l'on constate une augmentation de l'accumulation du gène cible *Abca1* dans les prostates dorso-latérales des

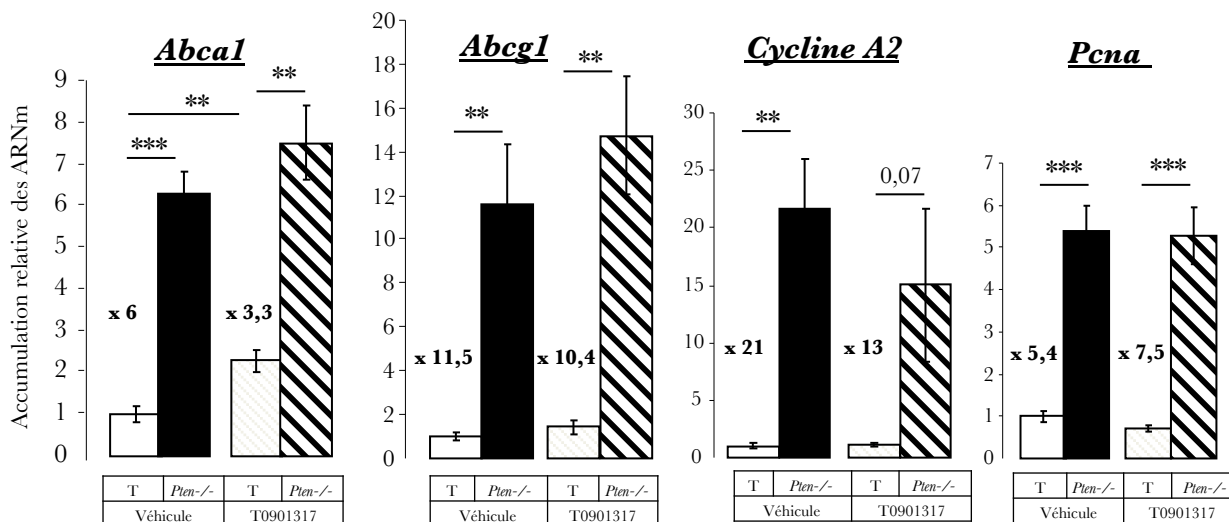
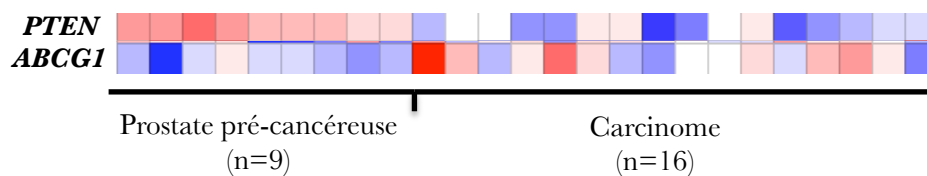


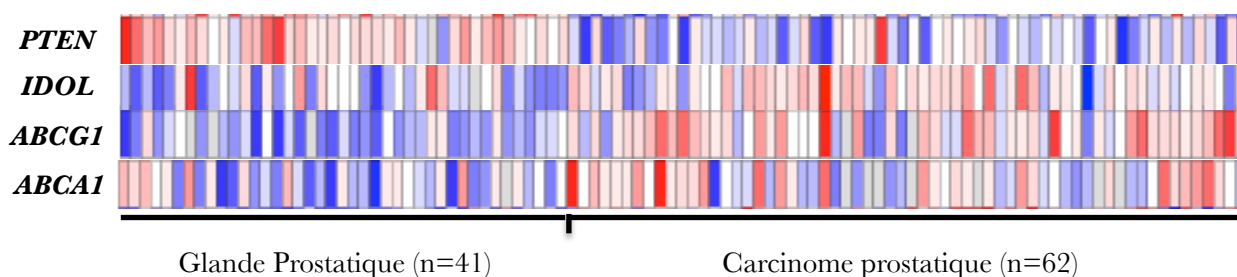
Figure 41 : Effet d'un traitement T0901317 sur les gènes cibles des LXR_s et les gènes associés à la prolifération.

Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes cibles des LXR_s, *Abca1* et *Abcg1* puis des gènes de prolifération *Cycline A2* et *Pcna* dans les prostates des souris témoins et *Pten*^{-/-} de 20 semaines traitées 1 mois par le véhicule (méthylcellulose 1 %) ou le T0901317 (20mg/kg). La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

A)



B)



Sous-expression Sur-expression

Figure 42 : Analyse Oncomine reflétant les variations d'expression des gènes cibles des LXR_s en fonction de PTEN chez l'homme.

A) Données transcriptomiques de Luo *et al.*, 2001 pour l'expression de *PTEN* et *ABCG1* dans des échantillons de prostate pré-cancéreuse et de carcinoma. **B)** Données transcriptomiques de Lapointe *et al.*, 2004 pour l'expression de *PTEN*, *IDOL*, *ABCG1* et *ABCA1* dans des échantillons de glande prostatique saine et de carcinoma prostatique.

souris sauvages traitées avec le T0901317 (Figure 41). En revanche, le T0901317 n'induit pas d'augmentation supplémentaire des transcrits des gènes cibles *Abca1* et *Abcg1* dans les prostates des souris *Pten*^{-/-}. De plus, l'expression de deux marqueurs de prolifération, *Cycline A2* et *Pcna* est augmentée chez les animaux *Pten*^{-/-} traité ou non avec le T0901317 (Figure 41).

Ces résultats suggèrent que la voie des LXR est activée dans les souris *Pten*^{-/-} de 8 à 20 semaines et que cette activation est maximale puisque le T0901317 n'a aucun effet sur les prostates *Pten*^{-/-}.

Qu'en est-il des LXR au niveau du cancer de la prostate chez l'Homme ?

A ce jour, il n'existe aucune donnée concernant les LXR dans la prostate humaine. Toutefois, nous nous sommes intéressés plus précisément à l'expression des LXR et des gènes cibles candidats *ABCA1*, *ABCG1* et *IDOL* en nous appuyant sur la plate-forme *Oncomine* (www.oncomine.org) qui est une base de données de transcriptomes publiés. Nous avons ainsi pu étudier des données obtenues chez l'Homme sur des échantillons de prostates normales et pathologiques (Figure 42). Tout d'abord, les données de Luo *et al.* 2001, permettent de comparer les signatures transcriptomiques d'échantillons de prostates non-cancéreuses avec des échantillons de carcinomes (Figure 42A) (Luo *et al.*, 2001). Conformément aux données de la littérature, l'expression de *PTEN* est fréquemment diminuée en cas de carcinomes. En parallèle, l'expression des gènes cibles des LXR, *ABCA1* et *ABCG1* présente également une augmentation d'expression dans les carcinomes prostatiques. Les données de Lapointe *et al.*, 2004 regroupant des échantillons de prostates saines et de carcinomes, montrent des résultats semblables : lorsque le carcinome est installée, *Pten* est perdu et corrèle avec une augmentation de l'expression de *ABCG1*, *ABCA1* et *IDOL* (Figure 42B) (Lapointe *et al.*, 2004).

Ces observations indiquent donc qu'il existe également un lien potentiel entre l'inactivation de *PTEN* et l'activité des LXR chez l'homme et placent les souris *Pten*^{-/-} comme un modèle d'étude très pertinent pour la compréhension de ce lien.

Développement de nouveaux modèles cellulaires

Afin d'explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans le phénotype prostatique des modèles murins, nous avons dérivé des MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) à partir des animaux *Pten*^{-/-} (Figure 43). L'inactivation de *Pten* conduit à l'accumulation d'AKT phosphorylée (Figure 43A). L'expression et l'accumulation protéique d'*Abca1* sont augmentées dans les MEFs *Pten*^{-/-}. L'expression d'*Abcg1* et *Srebf2* est augmentée dans les MEFs *Pten*^{-/-} ce qui reproduit les résultats obtenus *in vivo* sur la cinétique (Figure 43B). Néanmoins, les résultats

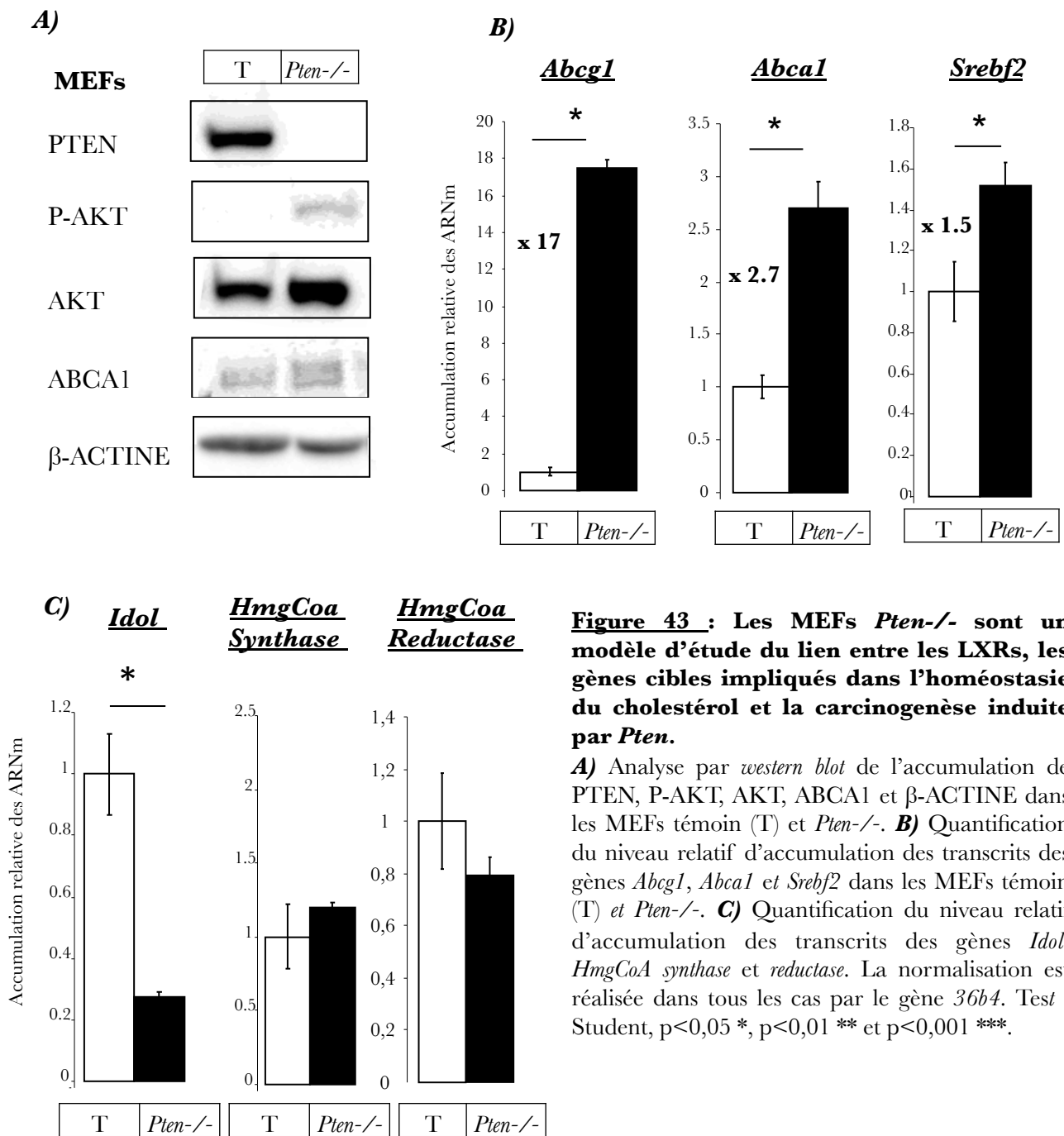


Figure 43 : Les MEFs *Pten*^{-/-} sont un modèle d'étude du lien entre les LXR, les gènes cibles impliqués dans l'homéostasie du cholestérol et la carcinogénèse induite par *Pten*.

A) Analyse par *western blot* de l'accumulation de PTEN, P-AKT, AKT, ABCA1 et β-ACTINE dans les MEFs témoin (T) et *Pten*^{-/-}. **B)** Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes *Abcg1*, *Abca1* et *Srebf2* dans les MEFs témoin (T) et *Pten*^{-/-}. **C)** Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes *Idol*, *HmgCoA synthase* et *reductase*. La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

sont différents des données *in vivo* pour *Idol*, *HMGCoA reductase* et *HMGCoA synthase* dont l'expression est diminuée et inchangée dans les MEFs *Pten*^{-/-} (Figure 43C).

Parce qu'elles reproduisent une partie des résultats observés sur les gènes cibles des LXR_s, les MEFs *Pten*^{-/-} peuvent donc servir de modèle pour étudier les mécanismes responsables de l'activation des LXR_s et plus particulièrement l'augmentation d'expression des gènes cibles impliqués dans l'homéostasie du cholestérol en contexte tumoral.

Afin d'étudier plus précisément les mécanismes moléculaires reliant les LXR_s à la carcinogenèse prostatique dépendante de *Pten*, nous avons voulu dériver des MEFs *Pten*^{-/-} *Lxra*^β^{-/-}. Nous avons effectué sur ces cellules des analyses par qPCR des transcrits *Abcg1* et *Abca1*; leur accumulation est effondrée dans ces MEFs confirmant que les variations de ces gènes observées en contexte *Pten*^{-/-} sont bien dues à des régulations dépendantes des LXR_s (Figure 44). Après génotypage, nous nous sommes rendus compte qu'il s'agissait de MEFs *Pten*^{-/-} *Lxra*^{+/-} *β*^{-/-}. Bien que ces cellules ne soient pas utilisables en tant que telles, elles montrent bien que les variations d'expression des gènes cibles des LXR_s, *Abca1* et *Abcg1* observées en contexte *Pten*^{-/-} sont dépendantes de la présence des LXR_s.

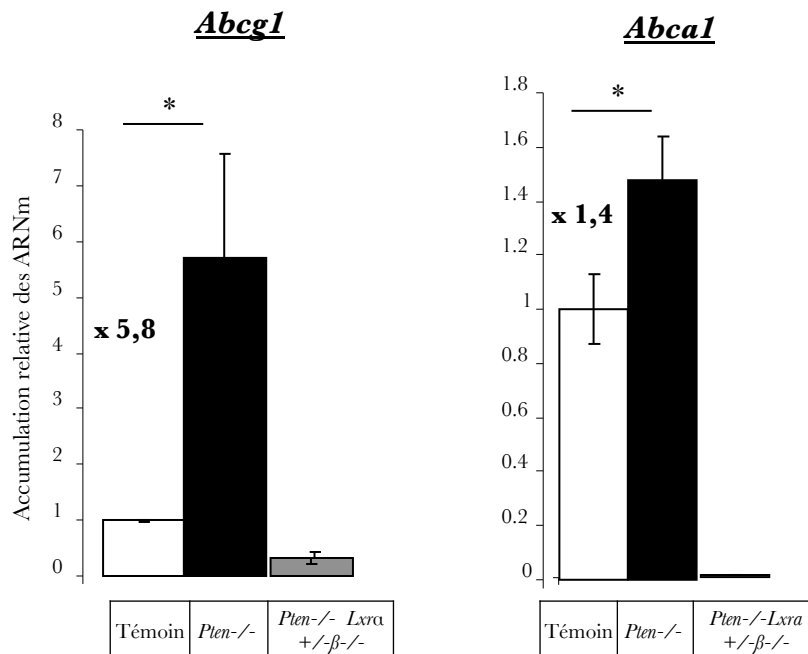


Figure 44 : Les variations d'expression d'*Abcg1* et *Abca1* en contexte *Pten*^{-/-} sont dépendantes des LXRs.

Quantification du niveau relatif d'accumulation des transcrits des gènes cibles des LXRs, *Abca1* et *Abcg1* dans les MEFs témoins, *Pten*^{-/-}, *Pten*^{-/-} *Lxra*^{+/-} β ^{-/-}. La normalisation est réalisée dans tous les cas par le gène *36b4*. Test *t* Student, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** et $p < 0,001$ ***.

Conclusion Projet 3

Dans un modèle de cancer de la prostate, les souris *Pten*^{-/-}, les LXRs sont activés ce qui se traduit par une augmentation de l'expression des gènes cibles impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, *Abca1*, *Abcg1* et *Idol*. Du fait de l'absence de réponse au traitement au T0901317, nous avons montré que la voie des LXRs semble être activée de manière maximale dans les souris *Pten*^{-/-}. Afin de déterminer le rôle des LXRs dans la carcinogenèse prostatique, nous avons étudié l'impact de la perte des deux isoformes de ces récepteurs dans les souris *Pten*^{-/-}. Dans ces souris *Pten*^{-/-}*Lxra*^β^{-/-}, la progression tumorale semble être accélérée.

De manière intéressante, les LXRs qui jusqu'à présent étaient montrés comme ayant un rôle protecteur dans la carcinogenèse prostatique semblent être stimulés en contexte tumoral. Une des hypothèses est qu'ils sont mis en jeu par la cellule pour lutter contre la synthèse massive de cholestérol qui stimule la prolifération des cellules tumorales. En diminuant le contenu intracellulaire de cholestérol, les LXRs exerceraient leur rôle anti-prolifératif sur les cellules tumorales prostatiques. Il pourrait donc s'agir d'un mécanisme de protection de la cellule en réponse au développement tumoral induit par l'invalidation de *Pten*.

DISCUSSION
&
PERSPECTIVES

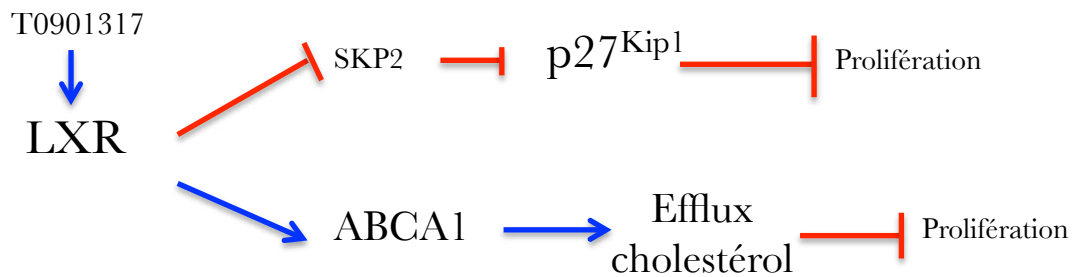
Les objectifs de mon travail de thèse étaient d'évaluer: 1) l'effet de l'absence des LXR α sur des cellules épithéliales prostatiques murines ; 2) les effets d'un régime enrichi en cholestérol dans le développement du cancer de la prostate ; 3) le ciblage des LXR α et de leurs gènes cibles par les processus de carcinogenèse prostatique. Nous montrons que les LXR α exercent leur effet anti-prolifératif sur des cellules épithéliales de prostate dorsale non-tumorale, les cellules MPECs, confirmant **l'importance des LXR α dans l'homéostasie prostatique**. Par ailleurs, dans ces cellules, les LXR α ont d'une part, un **rôle crucial dans la régulation de gènes cibles contrôlant l'homéostasie du cholestérol** et d'autre part, **une action modulatrice sur les voies de survie AKT et MAPK**. Nous avons ensuite mis en évidence qu'en absence des gènes *Lxr α* et *Lxr β* , des souris nourries avec un régime enrichi en cholestérol présentent des néoplasies intra-épithéliales associées à la répression de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur démontrant **le rôle protecteur des LXR α en condition d'hypercholestérolémie dans la prostate**. Enfin, nous avons montré que dans un modèle murin de cancer de la prostate, les souris *Pten*^{-/-}, **les LXR α sont activés constitutivement au cours de la carcinogenèse**. Il semble ainsi que cette stimulation des LXR α en contexte tumoral agisse telle une barrière puisque lorsque l'on invalide les deux isoformes de ces récepteurs nucléaires, la progression tumorale est accélérée.

L'ensemble de ces résultats soulève plusieurs questions :

I) **Comment les LXR α exercent-ils leur effet sur le cycle cellulaire?**

Les données de la littérature mettent en évidence un rôle anti-prolifératif et pro-apoptotique des LXR α sur des lignées tumorales prostatiques humaines. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués restent jusqu'à présent peu détaillés. Fukuchi *et al* ont montré que l'activation des LXR α par le T0901317 induit une diminution du nombre de cellules en phase S suite à une augmentation de l'accumulation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} et une baisse de l'accumulation de SKP2 capable de dégrader p27^{Kip1} (Fukuchi et al., 2004b). Ils ont également observé cet effet anti-prolifératif sur la lignée tumorale mammaire MDA-MB435S associé aux modulations de p27^{Kip1} et SKP2 définissant ces deux acteurs comme des médiateurs de l'effet des LXR α sur la prolifération de cellules tumorales. Nos résultats montrent que les cellules MPECs témoins présentent une accumulation de p21^{Waf1}, un autre inhibiteur du cycle de la même famille que p27^{Kip1}, en réponse au T0901317. Une étude réalisée sur des cellules de carcinomes ovariens a mis en évidence que l'effet anti-prolifératif du T0901317 sur ces cellules est associé à une accumulation de p27^{Kip1} mais également de

A) Dans les LNCaP



B) Dans les MPECs

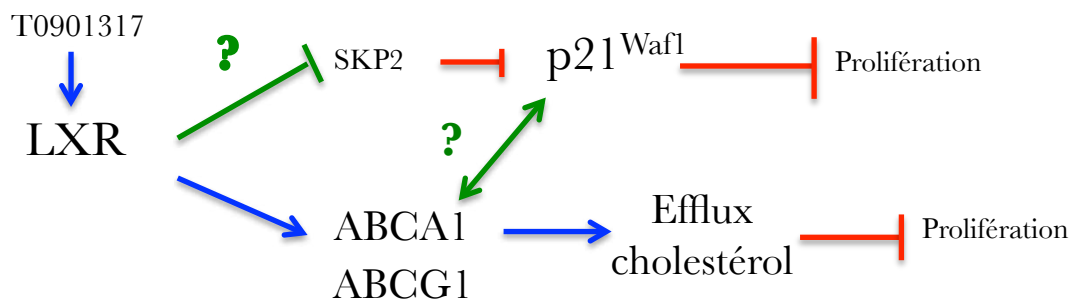


Figure 45 : Les LXR ont un rôle anti-prolifératif.

A) Schéma bilan des travaux de Fukuchi *et al.*, 2004 sur les cellules prostatiques tumorales LNCaP. L'activation des LXR par le T0901317 entraîne une diminution de la prolifération d'une part *via* la baisse de l'accumulation de SKP2 et la stimulation de p27^{KIP1} et d'autre part *via* la stimulation d'ABCA1 cassette d'efflux du cholestérol. **B)** Schéma bilan sur les cellules MPECs. L'activation des LXR inhibe p21^{Waf1} et stimule ABCA1 et ABCG1 entraîne une baisse de la prolifération. En vert sont représentés les perspectives de travail; i) étudier si l'accumulation de p21^{Waf1} est la conséquence d'une baisse de SKP2, ii) si l'effet des cassettes d'efflux est lié à p21^{Waf1}.

p21^{Waf1} (Rough et al., 2010). De plus, la dégradation de p21^{Waf1} peut également être médiée par SKP2 (Wang et al., 2005). L'effet du T0901317 sur la prolifération des cellules MPECs sauvages pourrait utiliser les facteurs p21^{Waf1} et SKP2. En effet, l'activation des LXR_s pourrait diminuer l'accumulation de SKP2 qui en réponse ne pourra plus dégrader p21^{Waf1}. Ce dernier sera donc capable d'inhiber le cycle cellulaire (Figure 45).

➤ Pour confirmer cette hypothèse, nous pouvons envisager d'inhiber par une voie d'ARN interférence p21^{Waf1} et d'étudier l'impact sur la prolifération cellulaire. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'accumulation de la protéine SKP2 dans ces cellules MPECs en réponse au T0901317.

En parallèle, Fukuchi *et al* ont montré que, lorsqu'ils réalisent des xéno greffes de cellules LNCaP sur souris nude, un traitement au T0901317 réduit le volume de la tumeur et permet une accumulation de la cassette d'efflux ABCA1 (Fukuchi et al., 2004b). De plus, des cellules LNCaP, pour lesquelles l'extinction du gène *ABCA1* est réalisée par interférence ARN, présentent une augmentation de la prolifération (Fukuchi et al., 2004a). Ces données montrent que le rôle des LXR_s sur la prolifération cellulaire est dépendant de l'accumulation du gène *ABCA1*. Une hypothèse suggérée pour relier ABCA1 à la prolifération cellulaire est son rôle dans l'efflux de cholestérol qui pourrait entraîner des modifications au niveau des plateformes de signalisation que sont les *rafts* lipidiques (Zhuang et al., 2002). Cependant, le mécanisme n'est pas élucidé ce qui montre l'intérêt de notre modèle cellulaire MPECs. L'effet de l'activation des LXR_s sur le cycle cellulaire des cellules tumorales prostatiques LNCaP et des cellules MPECs semble ainsi médié d'une part *via* une accumulation des inhibiteurs du cycle p27^{Kip1} ou p21^{Waf1} et d'autre part *via* la stimulation d'*Abca1* et une possible interaction avec les *rafts*. Mais s'agit-il de deux voies indépendantes ou existe-t-il un lien entre elles ?

➤ Il serait ainsi important d'étudier dans les MPECs la conséquence de l'inactivation d'*Abca1* au niveau de l'accumulation de p21^{Waf1}.

Par ailleurs, en plus de son effet sur le cycle cellulaire, l'activation des LXR_s favorise l'apoptose des cellules LNCaP par un mécanisme impliquant les *rafts* lipidiques (Pommier et al., 2010). De manière intéressante, au niveau de ces *rafts*, la kinase AKT est activée par phosphorylation afin de favoriser la survie et la croissance des cellules tumorales prostatiques. Or la présence de cholestérol au niveau de la membrane augmente la coalescence des *rafts* qui stimulent le recrutement et la phosphorylation d'AKT (Lasserre et al., 2008). Des études *in vitro* et *in vivo* ont pu montrer que l'activation des LXR_s entraîne l'efflux du cholestérol membranaire, en stimulant la transcription du gène codant la cassette ABCG1 ce qui va altérer l'organisation des *rafts* et diminuer la phosphorylation d'AKT (Pommier et al., 2010).

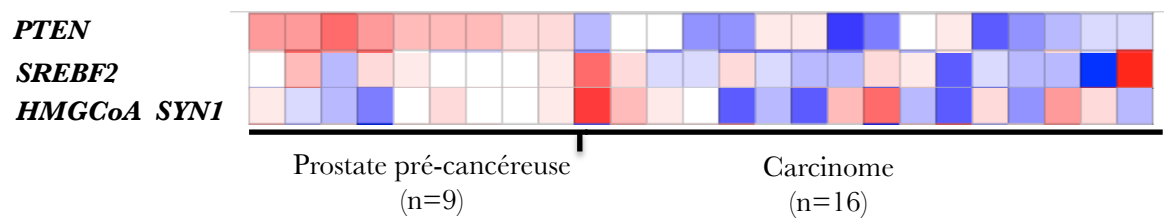
Par ce mécanisme, les LXR_s exercent un effet pro-apoptotique sur les cellules tumorales prostatiques. Les cellules MPECs témoins traitées avec les ligands des LXR_s ont une augmentation de l'expression du gène *Abcg1* et une baisse de l'accumulation d'AKT phosphorylé ce qui suggère que l'effet pro-apoptotique des LXR_s est maintenu dans les cellules épithéliales prostatiques saines. Nous pourrions vérifier que cet effet est bien dépendant d'une modulation des *rafts* lipidiques. Par ailleurs, les cellules MPECs *Lxrαβ*^{-/-} témoignent d'une suractivation de la voie de survie PI3K/AKT démontrant que l'effet pro-apoptotique est bien dépendant des LXR_s. Les cellules MPECs semblent donc appropriées pour étudier les mécanismes reliant les LXR_s à la prolifération et également à la voie de survie PI3K/AKT.

➤ Nous disposons au laboratoire de plusieurs modèles cellulaires établis ou en cours d'établissement, MEFs ou MPECs témoins, *Lxrαβ*^{-/-}, *Pten*^{-/-} et *Pten*^{-/-}*Lxrαβ*^{-/-} qui pourront nous permettre de compléter l'analyse du lien entre LXR, PTEN et AKT.

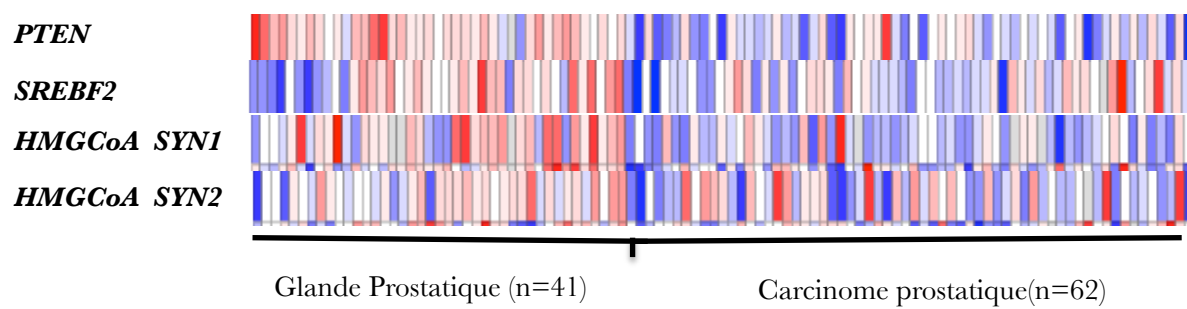
II) **Comment la voie des LXR_s peut-elle être activée dans les souris *Pten*^{-/-} ?**

Le point de départ de l'étude de l'accumulation et de l'activité des LXR_s dans un contexte de carcinogenèse prostatique murine est basé sur les études suggérant un rôle protecteur de ces récepteurs dans le cadre de cette pathologie. D'une part, les LXR_s exercent un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique *in vitro* sur des cellules prostatiques humaines et murines et *in vivo* sur des xénogreffes de cellules tumorales humaines (Fukuchi et al., 2004b; Chuu et al., 2006; Pommier et al., 2010 et Article 1). D'autre part, nous avons montré que l'absence des LXR_s entraîne l'apparition de néoplasies intra-épithéliales lorsque les souris sont nourries avec un régime enrichi en cholestérol. Au vu de ces données, notre hypothèse s'orientait vers une diminution d'expression ou au moins de l'activité des LXR_s au cours des processus de la carcinogenèse prostatique. A l'inverse, nous avons mis en évidence une augmentation de leur activité dans le modèle *Pten*^{-/-} ce qui peut s'expliquer si les LXR_s agissent comme une barrière à la progression tumorale. Une situation analogue est retrouvée dans une étude du rôle du facteur SMAD4 appartenant la voie pro-apoptotique du TGF-β, dans les souris *Pten*^{-/-} (*Transforming Growth Factor-β*) (Ding et al., 2011). En effet, les auteurs observent une augmentation de l'accumulation de la protéine SMAD4 dans les prostates des animaux *Pten*^{-/-}. Or l'inactivation de *Smad4* dans les souris *Pten*^{-/-} provoque une accélération de l'agressivité tumorale témoignant de l'effet barrière de cet acteur contre la progression.

A)



B)



Sous-expression Sur-expression

Figure 46 : Analyse Oncomine reflétant les variations d'expression des gènes de la synthèse *de novo* de cholestérol en fonction de *PTEN* chez l'homme.

A) Données transcriptomique de Luo *et al.*, 2001 pour l'expression de *PTEN*, *SREBF2* et *HMGCoA SYN1* dans des échantillons de prostate pré-cancéreuse et de carcinome. **B)** Données transcriptomique de Lapointe et al., 2004 pour l'expression de *PTEN*, *SREBF2*, *HMGCoA SYN1* et 2 dans des échantillons de glande prostatique saine et de carcinome prostatique.

Dans un premier temps, il est important de comprendre l'origine de l'activation des LXRs dans les animaux *Pten*^{-/-}. Pour cela, plusieurs pistes sont à envisager :

1) Biodisponibilité des oxystérols dans la prostate

L'argument en faveur de cette hypothèse est l'augmentation de l'accumulation des gènes clés de la synthèse de cholestérol. En effet, une synthèse accrue de cholestérol conduit à une augmentation des niveaux d'oxystérols.

Il est donc indispensable de doser le cholestérol et les oxystérols présents dans la prostate ainsi que de quantifier l'activité et l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des oxystérols telles que les cholestérol 24 et 25-hydroxylase et la sterol 27-hydroxylase.

De manière intéressante, les données *Oncomine* mettent en évidence que les gènes de la synthèse *de novo* du cholestérol ne sont pas associés aux variations de l'expression de *PTEN* (Figure 46). Cette augmentation de la synthèse *de novo* semblerait donc être une spécificité du modèle murin *Pten*^{-/-}. L'activation potentielle des LXRs chez l'homme associée à la perte de *PTEN*, retrouvée dans les données *Oncomine* (Figure 42), pourrait néanmoins être due à une augmentation des niveaux d'oxystérols si la quantité de cholestérol prostatique est augmentée par d'autres mécanismes tels que le captage ou la mobilisation des réserves de cholestérol.

➤ Il sera donc intéressant d'analyser l'expression de gènes et l'accumulation protéique des acteurs impliqués dans ces voies tels que *LDLR* et *ACAT*, au sein des tumeurs prostatiques humaines.

2) Modifications post-traductionnelles des LXRs et/ou de ses cofacteurs

L'hétérodimère LXR/RXR est fixé constitutivement sur ses éléments de réponse dans les promoteurs des gènes cibles. La présence de répresseurs comme N-CoR et SMRT inhibe l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère en contactant des histones désacétylases (HDAC) maintenant la chromatine condensée (Hu et al., 2003). A l'inverse, des co-facteurs participent à la stimulation de la transcription. D'une part, les facteurs remodelant la chromatine comme la famille SWI/SNF (*mating type switching/sucrose non fermenting*) peuvent déstabiliser les interactions entre l'ADN et les histones en hydrolysant l'ATP. D'autre part, certains facteurs peuvent modifier les histones comme les histones acétyl transférases ; SRC-1 (*Nuclear Receptor Coactivator 1*), GRIP-1 (*Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1*), CBP (*c-AMP Response Element Binding Protein*), p300, PGC1 α (*PPAR-Gamma Co-activator 1*), TRRAP (*Transformation/Transcription Domain-Associated Protein*) ainsi qu'un facteur touchant la méthylation des histones ; Rap250 (*Nuclear receptor-activating protein*). Une inhibition des

répresseurs ou à l'inverse une stimulation des co-facteurs pourrait expliquer l'activation des LXRs dans les souris *Pten*^{-/-}.

L'étude de l'accumulation de ces facteurs par RT-qPCR et *western blot* dans ce contexte semble indispensable.

Enfin, l'activité des LXR s peut également être influencée par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, désacétylations et/ou SUMOylations (Chen et al., 2006; Ghisletti et al., 2007; Li et al., 2007a; Delvecchio and Capone, 2008). Par exemple, la SIRT1 est une protéine co-activatrice des LXR s. Elle est capable d'induire leur désacétylation et leur dégradation protéosomale ce qui favorise la mise en place d'un nouvel hétérodimère sur les éléments de réponse dans les promoteurs de gènes cibles (Li et al., 2007b). Cette étude montre que la perte de SIRT1 entraîne la diminution de l'expression des gènes cibles LXR.

➤ Cet exemple confirme l'intérêt d'étudier l'expression et l'accumulation des acteurs comme *Sirt1* (RT-qPCR et *western blot*) et des modifications post-traductionnelles des LXR s (spectrométrie de masse) dans les souris *Pten*^{-/-}.

3) La voie des rétinoïdes

L'hétérodimère RXR/LXR est dit permissif ce qui signifie qu'il peut être également activé par la fixation du ligand de RXR, l'acide rétinoïque *9-cis*. Cette molécule est synthétisée dans les tissus suite à l'oxydation du rétinol (vitamine A) en acide rétinoïque existant sous forme *tout-trans* et *9-cis* (Parisotto et al., 2006). Même si l'existence de l'acide rétinoïque *9-cis in vivo* est controversée, il est considéré comme le ligand *bona fide* des RXR s (Dawson and Xia, 2012). Certains acides gras polyinsaturés tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA) peuvent également activer les RXR s (Dawson and Xia, 2012). De plus, les trois isoformes RXR α , β et γ sont exprimées dans la prostate même si RXR α semble avoir un rôle prépondérant puisque seules les souris *Rxra*^{-/-} développent des néoplasies au niveau prostatique identiques à celles des souris *Lxr $\alpha\beta$* ^{-/-} nourries avec le régime enrichi en cholestérol (Huang et al., 2002 et Article 2). Or dans la cinétique des animaux *Pten*^{-/-}, nous avons montré une augmentation de l'expression de *Rxra* ce qui pourrait étayer l'hypothèse d'un rôle de barrière de l'hétérodimère RXR/LXR contre la progression tumorale.

➤ Pour déterminer une potentielle dérégulation de la voie des rétinoïdes dans les prostates des souris *Pten*^{-/-} et l'activation de l'hétérodimère LXR/RXR, la présence des ligands devrait être analysée dans ces souris.

Par ailleurs, si les ligands des RXRs sont responsables de la stimulation des gènes cibles des LXR_s, nous proposons également d'étudier l'expression de gènes cibles de l'homodimère RXR/RXR.

III) L'effet anti-prolifératif des LXR_s et leur inductibilité sont-ils maintenus en absence de *Pten* ?

Les LXR_s exercent un effet anti-prolifératif *in vitro* sur des cellules tumorales prostatiques humaines et murines, et *in vivo* sur des xéno greffes de cellules tumorales humaines. Nous avons voulu étudier l'impact d'une activation pharmacologique des LXR_s dans le modèle murin *Pten*^{-/-}. Pour cela, nous avons traité, avec l'agoniste T0901317 pendant un mois des souris témoins et *Pten*^{-/-} de 20 semaines. L'analyse par RT-qPCR montre que l'expression des marqueurs de prolifération est inchangée chez les souris *Pten*^{-/-} traitées ou non avec le ligand des LXR_s.

➤ Ces résultats devront être confirmés par une quantification du marquage immunohistochimique contre le Ki67.

Nous nous sommes ensuite demandés si l'absence d'effet du T0901317 sur la prolifération n'était pas le résultat d'une mobilisation maximale des LXR_s dans les prostates des souris *Pten*^{-/-}. Les résultats témoignent d'une absence d'induction des gènes cibles des LXR_s, *Abca1* et *Abcg1* dans les souris *Pten*^{-/-} traitées au T0901317 ce qui suggère que les LXR_s sont constitutivement actifs dans les prostates de ces animaux. Cependant, l'induction de l'expression d'*Abca1* par le T0901317 est faible dans les souris sauvages. Ce résultat peut signifier que le protocole d'induction au T0901317 n'est pas adéquat pour étudier l'accumulation des gènes cibles des LXR_s.

➤ Afin d'éliminer le biais dû à la durée du traitement, nous prévoyons de traiter les souris 24h avec le T0901317 puis les sacrifier et étudier les profils transcriptomiques des gènes cibles. Si l'hypothèse qu'une augmentation des niveaux d'oxystérol est responsable de l'activation des LXR_s dans les souris *Pten*^{-/-} se vérifie, nous proposons de limiter en amont la quantité de cholestérol, en utilisant les statines, pour bloquer la synthèse *de novo* de cholestérol. Même si la signature moléculaire des prostates tumorales des souris *Pten*^{-/-} semble être différente de celle des prostates humaines du moins concernant la synthèse de cholestérol, il a été montré que les statines avaient chez l'Homme un impact sur le risque de cancer de la prostate (Roy et al., 2011). L'action des statines est centrée sur la synthèse du cholestérol au niveau du foie et

pourrait ainsi réduire les taux circulants et donc potentiellement captés par la tumeur. Il sera intéressant d'étudier si ce traitement par les statines permet; une diminution de la quantité de cholestérol intra-prostatique, un ralentissement de la progression tumorale et une modification de l'activation des LXR.

IV) L'absence des LXRs influence-t-elle la carcinogenèse dépendante de la perte de *Pten* ?

Les observations réalisées sur les souris *Pten*^{-/-} montrant une activation des LXRs nous permettent de formuler l'hypothèse qu'une barrière formée par la voie des LXRs s'oppose à la progression tumorale. Afin de confirmer que la perte des LXRs entraîne la progression tumorale, nous avons généré les souris *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-}. Les premiers résultats obtenus sur des animaux de 6 mois montrent que le poids des prostates augmente et que l'accumulation des gènes *Abca1* et *Abcg1*, est effondrée. Au niveau histologique, la présence d'un carcinome *in situ* est visualisée par une masse accolée au lobe antérieur et par une augmentation de la prolifération démontrée par un marquage Ki67 plus important. Les marqueurs étudiés orientent vers une accélération des processus tumoraux due à la perte des LXRs. De plus, un marquage Ki67 est également visible au sein du stroma mais absent dans les animaux *Pten*^{-/-}. Il serait important de déterminer si ces cellules sont épithéliales ou stromales, Pten⁺ ou Pten⁻. Elles pourraient être issues d'une transition épithélium-mésenchyme (TEM), phénomène associé à la progression tumorale (Hugo et al., 2007). En effet, les cellules épithéliales peuvent acquérir un phénotype mésenchymateux en perdant leurs caractéristiques épithéliales suite à des modifications architecturales et fonctionnelles.

➤ Afin de confirmer la présence de TEM, nous proposons de détecter la N-cadhérine qui est un marqueur de cette transition corrélé avec la perte de la E-cadhérine (Armstrong et al., 2011).

➤ Afin de déterminer si la présence de ces cellules dans le stroma est dépendante de la perte des LXRs au niveau de ce compartiment, nous pouvons envisager d'étudier le résultat d'un croisement entre souris *Pten*^{-/-} et souris dont l'invalidation des LXRs serait spécifique de l'épithélium prostatique.

Il est de première importance de comprendre comment ce phénotype prostatique s'est mis en place. En effet, nous avons choisi dans un premier temps, des animaux *Pten*^{-/-} *Lxra*β^{-/-} de 20 semaines puisque nous voulions voir une progression métastatique. Cependant, il est

important d'étudier la cinétique d'apparition des lésions chez les souris *Pten*^{-/-}*Lxra*β^{-/-} pour comprendre les altérations observées.

Par ailleurs, nous avons montré que les LXRs exerçaient un rôle protecteur sur la prostate en condition d'hypercholestérolémie (Article 2).

➤ Sur les animaux *Pten*^{-/-}*Lxra*β^{-/-}, nous envisageons d'étudier l'impact d'une exposition à des taux plasmatiques élevés de cholestérol. L'invalidation totale des *Lxrs* rend impossible une durée de régime supérieure à 5 semaines suite à une mortalité importante. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce temps serait trop court pour provoquer des altérations sur les souris *Pten*^{-/-}. En effet, les souris TRAMP sont mises 20 semaines en régime enrichi en cholestérol pour témoigner d'une aggravation (Llaverias et al., 2010). L'utilisation des souris *Lxra*β^{-/-} invalidées spécifiquement au niveau de la prostate croisées avec les souris *Pten*^{-/-} pourrait permettre d'une part de prolonger le régime et d'autre part de déterminer si le phénotype est prostatique ou s'il résulte d'un stress plus systémique dû à la perte globale des LXRs.

Concernant les métastases pulmonaires potentielles observées dans les souris *Pten*^{-/-}*Lxra*β^{-/-}, il faut avant toute chose confirmer l'origine prostatique des cellules par des marquages immunohistochimiques.

➤ Pour étudier le pouvoir métastatique, nous proposons dans un premier temps de xénotransplanter un explant de prostate de souris *Pten*^{-/-} et *Pten*^{-/-}*Lxra*β^{-/-} sous la capsule rénale de souris nude et dans un second temps des MPECs *Pten*^{-/-} et *Pten*^{-/-}*Lxra*β^{-/-} afin d'étudier la vitesse d'apparition de la tumeur et le volume tumoral.

V) Ces résultats sont-ils extrapolables à l'Homme ?

D'après les résultats de l'analyse *Oncomine*, l'augmentation de l'expression d'*ABCA1* et *ABCG1* est inversement corrélée à l'inactivation de *PTEN* chez l'Homme ce qui indique que la variation d'expression de ces gènes constitue un marqueur biologique d'intérêt dans le cadre du cancer de la prostate.

➤ Pour évaluer leur pertinence dans le processus de carcinogenèse prostatique, nous proposons d'étudier le phénotype prostatique des animaux invalidés pour *Abca1* et/ou *Abcg1* spécifiquement dans la prostate en association avec la perte de *Pten* en réalisant des croisements de ces lignées et d'analyser la cinétique d'apparition de la tumeur.

Par ailleurs, les seules données humaines dont nous disposons sont issues de l'analyse *Oncomine*. Nous avons actuellement commencé l'étude d'une banque de tissus prostatiques réalisée en

collaboration avec le service d'Urologie de Clermont-Ferrand (collaboration Pr L.Guy et Pr JL. Kemeny). L'originalité de cette banque réside dans le fait que les échantillons humains dont nous disposons sont constitués pour un même patient de tissu sain et tumoral ce qui va permettre de diminuer le biais dû à la variation entre les individus. Il serait important de vérifier la présence d'éventuelles mutations germinales ou somatiques des gènes codant pour les LXR_s pour déterminer l'existence d'un polymorphisme les associant à la pathologie.

➤ Nous allons analyser l'expression des LXR_s mais également de leurs cibles *ABCA1* et *ABCG1* en corrélation avec l'inactivation de *PTEN* dans les échantillons humains à notre disposition.

De manière intéressante, le gène *ABCA1* est 15 à 20 fois plus exprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes que dans les cellules androgéno-indépendantes ce qui suggère une extinction d'*ABCA1* au cours de la progression tumorale (Fukuchi et al., 2004a). Une étude a montré une diminution de l'expression d'*ABCG1* dans les métastases par rapport à un stade moins avancé.

➤ Ces données confortent l'intérêt de l'utilisation des gènes *ABCA1* et *ABCG1* en tant que marqueurs pronostiques et potentiellement prédictifs du développement métastatique du cancer.

VI) Les LXR_s peuvent-ils être des cibles thérapeutiques ?

Les rôles anti-prolifératif et pro-apoptotique des LXR_s observés *in vitro* et *in vivo* dans le cadre notamment du cancer de la prostate font de ces récepteurs des molécules d'intérêt pour un ciblage thérapeutique (Chuu et al., 2007). De plus, nous avons montré que les LXR_s agiraient comme une barrière contre la progression tumorale (Article 3). Cependant, les résultats obtenus sur les animaux *Pten*^{-/-} avec le T0901317 montrent que dans ce contexte un ciblage pharmacologique des LXR_s n'a pas d'impact sur la prolifération cellulaire. Or, sur des xénogreffes de cellules LNCaP, l'utilisation de T0901317 diminue le volume des tumeurs démontrant ainsi que les cellules tumorales humaines sont sensibles à l'induction pharmacologique des LXR_s (Pommier et al., 2010). Ce constat nous fait nous interroger sur l'importance du contexte tumoral pour l'efficacité d'un traitement au T0901317. En effet, dans le modèle *Pten*^{-/-}, les animaux ont été traités durant l'étape de carcinome prostatique alors que les cellules LNCaP sont issues de métastases prostatiques c'est-à-dire une étape plus avancée du cancer.

➤ Afin d'étudier ce phénomène, nous proposons de réaliser un traitement T0901317 sur un autre modèle murin de cancer de la prostate tel que les souris TRAMP au moment de l'invasion métastatique. Si l'effet anti-prolifératif du traitement sur les métastases est retrouvé, il confirmera l'intérêt d'un ciblage des LXRs au cours de la progression tumorale.

Au final, ce travail pourrait permettre de comprendre pourquoi certains cancers de la prostate restent indolents, alors qu'ils sont en stade de Gleason intermédiaire de 7, et d'autres cancers évoluent vers des formes agressives. D'après nos résultats, ces différences pourraient notamment être dues à une inductibilité variable de la voie des LXRs capable de ralentir la progression tumorale.

➤ Il semble donc fondamental de réaliser une étude rétrospective sur des prostatectomies des marqueurs ABCA1 et ABCG1 et de comparer ces données avec les taux de récurrences. Nos données pourraient permettre de souligner l'intérêt d'utiliser les cassettes ABCA1 et ABCG1 en tant que nouveaux facteurs pronostiques dans le cancer de la prostate.

ANNEXES

Article 3 :

LXR, prostate cancer and cholesterol: the Good, the Bad and the Ugly.

De Boussac H, Pommier A, Dufour J, Trousson A, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JMA. Am J Cancer Res 2013;3(1):58-69. **Review**

Review Article

LXR, prostate cancer and cholesterol: the Good, the Bad and the Ugly

Hugues de Boussac^{1,2,3,4}, Aurélien JC Pommier^{1,2,3,4*}, Julie Dufour^{1,2,3,4}, Amalia Trousson^{1,2,3,4}, Françoise Caira^{1,2,3,4}, David H Volle^{1,2,3,4}, Silvère Baron^{1,2,3,4}, Jean-Marc A Lobaccaro^{1,2,3,4}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France; ²CNRS, UMR 6293, GReD, F-63177 AUBIERE, France; ³INSERM, UMR 1103, GReD, F-63177 AUBIERE, France; ⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France. *Present address: AstraZeneca, R&D Oncology iMed, CHESHIRE SK10 4TG, UK.

Received December 13, 2012; Accepted December 28, 2012; Epub January 18, 2013; Published January 25, 2013

Abstract: Cholesterol is a fundamental molecule for life. Located in the cell membrane, this sterol participates to the cell signaling of growth factors. Inside the cell it can be converted in hormones such as androgens or modulate the immune response. Such important functions could not be solely dependent of external supply by diet hence *de novo* synthesis could occur from acetate in almost all mammalian cells. If a deficiency in cholesterol sourcing leads to development troubles, overstocking has been associated to various diseases such as atherosclerosis and cancers. Cholesterol homeostasis should thus be tightly regulated at the uptake, *de novo* synthesis, storage and export processes. Various transcription factors have been described these last years as important to regulate cholesterol levels. Besides, synthetic molecules have been developed for many years to modulate cholesterol synthesis, such as statins. Many articles have associated prostate cancer, whose incidence is constantly increasing, to cholesterol disequilibrium. Targeting cholesterol could thus be a new pharmacological hit to counteract the initiation, development and/or progression of prostate cancer. Among the transcription factors regulating cholesterol homeostasis, the nuclear receptors Liver X Receptors (LXRs) control cholesterol uptake and export. Targeting the LXRs offers a new field of investigation to treat cancer. This review highlights the molecular relationships among LXRs, prostate cancer and cholesterol and why LXRs have good chance to be targeted one day in this tumor. LXRs, prostate cancer and cholesterol, more than a “*Ménage à trois*”, The Good, the Bad and the Ugly.

Keywords: LXR, cholesterol, prostate cancer, lipid raft, pharmacological modulation

Introduction

Prostate cancer is one of the most common malignancy [1], mainly affecting elders. Various risk factors have been involved including aging, ethnic origins, hormonal status and energy balance. Among the lipids, cholesterol has a particular position. This fundamental molecule is part of the cell membrane and thus plays an architectural role in its organization by maintaining the fluidity or by securing important proteins in the membrane when located in the so-called “lipid rafts”. Cholesterol is also involved in “ligand-type” signaling: as the precursor of androgen synthesis as well as in the production of oxysterols, which activate the nuclear receptors LXR α and LXR β . Maintaining a tight regulation of cholesterol homeostasis is thus of primary importance since it could affect cell

signaling and the proliferation/apoptosis balance. Reducing *de novo* cholesterol synthesis and/or uptake, or increasing reverse transport by exporting cholesterol from the cell could represent an efficient way to control prostate epithelial proliferation. This review is focused on the deleterious effect of a higher cholesterol (The Ugly) concentration on prostate cancer (the Bad) and the role of LXRs (The Good) in maintaining cholesterol homeostasis to avoid progression of prostate cancer (**Figure 1**). The Saga started in 1909 and is still going on.

LXRs and cholesterol: when the Good controls the Ugly

The liver X receptors

Liver X Receptors (LXRs) are transcription factors initially isolated in the liver [2, 3], and acti-

vated by cholesterol derivatives, the oxysterols [4]. LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) share 80% identity both in their DNA- and ligand-binding domains. Their structure is characteristic of the nuclear receptor superfamily, which possesses three functionally independent domains [5, 6]. The N-terminal modulator domain contains an activating function of the transcription (AF1) independent from the presence of the ligand. This domain presents several putative sites of phosphorylation potentially important for LXR activity modulations [7, 8]. The DNA-binding domain recognizes the LXR response elements (LXRE) characterized by two direct repeats of the hexanucleotide motif AGGTCA usually separated by four nucleotides. Part of this domain is also involved in the heterodimerisation with the Retinoid X Receptor RXR (NR2B1-3), which binds 9-*cis* retinoic acid, the requisite LXR partner [3]. The carboxy-terminal region is responsible for the ligand-binding and contains the AF2 region necessary for the transcriptional initiation of target genes [4]. This domain is masked by co-repressors in absence of ligand. For a review on LXR-functioning, see Viennois et al. 2011 [9].

LXR α and LXR β are differentially expressed in tissues. While LXR β expression is accepted to be rather ubiquitous, LXR α is more restricted and mainly found in liver, intestine, fat tissue, macrophages, kidney and gonads, suggesting their important function in the control of cholesterol homeostasis (for a view on LXR expression see www.nursa.org). The fundamental role of LXRs in lipid homeostasis is highlighted by the highly conserved function of these receptors among species [10], and has been continuously demonstrated since the first observation of a link between LXR α and cholesterol homeostasis by Peet et al. [11]. They observed that mice lacking LXR α and fed a high cholesterol diet rapidly accumulate large amount of cholesterol ester in the liver inducing a liver steatosis. Actually these mice are unable to sense and respond to dietary cholesterol and develop an impaired bile acid metabolism due to a default in the transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase (*Cyp7a1*), encoding an enzyme essential in bile acid synthesis [11].

The discovery of the natural ligands of LXRs by Janowski et al. [4, 12], largely improved our comprehension of the unique role of LXRs in controlling cholesterol homeostasis. In these

studies, oxysterols, the natural derivatives of cholesterol, activated LXR at physiological concentrations. Following this finding the development of synthetic ligands of LXRs (e.g. T0901317 [13] and GW3965 [14]) and the generation of a mouse model lacking Lxr α and/or β , greatly contributed to the comprehension of the oxysterol/LXR dependent pathways in cells, and gave the opportunity to identify several target genes and therefore functions of the LXRs [9]. Thus, it has been admitted that LXR activities are associated with four schematic functions: 1) lipid metabolism, including cholesterol and fatty acids homeostasis; 2) steroidogenesis; 3) glucose homeostasis; 4) inflammation and immunity. Since in this review we will focus more specifically on the role of LXRs on cholesterol homeostasis, we will not develop further their other physiological functions. For more information about them, refer to Viennois et al. 2011 [9].

LXRs: two sensors of cholesterol homeostasis

Cholesterol is an essential structural component of mammalian cell membranes and is required to establish proper membrane permeability and fluidity. In addition cholesterol also serves as a precursor for the biosynthesis of steroid hormones, bile acids, and vitamin D. Besides, this molecule is also part of the membrane signaling pathway by its specific distribution in lipid rafts (see above). Furthermore, cholesterol also functions in intracellular transport, cell signaling and nerve conduction. Hence, although cholesterol is important and necessary for human health, its intra- and extra-cellular concentrations have to be strictly controlled as high levels of cholesterol in the blood have been linked to damages to arteries and cardiovascular diseases.

Modulation of de novo synthesis and uptake of cholesterol: LXRs act at various levels to control the intracellular pool of cholesterol. The first possible source of cholesterol results from the enzymatic reaction leading to the transformation of Acetyl-CoA in mevalonate by the HMG-CoA reductase [15]. That reaction ultimately leads to the formation of *de novo* cholesterol. In mice lacking *Lxr*, higher expression of *Srebp2*, *Hmgcoa* and *Squalene synthase* has been observed [16], while the oral treatment of wild type mice with T0901317 led to a decrease in *Hmgcoa synthase* and *Squalene synthase*

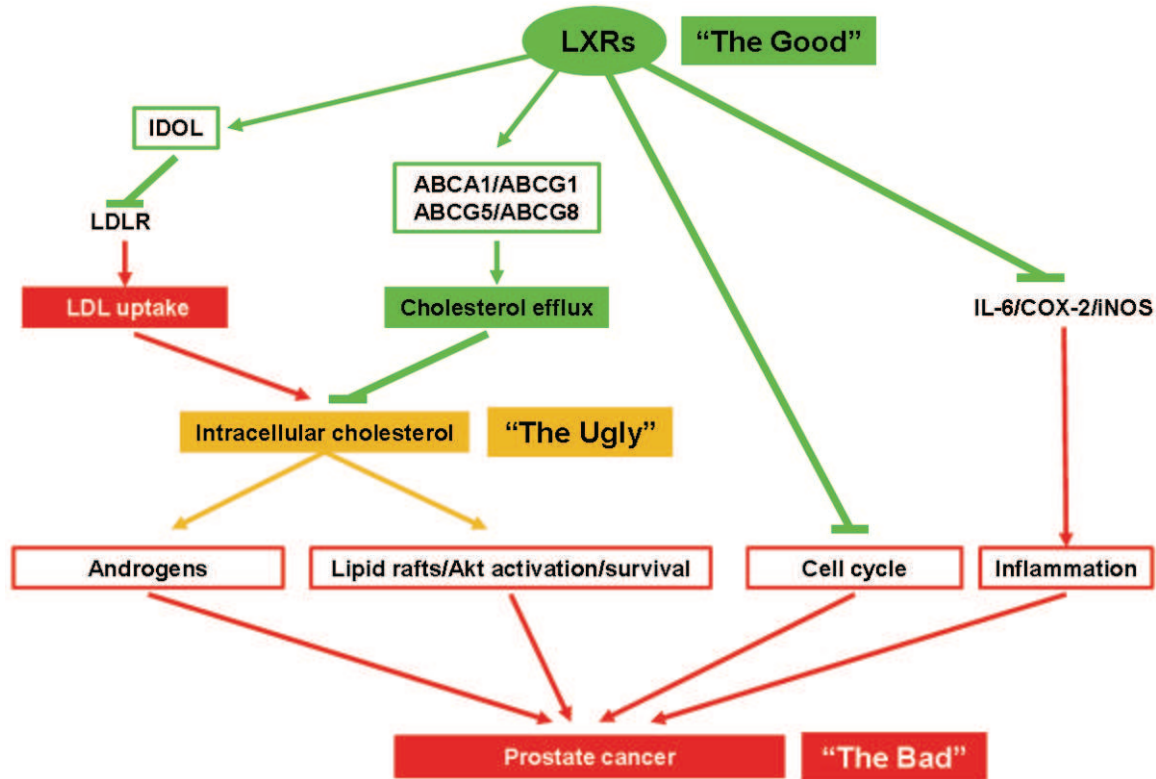


Figure 1. LXRs and prostate physiology: potential beneficial actions of LXRs over prostate cancer. LXR activity increases *IDOL* as well as various ABC transporters, which ultimately decreases LDL uptake and increases the efflux of cholesterol, altogether decreasing the intracellular pool of cholesterol. Consequently, this leads to the reduction of androgen synthesis and lipid raft/AKT/survival pathway. LXRs finally induce cell cycle arrests, and by inhibiting the expression of *IL-6*, *COX-2* and *iNOS* limit the inflammation inside the tumor. Altogether, LXR activation may limit prostate cancer development.

gene expression [17], suggesting a role of LXRs in the negative modulation of *de novo* cholesterol synthesis.

A second way to modulate the pool of intracellular cholesterol regards its cellular import via the LDL-receptor (LDLR). Even though a correlation was repeatedly observed between LXR activation and LDLR protein reduction, the mechanism has been described only recently. LXRs activate the expression of the E3 ubiquitin ligase *Idol* (Inducible Degradator of the LDLR), ultimately leading to the targeted degradation of LDLR, thus resulting in the reduction of the intracellular pool of cholesterol [18].

Induction of bile acid synthesis: *Cyp7a1* is the first and rate limiting enzyme that catalyzes the initial step of bile acid biosynthesis from cholesterol. Although it is not the primary function of bile acid synthesis, this reaction also allows the liver to reduce in rodent the excess of cholesterol in cells. Interestingly, while in wild type

mice fed a high cholesterol diet *Cyp7a1* expression increases, this induction is not observable in *Lxrα*-deficient mice fed similarly [11]. Additionally, in these mice the diet induces a hepatic steatosis due to an accumulation of cholesteryl esters in the liver [11, 16].

Induction of reverse cholesterol transport: The last way LXRs use to control cholesterol levels is by exporting it outside the cells. Indeed, several ATP-binding cassettes encoding genes such as *ABCA1* [19-21] and *ABCG1* [22] are LXR *bona fide* targets. These ABC transporters actively efflux cholesterol to the extracellular acceptor HDL and increase the reverse cholesterol transport. In addition, LXRs have also been shown to modulate Apolipoprotein E level, an essential component of the VLDL particles [23]. Furthermore, LXRs modulate the expression of the genes encoding *ABCG5* and *ABCG8* that export sterols from the inner compartment of hepatocytes to the bile duct [24, 25] and from the enterocytes into the gut lumen [26].

Altogether LXRs demonstrate a critical role in controlling the amount of intracellular cholesterol and in its processing outside the cells.

Steroid synthesis: We and others have shown that LXRs could regulate the rate of cholesterol transformation into steroids in various tissues such as testis [27]. A decrease in the amount of circulating testosterone can be detected after LXR activation by the synthetic agonist T0901317 [28]. That well identified mechanism is dependent on the activation by LXRs of Sulfotransferase 2a1 that deactivates androgens, and the inhibition by LXRs of the steroid-sulfatase that activates androgens [28]. Interestingly, those hormones have a key role in prostate cancer development. LXRs might thus have also a role to play in this part of the anti-cancer journey.

Cholesterol and prostate cancer: when the Ugly plays with the Bad

Due to its different roles, cholesterol is hence linked to cell proliferation (see above). Indeed, its synthesis increases in tissue with high proliferation rate such as in cancer. On the other side, inhibition of HMGCoA-reductase blocks cell growth [29].

Prostate cancer: the Bad at a glance

Prostate cancer (PCa) is the second most diagnosed cancer and a leading cause of cancer related death [1]. The incidence of PCa is constantly increasing due in part to new methods of diagnostic, and also to the increase in life expectancy. Indeed, this cancer has a slow evolution and about 85% of diagnosed PCa are in patients older than 65 years old [30]. Interestingly, it is accepted that more men die with PCa than from it. Indeed, an American study performed after autopsy determined that 50% of the men of 50 years old have latent PCa [31]. However the development and the cause of the disease is still poorly understood, and various factors such as genetic/ethnic origin, diet, life style and environmental factors have been suggested to play a role on it [32].

As already stated, great differences in the incidence of PCa are observed depending on the ethnical origin or the country of the patients. A Caucasian American has 30% less risk to develop a PCa compared to an African American

[30], but at the same time Asians develop twice less PCa than Americans. These differences are in part due to the ethnical factors, and thus to the genetic background and the lifestyle of the individuals. However it could also show disparities in the accessibility of the diagnostic tests and treatments.

Yet, the genetic background cannot explain everything since the first generation of Asian migrants living in the US have a more important risk of PCa than those leaving in Asia [33]. This unexpected observation is credited to be due to factors acting on PCa development rather than on PCa initiation, and presumably on the higher lipid consumption in the USA [34]. Additionally a comparable observation has been done with increased incidence to develop a PCa for Japanese population that moved to America [35]. In this study the authors also compared the migrants according to their age at arrival, and did not find any correlation with the risk to develop PCa. They therefore concluded that PCa risk may be increased by late rather than early life style event [35]. These two studies are therefore suggesting a potential lifestyle/diet parameter that can greatly influence the development of PCa.

Role of cholesterol in prostate cancer: the Ugly goes with the Bad!

Cholesterol accumulation in tumors is not a recent observation. White demonstrated in 1909 an accumulation of crystals of lipid nature in tumors [36]. Later Swyer and his coworkers showed for the first time an increase of cholesterol content in zone of the prostate affected by a mild hypertrophy [37] compared to healthy tissues. Afterward, similar observations were obtained on other types of cancer [38-40]. Two mechanisms are generally put forward to explain this intracellular cholesterol accumulation: a higher circulating cholesterol uptake, and the increase in the accumulation of the enzymes of the mevalonate pathway [41, 42]

Moreover, increased uptake of LDL particles and therefore exogenous cholesterol attributable to a loss of modulation in the LDL receptor expression, and a higher *de novo* cholesterol synthesis due to the upregulation of the HGM-CoA reductase, have been suggested as key components of that accumulation [17, 43]. The

final result of that process could potentially give sufficient bricks for the membrane to expand and to the tumor to grow and develop [44].

Diet, cholesterol and PCa

Since the late 90's, multiple lines of evidence have been highlighting the potential influence of diet on PCa appearance. First, intake of products from animal origin is correlated to a higher risk of developing metastatic PCa, but not on the initial development of PCa [45] as shown by the identical prevalence between vegetarians or meat eaters [46]. Second, the presence of dietary fat in the diet was shown to be a risk factor of PCa, although the exact contribution of fat was not clearly established [47]. Third, an increase in PCa incidence, angiogenesis and metastasis was observed in the TRAMP mouse model of PCa fed a western-type diet [48]. Finally aggressiveness of PCa was increased in elders having important dietary fat intake [49]. So far data linking excessive consumption of cholesterol, rates of circulating cholesterol and risk of PCa have been controversial [50], even though studies suggest an impact of cholesterol in the development of high grade PCa [51-53]. Inversely, Platz *et al.* pointed out that a "weak" level of circulating cholesterol (< 200mg/dL) was associated with a reduction of the risk of developing a prostate cancer of high grade [54]. Finally, circulating cholesterol increases tumor size of LNCaP xenografts in a mouse model, as well as intratumoral synthesis of androgens [55]. This suggests that the androgen dependent tumor growth could be under a deep association with circulating cholesterol. Likewise, high serum HDL is inversely correlated with PCa [53, 56]. Since HDL formation is dependent on the export of cholesterol *via* the ABCA1 and ABCG1 transporters that are under the positive modulation of LXRs, it could be suggested a possible beneficial role to over activating LXRs in PCa, even though this needs to be demonstrated.

Modulation of circulating cholesterol and PCa: when reasoning the Ugly can block the Bad

Altogether the presented data raise the question of the molecular mechanisms by which the cholesterol can favor tumor progression. Some observations on cancer development after treatment with statin, a cholesterol-lowering

drug that specifically inhibits the HMG-CoA reductase and therefore the formation of *de novo* cholesterol, partially answer that question. Indeed early investigations suggested a potent growth inhibitory effect as well as an anticancer potential of statins *in vitro* and *in vivo* [57, 58], partially explained by their ability of inducing apoptosis *via* the activation of the Caspase-7 [59]. Moreover in the PC3 prostate cancer cell line, statins also prevent the cell migration potential therefore reducing the formation of metastatic prostate colonies [60]. Then it seems that these cholesterol-lowering agents can act at different level on PCa progression. The potential use of statins to prevent PCa is currently under active investigation mostly on prospective studies. Until now, numbers of studies have been published and extensively reviewed [61]. Statin treatments do not seem to have any beneficial effect on the rate of appearance of prostate cancer conversely to the incidence of advanced PCa [62-64]. Interestingly this effect even increases when statins are used for more than five years [65].

Androgen synthesis is dependent on the amount of circulating cholesterol; besides, PCa is linked to androgen synthesis; moreover statins are cholesterol-lowering drugs. Altogether what could be the potential impact of statins on the hormonal status in prostate cancer? Actually, statins do not seem to decrease the circulating androgen [66], even though a decreased synthesis of androgens cannot be excluded since statins users show a decline in serum PSA levels, an androgen regulated gene in prostate [67].

Cholesterol is not only used as a precursor of steroid synthesis. Indeed, it can be found enriched in cell membranes in regions called rafts essential for the activation of the kinase cascade Akt and consequently for tumor survival [68]. Zhuang *et al.* showed that simvastatin decreases the cholesterol content of lipid rafts, leading to a decrease in Akt phosphorylation and activation, and subsequently to an increase of LNCaP cells apoptosis [69]. These results improve our comprehension of the mechanism of statins in cancer progression, and also suggest lipid rafts as new players in PCa development. In accordance with that suggestion, the essential component of lipid rafts caveolin 1 is associated with the aggressive-

ness of the PCa tumor and therefore considered as a marker of poor prognosis in PCa [70, 71]. Accordingly, the use of an antibody targeting the caveolin 1 can block the metastatic process in PCa [72]. Both observations then confirm the important role of lipid rafts in PCa progression.

LXRs and prostate cancer: a benefic effect of the Good over the Bad?

LXR activation leads to cell cycle arrest in prostate cancer cell lines

Since LXRs control cholesterol homeostasis, these nuclear receptors have been considered as putative pharmacological targets in prostate cancer. Hence, activation of LXRs by natural (22 (R)-hydroxycholesterol, 24 (S)-hydroxycholesterol) or synthetic (T0901317) agonists led to cycle arrest of LNCaP cells *via* the lack of degradation of p27Kip1, an essential inhibitor of the cell cycle. Moreover, and as expected, treatment with LXR agonists also induced the protein accumulation of ABCA1, thus activating cholesterol efflux [73]. Conversely, targeted disruption of ABCA1 increases the proliferation rate of LNCaP cells [74]. Moreover, Chuu *et al.* observed that LXR-target genes were down-modulated during the tumor progression in mouse, while activation of LXRs by T0901317 delayed the progression of PCa [75]. Altogether, these studies are clearly in favor of an important protective role of LXRs in prostate cancer progression, even if no data are available in human yet.

How could LXRs be so good?

As presented above, activating LXRs will lead to the modulation of cholesterol concentration by their action on the various pathway involved.

LXRs antagonize the development of prostate tumor by interacting with the androgen pathway: Prostate cancer development is tightly associated with androgens. Indeed, it is frequent to treat PCa patients with anti-androgens in order to block the androgen response, and therefore the early development of PCa [76]. Interestingly, the androgen receptor (AR) modulates the expression of *HMG-CoA synthase* and *reductase*, and *SREBP2*, whose product controls genes involved in cholesterol homeostasis such as the LDL-Receptor (LDLR) [77]. The con-

sequences of these modulations are: 1) an increase in intracellular cholesterol due to a higher *de novo* production and uptake *via* LDLR; 2) an increase in androgen synthesis from cholesterol. This may give an alternative explanation to the prostatic tumor growth dependence to cholesterol. Additionally, AR reduces LXR activation in prostate cancer, by competing for their coactivators [78].

There is also a mirror effect as LXRs reduce the proliferation of androgen-dependent cells *via* androgen deprivation [28], and inhibit tumor growth and slow down the passage of androgen dependent to androgen independent prostate cancer [75]. Furthermore T0901317 has also been suggested to act as an AR antagonist, even though the Kd found is highly questionable [79].

LXRs block cancer development through their transcriptional activity: Controlling the expression of key genes of cholesterol homeostasis is of primary importance to block cancer progression. Modulation of IDOL by LXRs [18] should decrease the amount of LDLR on the cell surface and then LDL uptake. Moreover as described previously, LXRs also modulate ABCA1 and ABCG1 two transporters responsible for the export of endogenous cholesterol. Associated to the crucial role of cholesterol on prostate cancer development, LXR activation thus reduces the potential pathogenicity of over accumulation of cholesterol, and therefore may limit the development of PCa.

LXRs induce apoptosis of prostate cancer cell line through lipid raft signaling: Activation of LXRs is associated with an important decrease of phosphorylation of Akt, a key player in the mechanism of cell survival, at the level of lipid rafts [68]. When LXRs are liganded, the pool of cholesterol is decreased in prostate cancer cells in parallel with lipid raft size and number. The consequences are a decrease in activated Akt and the induction of cells apoptosis [80, 81]. Then the effect of LXR activation on lipid rafts and PCa cells is very similar to that observed after statin treatment, thus highlighting LXRs as a potential therapeutic target in PCa.

LXRs down-modulate inflammatory molecules correlated with cancer: Cancers are often associated with increased inflammation inside and

surrounding the tumor [82]. This phenomenon is also characteristic of PCa, since a strong iNOS accumulation is found in tumor compared to peripheral tissue in PCa [83, 84] and is associated with high Gleason score [83, 85]. Associated to iNOS, COX-2, another pro-inflammatory enzyme, is highly expressed in tumor associated macrophages [86]. In the mouse model of prostate cancer TRAMP, Cox-2 expression increases with progression of carcinogenesis and the use of a COX-2 inhibitor increases the survival of mice with prostate cancer [87]. Additionally, IL-6, which promotes tumor growth [88], and activates the PI-3K/Akt signal transduction pathway [89], is highly expressed and associated with morbidity in PCa [90-92]. These observations are of particular interest since LXRs are known to down-modulate the accumulation of inflammatory molecules as iNOS, COX-2 and IL-6 [93], another argument making them good targets in PCa.

Pharmacologically targeting LXRs in PCa: Are the Good always trustable?

Considering the various beneficial effect of LXR activation on PCa *ex vivo* and in mouse models, using LXR modulators to treat patients seems very promising [9, 94]. Unfortunately, most of the LXR agonists also have a consistent deleterious effect since they lead to transient hypertriglyceridemia ([95] and reviewed in [96]). The screening of new LXR-ligands is currently under active investigations to limit this inconvenience [97]. The first tissue specific LXR ligand identified has been the (22E)-ergost-22-ene-1 α ,2 β diol (YT-32). In mice, oral gavage with YT-32 decreased the amount of cholesterol present in the plasma and led to the intestinal accumulation of the LXR-target genes *ABCA1*, *ABCG5* and *ABCG8* without any modification of the expression of these genes in the liver [98]. More recently another intestine specific ligand of LXRs, GW6340, leads to LXR- target gene accumulation in the small intestine without increasing neither the liver triglycerides content or the hepatic LXR target genes expression [99]. Besides this side effect due to a hepatic activity of LXRs on the triglyceride synthesis, the fact that LXRs are also highly expressed in many tissues has to be taken into account. Hence, LXR-623 agonist was tested in healthy volunteers [100]. The authors showed a higher accumulation of the expression of *ABCA1* and

ABCG1 in blood cells in parallel with lowering the LDL and cholesterol levels in the serum [101]. Unfortunately, an important adverse effect on the central nervous system was observed, which ended the trial [100]. As for the other nuclear receptors targeted in breast (ER) and prostate (AR) cancers, the development of selective Liver X modulators (SLiM) [96] could be a very promising treatment option in numbers of different pathology where cholesterol is involved, including in cancer. Considering the potential important role of LXRs and cholesterol in prostate cancer, the use of SLiM may slow down the evolution into high grade PCa, although more investigations will be necessary.

Acknowledgments

Chester's lab is supported by grants from Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Allier committee), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and Cancéropôle Lyon Rhône-Alpes Auvergne (CLARA). A. Pommier and J. Dufour were funded by MNERT and ARC grants. H. De Bousac was funded by Région Auvergne "Nouveau Chercheur" program.

Declaration of conflicts of interest

The authors have nothing to declare.

Address correspondence to: Jean-Marc A. Lobaccaro, "Génétique Reproduction et Développement", UMR CNRS GReD 6293-Clermont Université-INSERM 1103, 24 avenue des Landais, 63171 BP80026 - Aubière Cedex, France. Phone: 33 4 73 40 74 16; E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr

References

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
- [2] Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikstrom AC, Pelto-Huikko M and Gustafsson JA. OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2096-100.
- [3] Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA and Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid re-

- response pathway. *Genes Dev* 1995; 9: 1033-45.
- [4] Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR and Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; 383: 728-31.
- [5] Williams S, Bledsoe RK, Collins JL, Boggs S, Lambert MH, Miller AB, Moore J, McKee DD, Moore L, Nichols J, Parks D, Watson M, Wisely B and Willson TM. X-ray crystal structure of the liver X receptor beta ligand binding domain: regulation by a histidine-tryptophan switch. *J Biol Chem* 2003; 278: 27138-43.
- [6] Hoerer S, Schmid A, Heckel A, Budzinski RM and Nar H. Crystal structure of the human liver X receptor beta ligand-binding domain in complex with a synthetic agonist. *J Mol Biol* 2003; 334: 853-61.
- [7] Chen M, Bradley MN, Beaven SW and Tontonoz P. Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Lett* 2006; 580: 4835-41.
- [8] Yamamoto T, Shimano H, Inoue N, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Takahashi A, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H and Yamada N. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J Biol Chem* 2007; 282: 11687-95.
- [9] Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumedour A, El Hajjaji FZ, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S and Lobaccaro JM. Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 219-32.
- [10] Reschly EJ, Ai N, Welsh WJ, Ekins S, Hagey LR and Krasowski MD. Ligand specificity and evolution of liver X receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 110: 83-94.
- [11] Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE and Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; 93: 693-704.
- [12] Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ and Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 266-71.
- [13] Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD and Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 2831-8.
- [14] Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, Parks DJ, Wilson JG, Tipping TK, Binz JG, Plunket KD, Morgan DG, Beaudet EJ, Whitney KD, Kliewer SA and Willson TM. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 2002; 45: 1963-6.
- [15] Goldstein JL and Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430.
- [16] Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Pettersson S and Gustafsson JA. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest* 2001; 107: 565-73.
- [17] Chen Y and Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 2001; 91: 41-5.
- [18] Zelcer N, Hong C, Boyadjian R and Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 2009; 325: 100-4.
- [19] Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM and Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000; 289: 1524-9.
- [20] Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL and Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRBeta. *Genes Dev* 2000; 14: 2819-30.
- [21] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA and Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12097-102.
- [22] Venkateswaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, Bronson A, Mangelsdorf DJ and Edwards PA. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem* 2000; 275: 14700-7.
- [23] Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ and Tontonoz P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 507-12.
- [24] Wu JE, Basso F, Shamburek RD, Amar MJA, Vaisman B, Szakacs G, Joyce C, Tansey T, Freeman L, Paigen BJ, Thomas F, Brewer HB Jr and Santamarina-Fojo S. Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2004; 279: 22913-22925.
- [25] Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC and Hobbs HH. Stimulation of chole-

- terol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003; 278: 15565-70.
- [26] Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H and Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002; 277: 18793-800.
- [27] Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, Veyssière G, Benahmed M and Lobaccaro J-MA. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1014-1027.
- [28] Lee JH, Gong H, Khadem S, Lu Y, Gao X, Li S, Zhang J and Xie W. Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 2008; 149: 3778-88.
- [29] Brown MS and Goldstein JL. Suppression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and inhibition of growth of human fibroblasts by 7-ketocholesterol. *J Biol Chem* 1974; 249: 7306-14.
- [30] Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003; 361: 859-64.
- [31] Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE and Crissman JD. The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol* 1993; 150: 379-85.
- [32] Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ and Timms B. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 2004; 101: 2371-490.
- [33] Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM and Weiss NS. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J Urol* 1999; 161: 152-5.
- [34] Watanabe M, Nakayama T, Shiraishi T, Stemmermann GN and Yatani R. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol Oncol* 2000; 5: 274-283.
- [35] Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE and Mack TM. Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 1991; 63: 963-6.
- [36] White C. the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* 1909; 13: 3-10.
- [37] Swyer G. The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* 1942; 2: 372-375.
- [38] Dessi S, Batetta B, Pulisci D, Spano O, Anchisi C, Tessitore L, Costelli P, Baccino FM, Aroasio E and Pani P. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high-density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer* 1994; 73: 253-8.
- [39] Rudling M and Collins VP. Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA levels are coordinately reduced in human renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299: 75-9.
- [40] Yoshioka Y, Sasaki J, Yamamoto M, Saitoh K, Nakaya S and Kubokawa M. Quantitation by (1)H-NMR of dolichol, cholesterol and choline-containing lipids in extracts of normal and pathological thyroid tissue. *NMR Biomed* 2000; 13: 377-83.
- [41] Graziani SR, Igreja FA, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, Amancio RF, Pinotti JA and Maranhao RC. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 85: 493-7.
- [42] Tatidis L, Masquelier M and Vitols S. Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 2169-80.
- [43] Caruso MG, Notarnicola M, Santillo M, Cavallini A and Di Leo A. Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res* 1999; 19: 451-4.
- [44] Freeman MR and Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* 2004; 91: 54-69.
- [45] Michaud DS, Augustsson K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willet WC and Giovannucci E. A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 2001; 12: 557-67.
- [46] Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleby PN, Beral V, Reeves G, Burr ML, Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R, Kuzma JW, Mann J and McPherson K. Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of 5 prospective studies. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 516S-524S.
- [47] Kolonel LN, Nomura AM and Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 414-28.
- [48] Llaverias G, Danilo C, Wang Y, Witkiewicz AK, Daumer K, Lisanti MP and Frank PG. A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am J Pathol* 177: 3180-91.
- [49] West DW, Slattery ML, Robison LM, French TK and Mahoney AW. Adult dietary intake and prostate cancer risk in Utah: a case-control study with special emphasis on aggressive tumors. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 85-94.

LXRs, prostate cancer and cholesterol

- [50] Jacobs EJ and Gapstur SM. Cholesterol and cancer: answers and new questions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2805-6.
- [51] Shafique K, McLoone P, Qureshi K, Leung H, Hart C and Morrison DS. Cholesterol and the risk of grade-specific prostate cancer incidence: evidence from two large prospective cohort studies with up to 37 years' follow up. *BMC Cancer* 2012; 12: 25.
- [52] Kok DE, van Roermund JG, Aben KK, den Heijer M, Swinkels DW, Kampman E and Kiemeneij LA. Blood lipid levels and prostate cancer risk; a cohort study. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2011; 14: 340-5.
- [53] Mondul AM, Weinstein SJ, Virtamo J and Albanes D. Serum total and HDL cholesterol and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* 2011; 22: 1545-52.
- [54] Platz EA, Till C, Goodman PJ, Parnes HL, Figg WD, Albanes D, Neuhauser ML, Klein EA, Thompson IM and Kristal AR. Men with low serum cholesterol have a lower risk of high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2807-13.
- [55] Mostaghel EA, Solomon KR, Pelton K, Freeman MR and Montgomery RB. Impact of circulating cholesterol levels on growth and intratumoral androgen concentration of prostate tumors. *PLoS One* 2012; 7: e30062.
- [56] Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, Schatzkin A, Hayes RB, Virtamo J and Albanes D. Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 2814-21.
- [57] Maltese WA, Defendini R, Green RA, Sheridan KM and Donley DK. Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Clin Invest* 1985; 76: 1748-54.
- [58] Shibata MA, Kavanaugh C, Shibata E, Abe H, Nguyen P, Otsuki Y, Trepel JB and Green JE. Comparative effects of lovastatin on mammary and prostate oncogenesis in transgenic mouse models. *Carcinogenesis* 2003; 24: 453-9.
- [59] Marcelli M, Cunningham GR, Haidacher SJ, Padayatty SJ, Sturgis L, Kagan C and Denner L. Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res* 1998; 58: 76-83.
- [60] Brown M, Hart C, Tawadros T, Ramani V, Sangar V, Lau M and Clarke N. The differential effects of statins on the metastatic behaviour of prostate cancer. *Br J Cancer* 2012; 106: 1689-96.
- [61] Roy M, Kung HJ and Ghosh PM. Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 542-61.
- [62] Murtola TJ, Tammela TL, Lahtela J and Auvinen A. Cholesterol-lowering drugs and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2226-32.
- [63] Shannon J, Tewoderos S, Garzotto M, Beer TM, Derenick R, Palma A and Farris PE. Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 2005; 162: 318-25.
- [64] Jacobs EJ, Rodriguez C, Bain EB, Wang Y, Thun MJ and Calle EE. Cholesterol-lowering drugs and advanced prostate cancer incidence in a large U.S. cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2213-7.
- [65] Platz EA, Leitzmann MF, Visvanathan K, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC and Giovannucci E. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 1819-25.
- [66] Hall SA, Page ST, Trivison TG, Montgomery RB, Link CL and McKinlay JB. Do statins affect androgen levels in men? Results from the Boston area community health survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1587-94.
- [67] Loeb S, Kan D, Helfand BT, Nadler RB and Catalona WJ. Is statin use associated with prostate cancer aggressiveness? *BJU Int* 2010; 105: 1222-5.
- [68] Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR and Freeman MR. Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 2227-31.
- [69] Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR and Freeman MR. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* 2005; 115: 959-68.
- [70] Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT and Thompson TC. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1873-80.
- [71] Satoh T, Yang G, Egawa S, Addai J, Frolov A, Kuwano S, Timme TL, Baba S and Thompson TC. Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 2003; 97: 1225-33.
- [72] Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, Li L, Goltsov A, Ittmann M, Morrisett JD and Thompson TC. Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen-insensitive prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3882-5.
- [73] Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP and Liao S. Antiproliferative effect of liver X re-

- ceptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7686-9.
- [74] Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Hsu S, Ko AL, Fitzgerald ML and Liao S. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64: 7682-5.
- [75] Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY and Liao S. Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 2006; 66: 6482-6.
- [76] Zumsteg ZS and Zelefsky MJ. Short-term androgen deprivation therapy for patients with intermediate-risk prostate cancer undergoing dose-escalated radiotherapy: the standard of care? *Lancet Oncol* 2012; 13: e259-269.
- [77] Segawa T, Nau ME, Xu LL, Chilukuri RN, Makarem M, Zhang W, Petrovics G, Sesterhenn IA, McLeod DG, Moul JW, Vahey M and Srivastava S. Androgen-induced expression of endoplasmic reticulum (ER) stress response genes in prostate cancer cells. *Oncogene* 2002; 21: 8749-58.
- [78] Krycer JR and Brown AJ. Cross-talk between the androgen receptor and the liver X receptor: implications for cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2011; 286: 20637-47.
- [79] Chuu CP, Chen RY, Hiipakka RA, Kokontis JM, Warner KV, Xiang J and Liao S. The liver X receptor agonist T0901317 acts as androgen receptor antagonist in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 341-6.
- [80] Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S and Lobaccaro JM. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 2010; 29: 2712-23.
- [81] Dufour J, Viennois E, De Boussac H, Baron S and Lobaccaro JM. Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12: 724-8.
- [82] Vendramini-Costa DB and Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current pharmaceutical design* 2012; 18: 3831-3852.
- [83] Aaltoma SH, Lipponen PK and Kosma VM. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3101-6.
- [84] Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U and Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1897-903.
- [85] Baltaci S, Orhan D, Gogus C, Turkolmez K, Tulunay O and Gogus O. Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia, low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *BJU Int* 2001; 88: 100-3.
- [86] Tsai CS, Chen FH, Wang CC, Huang HL, Jung SM, Wu CJ, Lee CC, McBride WH, Chiang CS and Hong JH. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68: 499-507.
- [87] Gupta S, Adhami VM, Subbarayan M, MacLennan GT, Lewin JS, Hafeli UO, Fu P and Mukhtar H. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Res* 2004; 64: 3334-43.
- [88] Steiner H, Godoy-Tundidor S, Rogatsch H, Berger AP, Fuchs D, Comuzzi B, Bartsch G, Hobisch A and Culig Z. Accelerated in vivo growth of prostate tumors that up-regulate interleukin-6 is associated with reduced retinoblastoma protein expression and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Am J Pathol* 2003; 162: 655-63.
- [89] Wegiel B, Bjartell A, Culig Z and Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer* 2008; 122: 1521-9.
- [90] Siegmund MJ, Yamazaki H and Pastan I. Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *J Urol* 1994; 151: 1396-9.
- [91] Twillie DA, Eisenberger MA, Carducci MA, Hsieh WS, Kim WY and Simons JW. Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology* 1995; 45: 542-9.
- [92] Kuroda K, Nakashima J, Kanao K, Kikuchi E, Miyajima A, Horiguchi Y, Nakagawa K, Oya M, Ohigashi T and Murai M. Interleukin 6 is associated with cachexia in patients with prostate cancer. *Urology* 2007; 69: 113-7.
- [93] Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ and Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003; 9: 213-9.
- [94] Chuu CP, Kokontis JM, Hiipakka RA and Liao S. Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci* 2007; 14: 543-53.
- [95] Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF and Tontonoz P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 11019-25.
- [96] Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM and Baron S. Selective liver X receptor

LXRs, prostate cancer and cholesterol

- modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol Cell Endocrinol* 351: 129-41.
- [97] Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson J-Å and Steffensen KR. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends in pharmacological sciences* 2012; 33: 394-404.
- [98] Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I and Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003; 278: 36091-8.
- [99] Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, Briand F, Delerive P, Huet S and Rader DJ. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 781-6.
- [100] Katz A, Udata C, Ott E, Hickey L, Burczynski ME, Burghart P, Vesterqvist O and Meng X. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 2009; 49: 643-9.
- [101] Quinet EM, Basso MD, Halpern AR, Yates DW, Steffan RJ, Clerin V, Resmini C, Keith JC, Berrodin TJ, Feingold I, Zhong W, Hartman HB, Evans MJ, Gardell SJ, DiBlasio-Smith E, Mounts WM, LaVallie ER, Wrobel J, Nambi P and Vlasuk GP. LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. *J Lipid Res* 2009; 50: 2358-70.

Article 4 :

Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer.

Dufour J, Viennois E, De Boussac H, Baron S, Lobaccaro JM. Curr Opin Pharmacol. 2012 Dec;12(6):724-8. doi: 10.1016/j.coph.2012.06.012. Epub 2012 Jul 19. **Review**



ELSEVIER

Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer

Julie Dufour^{1,2,3,4}, Emilie Viennois^{1,2,3,4}, Hugues De Boussac^{1,2,3,4},
Silvère Baron^{1,2,3,4} and Jean-Marc Lobaccaro^{1,2,3,4}

Oxysterols derive from cholesterol oxidation. They display various biological activities such as regulating cholesterol, fatty acid and glucose homeostasis as well as cell survival/apoptosis balance. Oxysterols display these metabolic and transcriptional activities mainly through their nuclear receptors known as Liver X Receptors (LXRs) α and β . There is accumulating evidence that LXRs are key modulators of prostate cancer cell survival. Hence, LXR activation increases cholesterol efflux and induces a disruption of lipid rafts. The decrease of membrane cholesterol causes a down regulation of AKT survival pathway and consequently apoptosis. Moreover cholesterol is associated with an increased risk of developing aggressive forms of prostate cancer. These data highlight the interest of targeting the LXR–AKT axis in prostate carcinogenesis.

Addresses

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

² CNRS, UMR 6293, GReD, BP 80026, F-63171 Aubiere, France

³ INSERM, UMR 1103, GReD, BP 80026, F-63171 Aubiere, France

⁴ Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Corresponding author: Lobaccaro, Jean-Marc (j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr)

Current Opinion in Pharmacology 2012, 12:724–728

This review comes from a themed issue on **Endocrine and metabolic diseases**

Edited by **Sandrine Silvente-Poirot** and **Marc Poirot**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 19 July 2012

1471-4892/\$ – see front matter, © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2012.06.012>

Introduction

Oxysterols are oxygenated derivatives of cholesterol. They are widely distributed in nature [1^{••}]. These molecules exhibit many biological activities ranking from potent inhibitors of cholesterol biosynthesis to the inhibition of cell replication and/or induction of apoptosis [2], suggesting that they could be used as pharmacological molecules in cancer. Oxysterols are important cholesterol metabolites involved in bile acids and steroid hormones biosynthesis. Their effects on cellular membranes, on specific enzyme systems as well as cytotoxic, atherogenic, mutagenic, and carcinogenic activities make them a full-fledged of signal molecules. Hence, an increase of their

concentration has been associated to several cancers such as colon, lung, skin, breast, and bile ducts [3[•]]. Oxysterols are produced by either the attack of cholesterol by reactive oxygen species (*e.g.*, 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol) or by specific enzymatic reactions (*e.g.*, 24(S)-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and 27-hydroxycholesterol). In plasma membrane, cholesterol is a constituent of lipid rafts, domains acting as signal transduction platforms. In these rafts, AKT is recruited and activated by phosphorylation [4]. Also known as protein kinase B, AKT is a serine/threonine-specific protein kinase that plays a key role in multiple cellular processes including apoptosis. Because activation of the AKT pathway is frequent in prostate cancer (PCa), targeting its activation represents a promising therapeutic approach [5]. Among the various risk factors associated with PCa, cholesterol has also been pointed out in numerous studies [6[•]]. This cancer is the second most frequently diagnosed cancer and the sixth leading cause of cancer in men [7]. The main treatment of recurrent PCa is currently the androgen withdrawal therapy. Unfortunately, patients eventually relapse, developing castration resistant prostate cancer (CRPC) [8]. These data thus highlight the importance of finding new therapeutic targets to decrease the incidence and progression of PCa. Interestingly, men with higher cholesterol level have a greater risk of developing high-grade PCa but not overall risk of PCa. Interventions to reduce metabolic risk factors may have a role in reducing incidence of aggressive PCa [9]. Liver X Receptors (LXRs) α and β are ligand-inducible transcription factors, regulating cholesterol homeostasis [10]. Previous studies demonstrate an anti-proliferative and a pro-apoptotic effect of LXR activation in PCa cell lines suggesting a protective role of these receptors in this cancer [11[•]].

This review will focus on the role of the nuclear receptors LXRs in PCa, how AKT modulates cell proliferation, and finally whether LXR–AKT axis could be a good pharmacological target in PCa.

LXR α and LXR β , two *bona fide* oxysterol receptors

Even though oxysterols have been described *in vitro* to activate other nuclear receptors such as FXR α /NR1H4 [12] and ROR/NR1F1–3 [13], *in vivo* analyses demonstrated that specific oxygenated derived molecules were true physiological ligands of LXRs [14]. It is noteworthy that oxysterols were reported to modulate estrogen receptors as well [15,16].

Biochemical structure and functioning

LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) belong to the nuclear receptor superfamily [2]. Four functional domains have thus been identified: an activating function (AF1) motif where coactivators are recruited, in amino-terminus part; the DNA-binding domain made up of a two zinc fingers motif involved in the recognition of the response element and the formation of the heterodimer; a hinge domain linking the DNA-binding domain and the ligand-binding domain; in carboxy-terminus, the ligand-binding domain made up of a hydrophobic pocket where the ligand can be fixed and an activating function (AF2) permitting the recruitment of coactivators in presence of ligand.

Even though both LXRs can bind as monomer on some promoters [11^{*}], they usually bind with RXR, the receptor of 9-*cis* retinoic acid. In absence of ligand, the transcriptional activity of the heterodimer is inhibited by repressors. The ligand binding induces modifications of the carboxy-terminal domain releasing the co-repressors and trapping the ligand in its binding pocket, which reinforces the fixation of co-activators leading to a permissive state of the chromatin. Then, the transcriptional machinery is recruited inducing the transcription of target genes. Post-translational modifications (deacetylation, ubiquitinylation, SUMOylation, phosphorylations) can modulate LXR–RXR transcriptional activity [11^{*}].

LXR α and LXR β , two major actors of prostate physiology

Despite the huge amount of physiological functions described so far for both LXRs in various tissues [17,18], their involvement in prostate remains largely unknown. *In vivo* analyses on LXR-deficient mice and *ex vivo* experiments on established PCa cell lines provide some information on the main roles of these receptors in prostate. From these studies, it appears that LXRs regulate cholesterol homeostasis in prostate. Indeed, pharmacological activation of LXRs using a synthetic agonist such as T0901317 induces the accumulation of ATP-binding cassette (ABC) transporters A1 [19] and G1 [20^{**}], responsible for cholesterol export. Beyond this traditional activity, LXRs stimulation by T0901317 decreases the percentage of LNCaP cells in S-phase and increases the percentage of cells in G1-phase, suppressing the accumulation of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) which stimulates degradation of the cell cycle inhibitor p27^{kip1} [21^{**}]. In parallel of the proliferation blockade, LXRs lead to apoptosis of LNCaP cells by the disruption of the lipid raft signaling [20^{**}], through a decrease of the cholesterol content in membrane and a reduction of the phosphorylated fraction of AKT associated with lipid raft. These anti-proliferative and pro-apoptotic effects of LXR agonists have also been proved *in vivo* using athymic mice xenografted with LNCaP cells and orally gavaged with T0901317 [20^{**},21^{**}]. Hence we

and others pointed out the pharmacological potential of activating LXRs in order to increase apoptosis and/or decrease proliferation in PCa. Noteworthy, androgens involved in the development of PCa are able to inhibit LXRs in LNCaP cells [22].

Furthermore, LXR α also presents a crucial role in the mouse ventral prostate homeostasis. Kim *et al.* [23] showed, in LXR α -deficient mice, a hypertrophy of the stromal compartment associated with an activation of the TGF β pathway and epithelial proliferative cells. We showed that LXR α controls spermine-binding protein, highly regulated by androgens [24], through a non-direct transcriptional mechanism. Generation of chimera recombinant prostates demonstrates that LXR α is involved in the establishment of the epithelial–mesenchymal interactions in the prostate. LXR α -deficient mice might thus be a good model to investigate the molecular mechanisms of benign prostatic hyperplasia (BPH).

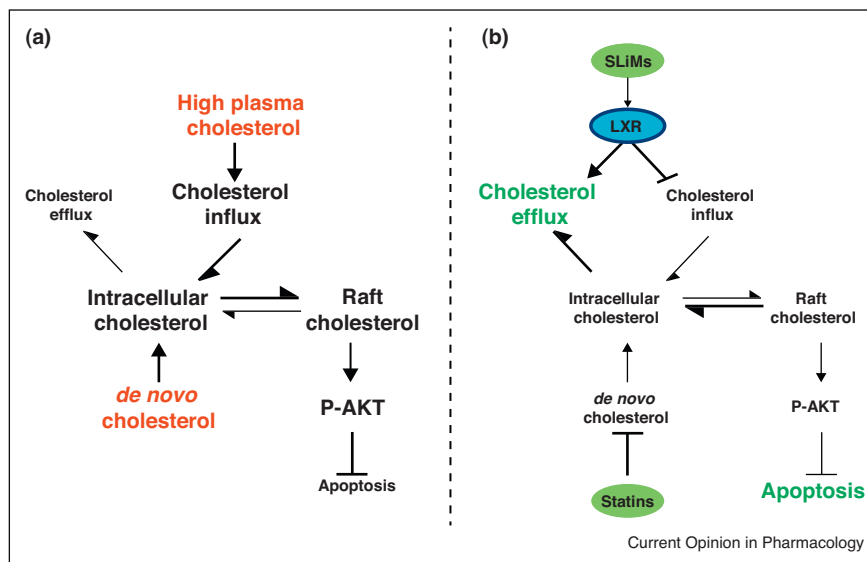
PI3K–AKT signaling pathway in prostate cancer

Activated phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and its downstream target AKT/PKB are important signaling molecules and key survival factors involved in the control of cell proliferation, apoptosis and thus oncogenesis. Three types of effectors are able to activate PI3K: growth factor receptors such as IGF-R (insulin growth factor-receptor) or PDGF-R (platelet derived growth factor-receptor); phosphoproteins like IRS-1/2 (insulin receptor substrate 1/2), CBL or Gab 1/2 (Grb 2-associated binder 1/2); the oncoprotein Ras (cellular murine sarcoma virus oncogene homolog) [25]. The products of the PI3K reaction are dephosphorylated by two types of phosphatases, PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) and SHIP-1/2 (SH2-domain-containing inositol phosphatase). Interestingly the PTEN tumor suppressor gene is lost or mutated in a large number of human cancers including PCa [26].

The PI3K–AKT pathway is constitutively activated in many cancers such as colon, pancreas, and glioblastomas. Several ways have been described to explain this aberrant activation [27].

The early lesion of PCa is the prostatic intra-epithelial neoplasia characterized by a hyperproliferation of the epithelium. *PTEN* expression is often decreased in these lesions and frequently lost with the progression of cancer, resulting in AKT activation [28]. The commonly used PC-3 and LNCaP cell lines are PTEN null cells as they display respectively *Pten* deletion and point mutations [29]. In these cells, AKT is constitutively phosphorylated and activates its downstream targets, including GSK3, FOXO, among others. Other actors of the PI3K/AKT pathway can be modified since 30% of patients with a CRPC display PI3K catalytic subunit mutations [28].

Figure 1



Schematic effect of cholesterol on cell apoptosis. **(a)** When the level of plasma cholesterol is high, influx increases and consequently cholesterol intracellular level. In parallel increased *de novo* cholesterol synthesis by HMGCoA reductase could have the same effect. Cholesterol could thus be accumulated at the membrane within the lipid rafts inducing their coalescence and the activation of PI3K/AKT survival pathway. **(b)** Intracellular cholesterol could be decreased by acting on two pathways: statins block *de novo* synthesis; selective liver X modulators (SLIMs) by activating LXRs increase cholesterol efflux and decrease cholesterol influx [11]. Lipid rafts are destructured, PI3K/AKT activation is decreased and apoptosis enhanced [20**]. P-AKT, phosphorylated AKT.

LXR modulation, a way to downregulate AKT survival pathway?

Several data underline that high quantity of circulating cholesterol increases the risk of aggressive forms of PCa whereas statins, a class of cholesterol lowering agents that inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, induce apoptosis and prevent metastasis of cancer cells [6*].

Cholesterol is a major component of rafts which are microdomains enriched in phospholipids and sphingolipids with highly saturated hydrocarbon chains. The model for signal transduction in raft is based on the association of the receptor at steady state with rafts. In raft coalescence [30], these receptors are activated by ligand binding and recruit crosslinking proteins.

Two-subsets of lipid rafts are actually involved in cancer [31]. ‘Cer-rafts’ are enriched domains with ceramide, sphingomyeline and proteins, like FAS, FASL and death-inducing signaling complex and mainly induce apoptosis. Conversely, ‘chol-rafts’ are enriched with cholesterol, sphingomyeline, ganglioside and proteins such as Caveolins, CD44 and receptor tyrosine kinase family members, and regulate cellular homeostasis. Interestingly, in many signaling alterations, ‘chol-rafts’ promote cell transformation, tumor progression, angiogenesis and metastasis (Figure 1). Cholesterol has a preponderant role in lipid raft coalescence, which increases the size of the

signaling platform [32]. In LNCaP cells, the cholesterol content in membrane regulates apoptosis in particular *via* the inhibition of EGFR/ERK and EGFR/AKT activities [31,33]. Mice xenografted with LNCaP cells, deleted in *caveolin* and *pten*, display an increase of AKT phosphorylation, promoting their survival when they are fed a cholesterol enriched diet. Conversely, simvastatin decreases raft-associated AKT phosphorylation [34].

As cholesterol homeostasis is controlled especially by the LXR pathway, we investigated a potential implication of these nuclear receptors in prostate carcinogenesis [20**]. We demonstrated that it was possible to downregulate AKT phosphorylation in lipid rafts of human PCa cells LNCaP by activating LXRs (Figure 1). Replenishment of cell membranes with exogenous cholesterol antagonized these effects, showing that cholesterol was a key modulator in this process. Interestingly, LXRs activation has an anti-proliferative effect on other cancers such as breast [35], ovaries [36], colon [37] and induces apoptosis of glioblastoma cells by inhibiting an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR pathway [38]. Altogether, pharmacological modulation of LXRs activity could thus reduce tumor growth, in particular in prostate, by enhancing apoptosis in a lipid raft-dependent manner.

Conclusions and perspectives

Even though PCa is diagnosed in elders, the economic burden of this cancer is substantial and growing. This fact

highlights the necessity to find new therapeutic targets and to develop new molecules. The therapeutic potential of LXR ligands in PCa is definitely promising. However, T0901317 and GW3965, two nonsteroid synthetic LXR agonists, are commonly used in experimental studies but a human therapeutic use of these molecules is impossible because of their temporary hypertriglyceridemic effect. Up to now, the LXR agonist tested in phase I clinical trial, even though acting specifically in macrophages without any lipogenic effect, has been excluded due to central nervous system adverse effects [39]. An alternative will be the development of SLiMs (selective liver X modulators) [11] to activate LXRs specifically in the target tissue (Figure 1). But this is another story.

Conflict of interest

None of the authors has declared any conflict of interest.

Acknowledgements

Chester's lab is supported by Fondation pour la Recherche Médicale and Fondation BNP-Paribas, Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comités Allier et Puy-de-Dôme), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Association de Recherche contre le Cancer, Nouveau Chercheur Auvergne (to SB), Fond Européen de Développement Régional (FEDER) grants. J.D. is supported by a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie grant. E.V. was supported by the Région Auvergne, FEDER and ARC grants. H.D.B. is supported by Région Auvergne. J.M.A.L. is a professor at the Université Blaise Pascal.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Schroeppfer GJ Jr: **Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes.** *Physiol Rev* 2000, **80**:361-554. The reference on oxysterols.

2. Viennois E, Pommier AJ, Mouzat K, Oumeddour A, El Hajjaji FZ, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JM: **Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail?** *Expert Opin Ther Targets* 2011, **15**:219-232.

3. Poirot M, Silvente-Poirot S: **Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer.** *Biochimie* 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.006>.

This is an up-to-date review of data from the literature related cholesterol epoxides that were suspected to be direct carcinogenic substances in the 80s.

4. Lasserre R, Guo XJ, Conchonaud F, Hamon Y, Hawchar O, Bernard AM, Soudja SM, Lenne PF, Rigneault H, Olive D et al.: **Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation.** *Nat Chem Biol* 2008, **4**:538-547.

5. Sheppard K, Kinross KM, Solomon B, Pearson RB, Phillips WA: **Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signaling in cancer.** *Crit Rev Oncog* 2012, **17**:69-95.

6. Roy M, Kung HJ, Ghosh PM: **Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins.** *Am J Cancer Res* 2011, **1**:542-561.

This review points out the negative impact of cholesterol levels and prostate cancer risks and aggressiveness.

7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**:69-90.

8. Tsao CK, Small AC, Galsky MD, Oh WK: **Overcoming castration resistance in prostate cancer.** *Curr Opin Urol* 2012, **22**:167-174.

9. Shafique K, McLoone P, Qureshi K, Leung H, Hart C, Morrison DS: **Cholesterol and the risk of grade-specific prostate cancer incidence: evidence from two large prospective cohort studies with up to 37 years' follow up.** *BMC Cancer* 2012, **12**:25.
10. Repa JJ, Mangelsdorf DJ: **The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis.** *Nat Med* 2002, **8**:1243-1248.
11. Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S: **Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health?** *Mol Cell Endocrinol* 2012, **351**:129-141.
- This review makes an exhaustive list of natural or synthetic LXR agonists or antagonists, as well their formulae and effects on physiology.
12. 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, **83**:184-187.
13. Wang Y, Kumar N, Crumbley C, Griffin PR, Burris TP: **A second class of nuclear receptors for oxysterols: regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol).** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1801**:917-923.
14. Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW: **Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice.** *Cell Metab* 2007, **5**:73-79.
15. Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, Korach KS, Shaul PW, Mangelsdorf DJ: **27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen.** *Nat Med* 2007, **13**:1185-1192.
16. Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM, Angelone T, Cerra MC, Picard D, Maggiolini M: **The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor alpha-mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes.** *PLoS One* 2011, **6**:e16631.
17. Calkin AC, Tontonoz P: **Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**:213-224.
18. Faulds MH, Zhao C, Dahlman-Wright K: **Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases.** *Curr Opin Pharmacol* 2010, **10**:692-697.
19. Chuu CP, Hiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, Liao S: **Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist.** *Cancer Res* 2006, **66**:6482-6486.
20. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F et al.: **Liver X receptor activation downregulates Akt survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells.** *Oncogene* 2010, **29**:2712-2723.
- This article shows for the first time that pharmacological activation of LXRs increases apoptosis of prostate cancer cells *ex vivo* and *in vivo*, by modifying lipid raft signaling.
21. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S: **Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2004, **64**:7686-7689.
- This is the *princeps* article that demonstrates for the first time that pharmacological activation of LXRs leads to a decreased proliferation of prostate cancer cells *ex vivo* and *in vivo*.
22. Krycer JR, Brown AJ: **Cross-talk between the androgen receptor and the liver X receptor: implications for cholesterol homeostasis.** *J Biol Chem* 2011, **286**:20637-20647.
23. Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA: **Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:558-563.
24. Viennois E, Esposito T, Dufour J, Pommier A, Fabre S, Kemeny JL, Guy L, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S: **Lxralpha regulates the androgen response in prostate epithelium.** *Endocrinology* 2012, **153**:3211-3223.
25. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A et al.: **Roles**

- of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**:1263-1284.
26. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Milliaresis C, Rodgers L, McCombie R *et al.*: **PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.** *Science* 1997, **275**:1943-1947.
 27. Restuccia DF, Hemmings BA: **From man to mouse and back again: advances in defining tumor AKTivities in vivo.** *Dis Model Mech* 2010, **3**:705-720.
 28. Sarker D, Reid AH, Yap TA, de Bono JS: **Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:4799-4805.
 29. Majumder PK, Sellers WR: **Akt-regulated pathways in prostate cancer.** *Oncogene* 2005, **24**:7465-7474.
 30. Simons K, Toomre D: **Lipid rafts and signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**:31-39.
 31. Patra SK: **Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1785**:182-206.
 32. Freeman MR, Solomon KR: **Cholesterol and benign prostate disease.** *Differentiation* 2011, **82**:244-252.
 33. Oh HY, Lee EJ, Yoon S, Chung BH, Cho KS, Hong SJ: **Cholesterol level of lipid raft microdomains regulates apoptotic cell death in prostate cancer cells through EGFR-mediated Akt and ERK signal transduction.** *Prostate* 2007, **67**:1061-1069.
 34. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR: **Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts.** *J Clin Invest* 2005, **115**:959-968.
 35. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR: **The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells.** *Carcinogenesis* 2009, **30**:575-579.
 36. Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, Daly JM: **Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells.** *J Ovarian Res* 2010, **3**:13.
 37. Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, Makishima M: **Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands.** *Biochem Pharmacol* 2009, **77**:186-195.
 38. Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, Kuga D, Amzajerdi AN, Soto H, Zhu S *et al.*: **An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway.** *Cancer Discov* 2011, **1**:442-456.
 39. Li X, Yeh V, Molteni V: **Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007-2009).** *Expert Opin Ther Pat* 2010, **20**:535-562.

Article 5 :

LXR α regulates androgen response in prostate epithelium.

Viennois E, Esposito T, Dufour J, Pommier A, Fabre S, Kemeny JL, Guy L, Morel L, Lobaccaro JMA. Endocrinology. 2012 Jul;153(7):3211-23. Epub 2012 Apr 30.

Lxr α Regulates the Androgen Response in Prostate Epithelium

Emilie Viennois, Teresa Esposito, Julie Dufour, Aurélien Pommier, Stephane Fabre, Jean-Louis Kemeny, Laurent Guy, Laurent Morel, Jean-Marc Lobaccaro, and Silvère Baron

Department of Génétique Reproduction et Développement (E.V., T.E., J.D., A.P., L.M., J.-M.L., S.B.), Clermont Université, Université Blaise Pascal, and Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne (E.V., T.E., J.D., A.P., L.M., J.-M.L., S.B.), F-63000 Clermont-Ferrand, France; Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6293 (E.V., T.E., J.D., A.P., L.M., J.-M.L., S.B.), and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 1103 (E.V., T.E., J.D., A.P., L.M., J.-M.L., S.B.), GReD, F-63177 Aubiere, France; Dipartimento di Medicina Sperimentale (T.E.), Laboratorio di Biologia Molecolare, Section F. Bottazzi, Second University of Naples, F-80138 Naples, Italy; Department of Physiologie de la Reproduction et des Comportements (S.F.), Unité Mixte de Recherche 6175 Institut National de la Recherche Agronomique-Centre National de la Recherche Scientifique-Université de Tours-Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France; and Service de Pathologie (J.-L.K.) and Service d'Urologie (L.G.), Hôpital Gabriel Montpied, F-63003 Clermont-Ferrand, France

Benign prostatic hyperplasia is a nonmalignant enlargement of the prostate that commonly occurs in older men. We show that liver X receptor (Lxr)- α knockout mice (*Lxr α ^{-/-}*) develop ventral prostate hypertrophy, correlating with an overaccumulation of secreted proteins in prostatic ducts and an alteration of vesicular trafficking in epithelial cells. In the fluid of the *Lxr α ^{-/-}* prostates, spermine binding protein is highly accumulated and shows a 3000-fold increase of its mRNA. This overexpression is mediated by androgen hypersensitivity in *Lxr α ^{-/-}* mice, restricted to the ventral prostate. Generation of chimeric recombinant prostates demonstrates that Lxr α is involved in the establishment of the epithelial-mesenchymal interactions in the mouse prostate. Altogether these results point out the crucial role of Lxr α in the homeostasis of the ventral prostate and suggest *Lxr α ^{-/-}* mice may be a good model to investigate the molecular mechanisms of benign prostatic hyperplasia. (*Endocrinology* 153: 3211–3223, 2012)

Benign prostate hyperplasia (BPH) is a common disorder that affects 50% of 60-yr-old men (1) characterized by lower urinary tract disorders having severe effects on the quality of life. Three main forms of BPH have been described: glandular, fibrous, and muscular. Pharmacological treatment of BPH relies on two types of medications: 5 α -reductase inhibitors, such as finasteride, which inhibit the conversion of testosterone into dihydrotestosterone (DHT) (2), and α -blockers, such as prazosin, which block the α -adrenergic receptor in the smooth muscle helping to relax prostate-associated muscle fibers (3). In addition to pharmacological treatment, transurethral prostate resection is the reference surgical procedure.

Androgens are important in prostate embryonic development as well as in the adult prostate (4), and androgen-mediated signaling plays a central role in the etiology of prostatic hypertrophy. Androgen receptor (AR; NR3C4) belongs to the nuclear hormone receptor superfamily and is activated by DHT or testosterone (5, 6). Interestingly, inhibition of testosterone conversion into DHT, the major active androgen within the prostate (7), is one of the most effective pharmacological treatments of BPH (2). Cunha (8) has extensively described the role of mesenchymal-epithelial interactions in normal and pathological prostate development as well as adult prostate homeostasis. Com-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2011-1996 Received November 16, 2011. Accepted April 5, 2012.

First Published Online April 30, 2012

Abbreviations: AR, Androgen receptor; BPH, benign prostate hyperplasia; DHT, dihydrotestosterone; EEA1, Early endosome antigen 1; IP, immunoprecipitation; LXR, liver X receptor; MEF, mouse embryonic fibroblast; MPE, mouse prostate epithelial; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SBP, spermine binding protein; UGE, urogenital epithelia; UGM, urogenital mesenchyme; VP, ventral prostate; WT, wild type.

binations were made between mesenchymal and epithelial tissue derived from normal embryos or mice with the mutation *Tfm* (9) (testicular feminized) in AR, which inhibits its function and makes animals insensitive to androgens. Different combinations of urogenital mesenchyme (UGM) and urogenital epithelia (UGE) demonstrated that mesenchymal-epithelial interactions were necessary for prostate development. Moreover, AR signaling in epithelial cells is not sufficient for the morphological development of the prostate, whereas mesenchymal AR is necessary and sufficient. In addition, these experiments demonstrate the existence of paracrine factors synthesized by mesenchymal cells in response to androgens that regulate the function and survival of epithelial cells.

Recent studies identified liver X receptors (LXR) as factors involved in prostate physiology (reviewed in Ref. 10). LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2), two members of the nuclear receptor superfamily, are bound by oxidized forms of cholesterol known as oxysterols. Activated LXR stimulate expression of target genes involved in lipid metabolism (11, 12). Interestingly, LXR ligands such as synthetic T0901317 have antiproliferative effects on the prostate cancer cell line LNCaP (13). We have previously shown that LXR activation also leads to LNCaP cell death by apoptosis as well as inhibition of tumor growth in xenograft models (14). Moreover, LXR activity can be downregulated by AR in LNCaP cells at the promoter level (15). This regulation implies the involvement of the N-terminal domain of AR. Conversely, constitutive activation of *Lxr α* in the liver activates androgen catabolism in mice (16).

Kim *et al.* (17) demonstrated that *Lxr α* -deficient mice were characterized by several BPH-like features such as dilated prostatic ducts, hyperproliferative epithelium, and hypertrophic stroma. The authors suggested that this phenotype resulted from stromal compartment alterations but did not provide any mechanism to explain the BPH phenotype. Moreover, knowing the crucial role of androgens in prostate homeostasis, we hypothesized that this phenotype was in part due to alterations of androgen signaling. Neither the specific role of each compartment in phenotype establishment nor the specific role of the androgenic pathway has previously been investigated.

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

Materials and Methods

Animal care and animal experiments procedure

Lxr-knockout mice [*Lxr α* ^{-/-}, *Lxr β* ^{-/-}, and *Lxr $\alpha\beta$* ^{-/-} (18)] and wild-type (WT) mice were maintained on a mixed strain

background (C57BL/6:129Sv) and housed in a temperature-controlled room with 12-h light, 12-h dark cycles. They were fed *ad libitum* with water and Global-diet 2016S (Harlan, Gannat, France). Eight- to 12-month-old mice were anesthetized by ketamine/xylazine; blood was collected by cardiac puncture, whereupon animals were killed by cervical dislocation and organs harvested. Some mice were surgically castrated at 6 months of age. Three weeks after the surgical procedure, castrated mice received two daily im injections of 75 μ g/kg testosterone propionate for 1 wk (Sigma-Aldrich; L'Isle d'Abeau, France) to allow the prostate to regenerate. Animals were then killed and the ventral prostate (VP) lobes were collected for various analyses. For antiandrogen experiments, 6-month-old mice were daily gavaged with the antiandrogen bicalutamide (12 mg/d/kg, Casodex; AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) or with vehicle methylcellulose. All the chemicals were from Sigma-Aldrich unless otherwise indicated. All mouse experiments were performed in agreement with the local ethic committee (no. CE26-11).

Anatomy and pathology analyses

VP lobes were collected, fixed in 4% PFA, and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin/eosin or Masson's trichrome and analyzed with an Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Vision GmbH, LePecq, France). For electron microscopy, samples were fixed in 2% glutaraldehyde-0.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer at 4 C for 24 h. Fixed VP were subsequently postfixed for 1.5 h in buffered osmium tetroxide at 4 C and embedded in Epon Araldite (Delta Microscopies, Ayguesvives, France). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and observed with a Hitachi H-7650 transmission electron microscope (Hitachi Elexience, Verrières-le-Buisson, France). Use of human samples was approved by the local ethical committee. Subjects received counseling and provided written consent for the study.

Mouse prostate epithelial cell establishment

The culture procedure was derived from methods developed for mouse vas deferens epithelial cells by Manin *et al.* (19). Briefly, mouse prostate epithelial (MPE) cells were harvested from the VP lobes of 20- to 30-d-old *Lxr α* ^{-/-} or WT mice and transferred onto cell culture insets (BD Falcon TM, Fontenay-sous-Bois, France) coated with a thin layer of extracellular matrix gel (Sigma Aldrich) and cultured in complete medium [DMEM/F12 (50:50; Invitrogen, Oslo, Norway) supplemented with 0.5% fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France), cholera toxin (10 ng/ml), epidermal growth factor (5 ng/ml), gentamycin (100 μ g/ml), insulin (5 μ g/ml), transferrin (10 μ g/ml), L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), ethanolamine (0.6 μ g/ml), cAMP (25 μ g/ml), selenium (17.3 ng/ml), and hydrocortisone (10 nM)].

Cell immunofluorescence and lysosomal labeling

MPE were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized in PBS Triton X-100 0.1%. Detection were performed using antirabbit EEA1 (Abcam, Paris, France) and antimouse tubulin (BD Transduction Laboratories, Le Pont de Claix, France) antibodies and revealed with Alexa 488-conjugated antirabbit and Alexa 555-conjugated antimouse immunoglobulins (Invitrogen). For lysosomal analysis, MPE were incubated in minimal medium containing 50 mM of lysotrackerRed (Invitrogen).

Cell culture and transient transfection

Mouse embryonic fibroblast (MEF) were transfected 24 h after seeding with 1 μ g of the luciferase reporter construct ARE-TK-LUC (20) in combination with 500 ng or 1 μ g of pSG5-hAR using Lipofectamine 2000 (Sigma-Aldrich). After transfection, cells were starved for 12 h in a basal medium without growth factors and were then cultured in DMEM in the absence or the presence of 1 nM DHT (Sigma-Aldrich) for 24 h. Luciferase activity was measured using luciferase assay kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

Hormone measurement

Plasma testosterone was extracted with ethyl acetate-cyclohexane as previously described (21) and measured by RIA. The limit of detection of the testosterone assay was 6 pg/tube, and the intraassay coefficient of variation was less than 12%. The anti-serum cross-reacted with 5 α -dihydrotestosterone (65%), 5 β -dihydrotestosterone (49.5%), androstenedione (0.7%), and less so with other steroids (<0.1%).

Intraprostatic DHT was quantified using an enzymatic immunoassay kit from Diagnostics Biochem Canada Inc. (London, Canada) (22). Briefly, ventral prostate lobes were homogenized with tissue lyser (QIAGEN, Les Ulis, France) in a solution of PBS-0.1 mg/ml BSA. DHT concentration in the homogenate was determined according to the manufacturer's instructions.

Quantitative PCR

mRNA were extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey Nagel EURL, Hoerd, France). cDNA was synthesized with 200 U of Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Promega), 5 pmol of random primers (Promega), 40 U RNasin (Promega), and 2.5 mM deoxynucleotide triphosphate. Quantitative PCR was performed on a Mastercycler ep Realplex (Eppendorf, LePecq, France) using MESA GREEN quantitative PCR masterMix Plus for SYBR (Eurogentec, Angers, France). Sequences of the primers used are listed in Supplemental Fig. 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://endo.endojournals.org>.

Coomassie blue gel and liquid chromatography and tandem mass spectrometry analysis

Proteins were extracted using HEPES 20 mM, NaCl 0.42 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, and Nonidet P-40 1% supplemented with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM (Sigma-Aldrich), protease inhibitor (Complete 1X; Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France), NaF 0.1 mM, and Na₂VO₃ 0.1 mM (Sigma-Aldrich). Total proteins were loaded on Mini-PROTEAN TGX 4–15% precast gels (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France), and gels were stained with Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad Laboratories). Protein bands were excised, destained, and submitted to tryptic digestion, as previously described (23). Briefly, positive ion matrix-assisted laser desorption ionization mass spectra were recorded in the reflectron mode of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (Voyager DE-Pro; Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The *Mus musculus* Swissprot database was queried using Mascot software. The following parameters were considered for the searches: a maximum ion mass tolerance of ± 25 ppm, partial oxidation of methionine, and one maximum miss cleavage.

Western blot analysis

Total proteins were subjected to denaturing SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-ECL membrane (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Detections were performed using antibodies raised against β -actin (Sigma-Aldrich), AR (PG21; Millipore, Euromedex, Mundolsheim, France), or pan-prostate secretions (a kind gift from Dr. C. Abate-Shen, Department of Medicine, Columbia University Medical Center, New York, NY) and revealed with peroxidase-conjugated antirabbit IgG (P.A.R.I.S, Compiègne, France) using a Western Lightning System kit (PerkinElmer, Villebon sur Yvette, France).

Chromatin immunoprecipitation

Ventral prostates were harvested and homogenized in 200 μ l of cell lysis buffer (5 mM 1,4-piperazine diethane sulfonic acid PIPES, 85 mM KCl, 0.5% Nonidet P-40) supplemented with PMSF 1 mM, and protease inhibitors one time. After centrifugation chromatin complexes were fixed by 1% formaldehyde/PBS for 15 min at room temperature. Fixation was stopped by the addition of glycine (125 mM final). After centrifugation, pellets were washed twice in PBS supplemented with 1 mM PMSF and protease inhibitors. Nuclei were then lysed 45 min on ice in nucleus lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate], and chromatin was sheared by sonication. Chromatin was then precleared 2 h at 4 C in 500 μ l immunoprecipitation (IP) buffer [0.01% sodium dodecyl sulfate, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1) and 167 mM NaCl] containing 30 μ l of Dynabeads Protein A (Invitrogen). The beads were subsequently discarded with MagnaRack (Invitrogen) and the sample was split in two identical fractions. Immunoprecipitation was performed overnight at 4 C with 5 μ g of negative control IgG (Diagenode, Liège, Belgium) or specific anti-AR antibody (Millipore). Beads were washed six times in cold IP buffer and elutions were performed according to Chelex protocol (Bio-Rad Laboratories). Before PCR, chromatin samples were further purified using Qiaquick PCR purification columns (QIAGEN) and eluted in 30 μ l of water. PCR was performed on 2 μ l of eluted chromatin using GoTaq (Promega).

PCR was performed with the following primers: *fkbp5*, 5'-ACCCCCATTTTAATCGGAGAAC-3' and 5'-TTTTGAAGAGCACAGAACACCCT-3'; *sbp*, 5'-GCCCTACTGACCCAGTATAGC-3' and 5'-GAACTTTGTTTTCTGCTTATCCCTCAG-3'; and *pbsn*, 5'-ATACTAAATGACACAATGTCAA TG-3' and 5'-CCCCAACACATTTGTTATTCTC-3'. The targeted androgen-responsive element-containing sequences for the *sbp* and *fkbp5* promoters were designed as previously described (24, 25).

Urogenital sinus dissection and subrenal prostate regeneration

Urogenital sinuses were collected from embryonic d 16.5 embryos and dissected into UGE and UGM as previously described (26). Briefly, dissected tissues were carefully digested with 10% trypsin at 4 C for 60 min and subsequent digestion with deoxyribonuclease (10 mg/ml; Roche). After 5 min, digestion was stopped with dissecting media (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin, and glutamine; Invitrogen). The mesenchyme (UGM) was separated from the epithelium (UGE). Mesenchymes and epithelia were mixed in type

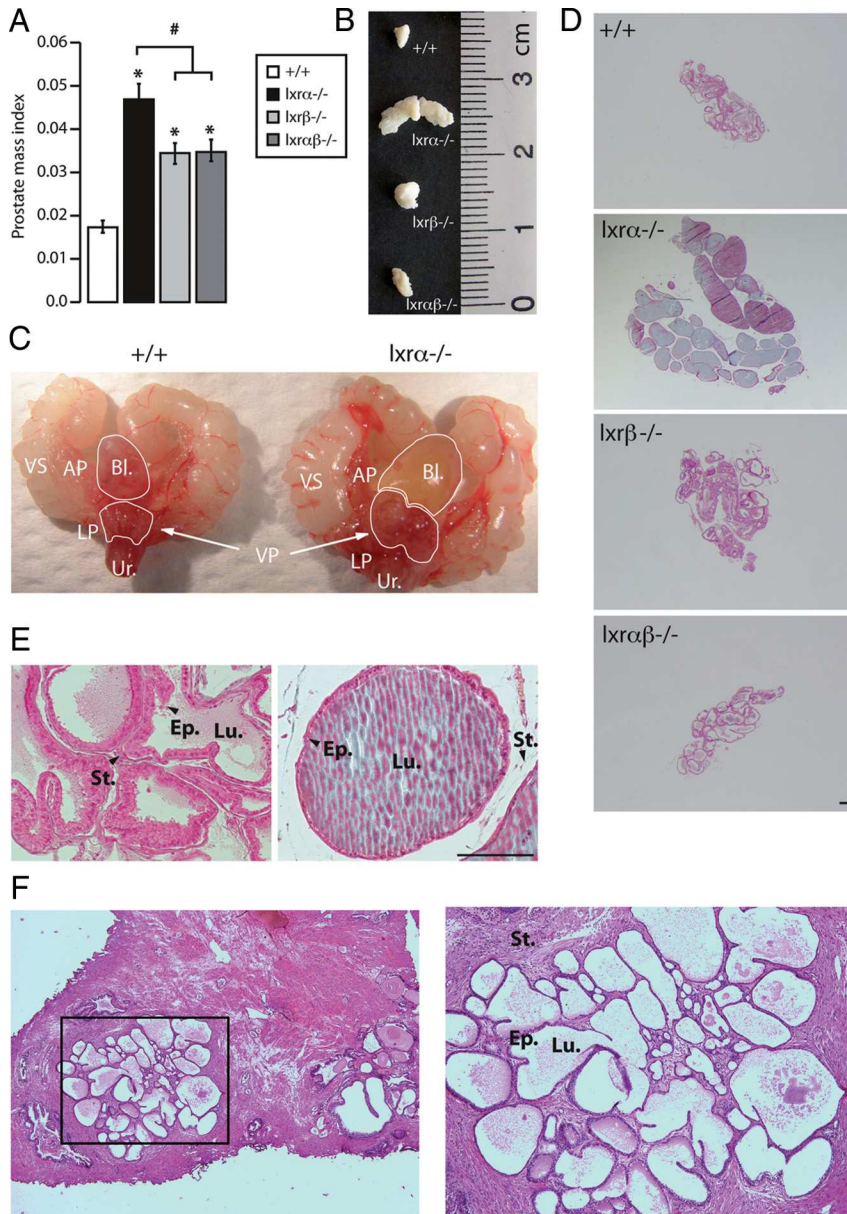


FIG. 1. *Lxra*^{-/-} mice develop prostate hypertrophy. A, VP weight normalized to body weight of 12-month-old WT, *Lxra*^{-/-}, *Lxrβ*^{-/-}, and *Lxrαβ*^{-/-} mice. *, *P* < 0.05 compared with the WT mice; #, *P* < 0.05 compared with *Lxra*^{-/-} mice. B, Macroscopic observation of VP lobes after necropsy (size in centimeters). Both VP weight and size are increased in *Lxra*^{-/-} mice compared with WT, *Lxrβ*^{-/-}, and *Lxrαβ*^{-/-} mice (*n* = 17–26 for each genotype). C, Macroscopic urogenital tract pictures of *Lxra*^{-/-} compared with WT mice. *Lxra*^{-/-} mice develop a bladder enlargement with urine accumulation. D and E, Masson trichrome staining of WT, *Lxra*^{-/-}, *Lxrβ*^{-/-}, and *Lxrαβ*^{-/-} VP, at the age of 8 months. Bars, 200 μm. F, Hematoxylin-eosin staining of human prostate that exhibits the duct enlargement frequently observed in BPH patients. Bl, Bladder; LP, lateral prostate; VS, seminal vesicle; AP, anterior prostate; Ur, urethra; Ep, epithelium; Lu, lumen; St, stroma.

1 collagen prepared extemporaneously (collagen, NaOH 1N; BD Biosciences). Four recombinations were generated: UGE_{WT}/UGM_{WT}; UGE_{*Lxra*^{-/-}}/UGM_{*Lxra*^{-/-}}; UGE_{WT}/UGM_{*Lxra*^{-/-}}; and UGE_{*Lxra*^{-/-}}/UGM_{WT}. After collagen polymerization at 37°C, the recombinants were cultured at 37°C, 5% CO₂ in dissecting media supplemented with 10⁻⁷ M DHT (Sigma-Aldrich) for 24 h before grafting under the kidney capsule in anesthetized male nude mice (Charles River, L'Arbresle, France) (26, 27). After kidney repositioning, mice were sutured. The grafts were harvested 8 wk after surgery. All mouse experiments were performed in agreement with the local ethic committee (no. CE21-11).

sitioning, mice were sutured. The grafts were harvested 8 wk after surgery. All mouse experiments were performed in agreement with the local ethic committee (no. CE21-11).

Statistical analysis

Values are expressed as means ± SEM. Statistical comparisons were performed using a two-tailed Student's *t* test. A *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mice lacking *Lxra* develop BPH-like features associated with abnormal epithelial secretory activity

VP were obtained from 12-month-old WT, *Lxra*^{-/-}, *Lxrβ*^{-/-}, and *Lxrαβ*^{-/-} mice. Lobe weights (Fig. 1A) and sizes (Fig. 1B) were significantly higher in *Lxr*^{-/-} compared with WT mice. *Lxra*^{-/-} mice had the most prominent phenotype with a 2.7-fold weight increase compared with WT (*vs.* 2-fold for *Lxrβ*^{-/-} and *Lxrαβ*^{-/-} mice). Therefore, most of the subsequent experiments were carried out using the *Lxra*^{-/-} genotype. Macroscopic analysis (Fig. 1C) showed that *Lxra*^{-/-} mice had urine-filled bladders, a sign of urinary flow obstruction usually observed in BPH patients. Histological analysis showed that prostatic ducts were aberrantly dilated (Fig. 1, D and E) and filled up with large amounts of secretion fluid, which could account for the increase in VP weight. Interestingly, this phenotype was restricted to VP (Supplemental Fig. 2A). These histological features are similar to dilated glands observed in some BPH patients (Fig. 1F). However, no evidence of fibrous nodule formation was found in our cohort as previously described (17).

Altogether these observations suggested that the enlarged VP phenotype could result from the deregulation of epithelial secretory activity. To further evaluate a potential secretory phenotype, VP tissue sections were analyzed by electron microscopy. These experiments showed larger secretion vesicles (Fig. 2, D and E) filled with a filamentous content (Fig. 2F) in the cytoplasm of *Lxra*^{-/-} VP cells com-

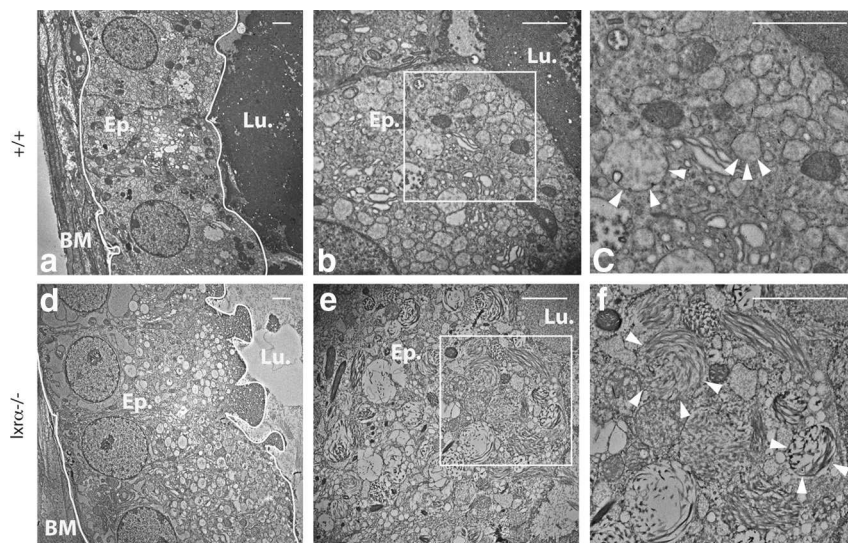


FIG. 2. *Lxrα*-deficient mice present an abnormal epithelial secretory activity. Ultrathin sections of VP from WT (A–C) or *Lxrα*^{-/-} (D–F) mice were made and analyzed by electron microscopy to observe the ultrastructural organization of the cells within the cytoplasm. White arrowheads indicate secretory vesicles. These are bigger and present filamentous content in cytoplasm of *Lxrα*^{-/-} epithelial cells. Ep, Epithelium; Lu, lumen; BM, basal membrane. Bar, 2 μm. Squared portions indicate the magnified view shown in C and F.

pared with WT (Fig. 2, A–C). Interestingly, this phenotype was not observed in *Lxrβ*^{-/-} VP (data not shown), even though the LXRβ isoform is expressed (Supplemental Fig. 2B). There is no compensation of *Lxr* isoform expression in each genotype (Supplemental Fig. 2C). Altogether these data suggested that there were an abnormal vesicle trafficking and vesicle structures in the VP of *Lxrα*^{-/-} mice.

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

To investigate the intrinsic role of *Lxrα* in VP epithelium, vesicular trafficking was analyzed in MPE cells derived from the VP of *Lxrα*^{-/-} or WT mice. Expression of Early endosome antigen 1 (EEA1), a protein that binds phospholipid vesicles and is involved in endosomal trafficking, was analyzed. Immunolabeling of tubulin was used to assess cellular morphology and all trafficking apparatus integrity. We found that endosomal vesicles were smaller in *Lxrα*^{-/-} MPE compared with WT (Fig. 3, Ac and Af). Lysosome biogenesis is tightly linked to vesicle trafficking (28). Therefore, we analyzed the effect of *Lxrα* ablation on lysosome structure by incubation of MPE cells with LysoTracker (Invitrogen). These experiments showed that lysosomes were smaller and less abundant in *Lxrα*^{-/-} vs. WT MPE (Fig. 3, Ai and Al). Taken together, these observations show that the absence of *Lxrα* in ventral prostate epithelial cells results in abnormal vesicle trafficking and reduced lysosome biogenesis. Next we sought to ascertain whether the VP of mice lacking *Lxrα* and/or *Lxrβ* exhibited deregulated expression of genes involved in

cell trafficking (Fig. 3B). We observed that *syngr*, *lamp1*, *golgb1*, and *rab27b* expressions were up-regulated in *Lxrαβ*^{-/-} mice and *synpr* expression was down-regulated in *Lxrα*^{-/-}, *Lxrβ*^{-/-}, and *Lxrαβ*^{-/-} mice (Fig. 3C). Altogether these results demonstrated that *Lxrα* and *Lxrβ* are required for a normal trafficking and secretory machinery in prostatic epithelium.

Lxrα^{-/-} ventral prostate exhibits an overaccumulation of secreted spermine binding protein (SBP) in the prostatic fluid

To decipher the molecular mechanisms leading to the phenotype observed in VP from *Lxrα*^{-/-} mice, protein accumulation profiles were analyzed by Western blotting followed by protein identification by mass spectrometry. Coomassie blue staining showed that *Lxrα* ablation resulted in multiple alterations in overall protein content (Fig. 4A). These observations were confirmed by Western blot using an antiserum directed toward the whole secretory content of mouse prostatic fluid (29) in isolated secretions and in cell lysates from WT and *Lxrα*^{-/-} mice (Fig. 4B). Both experiments showed strong accumulation of a 30-kDa protein in WT samples (band 1). This signal was absent from *Lxrα*^{-/-} samples. However, these samples were characterized by the strong accumulation of a 22/25 kDa protein (band 2) (Fig. 4B). Surprisingly, mass spectrometry analysis showed that both bands contained the same protein identified as SBP (Fig. 4C). The molecular weight discrepancy could result from differential posttranslational modifications. Indeed, SBP is known to be a highly glycosylated protein, which can be detected at multiple molecular weights (30). We further investigated the mechanisms of SBP deregulation by analyzing *sbp* expression using quantitative RT-PCR. This showed that *sbp* mRNA accumulation (Fig. 4D) was increased 3000-fold in *Lxrα*^{-/-} VP, suggesting that *Lxrα* ablation affects *Sbp* gene transcription. It is also noteworthy that *sbp* expression presents a discrete deregulation in *Lxrβ*^{-/-} mice and no alteration in *Lxrαβ*^{-/-} mice (Fig. 4D). Given that *Lxrα*^{-/-} mice exhibit an increased enlargement of VP lobe compared with *Lxrβ*^{-/-} and *Lxrαβ*^{-/-} mice and that SBP overaccumulation is observed only in *Lxrα*^{-/-} prostatic fluid (data not shown), we can conclude that *sbp* gene deregulation plays a central role in the prostate phenotype of *Lxrα*^{-/-} mice.

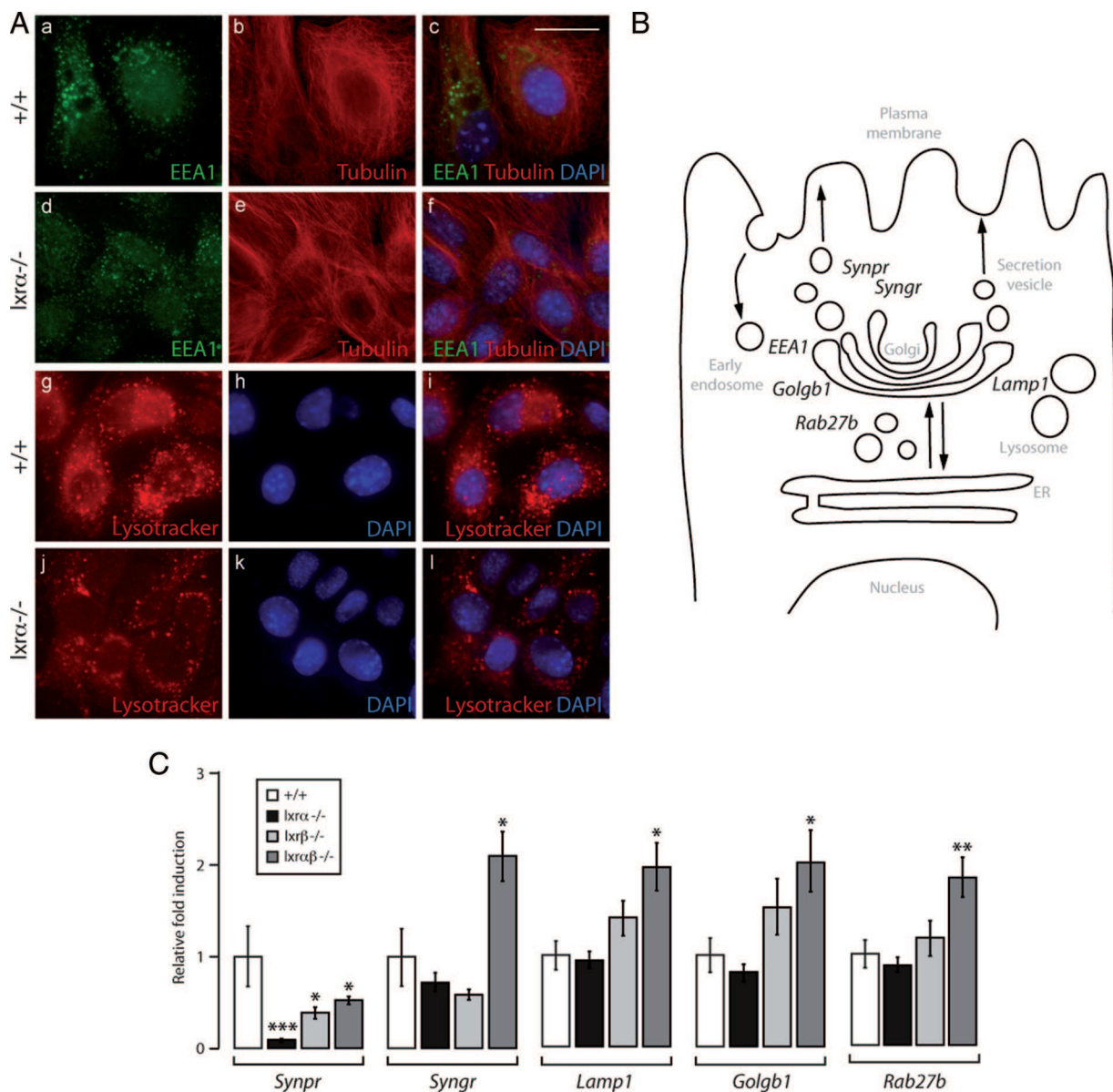


FIG. 3. Vesicular trafficking is altered by Lxr ablation. A, WT and *Lxr α ^{-/-}* MPE were immunostained using anti-EEA1 (a and d) and antitubulin (b and e) antibodies. The EEA1 labeling demonstrated that endosomal vesicles were smaller in *Lxr α ^{-/-}* vs. WT. LysoTracker analysis (g, i, j, and l; Invitrogen) was performed in MPE cells. Cell nuclei were stained with Hoechst. LysoTracker analysis showed that lysosomes were smaller and less abundant in *Lxr α ^{-/-}* vs. WT. Bar, 20 μ m. B, Schematic representation of the main proteins involved in secretion machinery in epithelial cells. Eea1, Early endosome antigen 1; Synpr, synaptoporin; Syng1, synaptogyrin; Lamp1, lysosomal-associated membrane protein 1; Golgb1, golgin B1; Rab27b, RAS oncogene family. C, mRNA relative accumulation levels of *synpr1*, *syng1*, *lamp1*, *golgb1*, and *rab27b* was measured in 9- to 12-month-old animals by quantitative PCR and normalized using *18s* (n = 7–10). *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ compared with WT.

Sbp over accumulation in *Lxr α ^{-/-}* mice is mediated by androgens

SBP is the most abundant protein within the prostatic fluid and its accumulation is tightly regulated by androgens (24, 31). To investigate whether the higher accumulation of SBP in the VP of *Lxr α ^{-/-}* mice resulted from increased levels of androgens, the plasma testosterone level was evaluated. As shown in Fig. 5A, plasma testosterone was significantly increased by 2-fold in *Lxr α ^{-/-}* mice compared with WT. The increased circulating testosterone level can be explained by the increase of *sts*

(steroid sulfatase), a mRNA-encoding enzyme that converts sulfonated androgens into active metabolites in both the liver and VP. In contrast, *sult2a1* (sulfotransferase 2a1) was undetectable in the VP and its expression was unaltered in the liver (Supplemental Fig. 3) (16). Even though testosterone was higher in *Lxr α ^{-/-}* mice, the concentration of DHT, the active androgen in the prostate, was not significantly altered by *Lxr α* ablation (Fig. 5A). Likewise, AR protein accumulation was not altered in the VP of *Lxr α ^{-/-}* mice (Fig. 5B). We thus concluded that increased ligand production or receptor expression was

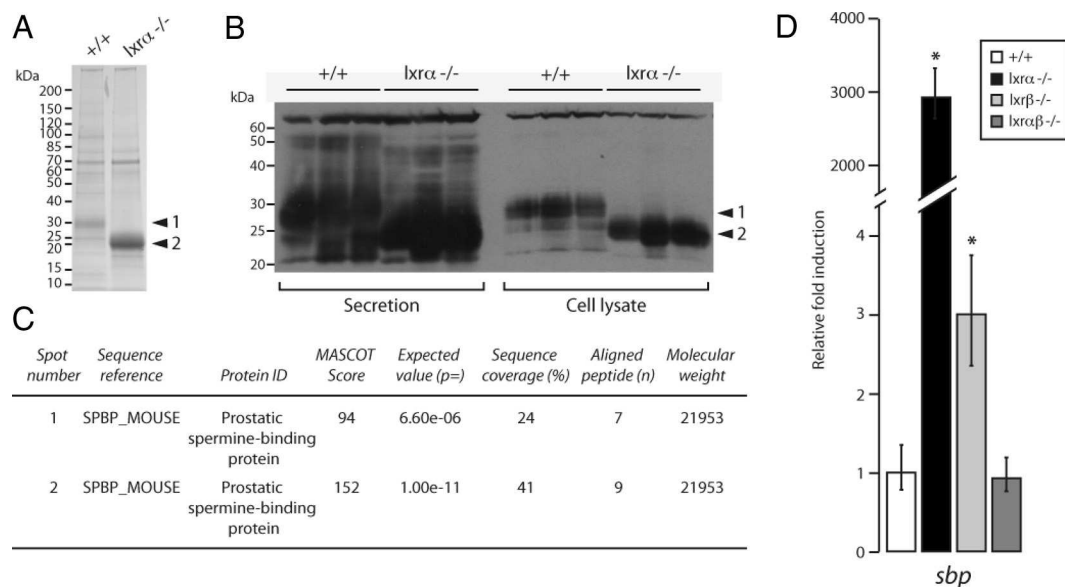


FIG. 4. *Lxra*^{-/-} ventral prostate exhibits an overaccumulation of the secreted protein SBP. A, Secretion protein lysates of WT and *Lxra*^{-/-} ventral prostates were resolved using 4–15% SDS-PAGE migration and the gel was stained with Coomassie Blue. B, Western blot analysis using antiprostate secretory protein immune serum was performed on samples of whole-prostate protein extracts or on prostate secretion only, from WT or *Lxra*^{-/-} mice. C, The protein spots (arrows 1 and 2 in A) were excised from the gel (A) and analyzed by mass spectrometry, and SBP protein was identified and found to be highly accumulated in secretions from *Lxra*^{-/-} VP compared with WT. D, mRNA relative accumulation levels of *sbp* were measured in 9- to 12-month WT, *Lxra*^{-/-}, *Lxrβ*^{-/-}, and *Lxrαβ*^{-/-} animals by quantitative PCR and normalized using *18s*. *Sbp* expression was 3000-fold higher in *Lxra*^{-/-} VP compared with WT and is 3-fold higher in *Lxrβ*^{-/-} compared with WT. *Sbp* transcript accumulation remains unchanged in *Lxrαβ*^{-/-} compared with WT (n = 7–10). *, P < 0.05, ***, P < 0.001 compared with WT.

unlikely to account for the huge increase in *sbp* expression resulting from *Lxra* ablation.

We then analyzed whether the increase in *sbp* expression in *Lxra*^{-/-} VP was directly dependent on androgens by performing castration and testosterone complementation experiments (Supplemental Fig. 4). As expected, castration abolished *sbp* accumulation in the VP of WT mice (Fig. 5C, white bars). The same drastic decrease was observed in *Lxra*^{-/-} mice, although the reduction was not as pronounced as in WT mice. Interestingly, testosterone treatment restored *sbp* expression in both WT and *Lxra*^{-/-} castrated-mice (Fig. 5C, black bars), confirming that *sbp* expression was regulated by androgens in both genotypes. Careful examination of these data showed that *sbp* accumulation was much higher after testosterone propionate treatment in *Lxra*^{-/-} mice (439-fold induction) compared with WT (122-fold induction). Furthermore, pharmacological inhibition of AR by the antiandrogen bicalutamide (Fig. 5D) resulted in decreased accumulation of *sbp* transcript both in WT (1.69-fold inhibition) and *Lxra*^{-/-} mice (2.78-fold inhibition). However, *sbp* accumulation was still higher in *Lxra*^{-/-} than in WT VP after bicalutamide treatment. Castration, testosterone supplementation, and bicalutamide treatment were validated by histology analysis and prostate weight measurement (Supplemental Fig. 4). Altogether these data show that even though androgens are clearly involved in the regulation of *sbp* expres-

sion in VP of *Lxra*^{-/-} mice, these mice still express higher amounts of *sbp* upon total androgen depletion (castration) or when AR is blocked (bicalutamide). We thus concluded that *sbp* accumulation *per se* was hypersensitive to androgens in *Lxra*^{-/-} mice.

Basal *sbp* accumulation was significantly higher in castrated *Lxra*^{-/-} than in WT mice (Fig. 5C). Some *Lxr* target genes show increased expression in *Lxr*-knockout mice in the absence of oxysterol stimulation such as *star* in the adrenal gland (18). This suggested that *sbp* could be a *bona fide* *Lxra* target gene. To test this hypothesis, WT mice were gavaged short-term with T0901317, a synthetic LXR agonist. Neither alteration of *sbp* level nor other androgen target genes such as *fkbp5* and *pbsn* were seen in T0901317-gavaged mice (Supplemental Fig. 5), ruling out a direct regulation of *sbp* expression by *Lxra*. These observations suggest that *Lxra* indirectly affects basal *sbp* expression, resulting in increased androgen sensitivity.

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

Next, we sought to determine whether the abnormal androgen response was VP specific or was also present in other tissues. Protein accumulation profiles were analyzed in several androgen-dependent tissues of the genital tract: dorsolateral and anterior prostates, epididymis, testis, vas

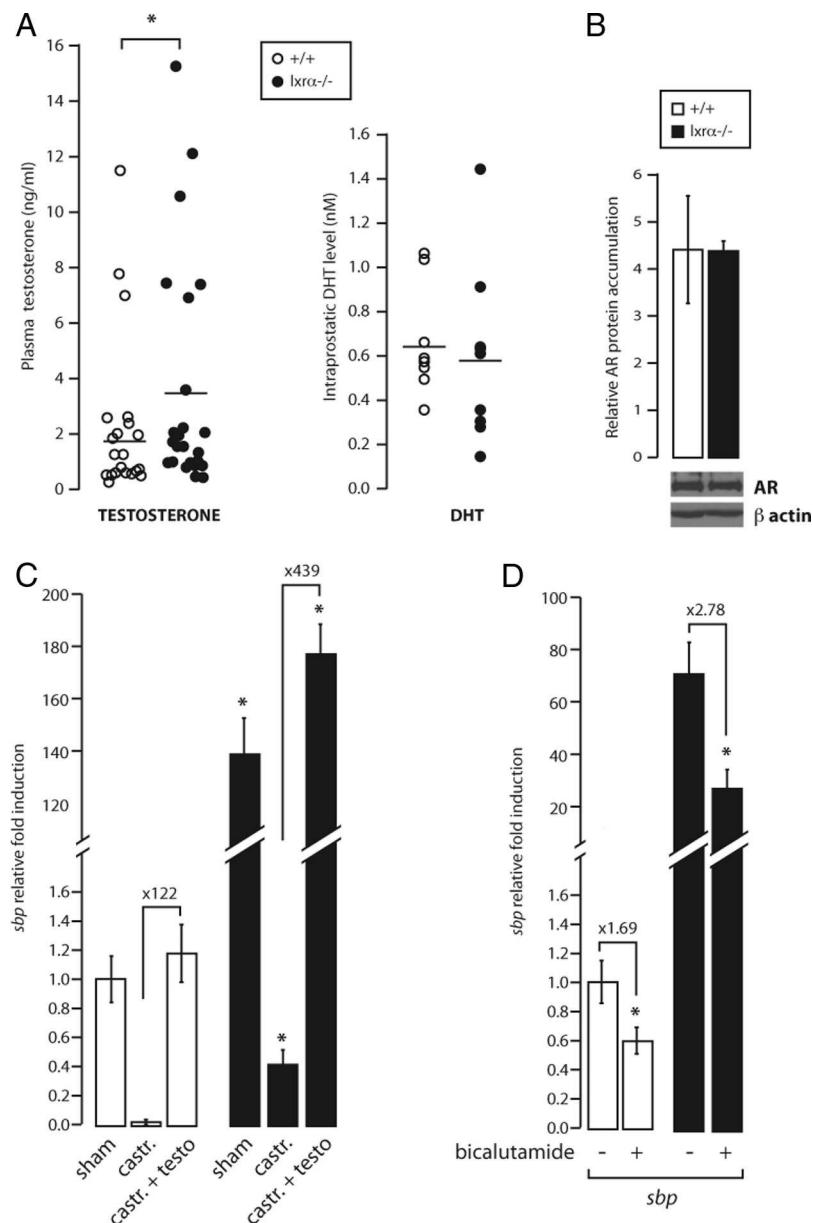


FIG. 5. *Sbp* expression deregulation in *Lxr α ^{-/-}* mice is mediated by androgens. **A**, Testosterone concentrations were measured in the plasma of WT and *Lxr α ^{-/-}* mice. Circulating testosterone was significantly increased in *Lxr α ^{-/-}* ($n = 25$) compared with WT ($n = 25$) mice. The active androgen metabolite, DHT, was measured in the VP of WT and *Lxr α ^{-/-}* mice. DHT levels were unchanged in the ventral prostate ($n = 25$). **B**, Basal AR accumulation determined by Western blot. As observed, this accumulation is unchanged in *Lxr α ^{-/-}* VP. *, $P < 0.05$. **C**, *Sbp* accumulation in 5- to 6-month-old WT or *Lxr α ^{-/-}* castrated (castr.) mice. Three weeks after castration, castrated mice were injected with 75 μ g/kg of testosterone (testo) twice a day for 1 wk. Castration caused a large decrease of *sbp* in WT and *Lxr α ^{-/-}* mice. Testosterone injection led to a larger recovery of *sbp* expression in the VP of *Lxr α ^{-/-}* compared with WT mice, suggesting an androgen hypersensitivity in *Lxr α ^{-/-}* ($n = 7$). *, $P < 0.05$ compared with sham WT mice. **D**, Five- to 6-month-old WT and *Lxr α ^{-/-}* mice were treated with bicalutamide at a daily oral dose of 12 mg/kg for 21 d. Bicalutamide caused a 2.78-fold decrease of androgen-dependent *sbp* expression in *Lxr α ^{-/-}* mice (1.69-fold decreased in WT mice) ($n = 7-9$). *, $P < 0.05$ compared with vehicle.

deferens, and seminal vesicles. There was no clear difference between the migration profiles of WT and *Lxr α ^{-/-}* samples (Fig. 6A). This provided evidence that the abnor-

mal response to androgens was restricted to the VP. We next investigated whether *sbp* was the only androgen-regulated gene to have its expression altered in the VP by analyzing the expression of several androgen-regulated genes by quantitative RT-PCR. These included *svs2* (seminal vesicle secretion-2) (32), *spp1* (secretory prostatic protein-1) (33), *fkbp5* (fk506 binding protein prostate-5) (25), *acpp* (acid phosphatase, prostate protein) (34), *calR* (calreticulin) (35), and *pbsn* (probasin) (36). Analysis of the PCR data allowed stratification of the genes into distinct categories (Fig. 6B): genes with increased basal expression (*svs2* and *spp1*); genes with unaltered expression (*fkbp5*, *acpp* and *calR*); and *pbsn* whose basal accumulation was significantly decreased by *Lxr α* ablation.

To gain insight into the molecular mechanisms accounting for these discrepancies, AR recruitment on the promoters of these genes was analyzed by *in vivo* chromatin immunoprecipitation. Surprisingly, the recruitment of AR to androgen-responsive element sequences of *sbp*, *pbsn*, and *fkbp5* promoters was unaltered by ablation of *Lxr α* (Fig. 6, C and D, and Supplemental Fig. 6). The similar recruitment of AR on target promoters in both WT and knockout VP suggested that *Lxr α* could act through an indirect route to modulate intrinsic AR transcriptional activity.

To test this hypothesis, WT and *Lxr α ^{-/-}* MEF were transfected with the androgen-sensitive construct AREtk-Luc in the presence or absence of an AR expression vector (Fig. 6E). As expected, *Lxr α* was present and functional in WT MEF cells (data not shown). Treatment with DHT in the absence of AR transfection induced a moderate increase in activity of the androgen-sensitive luciferase reporter construct (1.6 fold) in WT MEF. This mild induction was not found in *Lxr α ^{-/-}* MEF. As expected, androgen-responsiveness of the construct was further increased to 12-fold after AR transfection in WT cells. Surprisingly, there was no alteration of androgen responsiveness in *Lxr α ^{-/-}* MEF upon AR transfection. This suggested that *Lxr α* did not directly alter intrinsic AR transcriptional efficiency.

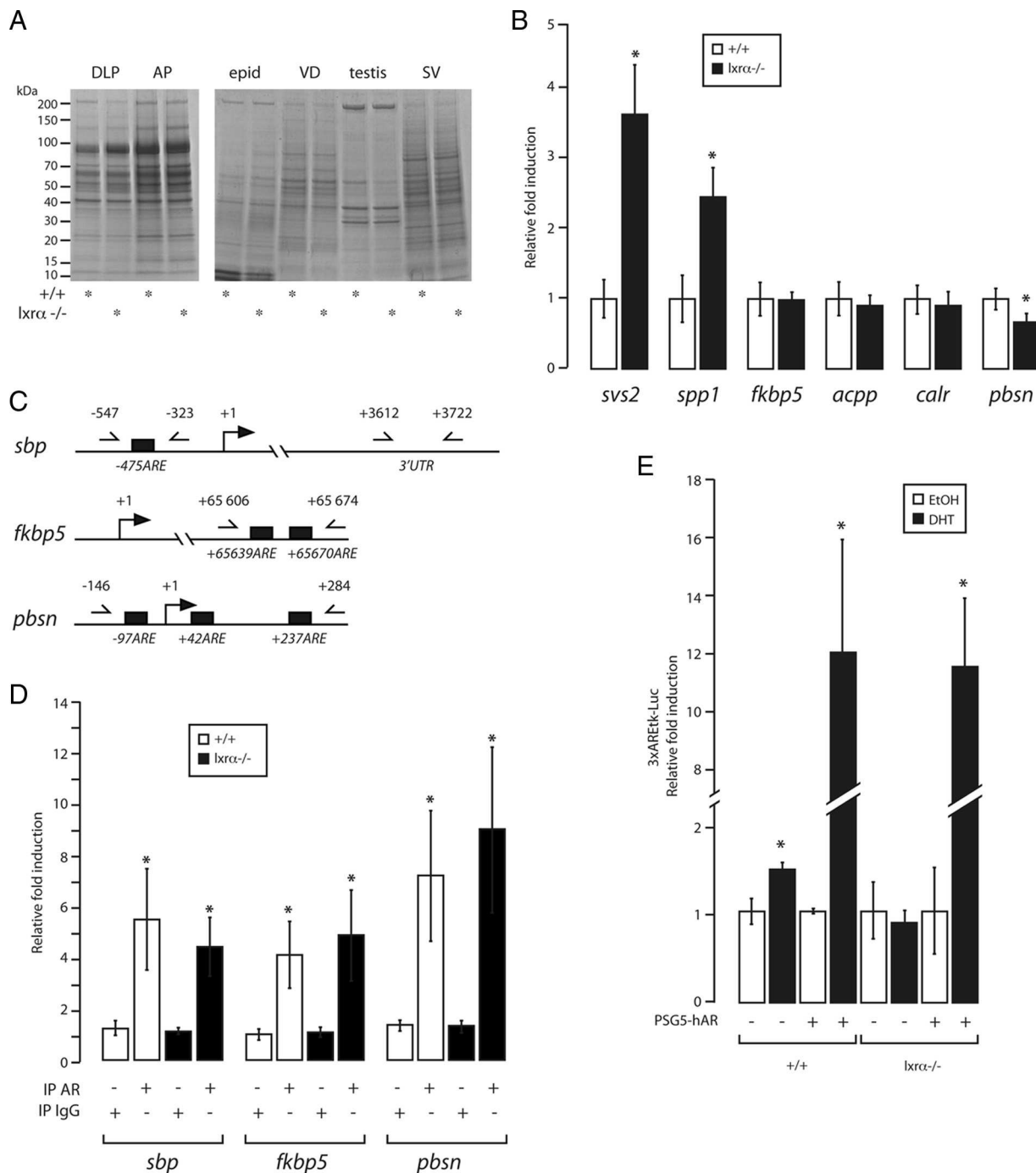


FIG. 6. Androgen hypersensitivity in *Lxra*^{-/-} mice targets specific genes and is restricted to the VP. **A**, Whole-protein extracts from the dorsolateral and anterior prostate, epididymis, vas deferens, testis, and seminal vesicles were migrated in a 4–15% polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. The *sbp* accumulation is lobe specific and is not found in the other male genital tract tissues. **B**, mRNA relative accumulation levels of *svs2*, *spp1*, *fkbp5*, *acpp*, *calr*, and *pbsn* were measured by quantitative PCR and normalized with *18s* in the VP of intact WT mice. Some of them have the same accumulation profile as *sbp*, and others are down-regulated or remain unchanged in the VP (n = 7–10). *, P < 0.05 compared with the WT animals. **C**, Schematic representation of the androgen-responsive element regulatory sites on *sbp*, *fkbp5*, and *pbsn* promoter sequences. The figure shows the amplified regions. Arrows represent primer localization around the amplified regions. **D**, Anti-AR or anti-IgG chromatin immunoprecipitation was performed on the VP of WT and *Lxra*^{-/-} mice. The AR specifically binds the regulatory element of androgen-regulated genes (*sbp*, *pbsn*, and *fkbp5*). Chromatin enrichment was quantified by quantitative PCR (n = 6–8 analyzed for three independent experiments). Lack of *Lxra* does not modify AR recruitment on regulating regions. **E**, *Lxra*^{-/-} and WT MEF cells were transfected with the luciferase reporter construct ARE-tk-LUC in combination with pSG5-hAR and treated or not with 10⁻⁹ M DHT (means ± SEM). *, P < 0.05 compared with the respective excipient incubated cells. DLP, Dorsolateral prostate; AP, anterior prostate; epid, epididymis; VD, vas deferens; SV, seminal vesicle.

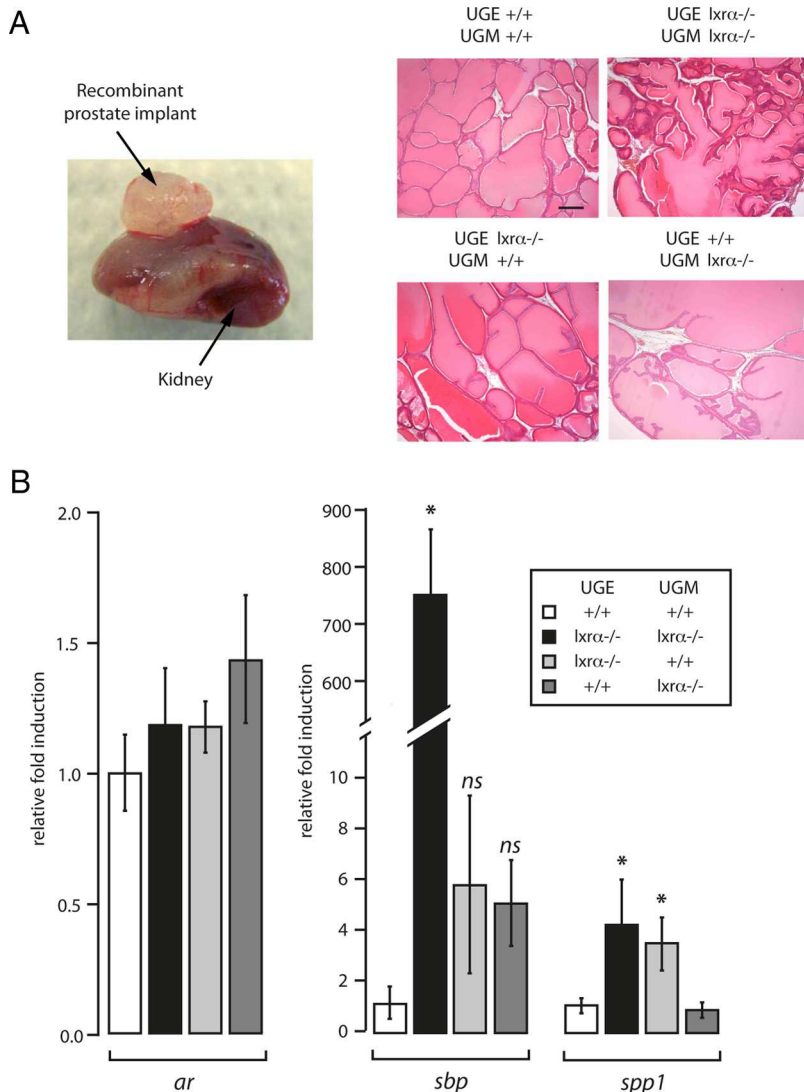


FIG. 7. The deregulation of androgen-dependent genes is dependent on both the stromal and epithelial compartments in *Lxr α ^{-/-}* mice. **A**, UGE and UGM were dissected from WT or *Lxr α ^{-/-}* embryos. Different combinations were performed (see text for more details). The different explants were grafted under the kidney capsule of nude mice. After 8 wk of growth, recombinant prostates (left panel) were dissected. Histological analysis (hematoxylin-eosin staining) was performed on the four different combinations (right panel). Bar, 200 μ m. **B**, Accumulations of *ar*, *sbp*, and *spp1* mRNA were measured by quantitative PCR and the fold induction between each recombinant condition was represented ($n = 3-7$). *, $P < 0.05$ compared with the UGE_{WT}/UGM_{WT} condition.

Lxr α coordinates stroma/epithelium functions to control the androgen-dependent secretory activity of the ventral prostate in mice

Androgen action on the prostate is the result of a complex paracrine network between stromal cells and epithelium (8). Integration of androgen signal is, in part, supported by the stromal compartment which is necessary for epithelium maintenance and survival (8). To investigate whether stromal/epithelial interactions could be involved in the development of enlarged VP ducts and increased accumulation of SBP, we generated chimeric recombinant prostates derived from embryonic WT or *Lxr α ^{-/-}*

UGM and WT or *Lxr α ^{-/-}* UGE. After recombination, the four UGE/UGM combinations (UGE_{WT}/UGM_{WT}; UGE_{Lxr α ^{-/-}}/UGM_{Lxr α ^{-/-}}; UGE_{WT}/UGM_{Lxr α ^{-/-}}; UGE_{Lxr α ^{-/-}}/UGM_{WT}) were grafted under the kidney capsule of nude mice (24). Eight weeks after grafting, the four types of recombinants had grown and presented a similar gross morphology characterized by differentiated prostatic lobes with enlarged tubules filled by accumulated secretions (Fig. 7A). *Ar* transcript accumulation was not altered in the different genotypes combinations. *Sbp* mRNA accumulation was strongly increased (767-fold accumulation) in the UGE_{Lxr α ^{-/-}}/UGM_{Lxr α ^{-/-}} compared with the UGE_{WT}/UGM_{WT} recombinants (Fig. 7B). This showed that this phenotype was intrinsically prostatic because the recombinants were grafted in WT nude mice.

Interestingly, *Sbp* accumulation, the marker of the BPH-like phenotype, was not significantly altered when the mutant UGM was combined with the WT UGE or when the mutant UGE was combined with the WT UGM (Fig. 7B). This demonstrated that *sbp* deregulation originates from combined stromal and epithelial *Lxr α ^{-/-}* ablation. In contrast, *Spp1* expression was deregulated when *Lxr α* was deleted in the epithelium alone or in combination with the mesenchyme. However, in the mesenchyme alone, *Lxr α* ablation had no effect on *Spp1* expression. We therefore concluded that *Lxr α* played a physiological role in both the stroma and epithelium. We further showed that the contribution of one or the other compartment to the phenotype was gene specific.

Discussion

In this report we show that a BPH-like phenotype of *Lxr α ^{-/-}* mice is characterized by increased secretory activity of the epithelium. Our work using UGE/UGM recombinations provides evidence that *Lxr α* is involved both at the stromal and the epithelial levels. Indeed, androgen-regulated gene expression is deregulated alternatively by *Lxr α* ablation in both compartments. Using *Lxr α ^{-/-}* mice, we found that neither androgen levels in prostate, nor AR recruitment in targeted-sequences was

altered. It can thus be concluded that the observed deregulation of androgen signaling in prostate results from a complex paracrine network between the epithelium and stroma.

Lxr α and Lxr β play an important role in prostate epithelium homeostasis in other lobes, specifically when the mice are challenged with a high-cholesterol diet (Pommier *et al.*, submitted data). As already mentioned, the human and murine prostates are architecturally different. Nevertheless, the gene expression pattern of the peripheral and central zones in human is closely related to the murine dorsolateral and ventral lobes, respectively (37). These observations highlight that the molecular signature of regionalization in the prostate is an important process conserved between the two species. Given that each lobe harbors specific features, it could be hypothesized that *lxra* ablation results in a different phenotype according the prostate lobes *in vivo*. Consistent with our findings, *lxra*^{-/-} mice have been described to recapitulate “several BPH-like features” according to Kim *et al.* (17). These authors reported fibrous nodules, abnormal stroma growth, and lesions in the muscular compartment (17), whereas we mainly reported an epithelial phenotype. This apparent discrepancy could be due to the fact that the *lxra*^{-/-} strains were not similarly engineered (18, 38).

The main function of the prostate epithelium is the production and the secretion of proteins that compose prostatic fluid. This secretion activity is tightly regulated *in vivo* by androgens that orchestrate the entire male genital tract capacity. A possible connection between LXR and AR has been previously suggested. DHT or synthetic androgen R1881 treatments result in decreased *abca1* accumulation in LNCaP cells (39), indicating that LXR target genes are sensitive to androgen stimulation. Krycer and Brown (15) showed that LXR were indeed required for the *abca1* down-regulation in response to R1881 treatment. The association between the expression of LXR target genes and androgen sensitivity has also been described in xenograft models that recapitulate pharmaco-resistant prostate cancer (40). In these tumors, *fas*, *srebp1c*, *abca1*, and *cyp-27* gene expressions decrease during androgen insensitivity evolution. Interestingly, another partner of retinoid X receptor, the pregnane X receptor (NR1I2) has been demonstrated to inhibit androgen-dependent proliferation of LAPC-4 cells (41). This raises the question whether LXR and pregnane X receptor could act through a similar molecular mechanism.

Given that *lxra* ablation resulted in an aberrant production of androgen-regulated secretory proteins in the prostate, we investigated how Lxr α could interfere with androgen signaling in the epithelium. Indeed, transgenic mice that overexpressed a dominant-positive construct of Lxr α specifically targeted in liver (42) exhibit an inhibition of androgen-dependent prostate regeneration after castration (16), indicating that Lxr activation impacts androgenic responsive tissues. Hepatic Lxr α activation leads to decreased circulating testosterone levels by regulating genes such as *sult2a1* and *sts* involved in androgen catabolism. In peripheral tissue, Lxr α controls androgens bioavailability through *sts* expression, which encodes the steroid sulfatase that desulfonates androgens to convert them into active metabolites. These data could explain the increase in testosterone levels observed in the plasma of *lxra*^{-/-} mice. Nevertheless, no modification of DHT accumulation or androgen receptor activity in androgen-regulated gene promoters was seen in the VP of *lxra*^{-/-} mice. Our findings indicate that the mechanism by which Lxr α regulates the response of andro-

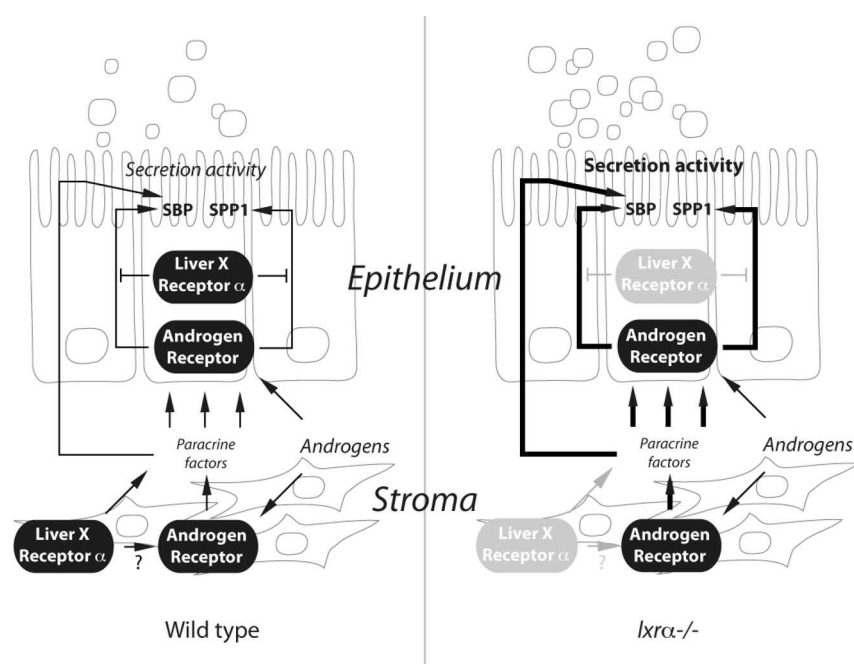


FIG. 8. Model for the physiological roles of the Lxr α in the ventral prostate and possible interactions with the androgen-regulated pathway. Schematic representation of Lxr α action in the stromal and epithelial compartments. Differential androgen-targeted genes regulation mechanisms by Lxr α are represented (*sbp* and *spp1*). *Sbp* expression is dependent of Lxr α in both the epithelium and stroma, suggesting that paracrine factors are involved. On the contrary, *spp1* expression is strictly dependent on *lxra* expression in the epithelium. Indeed, *spp1* expression is similar to WT recombinant in the absence of Lxr α in the stromal recombinant prostates. These observations underline the multiple connections involved in the cross talk between LXR and AR.

gen-regulated genes results from a complex network. This could involve epithelial factors, AR cofactors, and/or paracrine interaction between the different cell compartments of the prostate.

Consistent with this hypothesis, androgen-regulated gene expression exhibits different profiles in *Lxr α ^{-/-}* mouse prostate. Although *sbp* accumulation increases in mice lacking *Lxr α* , *calr* remains unchanged and *pbsn* decreases. These observations strongly support that several regulatory processes are involved. We schematized the putative role of paracrine interactions between epithelial and stromal cells in Fig. 8. Prostate mesenchymal-epithelial interactions have a preponderant role in normal and pathological prostate development as well as in adult prostate homeostasis (8). The role of AR has extensively been developed in the literature (8). Here we identify *Lxr α* as a new actor that mediates epithelial physiology through its activity in both stroma and epithelium. Indeed, the absence of *Lxr α* in both prostate stroma and epithelium is necessary to develop prostate hypertrophy. *Lxr α* also mediates androgen signaling, as demonstrated by the numerous androgen-responsive genes dysregulated when *Lxr α* is missing. Indeed, normal *spp1* gene expression needs *Lxr α* in epithelium, whereas the normal response of *sbp* to androgens by epithelium is dependent on *Lxr α* in both epithelial (directly) and stromal (indirectly) cells. The regulation of paracrine signals from the mesenchyme by *lxr α* might be one molecular mechanism.

Altogether these results demonstrate that *Lxr α* acts as a key modulator of the cross talk between the stromal and epithelial compartment, which is essential for the integration of androgen signaling in the prostate and its effect on the epithelium. Finally, identification of the set of genes targeted by *Lxr α* specifically in the prostatic ventral lobe in mice could be informative in understanding the BPH etiology in humans.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Thomsen (Institute of Cancer Research, London, UK) for his excellent advices on prostate regeneration; Dr. M. Manin (GR α D) for her helpful comments for the MPE cell culture; J. P. Saru and A. De Haze for molecular biology technical assistance; C. Puchol and S. Plantade for animal facilities. Dr. P. Val (GR α D) and Dr. S. Ingersoll (Georgia State University, Atlanta GA) for critically reading the manuscript; and the members of the Chester's laboratory for assistance in animal dissections and discussions; C. Szczepaniak and C. Blavignac (CICS platform, Clermont University) for their scientific and technical assistance in electron microscopy; Dr. B. Viguès (LMGE, Clermont-Ferrand) for helpful discussion on electron microscopy. Pan-prostate secretion antibody was a kind gift from Dr. C.

Abate-Shen (Department of Medicine, Columbia University Medical Center, New York, NY). Pathology analyses have been done on the Anip@th facility platform.

Address all correspondence and requests for reprints to: Génétique Reproduction et Développement, Unité Mixte de Recherche, Centre National de la Recherche Scientifique 6293, Clermont Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1103, 24 Avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. E-mail: silvere.baron@univ-bpclermont.fr.

This work was supported by the Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue Contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale, Fondation BNP-Paribas and the Association de Recherche Contre le Cancer, Nouveau Chercheur Auvergne research grants (to S.B.). E.V. was supported by the Région Auvergne and Fond Européen de Développement Régional and grants from the Association de Recherche Contre le Cancer. J.D. is supported by a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie grant. T.E. was the recipient of an European Community Action Scheme for the Mobility of University Students (ERASMUS) exchange grant.

Disclosure Summary: E.V., T.E., J.D., A.P., S.F., J.-L.K., L.G., L.M., J.-M.L., and S.B. have nothing to declare. E.V., J.D., L.M., J.-M.L., and S.B. are employed by the Université Blaise Pascal. A.P. was employed by the Université Blaise Pascal and now by AstraZeneca. T.E. is employed by the University of Naples. S.F. is employed by the Institut National de la Recherche Agronomique.

References

1. Madersbacher S, Haidinger G, Temml C, Schmidbauer CP 1998 Prevalence of lower urinary tract symptoms in Austria as assessed by an open survey of 2,096 men. *Eur Urol* 34:136–141
2. Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS 1992 The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med* 327:1185–1191
3. Lepor H 1990 Role of α -adrenergic blockers in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* 3:75–84
4. Huggins C, Clark PJ 1940 Quantitative studies of prostatic secretion: II. The effect of castration and of estrogen injection on the normal and on the hyperplastic prostate glands of dogs. *J Exp Med* 72:747–762
5. Gelmann EP 2002 Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 20:3001–3015
6. Heinlein CA, Chang C 2002 Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23:175–200
7. Bruchovsky N, Wilson JD 1968 The intranuclear binding of testosterone and 5- α -androstan-17- β -ol-3-one by rat prostate. *J Biol Chem* 243:5953–5960
8. Cunha GR 1973 The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat Rec* 175:87–96
9. Cunha GR, Chung LW 1981 Stromal-epithelial interactions—I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem* 14:1317–1324

10. El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, Caira F, Drevet JR, Volle DH, Baron S, Saez F, Lobaccaro JM 2011 Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta* 1812:974–981
11. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ 2003 Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17:985–993
12. Volle DH, Lobaccaro JM 2007 Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the “foie gras,” the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 265–266:183–189
13. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiiipakka RA, Chuu CP, Liao S 2004 Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7686–7689
14. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, Marceau G, Damon C, Mouzat K, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM 2010 Liver X receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29:2712–2723
15. Krycer JR, Brown AJ 2011 Cross-talk between the androgen receptor and the liver x receptor: implications for cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 286:20637–205647
16. Lee JH, Gong H, Khadem S, Lu Y, Gao X, Li S, Zhang J, Xie W 2008 Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149:3778–3788
17. Kim HJ, Andersson LC, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA 2009 Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:558–563
18. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefrançois-Martinez AM, Caira F, Veyssière G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM 2006 Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116:1902–1912
19. Manin M, Veyssiere G, Chevialle D, Chevalier M, Lecher P, Jean C 1992 In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. *Endocrinology* 131:2378–2386
20. Lobaccaro JM, Poujol N, Térouanne B, Georget V, Fabre S, Lumbroso S, Sultan C 1999 Transcriptional interferences between normal or mutant androgen receptors and the activator protein 1—dissection of the androgen receptor functional domains. *Endocrinology* 140:350–357
21. Monniaux D, Clemente N, Touzé JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S 2008 Intrafollicular steroids and anti-müllerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod* 79:387–396
22. Torres JM, Ortega E 2003 Differential regulation of steroid 5 α -reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J* 17:1428–1433
23. Nadaud I, Grousse C, Debiton C, Chambon C, Bouzidi MF, Martre P, Branlard G 2010 Proteomic and morphological analysis of early stages of wheat grain development. *Proteomics* 10:2901–2910
24. Sun Q, Yu X, Degraff DJ, Matusik RJ 2009 Upstream stimulatory factor 2, a novel FoxA1-interacting protein, is involved in prostate-specific gene expression. *Mol Endocrinol* 23:2038–2047
25. Magee JA, Chang LW, Stormo GD, Milbrandt J 2006 Direct, androgen receptor-mediated regulation of the FKBP5 gene via a distal enhancer element. *Endocrinology* 147:590–598
26. Lukacs RU, Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Witte ON 2010 Isolation, cultivation and characterization of adult murine prostate stem cells. *Nat Protoc* 5:702–713
27. Cunha GR, Lung B 1978 The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. *J Exp Zool* 205:181–193
28. Hirota Y, Kuronita T, Fujita H, Tanaka Y 2007 A role for Rab5 activity in the biogenesis of endosomal and lysosomal compartments. *Biochem Biophys Res Commun* 364:40–47
29. Economides KD, Capecchi MR 2003 Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development* 130:2061–2069
30. Chaurand P, DaGue BB, Ma S, Kasper S, Caprioli RM 2001 Strain-based sequence variations and structure analysis of murine prostate specific spermine binding protein using mass spectrometry. *Biochemistry* 40:9725–9733
31. Fujimoto N, Akimoto Y, Suzuki T, Kitamura S, Ohta S 2006 Identification of prostatic-secreted proteins in mice by mass spectrometric analysis and evaluation of lobe-specific and androgen-dependent mRNA expression. *J Endocrinol* 190:793–803
32. Kawano N, Yoshida M 2007 Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. *Biol Reprod* 76:353–361
33. Seenundun S, Robaire B 2007 Time-dependent rescue of gene expression by androgens in the mouse proximal caput epididymidis-1 cell line after androgen withdrawal. *Endocrinology* 148:173–188
34. Sharief FS, Mohler JL, Sharief Y, Li SS 1994 Expression of human prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen genes in neoplastic and benign tissues. *Biochem Mol Biol Int* 33:567–574
35. Zhu N, Pewitt EB, Cai X, Cohn EB, Lang S, Chen R, Wang Z 1998 Calreticulin: an intracellular Ca⁺⁺-binding protein abundantly expressed and regulated by androgen in prostatic epithelial cells. *Endocrinology* 139:4337–4344
36. Johnson MA, Hernandez I, Wei Y, Greenberg N 2000 Isolation and characterization of mouse probasin: an androgen-regulated protein specifically expressed in the differentiated prostate. *Prostate* 43:255–262
37. Berquin IM, Min Y, Wu R, Wu H, Chen YQ 2005 Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280:36442–36451
38. Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Björkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA 2001 Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXR β -deficient mice. *J Clin Invest* 107:565–573
39. Fukuchi J, Hiiipakka RA, Kokontis JM, Hsu S, Ko AL, Fitzgerald ML, Liao S 2004 Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:7682–7685
40. Chuu CP, Hiiipakka RA, Kokontis JM, Fukuchi J, Chen RY, Liao S 2006 Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 66:6482–6486
41. Zhang B, Cheng Q, Ou Z, Lee JH, Xu M, Kochhar U, Ren S, Huang M, Pflug BR, Xie W 2010 Pregnane X receptor as a therapeutic target to inhibit androgen activity. *Endocrinology* 151:5721–5729
42. Uppal H, Saini SP, Moschetta A, Mu Y, Zhou J, Gong H, Zhai Y, Ren S, Michalopoulos GK, Mangelsdorf DJ, Xie W 2007 Activation of LXRs prevents bile acid toxicity and cholestasis in female mice. *Hepatology* 45:422–432

Article 6 :

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

Viennois E, Mouzat K, Dufour J, Morel L, Lobaccaro JM, Baron S. Mol Cell Endocrinol. 2011 Sep 1 **Review**



Review

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

Emilie Viennois^{a,b,c}, Kevin Mouzat^d, Julie Dufour^{a,b,c}, Laurent Morel^{a,b,c}, Jean-Marc Lobaccaro^{a,b,c,*},
Silvère Baron^{a,b,c}

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

^b CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 Aubière, France

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

^d Laboratoire de Biochimie, Hôpital Universitaire Carêmeau, Place du Pr. Robert Debré, F-30029 Nîmes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 1 September 2011

Keywords:

Liver X receptors
Pharmacology
SLiMs
Human pathologies
Cholesterol
Nuclear receptors

ABSTRACT

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

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	130
1.1. LXR structure	130
1.2. Mechanism of action	130
2. Activator ligands	131
2.1. Endogenous agonists: oxysterols and other sterols	131
2.2. Ligands from microbial and plants	133
2.3. Synthetic agonists	133
3. Antagonists and inhibitors ligands	134
3.1. Natural antagonists	134
3.2. Synthetic antagonists	134
4. From physiological function to pathology	134
4.1. LXR and cancer	135
4.1.1. LXR and hormone-dependant cancer	135
4.1.2. LXR and colon cancer	136
4.2. LXR and skin disorders	136
4.3. LXR and Alzheimer's disease	137
4.4. LXR and atherosclerosis	137
4.5. LXR and inflammation	137
4.6. LXR and diabetes	138
5. Conclusion	138
Acknowledgments	138
References	138

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

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

1. Introduction

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

1.1. LXR structure

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

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

1.2. Mechanism of action

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

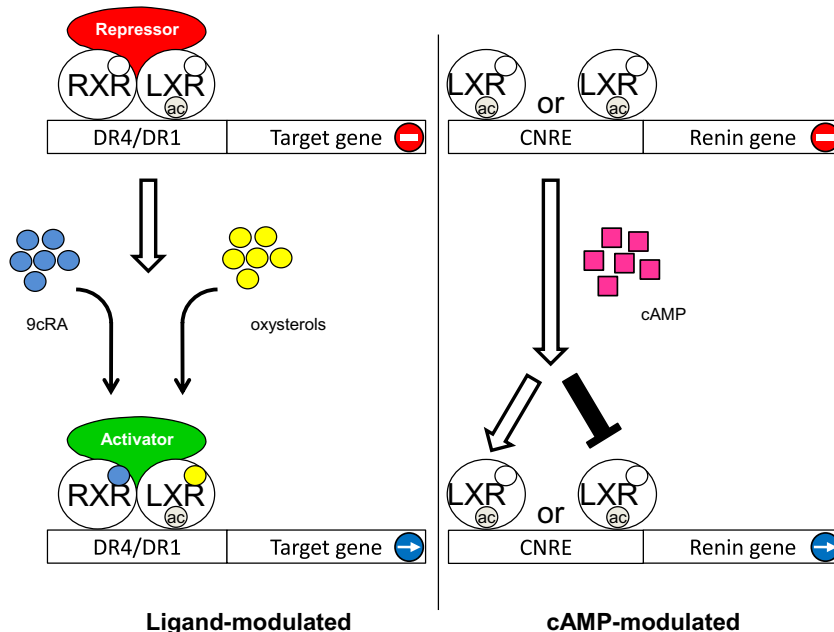


Fig. 1. Schematic view of LXR modulation of gene transcription. LXR α or LXR β usually bind RXR, the receptor for 9-*cis* retinoic acid, on a DR4 or a DR1 element. In absence of ligand RXR/LXR heterodimer is silenced by corepressors. The binding of their respective ligands (9 *cis* RA and/or oxysterols)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

2. Activator ligands

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

2.1. Endogenous agonists: oxysterols and other sterols

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

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

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

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

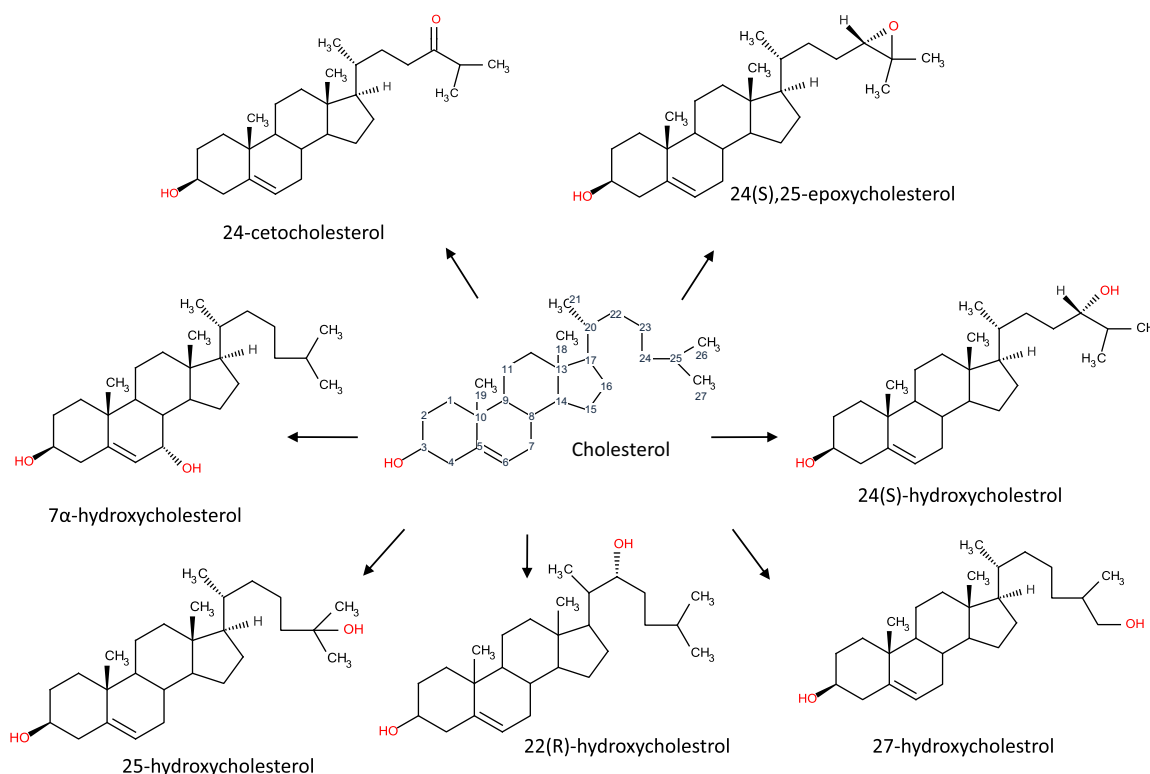


Fig. 2. Natural agonist ligands, the oxysterols. Cholesterol chemical structure is represented and carbon atoms are numbered. The name of each oxysterol depends on the hydroxyl group position.

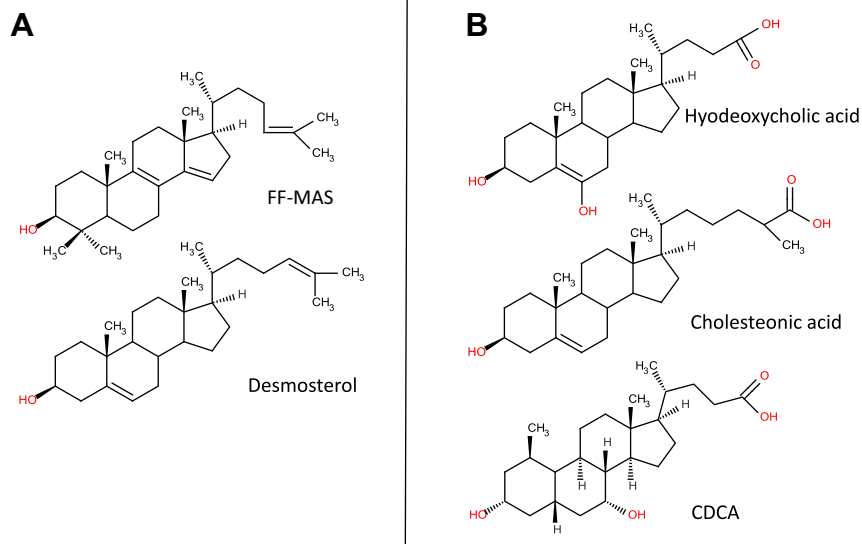


Fig. 3. Natural agonists, other cholesterol deriving sterols. (A) FF-MAS and demosterol chemical structure, molecules derived from cholesterol biosynthesis pathway, upstream cholesterol. FF-MAS, Follicular Fluid Meiosis Activating Sterol. (B) LXR agonists derived from Bile acids biosynthesis pathway.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

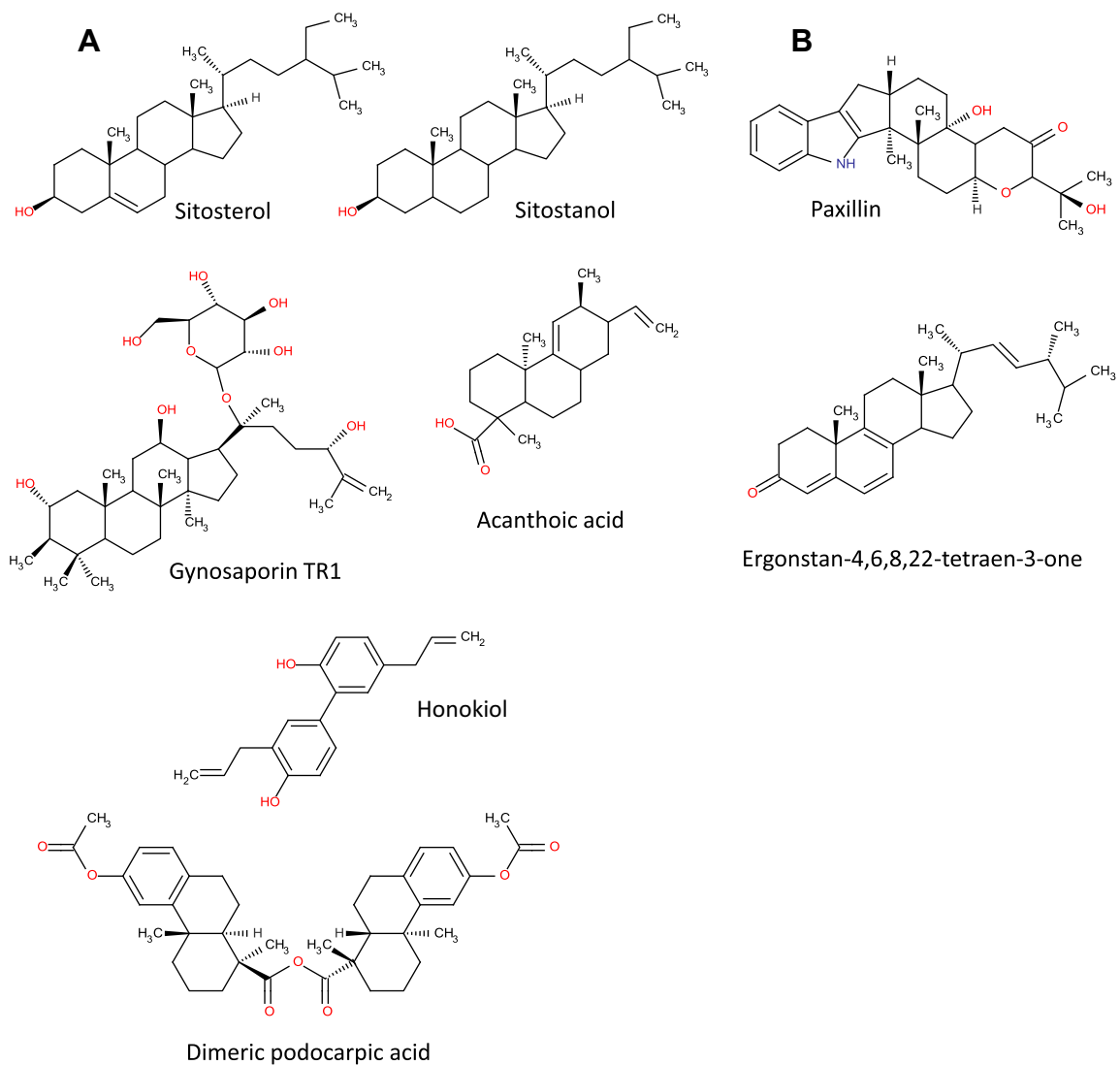


Fig. 4. LXR activators derived from plants (A) and fungi (B).

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

2.2. Ligands from microbial and plants

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

2.3. Synthetic agonists

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

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

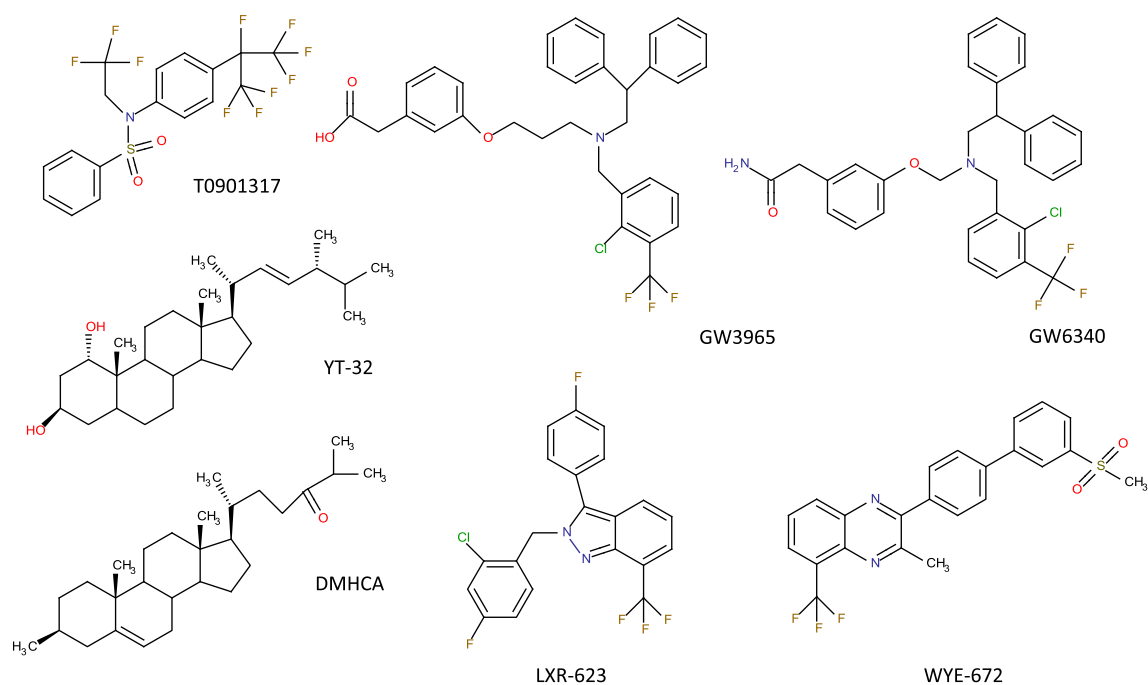


Fig. 5. Synthetic LXR agonists.

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

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

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

3. Antagonists and inhibitors ligands

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

3.1. Natural antagonists

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

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

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

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

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

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

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

3.2. Synthetic antagonists

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

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

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

4. From physiological function to pathology

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

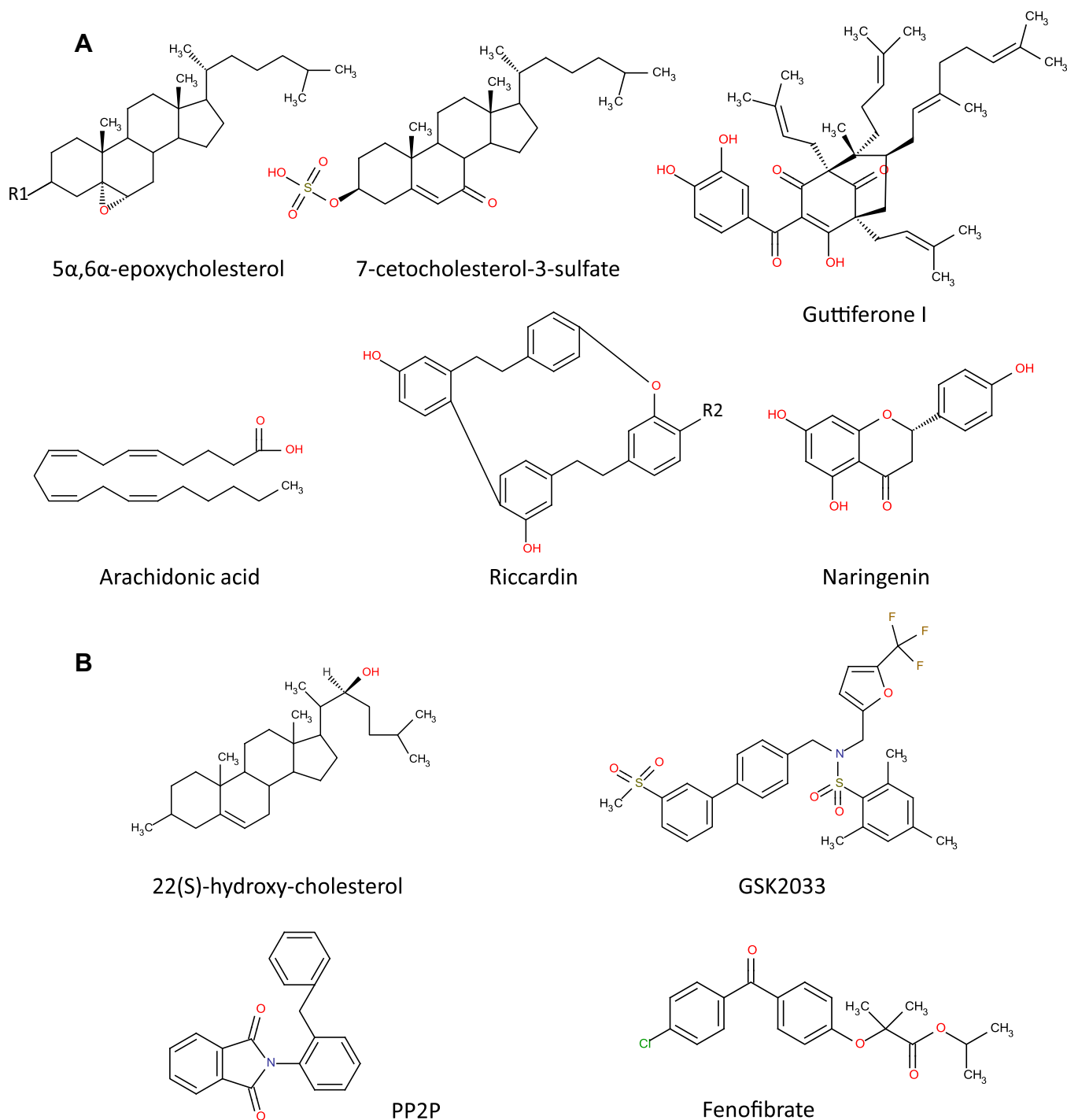


Fig. 6. Natural (A) or synthetic (B) LXR antagonists. (A) The R1 group is OH for 5 α ,6 α -epoxycholesterol and H₂SO₄ for the 5 α ,6 α -epoxycholesterol-3-sulfate, the compound initially described as LXR antagonist, R2 is OCH₃ for Riccardin F and OH for Riccardin C.

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

4.1. LXR and cancer

4.1.1. LXR and hormone-dependant cancer

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

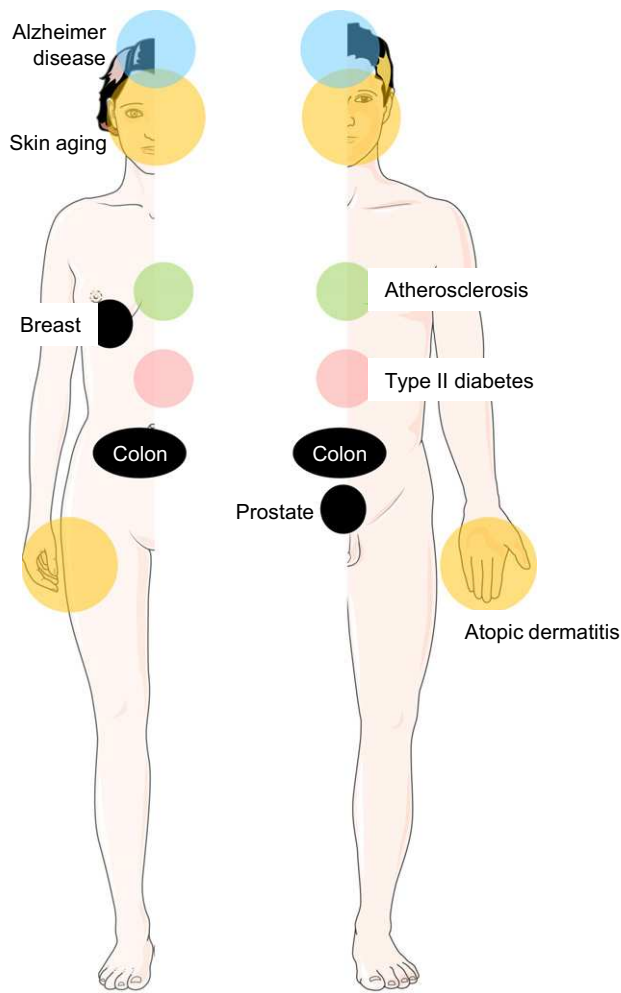


Fig. 7. Schematic representation of the diseases potentially targets of LXR ligands. Black circle, cancer.

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

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

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

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

4.1.2. LXR and colon cancer

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

4.2. LXR and skin disorders

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

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

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

4.3. LXR and Alzheimer's disease

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

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

4.4. LXR and atherosclerosis

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

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

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

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

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

4.5. LXR and inflammation

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

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

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

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

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

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

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

4.6. LXR and diabetes

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

5. Conclusion

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

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

Acknowledgments

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

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

References

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

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

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

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

Article 7 :

Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male.

El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJ, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, Caira F, Drevet JR, Volle DH, Baron S, Saez F, Lobaccaro JM. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Aug 15.

Review



Review

Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male[☆]

Fatim-Zorah El-Hajjaji^{a,b,c,1}, Abdelkader Oumeddour^{a,b,c,d,1}, Aurélien J.C. Pommier^{a,b,c}, Aurélia Ouvrier^{a,b}, Emilie Viennois^{a,b,c}, Julie Dufour^{a,b,c}, Françoise Caira^{a,b,c}, Joël R. Drevet^{a,b}, David H. Volle^{a,b,c}, Silvère Baron^{a,b,c}, Fabrice Saez^{a,b}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{a,b,c,*}

^a CNRS Unité Mixte de Recherche 6247 Génétique, Reproduction et Développement, F-63171 Aubière, France

^b Clermont Université, F-63171 Aubière, France

^c Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 rue Montalembert, 63009 Clermont-Ferrand, France

^d Laboratoire d'Endocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar Annaba, BP12, 23000 Annaba, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2010

Received in revised form 7 February 2011

Accepted 11 February 2011

Available online 18 February 2011

Keywords:

Testis

Epididymis

Prostate

LXR

Lipids

ABSTRACT

Liver X receptor (LXR) α and LXR β belong to the nuclear receptor superfamily. For many years, they have been called orphan receptors, as no natural ligand was identified. In the last decade, the LXR natural ligands have been shown to be oxysterols, molecules derived from cholesterol. While these nuclear receptors have been abundantly studied for their roles in the regulation of lipid metabolism, it appears that they also present crucial activities in reproductive organs such as testis and epididymis, as well as prostate. Phenotypic analyses of mice lacking LXRs (*lxr*^{-/-}) pointed out their physiological activities in the various cells and organs regulating reproductive functions. This review summarizes the impact of LXR-deficiency in male reproduction, highlighting the novel information coming from the phenotypic analyses of *lxr α* ^{-/-}, *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ;*lxr β* ^{-/-} mice. This article is part of a Special Issue entitled: Translating nuclear receptor from health to disease.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. LXRs at a glance

In the early 90's, the discovery of numerous nuclear receptors, called "orphan" since no *bona fide* ligand had been identified, opened the way of the reverse endocrinology [1]. In contrast to classical endocrinology where the effector is discovered following the study of its hormone, the nuclear receptor is used to screen for ligands, either natural or not, which modulate its transcriptional activity. The ligand, in turn, is used as a chemical tool to dissect the role of its nuclear receptor in physiology and pathophysiology [2]. Over the past decade, reverse endocrinology has been used to link several orphan receptors to ligands and biological functions. Such philosophy has led to the identification of liver X receptors (LXRs) α ([3]; NR1H3) and β ([4,5]; NR1H2) as oxysterol receptors [6,7], and to deciphering of their physiological functions. In turn, synthesis of non-metabolizable molecules modulating their transcriptional activity, permitted the investigations of their putative interest as pharmacological targets [8].

LXR α and LXR β form obligatory heterodimers with retinoid receptors (RXR, NR2B1-3), the receptors of 9-*cis* retinoic acid [3,9]. LXR β was found to be expressed in many tissues, whereas LXR α is expressed mainly in a restricted subset of tissues known to play an important role in lipid metabolism (such as liver, small intestine, kidney, spleen, and adipose tissue; for a review, see Ref. [10]). In absence of ligand, LXRs constitutively bind to RXRs and specific binding sequences localized on target gene promoters [3], together with co-repressors, which block transcription by recruitment of histone deacetylase. Hence, the presence of the complex [RXR/LXR-corepressor-histone deacetylase] on the DNA usually acts as a basal repressor of gene transcription [9]. Oxysterol or 9-*cis* retinoic acid binding to their respective nuclear receptors leads to modifications of the ligand binding pocket within the carboxy-terminus domain. This induces the release of the co-repressors and reinforces the interactions with the co-activators [11]. This cascade of events allows the recruitment of proteins with acetyl-transferase activity and a permissive chromatin environment, which finally enhances LXR-target gene expression and thus the physiological response of the cell.

A large number of natural LXR ligands have been described, such as oxidized derivatives of cholesterol (for a review, see Refs. [12,13]). In mammals, the main source of oxysterols remains endogenous production [13]. An important enzyme of this pathway is the sterol 14 α -demethylase (EC 1.14.13.70, CYP51), a cytochrome P450 required for sterol biosynthesis in different phyla, and the most widely distributed P450 gene family being found in all biological kingdoms [14]. It catalyzes the first

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Translating nuclear receptors from health to disease.

* Corresponding author at: UMR CNRS 6247, INSERM U 931, Clermont-Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 AUBIERE Cedex, France. Tel.: +33 473 40 74 16; fax: +33 473 40 70 42.

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

¹ Should be considered as equal first authors.

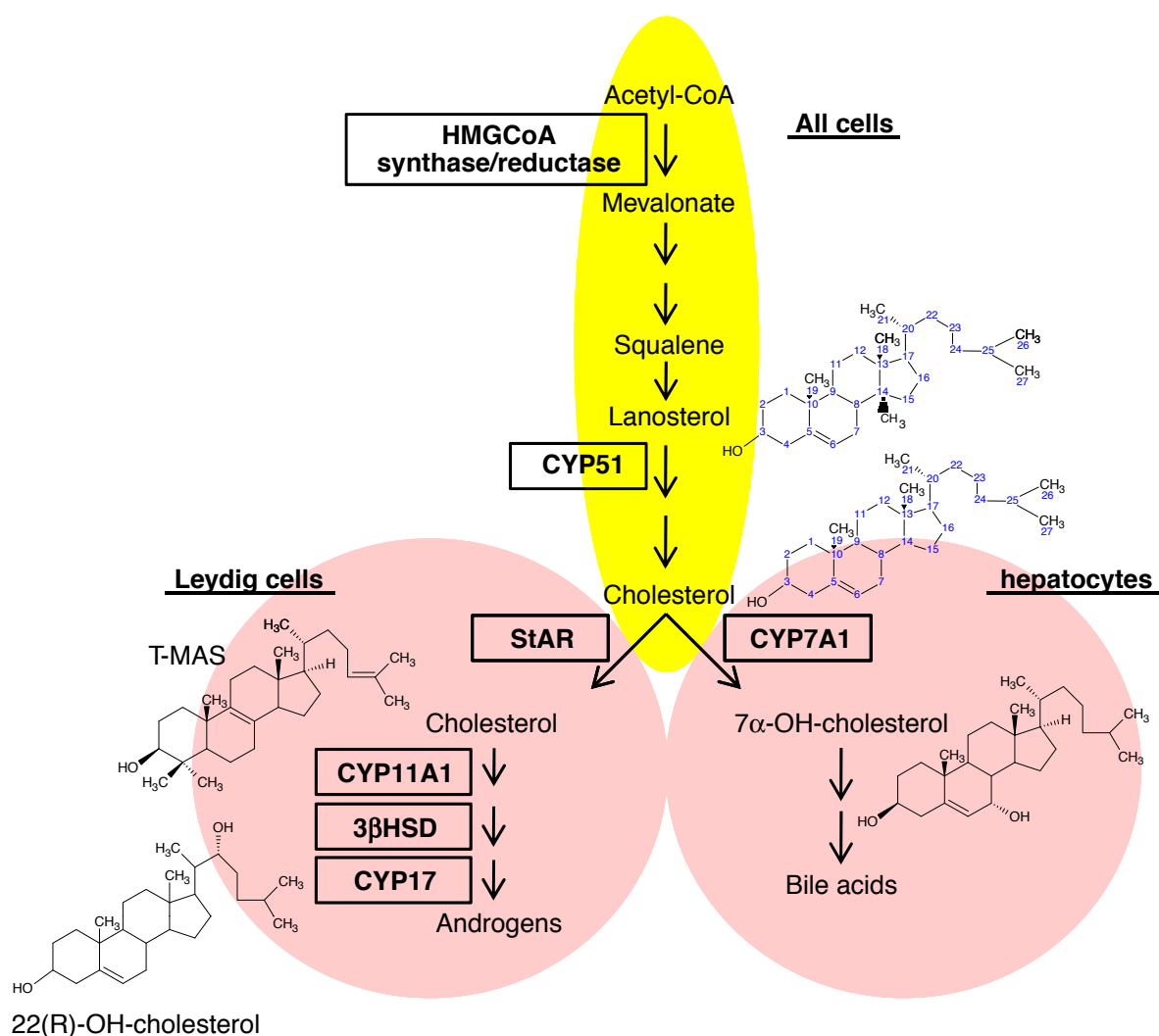


Fig. 1. Schematic representation of cholesterol synthesis and metabolism into androgens or bile acids. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase is the rate-controlling enzyme of the mevalonate pathway that produces cholesterol and other isoprenoids. This synthesis could virtually occur in all cells. Androgens synthesis mainly takes place in Leydig cells, bile acids synthesis in hepatocytes. Structures of the main sterols are indicated: lanosterol, cholesterol, T-MAS, 22(R)-OH-cholesterol and 7 α -OH-cholesterol. For more details about the indicated enzymes, see text. StAR, steroidogenic acute regulatory protein; CYP51, 14 α -demethylase; CYP7A1, cytochrome P450 cholesterol 7 α -hydroxylase; CYP11A1, cytochrome P450 side chain cleavage; CYP17, cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase; 3 β HSD, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2.

step following cyclization in sterol biosynthesis such as removal of the 14 α -methyl group from lanosterol in the cholesterol biosynthetic pathway (Fig. 1). Interestingly, although the human 14 α -demethylase gene is expressed in a variety of tissues, the highest levels are observed in testis, ovary, adrenal, prostate, liver, kidney, and lung. In the reproductive tract, many activating oxysterols are present (for a review, see Ref. [13]): including 22(R)-hydroxycholesterol (within the steroidogenic pathway), follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS), and its derivative, testis meiosis-activating sterol (T-MAS).

Due to the lipid nature of the ligands, the physiological roles of LXRs have been extensively detailed in the homeostasis of cholesterol in the gut-liver axis [15]. The role of the LXRs on cholesterol metabolism was determined using engineered knock-out mice lacking one (*lxr α* -/- or *lxr β* -/-) or both (*lxr α* ;*lxr β* -/-) isoforms. Historically, the first analyses were performed on the *lxr α* -/- mice, which developed a hepatic steatosis, due to cholesteryl-ester accumulation when fed a cholesterol-rich diet [16]. The molecular mechanism leading to this phenotype was the lack of upregulation of *cyp7a1* encoding for the rate-limiting enzyme for the metabolism of cholesterol into bile acid (Fig. 1). *Lxr β* -/- [17] and *lxr α* ;*lxr β* -/- [17,18] mice were then obtained. The role of the LXRs in cholesterol metabolism was thus extended to *de novo* synthesis of cholesterol [19], excretion [16] and detoxification of bile acids [20] or

lipids [21], as well as in glucose homeostasis [22], immunity [23], skin development and homeostasis [24] and brain functions [25,26]. LXRs, by regulating expression of several genes (including *ABCA1* [18,27], *ABCG1* [28], apolipoprotein E (*APOE*) [29], and *PLTP* [30]) also play a critical role in reverse cholesterol transport. Interestingly, activation of LXRs in intestine and macrophages efficiently prevents atherosclerosis [31,32]. This review will emphasize the physiological roles of LXRs in the male and thus focus on testis, epididymis and prostate (Fig. 2).

The hypothesis that LXRs could also have physiological roles in steroidogenic and reproductive tissues came from difficulties in maintenance of the mouse colony, as well as from previous studies performed on the adrenals [33,34]. LXR α -deficient mice presented an adrenomegaly due to a higher cholesteryl-ester content and a Cushing-like syndrome, as shown by the increased levels of blood corticosterone [33]. This work emphasized the role of LXR α as an important regulator of adrenal cholesterol homeostasis through its ability to modulate transcription of genes that govern the three major pathways of adrenal cholesterol, namely efflux, storage, and conversion into steroid hormones [33]. *In vivo* studies also showed that LXR α - and LXR β -deficient mice had reduced fertility, characterized by less frequent conception and lower number of pups per litter [35,36]. Careful examination confirmed that both sexes were affected by reproductive

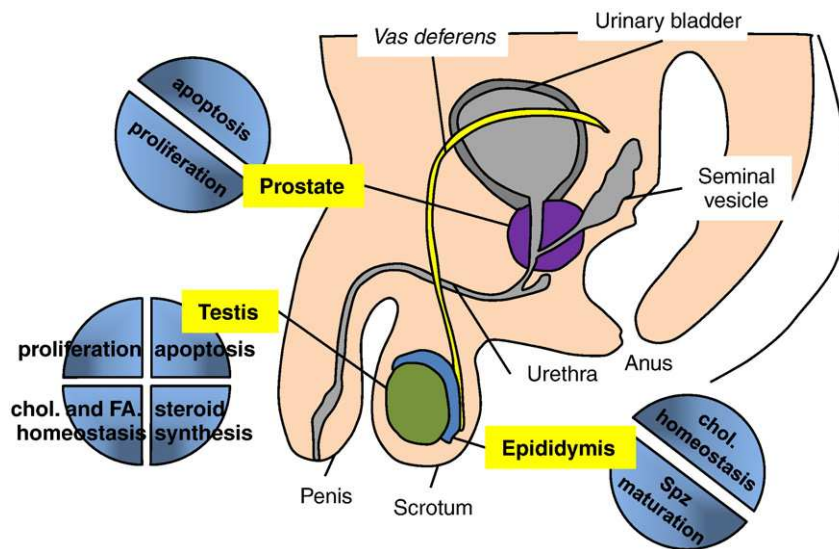


Fig. 2. Physiological roles of LXRs in male genital tract. Three main organs are targeted by LXR-disruption in male mice: testis, epididymis, and prostate. Schematically, LXRs regulate lipid homeostasis in testis and epididymis, as well as apoptosis–proliferation equilibrium of spermatozoa (spz), testicular germ cells and prostate epithelium. For more details, see text.

abnormalities. Female mice showed i) ovarian hyperstimulation-like syndrome [37], a syndrome characterized in women by ovarian enlargement associated with an extra-vascular fluid concentration, haemorrhagic ovarian *corpora lutea* and elevated estradiol serum levels [38,39], as well as ii) parturition defects due to abnormal uterine contraction [40]. LXR-deficient males present abnormal features both within the testis and epididymis (see following chapter). Besides, experiments performed on human cell culture suggested that LXRs could have a protective effect in prostate cancer (see Chapter 4.1).

2. LXR α and LXR β are involved in various physiological processes in the testis

Investigation of LXR-double knock-out mice revealed a decreased fertility at 5 months of age and evolving to complete infertility by 9 months [35,36]. Several testicular functions have been found impaired in LXR α - and LXR β -deficient mice: (1) steroidogenesis, (2) lipid metabolism and (3) proliferation–apoptosis balance in germ cells (Fig. 2).

Quantitative PCR analysis of both LXR isoforms showed that LXR α is expressed in Leydig cells, while LXR β was found in Sertoli cells, suggesting a specific role of each isoform. Both LXRs are present in the germ cells.

2.1. LXR α is involved in germ cell apoptosis while LXR β controls their proliferation

Spermatogenesis is maintained by a delicate balance between proliferation, differentiation, and death of germ cells. Alteration of these processes results in spermatogenic impairment and thus infertility. Both proliferation and apoptosis were found altered in LXR-deficient mice [36].

Analysis of the single LXR-KO mice showed that LXR α is involved in the regulation of apoptosis in the testis [36]. TUNEL analyses revealed that *lxr α* ^{−/−} (as well as *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−}) mice had a significantly higher number of apoptotic cells compared with wild-type mice, whereas a slightly but not significantly decreased number of apoptotic cells was observed in *lxr β* ^{−/−} mice. Consistent with these data, mRNA expression analyses showed a higher accumulation of the proapoptotic transcript *Bad*, as well as *TNF α* in LXR α -lacking mice. Conversely, LXR β -deficient (as well as *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−}) mice had a significantly lower number of proliferating cells [36] and *cyclinA1*

mRNA accumulation, suggesting that LXR β is involved in germ cell proliferation. Infertility and destructured testis were observed only when both isoforms were absent [36]. A schematic view of a testis tubule with the various cells and the proteins, whose accumulation was altered, is given in Fig. 3.

2.2. LXR α controls androgen synthesis in testis

The hypothesis that LXR α could regulate androgen production came from the decreased level of testicular testosterone observed in *lxr α* ^{−/−} and *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−} mice [36]. Type 1 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase (*3 β hsd1*) mRNA accumulation was the most affected of the mRNA encoding the steroidogenic proteins (Fig. 3), whereas levels of steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*) and the cytochrome 11a1 (*cyp11a1*) and 17 (*cyp17*) transcripts remained unchanged (refer to Fig. 1 for the proteins). Moreover, significantly lower plasma concentrations of luteinizing hormone (LH) were found in LXR α -deficient mice [36]. These data were confirmed by lower level of expression of the specific β -chain of LH in the pituitary of these animals. Additionally, LXR α -deficient mice were able to respond to human chorionic gonadotropin challenge by an increased production of testosterone similar to their wild-type controls. Interestingly, LXR agonist T0901317 increased testosterone concentration in wild-type mice (almost 14-fold compared to the vehicle-gavaged mice), as well as accumulation of *StAR* at both mRNA and protein levels. Together, these data indicate that LXR α regulates steroid synthesis not only in adrenal cells [33] but also in Leydig cells [36].

2.3. Both LXR α and LXR β play a crucial role in lipid homeostasis in the testis

Part of the phenotype observed in the LXR-deficient mice was correlated with an alteration of lipid homeostasis [35,36,41]. The main enzymes involved in the fatty acid pathway are indicated on Fig. 4. mRNA levels of sterol response element binding protein-1c (*sreb1c*) and fatty acid synthase (*fas*, Fig. 4), encoding the sterol response element binding protein-1c and the fatty acid synthase, respectively, were decreased by 40% in *lxr α* ;*lxr β* ^{−/−} mice (Fig. 3) compared to the wild-type mice [36]. In contrast, the level of *scd1*, encoding the stearoyl CoA-desaturase 1 (Fig. 4), was increased by 2-fold in LXR-deficient mice (Fig. 3), while *srb1*, encoding the scavenger receptor B1, *abca1* (ATP-binding cassette, sub-family A member 1), and *scd2*

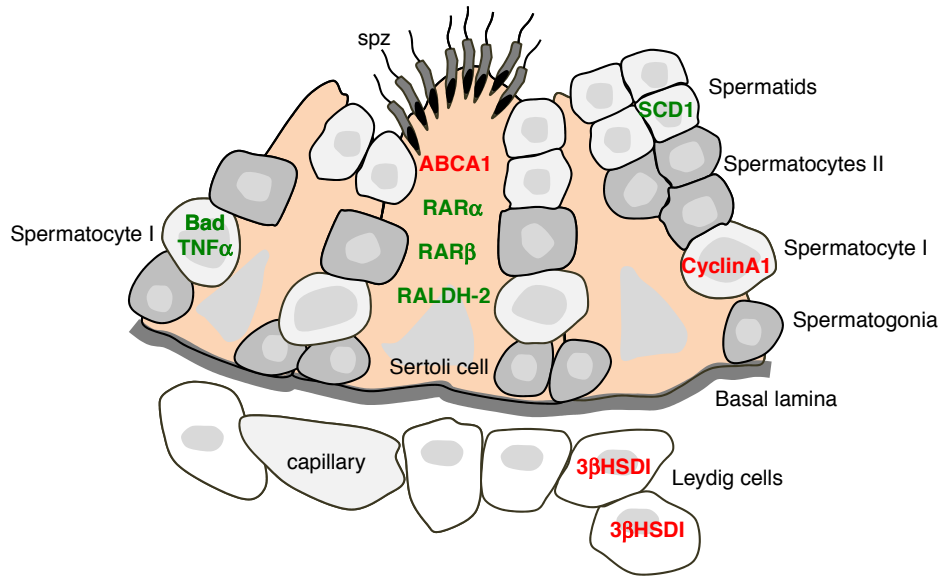


Fig. 3. Proteins which accumulation is altered by LXR-deficiency in the testis tubule. Schematically, LXRs regulate lipid homeostasis in testis, as well as apoptosis–proliferation equilibrium of spermatozoa (spz) and testicular germ cells. For clarity, fibroblasts and myoid cells below the basal lamina have been omitted. Likewise, cytoplasmic bridges between secondary spermatocytes and between early spermatids are not shown. Decreased accumulation is indicated in red; increased accumulation is indicated in green; ABC, ATP-binding cassette protein; Bad, Bcl-2 associated death promoter protein; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; RAR, all-*trans* retinoic acid receptor; RALDH, retinaldehyde dehydrogenase; SCD1, stearoyl coenzyme A desaturase 1; SREBP, sterol regulatory element binding protein; TNF, tumor necrosis factor. Adapted from Ref. [73].

(Fig. 4) were unchanged [36]. Interestingly, oil-red-O staining pointed an accumulation of lipids in the Sertoli cells and in spermatids of LXR-deficient mice. These observations confirmed that fatty acid metabolism is important for reproductive functions, as previously reported [42]. It could also be concluded that lipid homeostasis alteration was the first event in this long process of testis disorganization in *lrxα;β*^{-/-} mice [36], as suggested by Mascres et al. [35].

Our data also showed that the lack of both LXRα and LXRβ leads to an increase of RARα and RARβ (all-*trans* retinoic acid receptors, NR1B1 and NR1B3), and retinaldehyde dehydrogenase-2 (RALDH-2) expressions [36] (Fig. 3), resulting in deregulation of retinoic acid signaling. This is seen in the expression pattern of known RAR-target genes, such as dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (*dmc1*) and synaptonemal complex protein 3 (*scp3*), and could lead to spermatogenic disorders. Lipid accumulation has previously been observed in rat Sertoli cells in hypervitaminosis A [43], suggesting links between retinoid and lipid pathways. How the lack of LXRs act upon the retinoic acid signaling pathway remains to be clarified; however, it could be hypothesized that SHP (small heterodimeric partner, NROB2), a non-canonical orphan nuclear receptor, could play a major role as shown by Volle et al. [44,45] by studying SHP-deficient mice. Indeed, SHP has been described to be a negative regulator of a number of nuclear receptors such as LXRs and RARs [46].

Phenotypic analysis of *lrx*^{-/-} mice has thus shown that cooperation between LXRα and LXRβ maintains both testis structure and function. In human, Chen et al. [47] identified and characterized two alternative spliced transcript variants of LXRα. LXRα2, which has a shorter N-terminal domain and a reduced transcriptional activity, was found highly expressed in testis. The physiological role of the shorter form remains to be defined in man. Since ablation of LXRs impairs the fertility of aging mice, a putative defect in LXR-signaling cannot be excluded in the premature loss of fertility observed in some men.

3. LXR-deficient mice present abnormal features of the epididymis

As described above, *lrxα;β*^{-/-} male mice become completely infertile when the animals reach the age of 9 months. The infertility

arises from the association of testicular alterations [36] with an epididymal destructuration [48] observed in the two first segments of the organ (for a schematic representation see Fig. 5), which functions in regulation of the cholesterol homeostasis and maturation of spermatozoa. The phenotype observed in the *lrxα;β*^{-/-} mice is characterized by an enlargement of the tubule lumen, with the presence of an amorphous substance in the lumen and shrinkage of the epithelial height. Interestingly, a 15-day supplementation with androgens could not reverse the phenotype. Oil-red-O staining of *caput* epididymidis cryosections reveals lipid accumulation in the peritubular and interstitial tissues and the epithelium of *lrxα;β*^{-/-} male mice. The amorphous substance in the tubule lumen was not stained, thus indicating that it was not composed of neutral lipids. Many isolated spermatozoa heads and flagella were observed when sperm were retrieved from the *cauda* epididymidis, revealing that the gametes were fragile, probably as a result of both testicular and epididymal dysfunctions [48]. The expression levels of genes regulating the fatty acid metabolism also seemed to be affected since quantitative real time RT-PCR showed that *srebp1c*, *scd1* and *scd2* mRNAs were decreased in *lrxα;β*^{-/-} male *caput* epididymidis

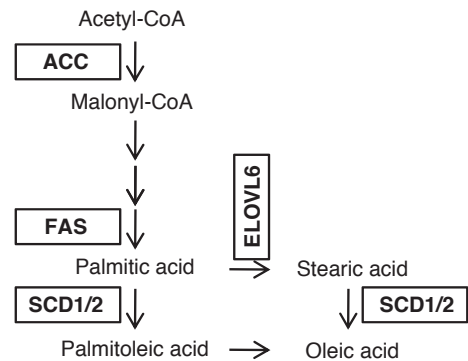


Fig. 4. Schematic representation of fatty acid synthesis in mammals. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is the rate-limiting (committed) step in fatty acid synthesis. There are two major isoforms of ACC in mammalian tissues; FAS, fatty acid synthase; SCD1/2, stearoyl CoA-desaturase 1 or 2; ELOVL6, elongation of very long chain.

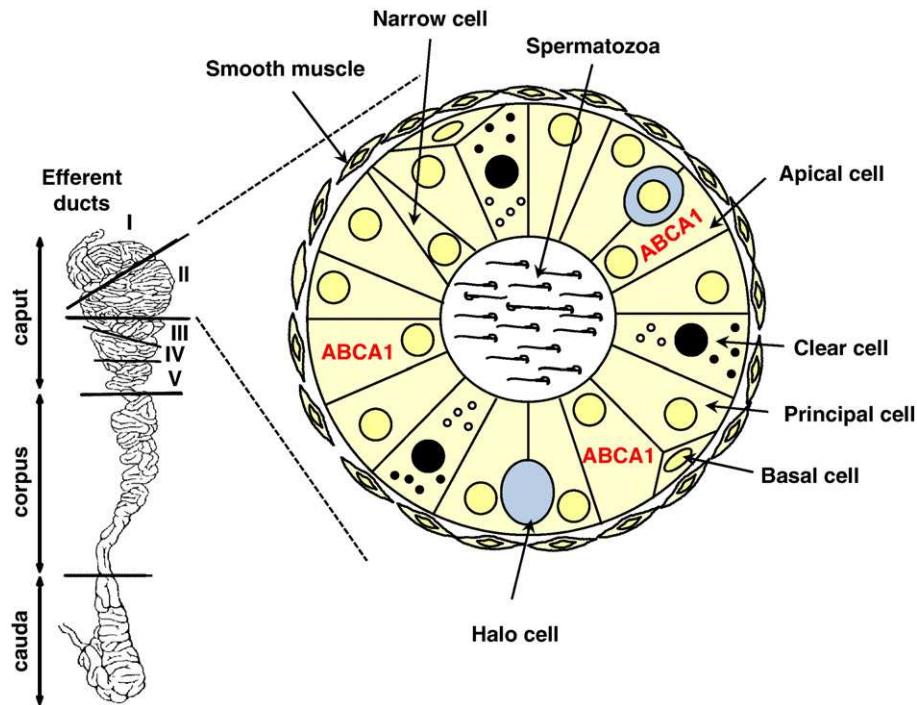


Fig. 5. Schematic representation of the role of LXRs in the *caput* epididymidis. Epididymis is organized in three parts (*caput*, *corpus* and *cauda*). The main cells are indicated. The major phenotype of the LXR-deficient mice is observed in the segments I and II of the *caput* with the lack of ABCA1 (indicated in red) in the apical membrane of the apical cells. Latin numerals indicate the *caput* segments.

compared to wild-type mice. However, the impact of these down regulations was moderate as they do not influence fatty acid compositions of separated phospholipid and neutral lipid fractions in *lxra*;β^{-/-} animals [49]. Further investigations revealed that cholesterol trafficking was a LXR-regulated mechanism in mouse *caput* epididymidis, in a segment- and cell-specific manner [50]. In LXRα- and LXRβ-deficient animals, apical cells present in the two first *caput* segments had their cytoplasm filled with cholesteryl-ester droplets, in association with a loss of ABCA1 in the apical membrane of the apical cells (Fig. 5). The level of apoptotic apical cells was also increased in *lxra*;β^{-/-} compared to wild-type mice. ABCA1 was thus confirmed to be an important factor in the male reproductive tract, as male mice invalidated for this gene were previously shown to have a 21% fertility decrease over their lifespan. Both expression and location of ABCG1 were different from ABCA1 and were not altered in the epididymis of LXR-deficient mice. ABCG1 was present at the apical pole of all epithelial cells in the proximal *caput* epididymal segments [50], suggesting complementary functions for these two cholesterol transporters in the epididymal epithelium. These locations raise the question how cholesterol efflux could be involved in sperm maturation.

Even though germ cells already presented abnormal lipid accumulation in the testis [36], alterations of cholesterol homeostasis may also be linked to sperm maturation defects along the epididymal duct and lead to impaired fertility. In man, dyslipidemia, obesity and/or hypercholesterolemia are generally associated with testicular defects and endocrine perturbations whereas defaults in epididymal sperm maturation are rarely investigated in these situations. Recent data showed that fertile three month-old *lxra*;β^{-/-} male mice became infertile when fed a 1.25% cholesterol containing diet during four weeks. An atherosclerosis-like process was observed in the proximal epididymis, provoking sperm morphological abnormalities, decreased motility and viability and premature acrosome reaction (Ouvrier et al. submitted). This study brings forward the epididymis as an early target of cholesterol toxicity in a dyslipidemic mouse model, and shows that post-

testicular sperm alterations may be associated with male infertility under dyslipidemic conditions.

4. Physiological role of LXRα and LXRβ in prostate cancer

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of death from cancer in men over 50 years old. Among the various genetic and environmental risk factors, epidemiological analyses have revealed a positive association between hypercholesterolemia and the development of prostate cancer [51,52]. Indeed, epidemiological studies have shown that Chinese populations, with a low risk to develop prostate cancer, had an increased risk after migration to the United States. This environmental effect was attributed to the deleterious impact of lipid consumption on this cancer [53]. Actually, cholesterol accumulation in tumors was first reported in the early 20th century [54] without any clear mechanistic explanation [55]. One of the various hypotheses was that rapidly proliferating cancer cells require new components to build *de novo* plasma membrane. Consistent with this hypothesis, HMG-CoA reductase inhibitors that impede *de novo* synthesis of cholesterol block prostate cancer cell growth *in vitro* [56]. Statins and their derivatives have thus been suspected to have benefits in prostate cancer progression in patients undergoing long-term treatment [57–59]. Even though LXRs are key-sensors of cholesterol homeostasis, their role in prostate physiology remains poorly understood.

4.1. Both LXRα and LXRβ modify the apoptosis–proliferation balance in prostate cancer cells

Fukuchi et al. [60] first reported the control of proliferation by LXRs on LNCaP human prostate carcinoma cell line, *in vitro* as well as *in vivo*. In their experiments, LXR agonist T0901317 decreased the percentage of cells in S-phase through an upregulation of *p27^{kip1}*. The induction of expression of the cholesterol membrane transporter ABCA1 by T0901317 led to the assumption that ABCA1 was the key-regulator of the cell cycle in response to LXR activation [61]. Freeman and

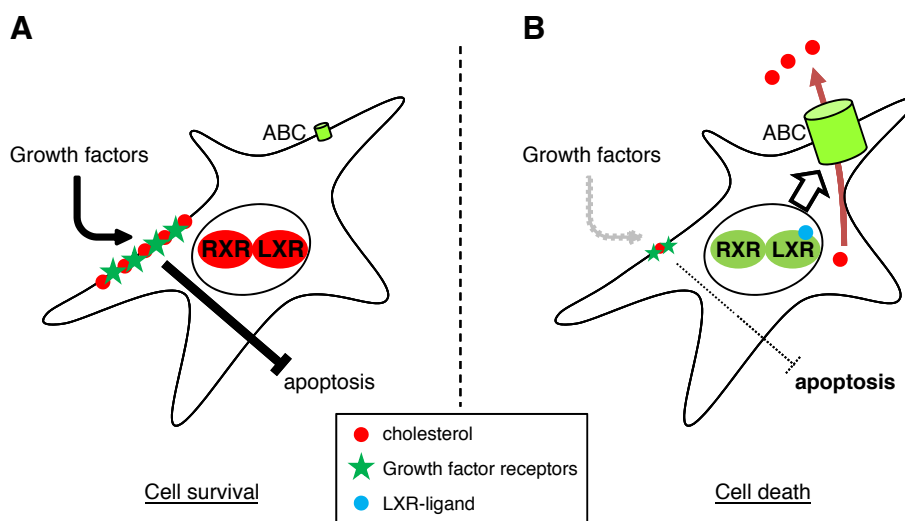


Fig. 6. Role of LXRs in apoptosis of prostate human cancer cells. A) When the level of cholesterol is high, it accumulates in membranes within the lipid rafts, which allows the growth factors to access to their receptors. Binding of these peptides increases cell proliferation and inhibits cell death by apoptosis. B) Activation of LXRs by its ligand induces a higher production of ATP-binding cassettes (ABC) involved in cholesterol efflux, which destructures the lipid rafts. Growth factors are less efficient to maintain cell proliferation, which in turn increases apoptosis. Broken arrow indicates an inhibition.

Solomon proposed that a critical cholesterol concentration in the membrane was required to allow raft coalescence [62]. Sequestration of “oncogenic” signaling proteins in a restricted area through raft coalescence could enhance their activity by exclusion of negative regulators outside the rafts [63,64]. Based on that hypothesis, we explored whether LXRs could modulate cholesterol concentration in rafts [65]. *In vitro* and *in vivo* analyses revealed that modulation of LXR activity triggered apoptosis of prostate cancer cells. This effect involves both the increase of cholesterol efflux by ABC proteins and the disruption of lipid-rafts signaling activity. Schematically (Fig. 6), LXRs first mediate upregulation of ABCG1 that stimulates reverse cholesterol transport. This results in a reduction in plasma membrane cholesterol steady state levels. Then, both disruption of lipid-rafts and down-regulation of raft-associated signaling in prostate cancer cells are induced, together with a decrease in the phosphorylated fraction of raft-associated AKT. Cholesterol replenishment prevents entry of the cells into apoptosis in the presence of T0901317 demonstrating that cholesterol homeostasis regulation by LXRs is a key-process to control cell death. Consistent with this mechanism, chronic T0901317 treatment down regulates AKT and stimulates apoptosis of LNCaP derived tumors in xenografted mice [65]. These results pointed out that LXR α and LXR β are important modulators of prostate cancer cell survival. Altogether, these findings reinforce the idea to consider LXR agonists as potential pharmacological agents in cancer prevention and anti-cancer therapy (for a review, see Ref. [66]). Various studies indeed enlighten the anti-proliferative and proapoptotic effects of LXR-ligand on ovarian [67] and breast [68,69] cancer models.

4.2. LXR α and benign prostatic hyperplasia

Benign prostatic hyperplasia concerns 50% of men over the age of 50 years [70]. Symptoms include urinary frequency, urgency incontinence (compelling need to void that cannot be deferred), and voiding at night (nocturia) [71]. Kim et al. [72] showed that LXR α –/– mice presented benign prostatic hyperplasia-like features on ventral prostate such as proliferative epithelial cells, multiple layers of dense stroma around the prostatic ducts and dilated prostatic ducts. These data suggest that LXR α agonists could also be useful in the treatment of this potentially harmful pathology since some patients may eventually progress to renal failure.

5. Are LXRs promising pharmacological targets in human diseases?

The discovery of new regulated transcription factors has always opened several fields of investigation. From an academic point of view, it is elegant to identify novel *bona fide* genes and associate the discovered factor to new physiological functions. The use of transgenic animals (fly, mouse, worm...) usually helps in linking abnormal features of the transcription factor (mutation or abnormal signaling pathway) to human diseases. At last, once this milestone is reached, chemists can synthesize thousands of new ligands in order to modulate the protein activity. However, the main concern for pharmacology researchers is to solve the pathological problem without opening Pandora's box to optimize the ligands of therapeutical interest without inducing major side effects (for a review, see Ref. [66]).

Studies on mice pointed out that LXR-deficiency could be associated with several phenotypes resembling putative diseases found in human such as metabolic disorders, reproductive failures, central nervous system alterations, or various types of cancer [66]. Clinical use of LXR agonists should thus theoretically be useful in reducing cholesterol levels, neural degeneration, parturition defects, and cancer progression. Up to now, the major side effect of LXRs is a hypertriglyceridemia due to their activity in the liver on the fatty acid synthase. In analogy with what was done for the estrogen receptors, it is likely that SLiMs (Selective Liver X Receptor Modulators) need to be developed [66]. They should have tremendous therapeutical possibilities, after having successfully undergone the extensive approval process. In a near future...

Acknowledgments

We thank Drs. Charles White and Laurent Morel (UMR GReD, Clermont-Ferrand) for critically reading the manuscript. The various works cited are financed in part by Fondation pour la Recherche Médicale INE2000-407031/1, Fondation BNP-Paribas, Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Association de Recherche contre le Cancer, Ligues de l'Allier et du Puy-de-Dôme contre le Cancer, and Société d'Andrologie de Langue Française. E. Viennois is funded by Région Auvergne and Fond Européen de Développement Régional (FEDER); A. Pommier, A. Ouvrier and J. Dufour are funded by

MNERT; A. Oumeddour is a recipient of a grant from the Algerian Government (Programme National Exceptionnel).

References

- [1] R. Lafont, Reverse endocrinology, or “hormones” seeking functions, *Insect biochem.* 21 (1991) 697–721.
- [2] S.A. Kliewer, J.M. Lehmann, T.M. Willson, Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse, *Science* 284 (1999) 757–760.
- [3] P.J. Willy, K. Umesono, E.S. Ong, R.M. Evans, R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway, *Genes Dev.* 9 (1995) 1033–1045.
- [4] D.M. Shinar, N. Endo, S.J. Rutledge, R. Vogel, G.A. Rodan, A. Schmidt, NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor, *Gene* 147 (1994) 273–276.
- [5] C. Song, J.M. Kokontis, R.A. Hiipakka, S. Liao, Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 (1994) 10809–10813.
- [6] B.A. Janowski, M.J. Grogan, S.A. Jones, G.B. Wisely, S.A. Kliewer, E.J. Corey, D.J. Mangelsdorf, Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96 (1999) 266–271.
- [7] B.A. Janowski, P.J. Willy, T.R. Devi, J.R. Falck, D.J. Mangelsdorf, An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha, *Nature* 383 (1996) 728–731.
- [8] M. Hansen, T. Connolly, Nuclear receptors as drug targets in obesity, dyslipidemia and atherosclerosis, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 247–255.
- [9] P.J. Willy, D.J. Mangelsdorf, Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR, *Genes Dev.* 11 (1997) 289–298.
- [10] D.H. Volle, J.M. Lobaccaro, Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the “foie gras”, the steroids and sex? *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266 (2007) 183–189.
- [11] M. Albers, B. Blume, T. Schlueter, M.B. Wright, I. Kober, C. Kremoser, U. Deuschle, M. Koegl, A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands. Competitive recruitment of activators and repressors, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4920–4930.
- [12] H. Ratni, M.B. Wright, Recent progress in liver X receptor-selective modulators, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 13 (2010) 403–413.
- [13] G.J. Schroepfer Jr., Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 361–554.
- [14] G.I. Lepesheva, M.R. Waterman, CYP51—the omnipotent P450, *Mol. Cell. Endocrinol.* 215 (2004) 165–170.
- [15] I. D’Errico, A. Moschetta, Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 1523–1543.
- [16] D.J. Peet, S.D. Turley, W. Ma, B.A. Janowski, J.M. Lobaccaro, R.E. Hammer, D.J. Mangelsdorf, Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha, *Cell* 93 (1998) 693–704.
- [17] S. Alberti, G. Schuster, P. Parini, D. Feltkamp, U. Diczfalusy, M. Rudling, B. Angelin, I. Bjorkhem, S. Pettersson, J.A. Gustafsson, Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) 565–573.
- [18] J.J. Repa, S.D. Turley, J.A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R.A. Heyman, J.M. Dietschy, D.J. Mangelsdorf, Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers, *Science* 289 (2000) 1524–1529.
- [19] Y. Wang, P.M. Rogers, C. Su, G. Varga, K.R. Stayrook, T.P. Burris, Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26332–26339.
- [20] O. Barbier, J. Trottier, J. Kaeding, P. Caron, M. Verreault, Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation, *Mol. Cell. Biochem.* 326 (2009) 3–8.
- [21] D.H. Volle, J.J. Repa, A. Mazur, C.L. Cummins, P. Val, J. Henry-Berger, F. Caira, G. Veyssiere, D.J. Mangelsdorf, J.M. Lobaccaro, 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 (2004) 888–898.
- [22] T.H. Kim, H. Kim, J.M. Park, S.S. Im, J.S. Bae, M.Y. Kim, H.G. Yoon, J.Y. Cha, K.S. Kim, Y.H. Ahn, Interrelationship between LXR(alpha), SREBP-1c, PPAR(gamma) and SHP in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver, *J. Biol. Chem.* (2009).
- [23] C. Hong, P. Tontonoz, Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18 (2008) 461–467.
- [24] M. Demerjian, E.H. Choi, M.Q. Man, S. Chang, P.M. Elias, K.R. Feingold, Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis, *Exp. Dermatol.* (2009).
- [25] R. Koldamova, I. Lefterov, Role of LXR and ABCA1 in the pathogenesis of Alzheimer’s disease—implications for a new therapeutic approach, *Curr. Alzheimer Res.* 4 (2007) 171–178.
- [26] R.P. Koldamova, I.M. Lefterov, M. Staufenbiel, D. Wolfe, S. Huang, J.C. Glorioso, M. Walter, M.G. Roth, J.S. Lazo, The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer’s disease, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4079–4088.
- [27] A. Venkateswaran, J.J. Repa, J.M. Lobaccaro, A. Bronson, D.J. Mangelsdorf, P.A. Edwards, Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 14700–14707.
- [28] M.A. Kennedy, A. Venkateswaran, P.T. Tarr, I. Xenarios, J. Kudoh, N. Shimizu, P.A. Edwards, Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39438–39447.
- [29] P.A. Mak, B.A. Laffitte, C. Desrumaux, S.B. Joseph, L.K. Curtiss, D.J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, P.A. Edwards, Regulated expression of the apolipoprotein E/C-1/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31900–31908.
- [30] G. Cao, T.P. Beyer, X.P. Yang, R.J. Schmidt, Y. Zhang, W.R. Bensch, R.F. Kauffman, H. Gao, T.P. Ryan, Y. Liang, P.I. Eacho, X.C. Jiang, Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39561–39565.
- [31] G. Lo Sasso, S. Murzilli, L. Salvatore, I. D’Errico, M. Petruzzelli, P. Conca, Z.Y. Jiang, L. Calabresi, P. Parini, A. Moschetta, Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis, *Cell Metab.* 12 (2010) 187–193.
- [32] T. Yasuda, D. Grillot, J.T. Billheimer, F. Briand, P. Delerive, S. Huet, D.J. Rader, Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 781–786.
- [33] C.L. Cummins, D.H. Volle, Y. Zhang, J.G. McDonald, B. Sion, A.M. Lefrancois-Martinez, F. Caira, G. Veyssiere, D.J. Mangelsdorf, J.M. Lobaccaro, Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1902–1912.
- [34] K.R. Steffensen, S.Y. Neo, T.M. Stulnig, V.B. Vega, S.S. Rahman, G.U. Schuster, J.A. Gustafsson, E.T. Liu, Genome-wide expression profiling; a panel of mouse tissues discloses novel biological functions of liver X receptors in adrenals, *J. Mol. Endocrinol.* 33 (2004) 609–622.
- [35] B. Mascrez, N.B. Ghyselinck, M. Watanabe, J.S. Annicotte, P. Chambon, J. Auwerx, M. Mark, Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells, *EMBO Rep.* 5 (2004) 285–290.
- [36] D.H. Volle, K. Mouzat, R. Duggavathi, B. Siddeek, P. Dechelotte, B. Sion, G. Veyssiere, M. Benahmed, J.M. Lobaccaro, Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1014–1027.
- [37] K. Mouzat, F. Volat, S. Baron, G. Alves, A.J. Pommier, D.H. Volle, G. Marceau, A. DeHaze, P. Dechelotte, R. Duggavathi, F. Caira, J.M. Lobaccaro, Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice, *Endocrinology* 150 (2009) 3369–3375.
- [38] H. Kurioka, K. Takahashi, N. Kita, Y. Noda, Hemorrhagic ovarian cyst without peritoneal bleeding in a patient with ovarian hyperstimulation syndrome: case report, *Chin. Med. J. (Engl)* 118 (2005) 1577–1581.
- [39] N.F. Vlahos, O. Gregoriou, Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome, *Ann. NY Acad. Sci.* 1092 (2006) 247–264.
- [40] K. Mouzat, M. Prod’homme, D.H. Volle, B. Sion, P. Dechelotte, K. Gauthier, J.M. Vanacker, J.M. Lobaccaro, Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 4693–4701.
- [41] K.M. Robertson, G.U. Schuster, K.R. Steffensen, O. Hovatta, S. Meaney, K. Hulthenby, L.C. Johansson, K. Svechnikov, O. Soder, J.A. Gustafsson, The liver X receptor-(beta) is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis, *Endocrinology* 146 (2005) 2519–2530.
- [42] A. Lenzi, M. Picardo, L. Gandini, F. Dondero, Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy, *Hum. Reprod. Update* 2 (1996) 246–256.
- [43] N.M. Biswas, C. Deb, Testicular degeneration in rats during hypervitaminosis A, *Endokrinologie* 49 (1965) 64–69.
- [44] D.H. Volle, R. Duggavathi, B.C. Magnier, S.M. Houten, C.L. Cummins, J.M. Lobaccaro, G. Verhoeven, K. Schoonjans, J. Auwerx, The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice, *Genes Dev.* 21 (2007) 303–315.
- [45] D.H. Volle, M. Decourteix, E. Garo, J. McNeilly, P. Fenichel, J. Auwerx, A.S. McNeilly, K. Schoonjans, M. Benahmed, The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3752–3764.
- [46] Y. Zhang, C.H. Hagedorn, L. Wang, Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer, *Biochim. Biophys. Acta* (2010).
- [47] M. Chen, S. Beaven, P. Tontonoz, Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2570–2579.
- [48] J.M. Frenoux, P. Vernet, D.H. Volle, A. Britan, F. Saez, A. Kocer, J. Henry-Berger, D.J. Mangelsdorf, J.M. Lobaccaro, J.R. Drevet, Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions, *J. Mol. Endocrinol.* 33 (2004) 361–375.
- [49] F. Saez, E. Chabory, R. Cadet, P. Vernet, S. Baron, J.M. Lobaccaro, J.R. Drevet, Liver X receptors and epididymal epithelium physiology, *Asian J. Androl.* 9 (2007) 574–582.
- [50] A. Ouvrier, R. Cadet, P. Vernet, B. Laillet, J.M. Chardigny, J.M. Lobaccaro, J.R. Drevet, F. Saez, LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1766–1775.
- [51] F. Bravi, L. Scotti, C. Bosetti, R. Talamini, E. Negri, M. Montella, S. Franceschi, C. La Vecchia, Self-reported history of hypercholesterolemia and gallstones and the risk of prostate cancer, *Ann. Oncol.* 17 (2006) 1014–1017.
- [52] L. Magura, R. Blanchard, B. Hope, J.R. Beal, G.G. Schwartz, A.E. Sahnoun, Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study, *Cancer Causes Control* 19 (2008) 1259–1266.
- [53] M. Watanabe, T. Nakayama, T. Shiraishi, G.N. Stemmermann, R. Yatani, Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review, *Urol. Oncol.* 5 (2000) 274–283.

- [54] C. White, On the occurrence of crystals in tumours, *J. Pathol. Bacteriol.* 13 (1909) 3–10.
- [55] G. Swyer, The cholesterol content of normal and enlarged prostates, *Cancer Res.* 2 (1942) 372–375.
- [56] L. Zhuang, J. Kim, R.M. Adam, K.R. Solomon, M.R. Freeman, Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 959–968.
- [57] E.A. Platz, M.F. Leitzmann, K. Visvanathan, E.B. Rimm, M.J. Stampfer, W.C. Willett, E. Giovannucci, Statin drugs and risk of advanced prostate cancer, *J. Natl Cancer Inst.* 98 (2006) 1819–1825.
- [58] J. Shannon, S. Tewoderos, M. Garzotto, T.M. Beer, R. Derenick, A. Palma, P.E. Farris, Statins and prostate cancer risk: a case-control study, *Am. J. Epidemiol.* 162 (2005) 318–325.
- [59] T.J. Murtola, T. Visakorpi, J. Lahtela, H. Syvala, T. Tammela, Statins and prostate cancer prevention: where we are now, and future directions, *Nat. Clin. Pract. Urol.* 5 (2008) 376–387.
- [60] J. Fukuchi, J.M. Kokontis, R.A. Hiipakka, C.P. Chuu, S. Liao, Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 7686–7689.
- [61] J. Fukuchi, R.A. Hiipakka, J.M. Kokontis, S. Hsu, A.L. Ko, M.L. Fitzgerald, S. Liao, Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 7682–7685.
- [62] M.R. Freeman, K.R. Solomon, Cholesterol and prostate cancer, *J. Cell. Biochem.* 91 (2004) 54–69.
- [63] G. Yang, L.D. Truong, T.L. Timme, C. Ren, T.M. Wheeler, S.H. Park, Y. Nasu, C.H. Bangma, M.W. Kattan, P.T. Scardino, T.C. Thompson, Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 1873–1880.
- [64] J. Kim, R.M. Adam, K.R. Solomon, M.R. Freeman, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells, *Endocrinology* 145 (2004) 613–619.
- [65] A.J. Pommier, G. Alves, E. Viennois, S. Bernard, Y. Communal, B. Sion, G. Marceau, C. Damon, K. Mouzat, F. Caira, S. Baron, J.M. Lobaccaro, Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells, *Oncogene* 29 (2010) 2712–2723.
- [66] E. Viennois, A.J.C. Pommier, K. Mouzat, A. Oumeddour, F.-Z. El Hajjaji, J. Dufour, F. Caira, D.H. Volle, S. Baron, J.-M.A. Lobaccaro, Targeting Liver X Receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15 (2) (2011) 219–232.
- [67] J.J. Rough, M.A. Monroy, S. Yerrum, J.M. Daly, Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells, *J Ovarian Res* 3 (2010) 13.
- [68] L.L. Vedin, S.A. Lewandowski, P. Parini, J.A. Gustafsson, K.R. Steffensen, The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells, *Carcinogenesis* 30 (2009) 575–579.
- [69] H. Gong, P. Guo, Y. Zhai, J. Zhou, H. Uppal, M.J. Jarzynka, W.C. Song, S.Y. Cheng, W. Xie, Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1781–1790.
- [70] D.R. Paolone, Benign prostatic hyperplasia, *Clin. Geriatr. Med.* 26 (2010) 223–239.
- [71] C.G. Roehrborn, Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH), *Med. Clin. North Am.* 95 (2011) 87–100.
- [72] H.J. Kim, L.C. Andersson, D. Bouton, M. Warner, J.A. Gustafsson, Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106 (2009) 558–563.
- [73] L.C. Junquiera, J. Carniero, R.O. Kelley, *Basic Histology*, 6th ed., Appleton and Lange, Norwalk, CT, 1989.

Article 8 :

Targeting Liver X Receptors in human health: deadlock or promising trail ?

Viennois E, Pommier AJC, Mouzat K, Oumeddour A, El-Hajjaji F-Z, Dufour J, Caira F, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JMA. Expert Opin Ther Targets. 2011; 15(2):219-232

Review

Expert Opinion

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

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

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

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

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

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

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

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

1. LXR, two members of the nuclear receptor superfamily

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

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

1.1 Structure

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

informa
healthcare

Article highlights.

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

This box summarizes key points contained in the article.

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

1.2 Mechanism of activation

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

1.3 Ligands

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

1.3.1 Ligands with agonistic activity

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

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

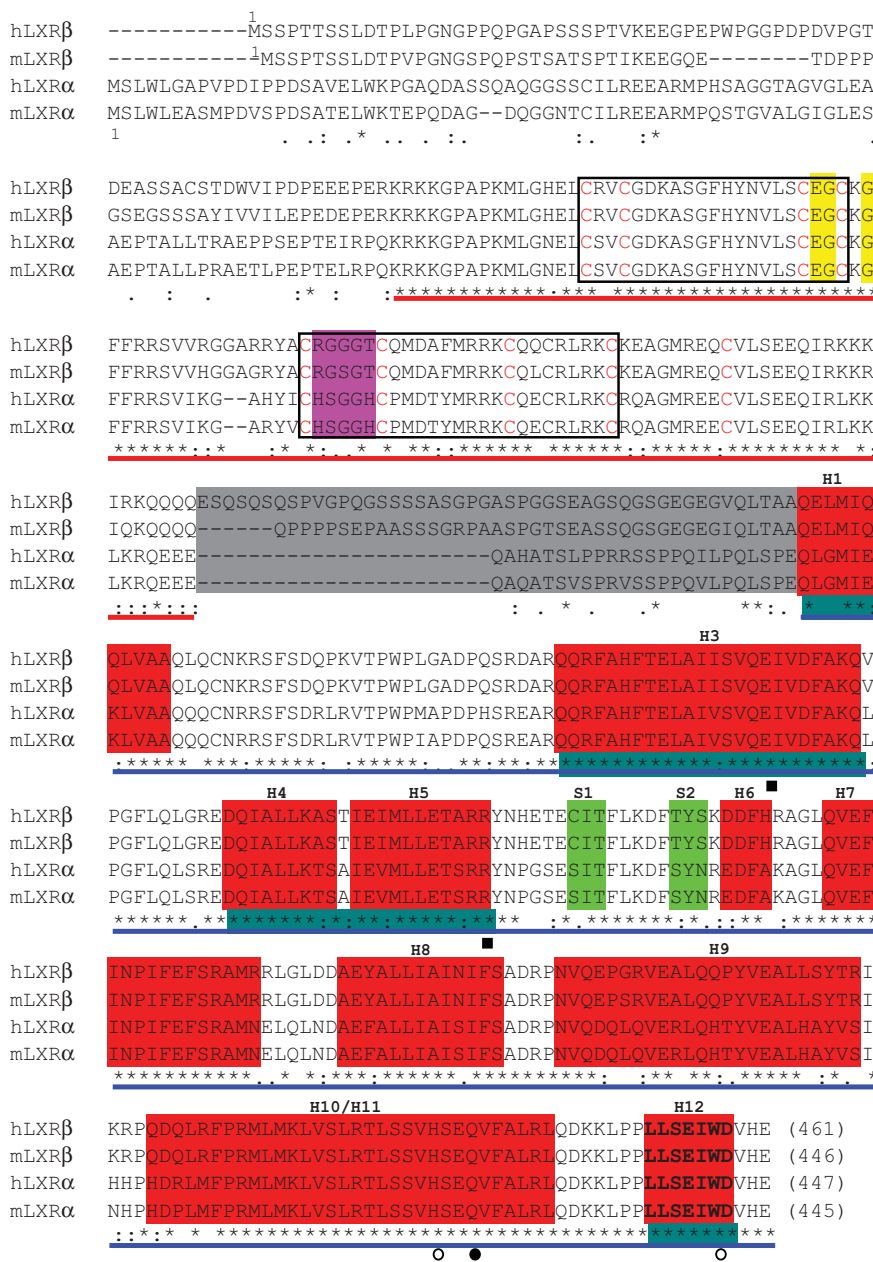


Figure 1. Protein sequence alignments of human (h) and mouse (m) LXRα and LXRβ. (*) identical amino acids; (:): similar amino acids; (.) structurally related amino acids. The 9 Cys of the DNA-binding domain are indicated in red type. DNA- and ligand-binding domains are underlined in red and blue, respectively.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

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

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

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

Expert Opin. Ther. Targets Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 12/09/12
For personal use only.

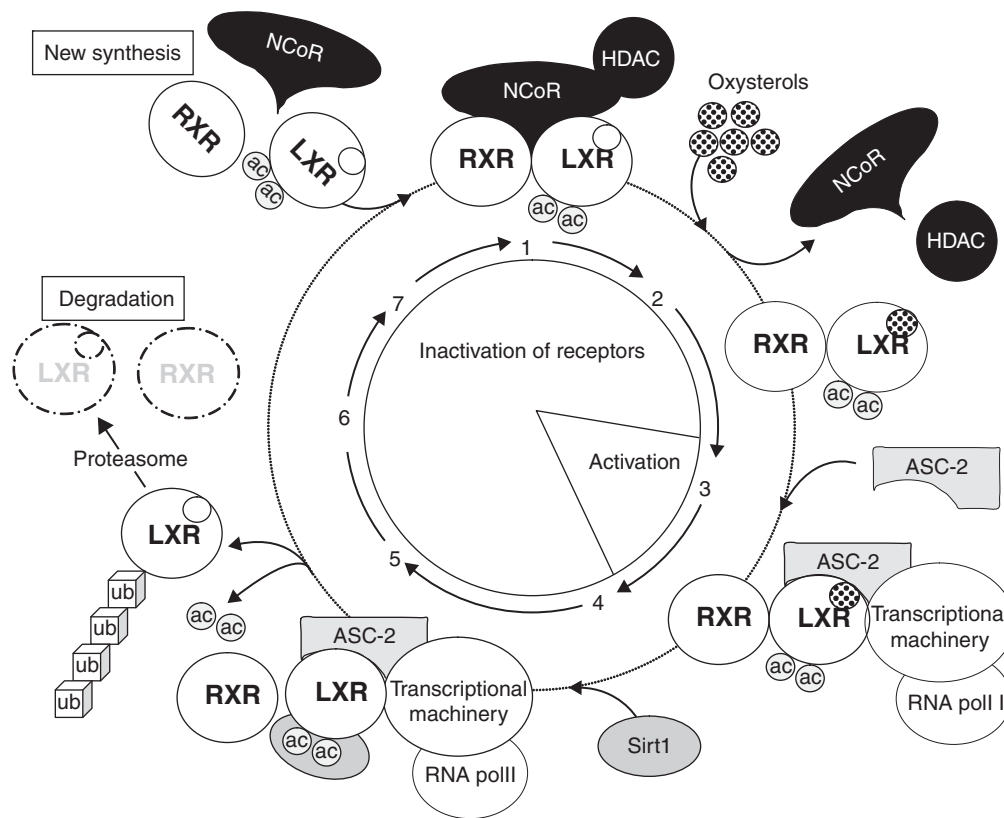


Figure 2. Schematic representation of the activation/inhibition cycle of liver X receptor (LXR) heterodimerizing with retinoid X receptor (RXR). In the absence of ligand, LXR/RXR is bound on DNA together with transcriptional co-repressor. Agonist binding of one of the two receptors will induce departure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

Adapted from [111].

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

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

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

1.3.2 Ligands with antagonistic activity

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

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

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

2. Physiological functions of LXR

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

2.1 LXR and lipid metabolism

2.1.1 Regulation of cholesterol homeostasis

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

2.1.1.1 De novo synthesis

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

2.1.1.2 Bile acid synthesis

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

2.1.1.3 Reverse cholesterol transport

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

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

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

2.1.2 LXR and fatty acid metabolism

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

2.2 LXR and glucose homeostasis

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

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

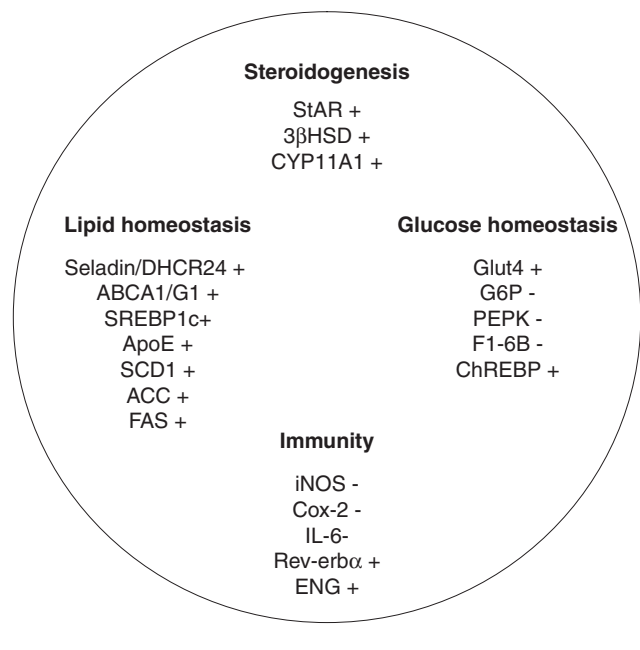


Figure 3. LXR target genes in steroidogenesis, lipid and glucose homeostasis, and immunity. The reported genes correspond to the list mentioned within the text. (+) upregulated gene; (-) down regulated gene.

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

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

2.3 LXR and steroidogenesis

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

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

2.4 LXR and immunity

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

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

3. Putative pharmacological targeting

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

3.1 LXR and atherosclerosis

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

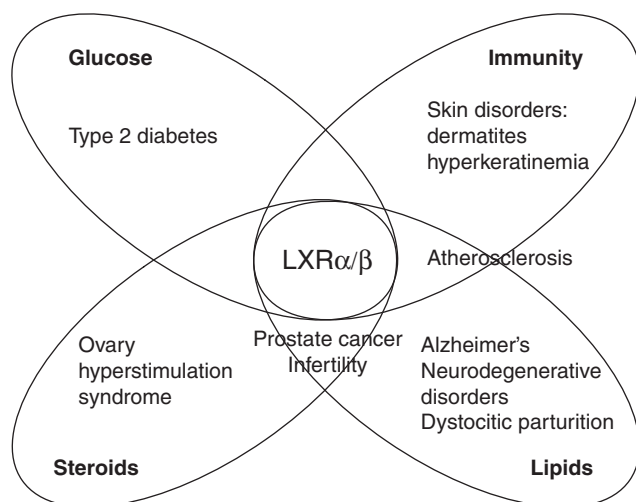


Figure 4. Synthesis of the role of liver X receptor (LXR) in physiology and putative associated diseases. The role of LXR in the control of lipid and glucose homeostasis, immunity and steroidogenesis has been extensively studied. Moreover, careful analysis of LXR-deficient mice led to the proposal of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

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

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

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

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

3.2 LXR and diabetes

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

3.3 LXR and Alzheimer's disease

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

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

3.4 LXR and skin disorders

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

3.5 LXR and reproductive tract disorders

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

3.5.1 LXR and female reproduction

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

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

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

3.5.2 LXR and male reproduction

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

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

3.6 LXR and cancer

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

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

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

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

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

4. Conclusion

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

5. Expert opinion

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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Declaration of interest

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

Bibliography

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

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

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

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

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

Expert Opin. Ther. Targets Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 12/09/12
For personal use only.

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

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

Affiliation

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

Article 9 :

Cholestérol et cancer de la prostate : données épidémiologiques.

Pommier A, Dufour J, Viennois E, Volle DH, Caira F, Baron S and Lobaccaro JMA.
Médecine Clinique; endocrinology et diabète. Hors série. **Revue**

Cholestérol et cancer de la prostate : données épidémiologiques

Aurélien JC. Pommier^{1,2,3},
Julie Dufour^{1,2,3},
Emilie Viennois^{1,2,3},
David Volle^{1,2,3},
Françoise Caira^{1,2,3},
Silvère Baron^{1,2,3},
Jean-Marc A. Lobaccaro^{1,2,3}.

1. Clermont Université,
Université Blaise Pascal,
Génétique Reproduction
et Développement,
63000 Clermont-Ferrand
2. CNRS,
UMR 6247,
GReD,
63177 Aubière

3. Centre de Recherche
en Nutrition Humaine d'Auvergne,
F-63000 Clermont-Ferrand

Correspondance :

Jean-Marc A. Lobaccaro,
"Génétique Reproduction
et Développement",
UMR CNRS GReD
6247 Clermont Université,
24 avenue des Landais,
63171 BP80026 - Aubière Cedex, France.
E-mail :
j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr
Tél. : 04 73 40 74 16.

Mots-clés :
cholestérol,
cancer de la prostate,
raft,
androgen receptor (AR),
liver x receptor (LXR)

Bien que l'observation d'une accumulation de cholestérol dans les tumeurs solides ait été rapportée depuis plus d'un siècle [1], le lien entre cholestérol et promotion et/ou progression du cancer a commencé à être étudié à la fin du 20^{ème} siècle. Ainsi, bien que la majorité des études ait été focalisée sur le cancer de la prostate, les mécanismes impliqués semblent plus généraux et peuvent s'étendre à d'autres types de cancers.

En France, le cancer de la prostate représente le premier cancer et la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme [2]. Son incidence (121,2 cas pour 100 000 par an) a augmenté de manière très importante ces deux dernières décennies avec un taux annuel moyen d'évolution de + 8.5% entre 2000 et 2005 [2]. L'amélioration des techniques de diagnostic ainsi que l'augmentation de l'espérance de vie permettent en partie d'expliquer ces chiffres. Pour autant, des études épidémiologiques montrent que les pays d'Asie tels que la Chine, le Japon ou encore l'Inde présentent des taux d'incidence nettement plus faibles que les pays occidentaux comme les Etats-Unis ou les pays Scandinaves : l'incidence du cancer de la prostate atteint 137 cas pour 100 000 Afro-Américains par an aux Etats-Unis contre 1,9 pour des Chinois vivant en Chine [3]. Lorsque des Chinois de Qidong migrent à San Francisco, l'incidence de ce cancer passe de 0,5 à 26 cas pour 100 000 [4]. Ces données illustrent parfaitement l'implication de deux composantes dans la survenue de cette pathologie : i) une composante génétique « protectrice » puisque l'incidence de ce cancer n'atteint jamais chez les immigrants asiatiques celle des Américains non asiatiques ; ii) une composante environnementale délétère. Parmi celle-ci, la nature des régimes alimen-

taires, connue pour être plus riche en lipides dans les pays occidentaux par rapport aux pays Asiatiques, pourrait expliquer en partie ces chiffres [4].

Le cholestérol, un lipide délétère pour le cancer de la prostate ?

Quelles sont les bases rationnelles de ce questionnement ?

Au cours des années 1980-90, de nombreuses études ont montré une association entre le risque de cancer de la prostate et la consommation de produits d'origine animale [5], notamment par la présence de lipides dont la nature exacte restait à déterminer [6]. En fait, les lipides semblent avoir un impact sur l'augmentation des cancers métastatiques plus que sur l'incidence totale des cancers. Alors que certains nutriments comme le calcium et certains lipides comme les acides gras permettent d'expliquer l'association observée entre consommation de produits laitiers et risque de cancer de la prostate de haut grade, le risque lié à la consommation de viande rouge reste inexplicable [5], orientant de fait les études vers un autre lipide : le cholestérol. Pendant de longues années, les liens existant entre la consommation excessive de cholestérol, les taux de cholestérol circulant et le risque de cancer de la prostate ont soulevé la controverse [7].

D'un coté, contrairement au postulat de départ, certaines études ont d'abord démontré l'existence d'une corrélation entre la survenue de cancer et de faibles taux de cholestérol circulant [8]. Cette corrélation inverse s'explique en fait par l'inclusion dans les cohortes de patients atteints d'autres cancers encore

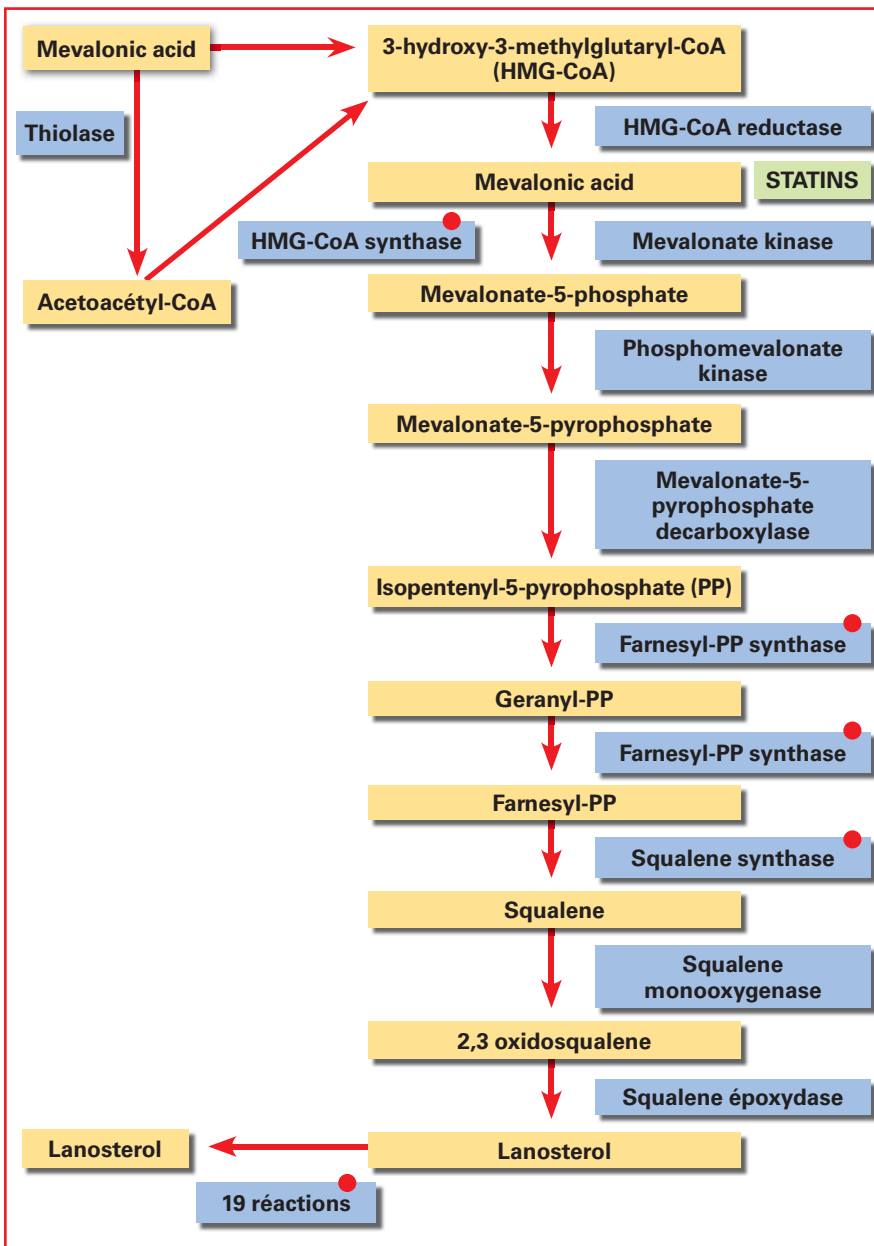


Figure 1. Principales enzymes impliquées dans la synthèse endogène du cholestérol. Les androgènes stimulent la voie de biosynthèse du cholestérol en induisant l'expression des enzymes marquées d'un ●. Parmi les 19 réactions mises en jeu pour la formation du cholestérol depuis le lanostérol, les androgènes stimulent la 3-β-hydroxystérol-Δ²⁴ réductase (DHCR24). A l'inverse, les statines bloquent cette voie en inhibant l'HMGCoA réductase (D'après Brown et Goldstein [38]).

non diagnostiqués et connus pour diminuer les quantités de cholestérol circulant [9]. En effet, il a ensuite été établi que le niveau de cholestérol circulant diminue avant les signes d'appel et le diagnostic du cancer. Ainsi cette corrélation inverse est perdue si les 5 à 9 premières années de suivie

sont exclues des études [10, 11]. Ces données démontrent que l'association entre de faibles taux de cholestérol circulants et le risque de cancer est donc due à un lien de causalité inverse.

D'un autre côté, des études ont montré qu'un « faible » taux de cholestérol circulant (< 200 mg/dl) est asso-

cié à une réduction du risque de développer un cancer de la prostate de haut grade (score de Gleason 8-10) [12]. Existe-il alors une association entre la prise de statines, agents hypocholestérolémiants, et le risque de cancer ? Les statines se concentrent essentiellement au niveau du foie et leurs effets hypocholestérolémiants s'expliquent majoritairement par l'inhibition de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA réductase), enzyme limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol depuis le mévalonate (Figure 1). Les études épidémiologiques rétrospectives effectuées sur des cohortes de patients traités pour des maladies cardiovasculaires montrent que la prise de statines diminue de façon importante le nombre de cancers agressifs de la prostate [13, 14] surtout lorsque la durée du traitement est supérieure à 5 ans [15, 16].

Au final, ces données épidémiologiques montrent que de fortes quantités de cholestérol circulant augmentent le risque de cancer avancé de la prostate alors que la prise d'agents hypocholestérolémiants comme les statines diminue ce risque, indiquant *de facto* le rôle promoteur du cholestérol dans la progression tumorale et/ou l'invasion métastatique.

Le cholestérol dans les tumeurs prostatiques

Après les travaux de White [1] qui montrent une accumulation de cristaux de nature lipidique dans les tumeurs, Swyer et al. sont les premiers à rapporter une augmentation de cholestérol dans les zones atteintes d'hypertrophie bénigne de la prostate par rapport aux tissus sains [17]. Par la suite ces observations se sont généralisées à d'autres types de cancers tels que les tumeurs gastro-intestinales, du poumon ou du rein. Deux mécanismes ont été identifiés :

- une augmentation du captage du cholestérol circulant [18, 19] associée à la perte des mécanismes régulateurs de l'expression du récepteur aux LDL [20] ;
- une augmentation de l'expression des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol comme l'HMG-CoA réduc-

tase [21] (Figure 1). Dans les deux cas, il s'agit de mécanismes actifs qui favorisent la disponibilité intracellulaire du cholestérol au cours du développement tumoral. Nygren et al. observent également une augmentation de cholestérol dans les cellules qui entourent les tissus cancéreux et suggèrent alors un événement précoce dans la transformation tumorale [22]. Ceci soulève la question des mécanismes moléculaires par lesquels le cholestérol peut favoriser la progression tumorale.

Rafts lipidiques et cancer de la prostate

Dans les membranes plasmiques ou intracellulaires, le cholestérol s'accumule en partie dans des radeaux (*rafts*) lipidiques, aussi connus sous le nom de DRM (*detergent-resistant membrane domains*) ou encore DIG (*detergent-insoluble, glycolipid-enriched complexes*). La présence de la cavéoline 1, marqueur des radeaux lipidiques, est un signe de mauvais pronostic associé aux cancers agressifs de la prostate [23, 24]. A l'inverse, l'administration d'un anticorps dirigé contre la cavéoline 1 bloque la dissémination métastatique du cancer de la prostate chez la souris, suggérant le lien potentiel entre les *rafts* et la progression tumorale [25]. Depuis ces dernières années les *rafts* lipidiques sont considérés comme de véritables plateformes impliquées dans la transduction des signaux intracellulaires. Ainsi la serine-thréonine kinase AKT est activée par phosphorylation au niveau de ces microdomaines lipidiques pour stimuler les processus de survie et de croissance cellulaire dans les tumeurs prostatiques. Cette phosphorylation est en partie dépendante de la présence de cholestérol dans la membrane qui, par sa présence, augmente la coalescence des *rafts* facilitant ainsi le recrutement de AKT au niveau de la membrane plasmique [26]. Le traitement des cellules cancéreuses prostatiques par la simvastatine (statine), la méthyl-beta-cyclodextrine (chélateur de cholestérol) ou la filipin (agent dispersant le cholestérol dans la membrane), diminue la phosphorylation de AKT au niveau des *rafts* et entraîne par conséquent l'apoptose

des cellules [27]. Ce rôle du cholestérol membranaire semble spécifique des cellules cancéreuses puisque la filipin ne modifie ni la phosphorylation de AKT ni l'apoptose des cellules normales de prostate PrEC [28].

Des récepteurs nucléaires modulant les taux de cholestérol comme cibles pharmacologiques dans le cancer de la prostate ?

L'homéostasie du cholestérol est sous le contrôle de certains récepteurs nucléaires tels que ceux des oxystérols (LXR ; *Liver X Receptor*) et celui des androgènes (AR ; *Androgen Receptor*). Un dysfonctionnement de ces facteurs de transcription pourrait permettre d'expliquer les dérèglements lipidiques observés dans les cellules tumorales, en en faisant ainsi des cibles pharmacologiques.

Ces récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription activables par des ligands. D'un point de vue structural, ils sont schématiquement constitués de trois domaines fonctionnellement indépendants (pour une revue lire [29]). Du côté amino-terminal, le domaine modulateur possède une fonction d'activation de la transcription AF1 (*Activating Function 1*) indépendante du ligand et possède plusieurs sites putatifs de phosphorylation. Le domaine central de liaison de l'ADN est constitué d'une structure en doigts de zinc comportant une boîte P impliquée dans la spécificité de fixation à l'élément de réponse hormonale et la boîte D, responsable de l'hétérodimérisation des récepteurs, ainsi qu'une région carboxy-terminale (CTE) participant aussi à la spécificité de fixation à l'élément de réponse. Enfin, le domaine carboxy-terminal est constitué d'une poche hydrophobe autorisant la fixation du ligand ; il permet également la dimérisation du récepteur et possède une région transactivatrice AF2 (*Activating Function 2*) qui est démasquée en présence du ligand et qui peut recruter des co-activateurs, acteurs moléculaires indispensables à l'initiation de la transcription.

Androgen receptor (AR)

Les androgènes font partie des principaux facteurs responsables de la progression du cancer de la prostate. Ainsi, l'administration d'anti-androgènes tels que le bicalutamide (Casodex®), la cyprotérone (Androcur®), le flutamide (Eulexine®) ou le nilutamide (Anandron®), visant à bloquer l'action des androgènes sur AR, voire le finastéride (Chibro-Proscar®) ou le duastéride (Avodart®), tous deux inhibiteurs de la 5-alpha-réductase, est une thérapie couramment utilisée dans le traitement du cancer de la prostate.

Il est intéressant de noter que certains gènes cibles des androgènes sont impliqués directement dans le métabolisme du cholestérol (Figure 1). C'est le cas de la *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase* (HMGCo-A-Synt) et *reductase* (HMGCo-A-Red), la *farnesyl diphosphate synthase*, la *3-β-hydroxysterol-Δ-24 reductase* (DHCR24), la *squalene synthase* (SQS) qui interviennent dans la synthèse du cholestérol mais aussi de la *sterol regulatory element-binding protein-2* (SREBP-2), facteur de transcription contrôlant les gènes de synthèse du cholestérol ou encore de *SREBP-cleavage-activating protein* (SCAP), senseur de cholestérol responsable de l'activation de SREBP. De même, les androgènes contrôlent l'entrée et l'efflux de cholestérol en régulant respectivement l'expression du récepteur aux LDL (LDLR) et des transporteurs membranaires tels que *ATP-binding cassette A1* (ABCA1) (pour une revue lire [30]). Le contrôle transcriptionnel de ces gènes cibles a pour conséquence une augmentation de la concentration en cholestérol intracellulaire qui s'explique à la fois par une stimulation de sa synthèse, une augmentation de son entrée depuis le milieu extracellulaire et enfin une inhibition de son efflux (Figure 2). De manière intéressante, le cholestérol ainsi accumulé peut être utilisé par les cellules tumorales prostatiques comme substrat pour la synthèse d'androgènes [31] (Figure 2). Cette capacité de synthèse *de novo* d'androgènes confère un avantage certain aux cellules qui ne sont alors plus dépend-

dantes des androgènes circulants. Ce mécanisme permet de comprendre i) la sensibilité/dépendance importante des tumeurs prostatiques vis-à-vis du cholestérol par rapport aux autres types de tumeurs et ii) comment la croissance des cellules tumorales devient inexorablement indépendante des androgènes et donc d'expliquer l'évolution vers un échappement thérapeutique. De façon simpliste on peut évoquer un cercle vicieux dans lequel les androgènes favorisent l'accumulation de cholestérol, lui-même utilisé pour la production d'androgènes (Figure 2).

Cette dépendance des cellules tumorales vis-à-vis du cholestérol est maintenant bien caractérisée et les effets du cholestérol sur le développement tumoral (direct ou indirect *via* les androgènes) sont bien établis. Ainsi est-il possible qu'un des mécanismes d'action des anti-androgènes passe par le blocage de l'accumulation de cholestérol dans la cellule cancéreuse et inhibe, au moins temporairement, la progression tumorale.

Liver X Receptor

Isolés initialement dans le foie, les deux isoformes de ces récepteurs, LXR α et LXR β , ont jusqu'à 80 % d'identité dans les domaines de liaison de l'ADN et de l'hormone. LXR β est ubiquiste, alors que LXR α a une expression plutôt restreinte aux tissus présentant un fort métabolisme lipidique (pour une revue lire [32]). Les LXR α forment des hétérodimères obligatoires avec le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque 9-cis RXR (*Retinoid X Receptor*). En l'absence de ligand et dans leur fonctionnement canonique, les hétérodimères RXR/LXR sont constitutivement fixés sur leurs éléments de réponse à l'ADN. Les ligands des LXR sont les oxystérols, dérivés naturels du cholestérol. Des agonistes synthétiques tels que le T0901317 ou le GW3965 capables d'activer spécifiquement les LXR ont été développés. La présence d'un des deux ligands (de RXR ou LXR) induit le recrutement de co-activateurs créant un environnement permissif pour l'initiation de la transcription. L'étude phénotypique de souris dont

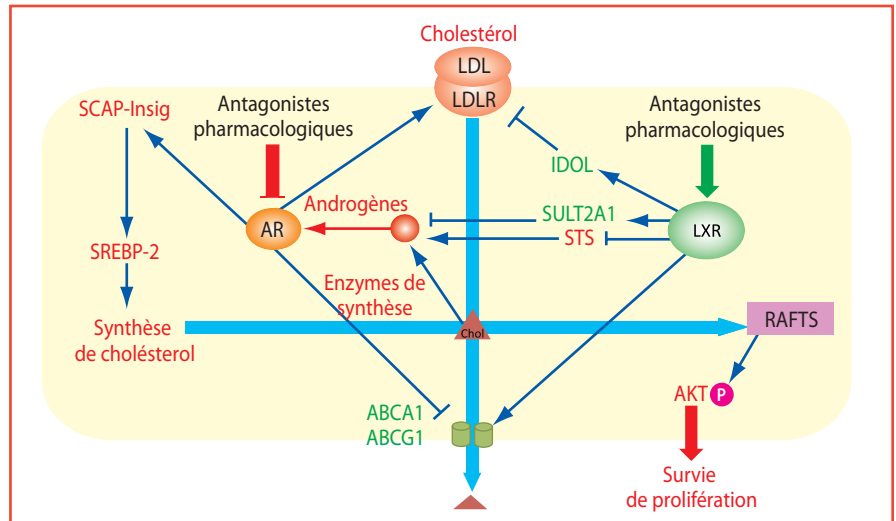


Figure 2. Régulation de l'homéostasie du cholestérol dans une cellule tumorale prostatique : actions de AR et LXR. ABCA1 : ATP-binding cassettes A1, AR : androgen receptor, Chol. : cholestérol, IDOL : inducible degrador of LDLR, LDL : low density lipoprotein, LDLR : ldl receptor, LXR : liver X receptor, AKT : alpha serine/threonine-protein kinase, SCAP: SREBP-cleavage-activating protein, SULT2A1 : hydroxysteroid-sulfotransferase 2A1, SREBP-2 : sterol regulatory element-binding protein-2, STS : steroid-sulfatase. Les facteurs favorisant la progression tumorale apparaissent en rouge. A l'inverse, en vert, figurent les éléments qui inhibent la progression. Les pointes de flèches symbolisent une activation tandis que les flèches plates indiquent une inhibition. P : Phosphorylation.

les gènes codant LXR α et LXR β ont été invalidés par recombinaison homologue (*lxra*; β -/-) et l'analyse de leurs protéines cibles ont permis d'associer les LXR α *in vivo* à cinq grandes fonctions physiologiques [32] : (1) le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et (2) de celle des acides gras, (3) le contrôle de la glycémie, (4) l'inflammation et (5) la stéroïdogenèse. Au niveau de l'homéostasie lipidique, les LXR α sont considérés comme des facteurs hypocholestérolémiant. En effet lorsque les souris *lxra*-/- sont nourries avec un régime hypercholestérolémiant, elles développent une hépatomégalie caractérisée par une accumulation d'esters de cholestérol dans les hépatocytes, non compensée par la présence de LXR β . Chez les souris sauvages, LXR α stimule l'expression du gène codant la *cholesterol-7 α -hydroxylase* (CYP7A1), enzyme catalysant l'étape initiale et limitante de la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, permettant la transformation et l'élimination de l'excès de cholestérol en acides biliaires par l'intestin. La stéatose hépatique des souris *lxra*-/- est due à une faible expression du gène *cyp7a1*. De plus, les LXR α

stimulent l'expression de certains transporteurs de la famille *ATP-Binding Cassettes* (ABC) comme ABCA1, ABCG5 et ABCG8, responsables de l'efflux de cholestérol des cellules. Par ailleurs les LXR α stimulent le retour hépatique du cholestérol par les *high density lipoprotein* (HDL) *via* la régulation des apolipoprotéines ApoE/CII/CIV qui les composent. Les LXR α sont également capables de limiter l'entrée de cholestérol dans les cellules en inhibant le récepteur des LDL (LDLR) [33]. Ce mécanisme indirect passe par la régulation transcriptionnelle du gène *inducible degrador of LDLR* (*idol*). En outre, l'activation des gènes codant *sterol regulatory element binding protein 1c* (*srebp-1c*), *fatty acid synthase* (*fas*) et *acetyl-CoA carboxylase* (*acc*) confère aux LXR α un effet hypertriglycéridémiant temporaire, favorisant les voies de synthèse des acides gras. Enfin, les LXR α sont des régulateurs fondamentaux de la synthèse de stéroïdes aux niveaux cortico-surrénalien, ovarien et testiculaire, et interviennent dans le métabolisme hépatique des androgènes [34]. En effet, l'activation pharmacologique par du T0901317, ou la surexpression génique de *lxra* dans le foie

entraîne une diminution de la quantité de testostérone dans les tissus cibles tels que la prostate et ce par deux mécanismes bien établis :

- LXR α active l'expression de *sult2a1*, une *hydroxysteroid-sulfotransferase* essentielle pour la désactivation métabolique des androgènes et

- LXR α inhibe l'expression de *sts*, une *steroid-sulfatase* qui active les androgènes par sulfatation. Ainsi le traitement de souris par le T0901317 ou la surexpression hépatique de *Lxr α* entraîne une diminution de la taille des prostatites. En culture de cellules, l'activation des LXRs bloque à la fois la croissance cellulaire et l'expression du gène *prostate specific antigen (psa)* induite par les androgènes. Malgré l'absence d'étude claire à ce sujet, il est tout à fait possible d'envisager que cette « activité anti-androgénique » des LXRs puisse participer au blocage de l'activité lipogénique de AR décrite précédemment et ainsi s'opposer à l'accumulation de cholestérol dans les cellules.

Le traitement de lignées cellulaires tumorales prostatiques par des agonistes naturels des LXRs, tels que le 22(R)-hydroxycholestérol et le 24(S)-hydroxycholestérol, ou synthétique, comme le T0901317, entraîne un ralentissement du cycle cellulaire caractérisé par une diminution de l'accumulation de Skp2 [35]. Skp2 est une protéine responsable de la dégradation par le système ubiquitine-protéasome de protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que p27Kip1. Le traitement de cellules LNCaP par du T0901317 entraîne alors une augmentation de p27Kip1 qui est peu ou pas dégradée par le protéasome pouvant ainsi expliquer l'effet inhibiteur du T0901317 sur le cycle cellulaire. De plus, le traitement des cellules LNCaP avec du T0901317 provoque une augmentation de l'accumulation de ABCA1 et l'efflux du cholestérol vers le milieu extracellulaire cellulaire [35] (Figure 2). Les auteurs proposent ainsi que l'activité antiproliférative du T0901317 passe, au moins en partie, par cette diminution de la quantité de cholestérol intracellulaire.

Plus récemment nous avons mis en évidence l'activité pro-apoptotique des LXRs. Leur activation entraîne la

mort des cellules de LNCaP (*lymph node cancer prostate*) par apoptose et une inhibition de la croissance tumorale sur des modèles de xénogreffes [36]. Nos résultats montrent que l'activation des LXRs diminue la quantité de cholestérol intracellulaire par un contrôle transcriptionnel des transporteurs ABCG1, responsables, comme ABCA1, de l'efflux de cholestérol. L'analyse de la composition et des caractéristiques morphologiques des *rafts* membranaires par microscopie à force atomique a permis de montrer que cette diminution intracellulaire de cholestérol se traduisait par une réduction de leur taille mais aussi de leur activité. L'activation des LXRs s'accompagne d'une diminution importante de la protéine phospho-AKT, acteur clé dans les mécanismes de survie cellulaire connu pour être activé par phosphorylation au niveau des *rafts* (Figure 2). L'apport exogène de cholestérol maintient la phosphorylation de AKT dépendante des *rafts* et bloque ainsi l'apoptose induite par l'activation des LXRs.

Ainsi, ces données démontrent les propriétés « anti-oncogéniques » des LXRs, à la fois par leur action sur la biodisponibilité des androgènes au niveau des cellules prostatiques, sur l'accumulation de molécules clés du cycle cellulaire, et la modulation de la distribution du cholestérol dans les *rafts* lipidiques *via* le contrôle des cassettes d'efflux de cholestérol.

Conclusion

Qu'elle soit d'origine alimentaire ou bien la résultante de diverses dérégulations, une quantité élevée de cholestérol dans les cellules cancéreuses est un facteur favorisant la progression tumorale. Les composés pharmacologiques qui diminuent directement ou indirectement la quantité de cholestérol intracellulaire sont capables d'inhiber la prolifération et la survie cellulaire. La figure 2 schématise la gestion du cholestérol dans une cellule tumorale prostatique avec les acteurs (en rouge) qui favorisent la présence de cholestérol et donc la progression tumorale et à l'inverse, les acteurs (en vert) qui s'opposent à l'accumulation de cholestérol et inhibent le développement tumoral. Pour l'instant,

l'accumulation de cholestérol au niveau des *rafts* est le mécanisme principal par lequel le cholestérol favorise la survie et la prolifération cellulaire. Ainsi, l'action antiproliférative des statines ou des agonistes de LXR passe par une diminution de l'activité des *rafts*. Ce mécanisme largement décrit dans le cancer de la prostate s'étend plus largement à d'autres types de cancers. Actuellement, les recherches s'orientent logiquement vers l'étude de composés pharmacologiques capables d'inhiber la formation des *rafts* (edelfosine) et Mollinedo et al. présentent des résultats prometteurs quant à l'utilisation de l'edelfosine dans le traitement des myélomes multiples [37].

(Travaux en partie financés par la FRM, la Fondation BNP-Paribas, l'ARC, La Ligue Contre le Cancer, l'ARTP, la région Auvergne).

Références

- White C, J Pathol Bacteriol 1909 ; 13:3.
- Belot A et al, Rev Epidemiol Sante Publique 2008 ; 56:159.
- Gronberg H, Lancet 2003 ; 361:859.
- Watanabe M et al, Urol Oncol 2000 ; 5:274.
- Michaud DS et al, Cancer Causes Control 2001 ; 12:557.
- Kolonel LN et al, J Natl Cancer Inst 1999 ; 91: 414.
- Jacobs EJ & Gapstur SM, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 ; 18:2805.
- Eichholzer M et al, Am J Clin Nutr 2000 ; 71:569.
- Freeman MR & Solomon KR, J Cell Biochem 2004 ; 91:54.
- Ahn J et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 ; 18:2814.
- Law MR & Thompson SG, Cancer Causes Control 1991 ; 2:253.
- Platz EA et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 ; 18:2807.
- Murtola TJ et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007 ; 16:2226.
- Platz EA et al, J Natl Cancer Inst 2006 ; 98:1819.
- Flick ED et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007 ; 16:2218.
- Jacobs EJ et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007 ; 16:2213.
- Swyer G, Cancer Res 1942 ; 2:372.
- Graziani SR et al, Gynecol Oncol 2002 ; 85:493.
- Tatidis L et al, Biochem Pharmacol 2002 ; 63:2169.
- Chen Y & Hughes-Fulford M, Int J Cancer 2001 ; 91:41.
- Caruso MG et al, Anticancer Res 1999 ; 19:451.
- Nygren C et al, Br J Neurosurg 1997 ; 11:216.
- Satoh T et al, Cancer 2003 ; 97:1225.
- Yang G et al, Clin Cancer Res 1998 ; 4:1873.
- Tahir SA et al, Cancer Res 2001 ; 61:3882.
- Lasserre R et al, Nat Chem Biol 2008 ; 4:538.
- Zhuang L et al, J Clin Invest 2005 ; 115:959.
- Zhuang L et al, Cancer Res 2002 ; 62:2227.
- Mouzat K et al, Med Sci (Paris) 2009 ; 25:141.
- Swinin JV et al, J Steroid Biochem Mol Biol 2004 ; 92:273.
- Dillard PR et al, Mol Cell Endocrinol 2008 ; 295:115.
- Volle DH & Lobaccaro JM, Mol Cell Endocrinol 2007 ; 265-266:183.
- Zelcer N et al, Science 2009 ; 325:100.
- Lee JH et al, Endocrinology 2008 ; 149: 3778.
- Fukuchi J et al, Cancer Res 2004 ; 64:7686.
- Pommier AJ et al, Oncogene 2010 ; 29:2712.
- Mollinedo F et al, Oncogene 2010 ; 29:3748.
- Goldstein JL & Brown MS, Nature 1990 ; 343:425.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abate-Shen, C., Banach-Petrosky, W.A., Sun, X., Economides, K.D., Desai, N., Gregg, J.P., Borowsky, A.D., Cardiff, R.D., and Shen, M.M. (2003). Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res.* *63*, 3886–3890.
- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* *14*, 2410–2434.
- Abdulkadir, S.A., Magee, J.A., Peters, T.J., Kaleem, Z., Naughton, C.K., Humphrey, P.A., and Milbrandt, J. (2002). Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1495–1503.
- Abremski, K., and Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* *259*, 1509–1514.
- Alavanja, M.C., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C.F., Knott, C., Thomas, K., Hoppin, J.A., Barker, J., et al. (2003). Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. *Am J Epidemiol* *157*, 800–814.
- Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Bjorkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J.A. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest* *107*, 565–573.
- Algarté-Génin, M., Cussenot, O., and Costa, P. (2004). Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur. Urol.* *46*, 285–294; discussion 294–295.
- Alkarain, A., and Slingerland, J. (2004). Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *6*, 13–21.
- Alonso, D.F., Farina, H.G., Skilton, G., Gabri, M.R., De Lorenzo, M.S., and Gomez, D.E. (1998). Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Res. Treat.* *50*, 83–93.
- Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr, Zhu, L.-J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* *303*, 1201–1204.
- Amundadottir, L.T., Sulem, P., Gudmundsson, J., Helgason, A., Baker, A., Agnarsson, B.A., Sigurdsson, A., Benediksdottir, K.R., Cazier, J.-B., Sainz, J., et al. (2006). A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat. Genet.* *38*, 652–658.
- Anai, S., Goodison, S., Shiverick, K., Iczkowski, K., Tanaka, M., and Rosser, C.J. (2006). Combination of PTEN gene therapy and radiation inhibits the growth of human prostate cancer xenografts. *Hum. Gene Ther.* *17*, 975–984.
- Andjelković, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* *272*, 31515–31524.
- Andreoiu, M., and Cheng, L. (2010). Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum. Pathol.* *41*, 781–793.
- Armstrong, A.J., Freedland, S.J., and Garcia-Blanco, M. (2011). Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: providing new targets for therapy. *Asian J. Androl.* *13*, 179–180.

- Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., and Shirai, T. (2002). Effects of genetic background on prostate and taste bud carcinogenesis due to SV40 T antigen expression under probasin gene promoter control. *Carcinogenesis* 23, 463–467.
- Asatiani, E., Huang, W.-X., Wang, A., Rodriguez Ortner, E., Cavalli, L.R., Haddad, B.R., and Gelmann, E.P. (2005). Deletion, methylation, and expression of the NKX3.1 suppressor gene in primary human prostate cancer. *Cancer Res.* 65, 1164–1173.
- Aumais, J.P., Lee, H.S., DeGannes, C., Horsford, J., and White, J.H. (1996). Function of directly repeated half-sites as response elements for steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 271, 12568–12577.
- Backman, S.A., Ghazarian, D., So, K., Sanchez, O., Wagner, K.-U., Hennighausen, L., Suzuki, A., Tsao, M.-S., Chapman, W.B., Stambolic, V., et al. (2004). Early onset of neoplasia in the prostate and skin of mice with tissue-specific deletion of Pten. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 1725–1730.
- Barbanti-Brodano, G., Sabbioni, S., Martini, F., Negrini, M., Corallini, A., and Tognon, M. (2004). Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* 318, 1–9.
- Barbier, O., Trottier, J., Kaeding, J., Caron, P., and Verreault, M. (2009). Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol. Cell. Biochem.* 326, 3–8.
- Batty, G.D., Kivimäki, M., Clarke, R., Davey Smith, G., and Shipley, M.J. (2011). Modifiable risk factors for prostate cancer mortality in London: forty years of follow-up in the Whitehall study. *Cancer Causes Control* 22, 311–318.
- Baumann, N.A., Sullivan, D.P., Ohvo-Rekilä, H., Simonot, C., Pottekat, A., Klaassen, Z., Beh, C.T., and Menon, A.K. (2005). Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. *Biochemistry* 44, 5816–5826.
- Bayne, C.W., Ross, M., Donnelly, F., and Habib, F.K. (2000). The selectivity and specificity of the actions of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on the prostate. *J. Urol.* 164, 876–881.
- Bedolla, R., Prihoda, T.J., Kreisberg, J.I., Malik, S.N., Krishnegowda, N.K., Troyer, D.A., and Ghosh, P.M. (2007). Determining risk of biochemical recurrence in prostate cancer by immunohistochemical detection of PTEN expression and Akt activation. *Clin. Cancer Res.* 13, 3860–3867.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P., and Tsichlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274–277.
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159–175.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290, 1771–1775.
- Berger, A.H., and Pandolfi, P.P. (2011). Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. *J. Pathol.* 223, 137–146.

- Berquin, I.M., Min, Y., Wu, R., Wu, H., and Chen, Y.Q. (2005). Expression signature of the mouse prostate. *J Biol Chem* 280, 36442–36451.
- Bethel, C.R., Faith, D., Li, X., Guan, B., Hicks, J.L., Lan, F., Jenkins, R.B., Bieberich, C.J., and De Marzo, A.M. (2006). Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res.* 66, 10683–10690.
- Birbach, A., Casanova, E., and Schmid, J.A. (2009). A Probasin-MerCreMer BAC allows inducible recombination in the mouse prostate. *Genesis* 47, 757–764.
- Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Leal, J.F.M., and Carnero, A. (2007). PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 28, 1379–1386.
- Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19–28.
- Bloch, K. (1992). Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids* 57, 378–383.
- Boccon-Gibod, L., Iversen, P., and Persson, B.-E. (2009). Degarelix 240/80 mg: a new treatment option for patients with advanced prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 1737–1743.
- Bose, H.S., Lingappa, V.R., and Miller, W.L. (2002). The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocr. Res.* 28, 295–308.
- Bose, S.K., Bullard, R.S., and Donald, C.D. (2008). Oncogenic role of engrailed-2 (en-2) in prostate cancer cell growth and survival. *Transl Oncogenomics* 3, 37–43.
- Bostwick, D.G., Burke, H.B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S.M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D.J., et al. (2004a). Human prostate cancer risk factors. *Cancer* 101, 2371–2490.
- Bostwick, D.G., Liu, L., Brawer, M.K., and Qian, J. (2004b). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol* 6, 171–179.
- Boudreau, D.M., Yu, O., and Johnson, J. (2010). Statin use and cancer risk: a comprehensive review. *Expert Opin Drug Saf* 9, 603–621.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* 375, 377–382.
- Brown, J.M., and Yu, L. (2009). Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry* 9, 18–29.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191, 150–154.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1980). Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21, 505–517.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34–47.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331–340.

- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11041–11048.
- Brunham, L.R., Kruit, J.K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J.M., Pape, T.D., Coburn, B.A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A.K., et al. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* *116*, 1052–1062.
- Cai, C., Hsieh, C.-L., Omwancha, J., Zheng, Z., Chen, S.-Y., Baert, J.-L., and Shemshedini, L. (2007). ETV1 is a novel androgen receptor-regulated gene that mediates prostate cancer cell invasion. *Mol. Endocrinol.* *21*, 1835–1846.
- Calabresi, L., Favari, E., Moleri, E., Adorni, M.P., Pedrelli, M., Costa, S., Jessup, W., Gelissen, I.C., Kovanen, P.T., Bernini, F., et al. (2009). Functional LCAT is not required for macrophage cholesterol efflux to human serum. *Atherosclerosis* *204*, 141–146.
- Calkin, A.C., and Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 213–224.
- Caruso, M.G., Notarnicola, M., Santillo, M., Cavallini, A., and Di Leo, A. (1999). Enhanced 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase activity in human colorectal cancer not expressing low density lipoprotein receptor. *Anticancer Res* *19*, 451–454.
- Carver, B.S., Tran, J., Gopalan, A., Chen, Z., Shaikh, S., Carracedo, A., Alimonti, A., Nardella, C., Varmeh, S., Scardino, P.T., et al. (2009). Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat. Genet.* *41*, 619–624.
- Casimiro, M., Rodriguez, O., Pootrakul, L., Aventian, M., Lushina, N., Cromelin, C., Ferzli, G., Johnson, K., Fricke, S., Diba, F., et al. (2007). ErbB-2 induces the cyclin D1 gene in prostate epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *67*, 4364–4372.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Vaidya, S.A., Haberland, M., Fogelman, A.M., Cheng, G., and Tontonoz, P. (2003). Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* *12*, 805–816.
- Cato, A.C., Henderson, D., and Ponta, H. (1987). The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* *6*, 363–368.
- Cerveira, N., Ribeiro, F.R., Peixoto, A., Costa, V., Henrique, R., Jeronimo, C., and Teixeira, M.R. (2006). TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* *8*, 826–832.
- Cha, J.Y., and Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* *282*, 743–751.
- Chaible, L.M., Corat, M.A., Abdelhay, E., and Dagli, M.L.Z. (2010). Genetically modified animals for use in research and biotechnology. *Genet. Mol. Res.* *9*, 1469–1482.
- Chan, K.K.W., Oza, A.M., and Siu, L.L. (2003). The statins as anticancer agents. *Clin. Cancer Res.* *9*, 10–19.
- Chang, T.Y., Chang, C.C., and Cheng, D. (1997). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 613–638.

- Chavarro, J.E., Stampfer, M.J., Campos, H., Kurth, T., Willett, W.C., and Ma, J. (2008). A prospective study of trans-fatty acid levels in blood and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 95–101.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–1870.
- Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.
- Chen, M., Bradley, M.N., Beaven, S.W., and Tontonoz, P. (2006). Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Lett* 580, 4835–4841.
- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* 5, 73–79.
- Chen, Y., and Hughes-Fulford, M. (2001). Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer* 91, 41–45.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.
- Chuu, C.P., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Fukuchi, J., Chen, R.Y., and Liao, S. (2006). Inhibition of tumor growth and progression of LNCaP prostate cancer cells in athymic mice by androgen and liver X receptor agonist. *Cancer Res* 66, 6482–6486.
- Chuu, C.P., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (2007). Modulation of liver X receptor signaling as novel therapy for prostate cancer. *J Biomed Sci*.
- Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C.S., Eeles, R., Martin, F.L., Phillips, D.H., Crundwell, M., et al. (2007). Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26, 2667–2673.
- Coffer, P.J., and Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* 201, 475–481.
- Cooke, P.S., Young, P., and Cunha, G.R. (1991). Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* 128, 2867–2873.
- Cooperberg, M.R., Lubeck, D.P., Mehta, S.S., and Carroll, P.R. (2003). Time trends in clinical risk stratification for prostate cancer: implications for outcomes (data from CaPSURE). *J. Urol.* 170, S21–25; discussion S26–27.
- Cordon-Cardo, C., Koff, A., Drobnjak, M., Capodiceci, P., Osman, I., Millard, S.S., Gaudin, P.B., Fazzari, M., Zhang, Z.F., Massague, J., et al. (1998). Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1284–1291.
- Corsini, A., and Ceska, R. (2011). Drug-drug interactions with statins: will pitavastatin overcome the statins' Achilles' heel? *Curr Med Res Opin* 27, 1551–1562.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240–28245.

Covey, T.M., Edes, K., and Fitzpatrick, F.A. (2007). Akt activation by arachidonic acid metabolism occurs via oxidation and inactivation of PTEN tumor suppressor. *Oncogene* 26, 5784–5792.

Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2001). Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat. Genet.* 27, 222–224.

Crowe, F.L., Allen, N.E., Appleby, P.N., Overvad, K., Aardestrup, I.V., Johnsen, N.F., Tjønneland, A., Linseisen, J., Kaaks, R., Boeing, H., et al. (2008). Fatty acid composition of plasma phospholipids and risk of prostate cancer in a case-control analysis nested within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 88, 1353–1363.

Cuchel, M., and Rader, D.J. (2006). Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 113, 2548–2555.

Cummins, C.L., Volle, D.H., Zhang, Y., McDonald, J.G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Caira, F., Veysiére, G., Mangelsdorf, D.J., and Lobaccaro, J.M. (2006). Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest* 116, 1902–1912.

Cunha, G.R., and Lung, B. (1978). The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen-insensitive (Tfm) mice. *J. Exp. Zool.* 205, 181–193.

Cunha, G.R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P.C., Risbridger, G., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., Donjacour, A.A., and Kurita, T. (2004). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92, 221–236.

Cybulski, C., Gorski, B., Debniak, T., Gliniewicz, B., Mierzejewski, M., Masojc, B., Jakubowska, A., Matyjasik, J., Zlowocka, E., Sikorski, A., et al. (2004a). NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res* 64, 1215–1219.

Cybulski, C., Huzarski, T., Gorski, B., Masojc, B., Mierzejewski, M., Debniak, T., Gliniewicz, B., Matyjasik, J., Zlowocka, E., Kurzawski, G., et al. (2004b). A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 64, 2677–2679.

Dawson, M.I., and Xia, Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 21–56.

DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D.M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275–283.

Delcomenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11211–11216.

Delvecchio, C.J., and Capone, J.P. (2008). Protein kinase C alpha modulates liver X receptor alpha transactivation. *J. Endocrinol.* 197, 121–130.

Denechaud, P.D., Bossard, P., Lobaccaro, J.M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest* 118, 956–964.

Denis, L. (1998). European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) prostate cancer trials, 1976-1996. *Urology* 51, 50–57.

- Dentin, R., Denechaud, P.D., Benhamed, F., Girard, J., and Postic, C. (2006). Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP. *J Nutr* 136, 1145–1149.
- Dhir, R., Vietmeier, B., Arlotti, J., Acquafondata, M., Landsittel, D., Masterson, R., and Getzenberg, R.H. (2004). Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. *J. Urol.* 171, 1419–1423.
- DiBlasio-Smith, E.A., Arai, M., Quinet, E.M., Evans, M.J., Kornaga, T., Basso, M.D., Chen, L., Feingold, I., Halpern, A.R., Liu, Q.Y., et al. (2008). Discovery and implementation of transcriptional biomarkers of synthetic LXR agonists in peripheral blood cells. *J Transl Med* 6, 59.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., and Spady, D.K. (1993). Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* 34, 1637–1659.
- Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G.C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S.R., Labrot, E.S., Wu, X., Lis, R., et al. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* 470, 269–273.
- Djulgovic, M., Beyth, R.J., Neuberger, M.M., Stoffs, T.L., Vieweg, J., Djulgovic, B., and Dahm, P. (2010). Screening for prostate cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 341, c4543.
- Driscoll, S.G., and Taylor, S.H. (1980). Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system. *Obstet Gynecol* 56, 537–542.
- Du, X., Kumar, J., Ferguson, C., Schulz, T.A., Ong, Y.S., Hong, W., Prinz, W.A., Parton, R.G., Brown, A.J., and Yang, H. (2011). A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking. *J. Cell Biol.* 192, 121–135.
- Dufour, J., Viennois, E., De Boussac, H., Baron, S., and Lobaccaro, J.-M. (2012). Oxysterol receptors, AKT and prostate cancer. *Current Opinion in Pharmacology*.
- Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. (1997). Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 272, 12778–12785.
- Duval, C., Touche, V., Tailleux, A., Fruchart, J.-C., Fievet, C., Clavey, V., Staels, B., and Lestavel, S. (2006). Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1259–1263.
- Eastham, J.A., Stapleton, A.M., Gousse, A.E., Timme, T.L., Yang, G., Slawin, K.M., Wheeler, T.M., Scardino, P.T., and Thompson, T.C. (1995). Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 1, 1111–1118.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86, 839–848.
- Edwards, S.M., and Eeles, R.A. (2004). Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 129C, 65–73.
- Effert, P.J., McCoy, R.H., Walther, P.J., and Liu, E.T. (1993). p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J. Urol.* 150, 257–261.

- Elghany, N.A., Schumacher, M.C., Slattery, M.L., West, D.W., and Lee, J.S. (1990). Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology* *1*, 107–115.
- Ellwood-Yen, K., Graeber, T.G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M.L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G.V., and Sawyers, C.L. (2003). Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell* *4*, 223–238.
- Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M., and Tanzawa, K. (1977). Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur. J. Biochem.* *77*, 31–36.
- Espenshade, P.J. (2006). SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J. Cell. Sci.* *119*, 973–976.
- Faulds, M.H., Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2010). Molecular biology and functional genomics of liver X receptors (LXR) in relationship to metabolic diseases. *Curr Opin Pharmacol* *10*, 692–697.
- Feldman, B.J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 34–45.
- Fleming, W.H., Hamel, A., MacDonald, R., Ramsey, E., Pettigrew, N.M., Johnston, B., Dodd, J.G., and Matusik, R.J. (1986). Expression of the c-myc protooncogene in human prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Res.* *46*, 1535–1538.
- Flick, E.D., Habel, L.A., Chan, K.A., Van Den Eeden, S.K., Quinn, V.P., Haque, R., Orav, E.J., Seeger, J.D., Sadler, M.C., Quesenberry, C.P., et al. (2007). Statin use and risk of prostate cancer in the California Men's Health Study cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *16*, 2218–2225.
- Fontaine, C., Rigamonti, E., Pourcet, B., Duez, H., Duhem, C., Fruchart, J.-C., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2008). The nuclear receptor Rev-erbalpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol. Endocrinol.* *22*, 1797–1811.
- Foufelle, F., Hegarty, B., Bobard, A., Hainault, I., Bossard, P., and Ferré, P. (2005). [A new role for insulin in the control of energetic metabolism in liver]. *Med Sci (Paris)* *21*, 569–571.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* *275*, 665–668.
- Freeman, M.R., Cinar, B., Kim, J., Mukhopadhyay, N.K., Di Vizio, D., Adam, R.M., and Solomon, K.R. (2007). Transit of hormonal and EGF receptor-dependent signals through cholesterol-rich membranes. *Steroids* *72*, 210–217.
- Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2004). Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem* *91*, 54–69.
- Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2011). Cholesterol and benign prostate disease. *Differentiation* *82*, 244–252.
- Frye, S.V., Bramson, H.N., Hermann, D.J., Lee, F.W., Sinhababu, A.K., and Tian, G. (1998). Discovery and development of GG745, a potent inhibitor of both isozymes of 5 alpha-reductase. *Pharm Biotechnol* *11*, 393–422.
- Fukuchi, J., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Hsu, S., Ko, A.L., Fitzgerald, M.L., and Liao, S. (2004a). Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* *64*, 7682–7685.

- Fukuchi, J., Hiipakka, R.A., Kokontis, J.M., Hsu, S., Ko, A.L., Fitzgerald, M.L., and Liao, S. (2004b). Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 7682–7685.
- Fukuchi, J., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., Chuu, C.P., and Liao, S. (2004c). Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 64, 7686–7689.
- Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., Storey, S.M., Starodub, O., Petrescu, A.D., Huang, H., McIntosh, A.L., Martin, G.G., Chao, H., Kier, A.B., et al. (2001). Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. *Prog. Lipid Res.* 40, 498–563.
- Ganley, I.G., and Pfeffer, S.R. (2006). Cholesterol accumulation sequesters Rab9 and disrupts late endosome function in NPC1-deficient cells. *J. Biol. Chem.* 281, 17890–17899.
- Gao, H., Ouyang, X., Banach-Petrosky, W., Borowsky, A.D., Lin, Y., Kim, M., Lee, H., Shih, W.-J., Cardiff, R.D., Shen, M.M., et al. (2004). A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17204–17209.
- Gao, X., Porter, A.T., Grignon, D.J., Pontes, J.E., and Honn, K.V. (1997). Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate* 31, 264–281.
- Gary, B., Azuero, R., Mohanty, G.S., Bell, W.C., Eltoum, I.-E.A., and Abdulkadir, S.A. (2004). Interaction of Nkx3.1 and p27kip1 in prostate tumor initiation. *Am. J. Pathol.* 164, 1607–1614.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 534–540.
- Gelmann, E.P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. *J. Clin. Oncol.* 20, 3001–3015.
- Getzenberg, R.H., Pienta, K.J., Huang, E.Y., and Coffey, D.S. (1991). Identification of nuclear matrix proteins in the cancer and normal rat prostate. *Cancer Res.* 51, 6514–6520.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25, 57–70.
- Gill, S., Stevenson, J., Kristiana, I., and Brown, A.J. (2011). Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond HMG-CoA reductase. *Cell Metab.* 13, 260–273.
- Gingrich, J.R., Barrios, R.J., Kattan, M.W., Nahm, H.S., Finegold, M.J., and Greenberg, N.M. (1997). Androgen-independent prostate cancer progression in the TRAMP model. *Cancer Res.* 57, 4687–4691.
- Gingrich, J.R., Barrios, R.J., Morton, R.A., Boyce, B.F., DeMayo, F.J., Finegold, M.J., Angelopoulou, R., Rosen, J.M., and Greenberg, N.M. (1996). Metastatic prostate cancer in a transgenic mouse. *Cancer Res.* 56, 4096–4102.
- Gleason, D.F., and Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J. Urol.* 111, 58–64.
- Glomset, J.A. (1973). The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives from pathology. *Adv. Lipid Res.* 11, 1–65.

- Goedeke, L., and Fernández-Hernando, C. (2012). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 915–930.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124, 35–46.
- Goldstein, J.L., Rawson, R.B., and Brown, M.S. (2002). Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 139–148.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., et al. (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 6, 517–526.
- Goodwin, B., Watson, M.A., Kim, H., Miao, J., Kemper, J.K., and Kliewer, S.A. (2003). Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 17, 386–394.
- Gormley, G.J., Stoner, E., Bruskewitz, R.C., Imperato-McGinley, J., Walsh, P.C., McConnell, J.D., Andriole, G.L., Geller, J., Bracken, B.R., and Tenover, J.S. (1992). The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N. Engl. J. Med.* 327, 1185–1191.
- Graaf, M.R., Beiderbeck, A.B., Egberts, A.C., Richel, D.J., and Guchelaar, H.J. (2004). The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 22, 2388–2394.
- Graziani, S.R., Igreja, F.A., Hegg, R., Meneghetti, C., Brandizzi, L.I., Barboza, R., Amancio, R.F., Pinotti, J.A., and Maranhao, R.C. (2002). Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 85, 493–497.
- Greenberg, N.M., DeMayo, F., Finegold, M.J., Medina, D., Tilley, W.D., Aspinall, J.O., Cunha, G.R., Donjacour, A.A., Matusik, R.J., and Rosen, J.M. (1995). Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3439–3443.
- Greenberg, N.M., DeMayo, F.J., Sheppard, P.C., Barrios, R., Lebovitz, R., Finegold, M., Angelopoulou, R., Dodd, J.G., Duckworth, M.L., and Rosen, J.M. (1994). The rat probasin gene promoter directs hormonally and developmentally regulated expression of a heterologous gene specifically to the prostate in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 8, 230–239.
- Grundy, S.M. (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu. Rev. Nutr.* 3, 71–96.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Saitoh, M., Kinkel, S., Crosby, K., Sheen, J.H., Mullholland, D.J., Magnuson, M.A., Wu, H., and Sabatini, D.M. (2009). mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice. *Cancer Cell* 15, 148–159.
- Guo, D., Reinitz, F., Youssef, M., Hong, C., Nathanson, D., Akhavan, D., Kuga, D., Amzajerdi, A.N., Soto, H., Zhu, S., et al. (2011). An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discov* 1, 442–456.
- Gupta, A., Gupta, S., Pavuk, M., and Roehrborn, C.G. (2006). Anthropometric and metabolic factors and risk of benign prostatic hyperplasia: a prospective cohort study of Air Force veterans. *Urology* 68, 1198–1205.

- Gurel, B., Iwata, T., Koh, C.M., Yegnasubramanian, S., Nelson, W.G., and De Marzo, A.M. (2008). Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets. *Adv Anat Pathol* 15, 319–331.
- Gutman, EB, Sproul, EE, and Gutman, AB (1936). Significance of increased phosphatase activity at the site of osteoplastic metastases secondary to carcinoma of the prostate gland. *Am J Cancer* 28, 485–495.
- Haas, G.P., Delongchamps, N., Brawley, O.W., Wang, C.Y., and De la Roza, G. (2008). The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 15, 3866–3871.
- Haese, A., De la Taille, A., Van Poppel, H., Marberger, M., Stenzl, A., Mulders, P.F.A., Huland, H., Abbou, C.-C., Remzi, M., Tinzl, M., et al. (2008). Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur. Urol.* 54, 1081–1088.
- Haidar, B., Kiss, R.S., Sarov-Blat, L., Brunet, R., Harder, C., McPherson, R., and Marcel, Y.L. (2006). Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. *J. Biol. Chem.* 281, 39971–39981.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Haute Autorité de Santé (2012). Cancer de la prostate : identification des facteurs de risque et pertinence d'un dépistage par dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA) de populations d'hommes à haut risque ?
- Hegarty, B.D., Bobard, A., Hainault, I., Ferré, P., Bossard, P., and Foufelle, F. (2005). Distinct roles of insulin and liver X receptor in the induction and cleavage of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 791–796.
- Hessels, D., Klein Gunnewiek, J.M.T., Van Oort, I., Karthaus, H.F.M., Van Leenders, G.J.L., Van Balken, B., Kiemeny, L.A., Witjes, J.A., and Schalken, J.A. (2003). DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur. Urol.* 44, 8–15; discussion 15–16.
- Hessels, D., Smit, F.P., Verhaegh, G.W., Witjes, J.A., Cornel, E.B., and Schalken, J.A. (2007). Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 5103–5108.
- Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M., and Sato, R. (2003). Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 16809–16819.
- Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., and Sato, R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 36431–36437.
- Hölttä-Vuori, M., Tanhuanpää, K., Möbius, W., Somerharju, P., and Ikonen, E. (2002). Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol. Biol. Cell* 13, 3107–3122.
- Hooper, N.M. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* 16, 145–156.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397–404.

- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* *109*, 1125–1131.
- Horton, J.D., and Shimomura, I. (1999). Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol.* *10*, 143–150.
- Houck, K.A., Borchert, K.M., Hepler, C.D., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Michael, L.F., and Burris, T.P. (2004). T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Mol Genet Metab* *83*, 184–187.
- Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D.S. (2003). Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol* *17*, 1019–1026.
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 11603–11607.
- Huang, J., Powell, W.C., Khodavirdi, A.C., Wu, J., Makita, T., Cardiff, R.D., Cohen, M.B., Sucov, H.M., and Roy-Burman, P. (2002). Prostatic intraepithelial neoplasia in mice with conditional disruption of the retinoid X receptor alpha allele in the prostate epithelium. *Cancer Res* *62*, 4812–4819.
- Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., and Thompson, E.W. (2007). Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression. *J. Cell. Physiol.* *213*, 374–383.
- Huxley, R. (2007). The impact of modifiable risk factors on mortality from prostate cancer in populations of the Asia-Pacific region. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *8*, 199–205.
- Imperato-McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T., and Peterson, R.E. (1974). Steroid 5alpha-reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* *186*, 1213–1215.
- Institut National du Cancer (2010). Les traitements du cancer de la prostate.
- Ishani, A., MacDonald, R., Nelson, D., Rutks, I., and Wilt, T.J. (2000). Pygeum africanum for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: a systematic review and quantitative meta-analysis. *Am. J. Med.* *109*, 654–664.
- Iyer, A.K., and McCabe, E.R.B. (2004). Molecular mechanisms of DAX1 action. *Mol. Genet. Metab.* *83*, 60–73.
- Jack, R.H., Davies, E.A., and Møller, H. (2007). Testis and prostate cancer incidence in ethnic groups in South East England. *Int. J. Androl.* *30*, 215–220; discussion 220–221.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* *383*, 728–731.
- Jasińska, M., Owczarek, J., and Orszulak-Michalak, D. (2007). Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep* *59*, 483–499.
- Jeet, V., Russell, P.J., and Khatri, A. (2010). Modeling prostate cancer: a perspective on transgenic mouse models. *Cancer Metastasis Rev.* *29*, 123–142.

- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., and Tall, A.R. (1997). Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272, 20982–20985.
- Jöbsis, A.C., De Vries, G.P., Meijer, A.E., and Ploem, J.S. (1981). The immunohistochemical detection of prostatic acid phosphatase: its possibilities and limitations in tumour histochemistry. *Histochem. J.* 13, 961–973.
- Johansson, M., Bocher, V., Lehto, M., Chinetti, G., Kuismanen, E., Ehnholm, C., Staels, B., and Olkkonen, V.M. (2003). The two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct. *Mol. Biol. Cell* 14, 903–915.
- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 245–256.
- Joniau, S., Goeman, L., Pennings, J., and Van Poppel, H. (2005). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): importance and clinical management. *Eur Urol* 48, 379–385.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213–219.
- 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. (2002a). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem* 277, 11019–11025.
- Joseph, S.B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M.A., Collins, A.R., Laffitte, B.A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G.N., et al. (2002b). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7604–7609.
- Joshua, A.M., Evans, A., Van der Kwast, T., Zielenska, M., Meeker, A.K., Chinnaiyan, A., and Squire, J.A. (2008). Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 156–181.
- Kandutsch, A.A., and Russell, A.E. (1960). Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J. Biol. Chem.* 235, 2256–2261.
- Kandutsch, A.A., and Shown, E.P. (1981). Assay of oxysterol-binding protein in a mouse fibroblast, cell-free system. Dissociation constant and other properties of the system. *J. Biol. Chem.* 256, 13068–13073.
- Kaneko, E., Matsuda, M., Yamada, Y., Tachibana, Y., Shimomura, I., and Makishima, M. (2003). Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 278, 36091–36098.
- Kang-Park, S., Lee, Y.I., and Lee, Y.I. (2003). PTEN modulates insulin-like growth factor II (IGF-II)-mediated signaling; the protein phosphatase activity of PTEN downregulates IGF-II expression in hepatoma cells. *FEBS Lett.* 545, 203–208.
- Kasper, S. (2005). Survey of genetically engineered mouse models for prostate cancer: analyzing the molecular basis of prostate cancer development, progression, and metastasis. *J. Cell. Biochem.* 94, 279–297.
- Kasper, S., Sheppard, P.C., Yan, Y., Pettigrew, N., Borowsky, A.D., Prins, G.S., Dodd, J.G., Duckworth, M.L., and Matusik, R.J. (1998). Development, progression, and androgen-dependence of prostate tumors in probasin-large T antigen transgenic mice: a model for prostate cancer. *Lab. Invest.* 78, i–xv.

- Katz, A., Udata, C., Ott, E., Hickey, L., Burczynski, M.E., Burghart, P., Vesterqvist, O., and Meng, X. (2009). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. *J Clin Pharmacol* 49, 643–649.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1, 121–131.
- Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. (2001). Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 276, 39438–39447.
- Kim, H.J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2009). Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 558–563.
- Kim, M.J., Bhatia-Gaur, R., Banach-Petrosky, W.A., Desai, N., Wang, Y., Hayward, S.W., Cunha, G.R., Cardiff, R.D., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2002a). Nkx3.1 mutant mice recapitulate early stages of prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 2999–3004.
- Kim, M.J., Cardiff, R.D., Desai, N., Banach-Petrosky, W.A., Parsons, R., Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2002b). Cooperativity of Nkx3.1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2884–2889.
- Klein, R.D. (2005). The use of genetically engineered mouse models of prostate cancer for nutrition and cancer chemoprevention research. *Mutat. Res.* 576, 111–119.
- Klotz, L. (2006). Combined androgen blockade: an update. *Urol. Clin. North Am.* 33, 161–166, v–vi.
- Knudson, A.G., Jr (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 820–823.
- De Kok, J.B., Verhaegh, G.W., Roelofs, R.W., Hessels, D., Kiemeny, L.A., Aalders, T.W., Swinkels, D.W., and Schalken, J.A. (2002). DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 62, 2695–2698.
- Kopper, L., and Tímár, J. (2005). Genomics of prostate cancer: is there anything to “translate”? *Pathol. Oncol. Res.* 11, 197–203.
- Kristal, A.R., Arnold, K.B., Schenk, J.M., Neuhauser, M.L., Goodman, P., Penson, D.F., and Thompson, I.M. (2008). Dietary patterns, supplement use, and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *Am. J. Epidemiol.* 167, 925–934.
- Krycer, J.R., and Brown, A.J. (2011). Cross-talk between the androgen receptor and the liver X receptor: implications for cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286, 20637–20647.
- Kuhn, E.J., Kurnot, R.A., Sesterhenn, I.A., Chang, E.H., and Moul, J.W. (1993). Expression of the c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein in human prostatic carcinoma. *J. Urol.* 150, 1427–1433.
- Kutscher, W Wolbergs, H (1935). Prostataphosphatase. *Ztschr. F. Physiol. Chem* 236,237.

- Laffitte, B.A., Chao, L.C., Li, J., Walczak, R., Hummasti, S., Joseph, S.B., Castrillo, A., Wilpitz, D.C., Mangelsdorf, D.J., Collins, J.L., et al. (2003a). Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 5419–5424.
- Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Chen, M., Castrillo, A., Repa, J., Wilpitz, D., Mangelsdorf, D., and Tontonoz, P. (2003b). The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2182–2191.
- Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 507–512.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J.P., Van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., et al. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 811–816.
- Lasnitzki, I., and Mizuno, T. (1980). Antagonistic effects of cyproterone acetate and oestradiol on the development of the fetal rat prostate gland induced by androgens in organ culture. *Prostate* *1*, 147–156.
- Lasserre, R., Guo, X.J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A.M., Soudja, S.M., Lenne, P.F., Rigneault, H., Olive, D., et al. (2008). Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat Chem Biol* *4*, 538–547.
- Latil, A., Bieche, I., Pesche, S., Volant, A., Valeri, A., Fournier, G., Cussenot, O., and Lidereau, R. (1999). Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer. *Hum Pathol* *30*, 809–815.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* *19*, 207–226.
- Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Fauré, J., and Gruenberg, J. (2002). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *EMBO J.* *21*, 1289–1300.
- Lee, M., Metso, J., Jauhiainen, M., and Kovanen, P.T. (2003). Degradation of phospholipid transfer protein (PLTP) and PLTP-generated pre-beta-high density lipoprotein by mast cell chymase impairs high affinity efflux of cholesterol from macrophage foam cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 13539–13545.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* *272*, 3137–3140.
- Lei, Q., Jiao, J., Xin, L., Chang, C.-J., Wang, S., Gao, J., Gleave, M.E., Witte, O.N., Liu, X., and Wu, H. (2006). NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell* *9*, 367–378.
- Leow, C.C., Wang, X.-D., and Gao, W.-Q. (2005). Novel method of generating prostate-specific Cre-LoxP gene switching via intraductal delivery of adenovirus. *Prostate* *65*, 1–9.
- Lesche, R., Groszer, M., Gao, J., Wang, Y., Messing, A., Sun, H., Liu, X., and Wu, H. (2002). Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis* *32*, 148–149.

- Levin, N., Bischoff, E.D., Daige, C.L., Thomas, D., Vu, C.T., Heyman, R.A., Tangirala, R.K., and Schulman, I.G. (2005). Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 135–142.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., et al. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* *275*, 1943–1947.
- Li, X., Yeh, V., and Molteni, V. (2010). Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007 - 2009). *Expert Opin Ther Pat* *20*, 535–562.
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007a). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* *28*, 91–106.
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007b). SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR. *Mol Cell* *28*, 91–106.
- Lilja, H., Ulmert, D., Björk, T., Becker, C., Serio, A.M., Nilsson, J.-A., Abrahamsson, P.-A., Vickers, A.J., and Berglund, G. (2007). Long-term prediction of prostate cancer up to 25 years before diagnosis of prostate cancer using prostate kallikreins measured at age 44 to 50 years. *J. Clin. Oncol.* *25*, 431–436.
- Linder, M.D., Uronen, R.-L., Hölttä-Vuori, M., Van der Sluijs, P., Peränen, J., and Ikonen, E. (2007). Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 47–56.
- Linsel-Nitschke, P., and Tall, A.R. (2005). HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 193–205.
- Litvinov, I.V., De Marzo, A.M., and Isaacs, J.T. (2003). Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 2972–2982.
- Llaverias, G., Danilo, C., Wang, Y., Witkiewicz, A.K., Daumer, K., Lisanti, M.P., and Frank, P.G. (2010). A Western-type diet accelerates tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Am J Pathol* *177*, 3180–3191.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* *6*, 507–515.
- Luchman, H.A., Benediktsson, H., Villemare, M.L., Peterson, A.C., and Jirik, F.R. (2008). The pace of prostatic intraepithelial neoplasia development is determined by the timing of Pten tumor suppressor gene excision. *PLoS ONE* *3*, e3940.
- Luo, J., Duggan, D.J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C.M., Bittner, M.L., Trent, J.M., and Isaacs, W.B. (2001). Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res.* *61*, 4683–4688.
- Ma, P.T., Gil, G., Südhof, T.C., Bilheimer, D.W., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1986). Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 8370–8374.
- Ma, X., Ziel-van der Made, A.C., Autar, B., Van der Korput, H.A., Vermeij, M., Van Duijn, P., Cleutjens, K.B., De Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A., et al. (2005). Targeted biallelic

inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer Res.* *65*, 5730–5739.

Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* *273*, 13375–13378.

Magura, L., Blanchard, R., Hope, B., Beal, J.R., Schwartz, G.G., and Sahmoun, A.E. (2008). Hypercholesterolemia and prostate cancer: a hospital-based case-control study. *Cancer Causes Control* *19*, 1259–1266.

Maier, D., Jones, G., Li, X., Schönthal, A.H., Gratzl, O., Van Meir, E.G., and Merlo, A. (1999). The PTEN lipid phosphatase domain is not required to inhibit invasion of glioma cells. *Cancer Res.* *59*, 5479–5482.

Majumder, P.K., Yeh, J.J., George, D.J., Febbo, P.G., Kum, J., Xue, Q., Bikoff, R., Ma, H., Kantoff, P.W., Golub, T.R., et al. (2003). Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 7841–7846.

Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* *83*, 841–850.

Marker, P.C., Donjacour, A.A., Dahiya, R., and Cunha, G.R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. *Dev. Biol.* *253*, 165–174.

Martelli, A.M., Tazzari, P.L., Evangelisti, C., Chiarini, F., Blalock, W.L., Billi, A.M., Manzoli, L., McCubrey, J.A., and Cocco, L. (2007). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. *Curr. Med. Chem.* *14*, 2009–2023.

Mastaglia, F.L. (2010). Iatrogenic myopathies. *Curr. Opin. Neurol.* *23*, 445–449.

Masumori, N., Thomas, T.Z., Chaurand, P., Case, T., Paul, M., Kasper, S., Caprioli, R.M., Tsukamoto, T., Shappell, S.B., and Matusik, R.J. (2001). A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer Res.* *61*, 2239–2249.

Maxfield, F.R., and Wüstner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* *110*, 891–898.

McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* *1773*, 1263–1284.

McVary, K.T. (2003). Clinical Evaluation of Benign Prostatic Hyperplasia. *Reviews in Urology* *5*, S3.

Meeks, J.J., and Schaeffer, E.M. (2011). Genetic regulation of prostate development. *J. Androl.* *32*, 210–217.

Mitro, N., Vargas, L., Romeo, R., Koder, A., and Saez, E. (2007). T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett* *581*, 1721–1726.

Molinié, V., Hervé, J.-M., Lugagne, P.-M., Yonneau, L., Ellard, S., Lebret, T., and Botto, H. (2005). [Value of new prostate cancer markers: alpha methylacyl CoA racemase (P504S) and p63]. *Prog. Urol.* *15*, 611–615.

- Mondul, A.M., Clipp, S.L., Helzlsouer, K.J., and Platz, E.A. (2010). Association between plasma total cholesterol concentration and incident prostate cancer in the CLUE II cohort. *Cancer Causes Control* 21, 61–68.
- Morello, F., De Boer, R.A., Steffensen, K.R., Gneccchi, M., Chisholm, J.W., Boomsma, F., Anderson, L.M., Lawn, R.M., Gustafsson, J.-A., Lopez-Illasaca, M., et al. (2005). Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J. Clin. Invest.* 115, 1913–1922.
- Morgan, R., Boxall, A., Bhatt, A., Bailey, M., Hindley, R., Langley, S., Whitaker, H.C., Neal, D.E., Ismail, M., Whitaker, H., et al. (2011). Engrailed-2 (EN2): a tumor specific urinary biomarker for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 17, 1090–1098.
- Morris, D.S., Tomlins, S.A., Montie, J.E., and Chinnaiyan, A.M. (2008). The discovery and application of gene fusions in prostate cancer. *BJU Int.* 102, 276–282.
- Mouzat, K., Alves, G., Pommier, A., Viennois, E., Pihen, T., Caira, F., Baron, S., and JM, A.L. (2009a). [Nuclear liver X receptors are involved in the biology of reproduction]. *Med Sci (Paris)* 25, 141–144.
- Mouzat, K., Prod'homme, M., Volle, D.H., Sion, B., Dechelotte, P., Gauthier, K., Vanacker, J.M., and Lobaccaro, J.M. (2007). Oxysterol nuclear receptor LXRBeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 282, 4693–4701.
- Mouzat, K., Volat, F., Baron, S., Alves, G., Pommier, A.J., Volle, D.H., Marceau, G., DeHaze, A., Dechelotte, P., Duggavathi, R., et al. (2009b). Absence of nuclear receptors for oxysterols liver X receptor induces ovarian hyperstimulation syndrome in mice. *Endocrinology* 150, 3369–3375.
- Mulholland, D.J., Tran, L.M., Li, Y., Cai, H., Morim, A., Wang, S., Plaisier, S., Garraway, I.P., Huang, J., Graeber, T.G., et al. (2011). Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth. *Cancer Cell* 19, 792–804.
- Mullen, P.J., Lüscher, B., Scharnagl, H., Krähenbühl, S., and Brecht, K. (2010). Effect of simvastatin on cholesterol metabolism in C2C12 myotubes and HepG2 cells, and consequences for statin-induced myopathy. *Biochem. Pharmacol.* 79, 1200–1209.
- Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 13513–13518.
- Naik, S.U., Wang, X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 113, 90–97.
- Nakanishi, H., Groskopf, J., Fritsche, H.A., Bhadkamkar, V., Blase, A., Kumar, S.V., Davis, J.W., Troncoso, P., Rittenhouse, H., and Babaian, R.J. (2008). PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J. Urol.* 179, 1804–1809; discussion 1809–1810.
- Nandi, S., Ma, L., Denis, M., Karwatsky, J., Li, Z., Jiang, X.-C., and Zha, X. (2009). ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. *J. Lipid Res.* 50, 456–466.
- Nasi, S., Ciarapica, R., Jucker, R., Rosati, J., and Soucek, L. (2001). Making decisions through Myc. *FEBS Lett.* 490, 153–162.

- Navone, N.M., Troncoso, P., Pisters, L.L., Goodrow, T.L., Palmer, J.L., Nichols, W.W., Von Eschenbach, A.C., and Conti, C.J. (1993). p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *85*, 1657–1669.
- Ngo, M., and Ridgway, N.D. (2009). Oxysterol binding protein-related Protein 9 (ORP9) is a cholesterol transfer protein that regulates Golgi structure and function. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1388–1399.
- Ogawa, D., Stone, J.F., Takata, Y., Blaschke, F., Chu, V.H., Towler, D.A., Law, R.E., Hsueh, W.A., and Bruemmer, D. (2005). Liver x receptor agonists inhibit cytokine-induced osteopontin expression in macrophages through interference with activator protein-1 signaling pathways. *Circ Res* *96*, e59–67.
- Ogunlewe, J.O., and Osegbe, D.N. (1989). Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate. *Cancer* *63*, 1388–1392.
- Oram, J.F., and Yokoyama, S. (1996). Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid Res.* *37*, 2473–2491.
- Osborne, T.F. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* *275*, 32379–32382.
- Ow, K.T., Mameghan, H., Lochhead, A., Fisher, R., Yang, J.L., Mameghan, J., Andersen, S., and Russell, P.J. (1995). The prognostic significance of tumor-associated markers p53, HER-2/neu, c-myc, v-H-ras, PCNA and EGFr of local and distant recurrence in localized human prostatic adenocarcinoma. *Urol. Oncol.* *1*, 144–152.
- Pal, R.P., Maitra, N.U., Mellon, J.K., and Khan, M.A. (2012). Defining prostate cancer risk before prostate biopsy. *Urologic Oncology*.
- Parisotto, M., Brodeur, H., Bhat, P.V., and Mader, S. (2006). [Retinoid metabolism and cancer]. *Med Sci (Paris)* *22*, 1101–1106.
- Parker, R.A., Clark, R.W., Sit, S.Y., Lanier, T.L., Grosso, R.A., and Wright, J.J. (1990). Selective inhibition of cholesterol synthesis in liver versus extrahepatic tissues by HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* *31*, 1271–1282.
- Parsons, J.K., Carter, H.B., Partin, A.W., Windham, B.G., Metter, E.J., Ferrucci, L., Landis, P., and Platz, E.A. (2006). Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 2562–2568.
- Patra, S.K. (2008). Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1785*, 182–206.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* *93*, 693–704.
- Pelton, K., Freeman, M.R., and Solomon, K.R. (2012). Cholesterol and prostate cancer. *Current Opinion in Pharmacology*.
- Pipas, J.M., and Levine, A.J. (2001). Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* *11*, 23–30.
- Platz, E.A., Till, C., Goodman, P.J., Parnes, H.L., Figg, W.D., Albanes, D., Neuhausser, M.L., Klein, E.A., Thompson, I.M., and Kristal, A.R. (2009). Men with low serum cholesterol have a lower risk of

high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *18*, 2807–2813.

Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R. (1999). Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1563–1568.

Pommier, A.J., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Caira, F., et al. (2010). Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* *29*, 2712–2723.

Ponting, C.P., and Aravind, L. (1999). START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 130–132.

Prins, G.S., and Birch, L. (1995). The developmental pattern of androgen receptor expression in rat prostate lobes is altered after neonatal exposure to estrogen. *Endocrinology* *136*, 1303–1314.

Prins, G.S., Birch, L., Couse, J.F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., and Korach, K.S. (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. *Cancer Res.* *61*, 6089–6097.

Prins, G.S., and Putz, O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation* *76*, 641–659.

Prinz, W.A. (2007). Non-vesicular sterol transport in cells. *Prog. Lipid Res.* *46*, 297–314.

Pritchard, C.C., and Nelson, P.S. (2008). Gene expression profiling in the developing prostate. *Differentiation* *76*, 624–640.

Priulla, M., Calastretti, A., Bruno, P., Azzariti, A., Amalia, A., Paradiso, A., Canti, G., and Nicolini, A. (2007). Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *Prostate* *67*, 782–789.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (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*, 6511–6518.

Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H., and Georgescu, M.-M. (2003). PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6139–6149.

Ratnacaram, C.K., Teletin, M., Jiang, M., Meng, X., Chambon, P., and Metzger, D. (2008). Temporally controlled ablation of PTEN in adult mouse prostate epithelium generates a model of invasive prostatic adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 2521–2526.

Rebbeck, T.R., Walker, A.H., Zeigler-Johnson, C., Weisburg, S., Martin, A.M., Nathanson, K.L., Wein, A.J., and Malkowicz, S.B. (2000). Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am J Hum Genet* *67*, 1014–1019.

Reddick, R.L., Zhang, S.H., and Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler. Thromb.* *14*, 141–147.

Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S., et al. (2001). Apolipoprotein

specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *280*, 818–823.

Rennert, H., Bercovich, D., Hubert, A., Abeliovich, D., Rozovsky, U., Bar-Shira, A., Soloviov, S., Schreiber, L., Matzkin, H., Rennert, G., et al. (2002). A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* *71*, 981–984.

Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* *277*, 18793–18800.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* *14*, 2819–2830.

Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 459–481.

Rodriguez, O.C., Lai, E.W., Vissapragada, S., Cromelin, C., Avetian, M., Salinas, P., Ramos, H., Kallakury, B., Casimiro, M., Lisanti, M.P., et al. (2009). A reduction in Pten tumor suppressor activity promotes ErbB-2-induced mouse prostate adenocarcinoma formation through the activation of signaling cascades downstream of PDK1. *Am. J. Pathol.* *174*, 2051–2060.

Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L., and Mitschelen, J.J. (1976). Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* *14*, 1–74.

Roobol, M.J., Schröder, F.H., Van Leeuwen, P., Wolters, T., Van den Bergh, R.C.N., Van Leenders, G.J.L.H., and Hessels, D. (2010). Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur. Urol.* *58*, 475–481.

Ross, J.S., Nazeer, T., Church, K., Amato, C., Figge, H., Rifkin, M.D., and Fisher, H.A. (1993). Contribution of HER-2/neu oncogene expression to tumor grade and DNA content analysis in the prediction of prostatic carcinoma metastasis. *Cancer* *72*, 3020–3028.

Rostad, K., Hellwinkel, O.J.C., Haukaas, S.A., Halvorsen, O.J., Øyan, A.M., Haese, A., Budäus, L., Albrecht, H., Akslén, L.A., Schlomm, T., et al. (2009). TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis. *APMIS* *117*, 575–582.

Rough, J.J., Monroy, M.A., Yerrum, S., and Daly, J.M. (2010). Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res* *3*, 13.

Roy, M., Kung, H.-J., and Ghosh, P.M. (2011). Statins and prostate cancer: role of cholesterol inhibition vs. prevention of small GTP-binding proteins. *Am J Cancer Res* *1*, 542–561.

Ruska, K.M., Sauvageot, J., and Epstein, J.I. (1998). Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am. J. Surg. Pathol.* *22*, 1073–1077.

Russell, D.W., and Setchell, K.D. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* *31*, 4737–4749.

Russell, P.J., and Khatri, A. (2006). Novel gene-directed enzyme prodrug therapies against prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* *15*, 947–961.

- Sabol, S.L., Brewer, H.B., and Santamarina-Fojo, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 46, 2151–2167.
- Saez, F., Chabory, E., Cadet, R., Vernet, P., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A., and Drevet, J.R. (2007). Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J. Androl.* 9, 574–582.
- Salami, S.S., Schmidt, F., Laxman, B., Regan, M.M., Rickman, D.S., Scherr, D., Bueti, G., Siddiqui, J., Tomlins, S.A., Wei, J.T., et al. (2011). Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol. Oncol.*
- Salomon, L., Azria, D., Bastide, C., Beuzeboc, P., Cormier, L., Cornud, F., Eiss, D., Eschwège, P., Gaschignard, N., Hennequin, C., et al. (2010). [Recommendations Onco-Urology 2010: Prostate cancer]. *Prog. Urol.* 20 *Suppl* 4, S217–251.
- Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Brogna, C., Piccirilli, M., D'Andrea, G., Occhiogrosso, G., Pichierri, A., and Caroli, E. (2005). Brain metastasis from prostate cancer. Report of 13 cases and critical analysis of the literature. *J Exp Clin Cancer Res* 24, 203–207.
- Sarma, A.V., Parsons, J.K., McVary, K., and Wei, J.T. (2009). Diabetes and benign prostatic hyperplasia/lower urinary tract symptoms--what do we know? *J. Urol.* 182, S32–37.
- Scheble, V.J., Braun, M., Beroukhim, R., Mermel, C.H., Ruiz, C., Wilbertz, T., Stiedl, A.-C., Petersen, K., Reischl, M., Kuefer, R., et al. (2010). ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Mod. Pathol.* 23, 1061–1067.
- Scherl, A., Li, J.-F., Cardiff, R.D., and Schreiber-Agus, N. (2004). Prostatic intraepithelial neoplasia and intestinal metaplasia in prostates of probasin-RAS transgenic mice. *Prostate* 59, 448–459.
- Schneider, A., Brand, T., Zweigerdt, R., and Arnold, H. (2000). Targeted disruption of the Nkx3.1 gene in mice results in morphogenetic defects of minor salivary glands: parallels to glandular duct morphogenesis in prostate. *Mech Dev* 95, 163–174.
- Schroepfer, G.J. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* 80, 361–554.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14, 2831–2838.
- Selman, S.H. (2011). The McNeal prostate: a review. *Urology* 78, 1224–1228.
- Shafique, K., McLoone, P., Qureshi, K., Leung, H., Hart, C., and Morrison, D.S. (2012). Cholesterol and the risk of grade-specific prostate cancer incidence: evidence from two large prospective cohort studies with up to 37 years' follow up. *BMC Cancer* 12, 25.
- Shannon, J., Tewoderos, S., Garzotto, M., Beer, T.M., Derenick, R., Palma, A., and Farris, P.E. (2005a). Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 162, 318–325.
- Shannon, J., Tewoderos, S., Garzotto, M., Beer, T.M., Derenick, R., Palma, A., and Farris, P.E. (2005b). Statins and prostate cancer risk: a case-control study. *Am J Epidemiol* 162, 318–325.
- Shannon, J.M., and Cunha, G.R. (1983). Autoradiographic localization of androgen binding in the developing mouse prostate. *Prostate* 4, 367–373.

- Shen, W.H., Balajee, A.S., Wang, J., Wu, H., Eng, C., Pandolfi, P.P., and Yin, Y. (2007). Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* *128*, 157–170.
- Shenoy, S.D., Spencer, T.A., Mercer-Haines, N.A., Alipour, M., Gargano, M.D., Runge-Morris, M., and Kocarek, T.A. (2004). CYP3A induction by liver x receptor ligands in primary cultured rat and mouse hepatocytes is mediated by the pregnane X receptor. *Drug Metab. Dispos.* *32*, 66–71.
- Shim, E.-H., Johnson, L., Noh, H.-L., Kim, Y.-J., Sun, H., Zeiss, C., and Zhang, H. (2003). Expression of the F-box protein SKP2 induces hyperplasia, dysplasia, and low-grade carcinoma in the mouse prostate. *Cancer Res.* *63*, 1583–1588.
- Shinar, D.M., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Rodan, G.A., and Schmidt, A. (1994). NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* *147*, 273–276.
- Simard, J., Dumont, M., Labuda, D., Sinnett, D., Meloche, C., El-Alfy, M., Berger, L., Lees, E., Labrie, F., and Tavtigian, S.V. (2003). Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed. *Endocr. Relat. Cancer* *10*, 225–259.
- Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D., Grönberg, H., Xu, J., Isaacs, S.D., Brownstein, M.J., Bova, G.S., Guo, H., Bujnovszky, P., et al. (1996). Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* *274*, 1371–1374.
- Sobel, R.E., and Sadar, M.D. (2005). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J. Urol.* *173*, 342–359.
- Sobin, L.H., Hjernstad, B.M., Sesterhenn, I.A., and Helwig, E.B. (1986). Prostatic acid phosphatase activity in carcinoid tumors. *Cancer* *58*, 136–138.
- Soccio, R.E., and Breslow, J.L. (2003). StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* *278*, 22183–22186.
- Soccio, R.E., and Breslow, J.L. (2004). Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 1150–1160.
- Sokoll, L.J., Ellis, W., Lange, P., Noteboom, J., Elliott, D.J., Deras, I.L., Blase, A., Koo, S., Sarno, M., Rittenhouse, H., et al. (2008). A multicenter evaluation of the PCA3 molecular urine test: pre-analytical effects, analytical performance, and diagnostic accuracy. *Clin. Chim. Acta* *389*, 1–6.
- Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2011). The complex interplay between cholesterol and prostate malignancy. *Urol. Clin. North Am.* *38*, 243–259.
- Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (1994). Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 10809–10813.
- Souidi, M., Dubrac, S., Parquet, M., Volle, D.H., Lobaccaro, J.M., Mathe, D., Combes, O., Scandiff, P., Lutton, C., and Aigueperse, J. (2004). [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol.* *28*, 279–293.
- Sreekumar, A., Laxman, B., Rhodes, D.R., Bhagavathula, S., Harwood, J., Giacherio, D., Ghosh, D., Sanda, M.G., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2004). Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 834–843.

- Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S., and Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N. Engl. J. Med.* *317*, 909–916.
- Stelman, L.S., Abrams, S.L., Whelan, J., Bertrand, F.E., Ludwig, D.E., Bäsecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2008). Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* *22*, 686–707.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., and Vogt, P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* *260*, 170–173.
- Steuber, T., Vickers, A.J., Haese, A., Becker, C., Pettersson, K., Chun, F.K.-H., Kattan, M.W., Eastham, J.A., Scardino, P.T., Huland, H., et al. (2006). Risk assessment for biochemical recurrence prior to radical prostatectomy: significant enhancement contributed by human glandular kallikrein 2 (hK2) and free prostate specific antigen (PSA) in men with moderate PSA-elevation in serum. *Int. J. Cancer* *118*, 1234–1240.
- Stocco, D.M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* *63*, 193–213.
- Stokoe, D. (2001). PTEN. *Curr. Biol.* *11*, R502.
- Sun, L.P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (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*, 6519–6526.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J.E., Feldman, R.I., Yuan, Z.Q., Ma, X.L., Shelley, S.A., Jove, R., Tschlis, P.N., Nicosia, S.V., et al. (2001). AKT1/PKB α kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am. J. Pathol.* *159*, 431–437.
- Swyer, G. (1942). The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res* *2*, 372–375.
- Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., and Wang, N. (2008). HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab.* *7*, 365–375.
- Talukdar, S., and Hillgartner, F.B. (2006). The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase- α gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res* *47*, 2451–2461.
- Tamura, K., Chen, Y.E., Horiuchi, M., Chen, Q., Daviet, L., Yang, Z., Lopez-Illasaca, M., Mu, H., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (2000). LXRA α functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 8513–8518.
- Tanigawa, H., Billheimer, J.T., Tohyama, J., Fuki, I.V., Ng, D.S., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2009). Lecithin: cholesterol acyltransferase expression has minimal effects on macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* *120*, 160–169.
- Tantivejkul, K., Kalikin, L.M., and Pienta, K.J. (2004). Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J Cell Biochem* *91*, 706–717.
- Tao, W., and Levine, A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 6937–6941.
- Tatidis, L., Masquelier, M., and Vitols, S. (2002). Elevated uptake of low density lipoprotein by drug resistant human leukemic cell lines. *Biochem Pharmacol* *63*, 2169–2180.

- The Leuprolide Study Group (1984). Leuprolide versus diethylstilbestrol for metastatic prostate cancer. The Leuprolide Study Group. *N. Engl. J. Med.* *311*, 1281–1286.
- Thompson, D., and Easton, D.F. (2002). Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 1358–1365.
- Thompson, I.M., Pauler, D.K., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Ford, L.G., Lippman, S.M., Crawford, E.D., et al. (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2239–2246.
- Thompson, T.C., Kadmon, D., Timme, T.L., Merz, V.W., Egawa, S., Krebs, T., Scardino, P.T., and Park, S.H. (1991). Experimental oncogene induced prostate cancer. *Cancer Surv.* *11*, 55–71.
- Thompson, T.C., Park, S.H., Timme, T.L., Ren, C., Eastham, J.A., Donehower, L.A., Bradley, A., Kadmon, D., and Yang, G. (1995). Loss of p53 function leads to metastasis in ras+myc-initiated mouse prostate cancer. *Oncogene* *10*, 869–879.
- Thompson, T.C., Truong, L.D., Timme, T.L., Kadmon, D., McCune, B.K., Flanders, K.C., Scardino, P.T., and Park, S.H. (1993). Transgenic models for the study of prostate cancer. *Cancer* *71*, 1165–1171.
- Timmins, J.M., Lee, J.-Y., Boudyguina, E., Kluckman, K.D., Brunham, L.R., Mulya, A., Gebre, A.K., Coutinho, J.M., Colvin, P.L., Smith, T.L., et al. (2005). Targeted inactivation of hepatic Abcal causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J. Clin. Invest.* *115*, 1333–1342.
- Timms, B.G. (2008). Prostate development: a historical perspective. *Differentiation* *76*, 565–577.
- Toker, A., and Cantley, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* *387*, 673–676.
- Toker, A., and Newton, A.C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.* *275*, 8271–8274.
- Tomlins, S.A., Aubin, S.M.J., Siddiqui, J., Lonigro, R.J., Sefton-Miller, L., Miick, S., Williamsen, S., Hodge, P., Meinke, J., Blase, A., et al. (2011). Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med* *3*, 94ra72.
- Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B.E., Cao, Q., Prensner, J.R., Rubin, M.A., Shah, R.B., et al. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* *10*, 177–188.
- Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S.M., Kalyana-Sundaram, S., Wei, J.T., Rubin, M.A., Pienta, K.J., et al. (2007). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat. Genet.* *39*, 41–51.
- Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Smith, L.R., Roulston, D., Helgeson, B.E., Cao, X., Wei, J.T., Rubin, M.A., Shah, R.B., et al. (2006). TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res.* *66*, 3396–3400.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., et al. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* *310*, 644–648.

- Torri, V., and Floriani, I. (2005). Cyproterone acetate in the therapy of prostate carcinoma. *Arch Ital Urol Androl* 77, 157–163.
- Tricoli, J.V., Gumerlock, P.H., Yao, J.L., Chi, S.G., D'Souza, S.A., Nestok, B.R., and deVere White, R.W. (1996). Alterations of the retinoblastoma gene in human prostate adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 108–114.
- Tsujita, Y., Kuroda, M., Shimada, Y., Tanzawa, K., Arai, M., Kaneko, I., Tanaka, M., Masuda, H., Tarumi, C., and Watanabe, Y. (1986). CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: tissue-selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. *Biochim. Biophys. Acta* 877, 50–60.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y., and Smart, E.J. (1998). Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* 273, 6525–6532.
- Ukomadu, C., and Dutta, A. (2003). Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J Biol Chem* 278, 4840–4846.
- Uno, S., Endo, K., Jeong, Y., Kawana, K., Miyachi, H., Hashimoto, Y., and Makishima, M. (2009). Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem. Pharmacol.* 77, 186–195.
- Val, P., Lefrançois-Martinez, A.-M., Veyssière, G., and Martinez, A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl. Recept.* 1, 8.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2003). ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 44, 1373–1380.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47, 2433–2443.
- Vazquez, F., and Sellers, W.R. (2000). The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1470, M21–35.
- Vedhachalam, C., Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 282, 25123–25130.
- Vedin, L.L., Lewandowski, S.A., Parini, P., Gustafsson, J.A., and Steffensen, K.R. (2009). The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 30, 575–579.
- Van der Velde, A.-E. (2010). Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J. Gastroenterol.* 16, 5908–5915.
- Viennois, E., Esposito, T., Dufour, J., Pommier, A., Fabre, S., Kemeny, J.-L., Guy, L., Morel, L., Lobaccaro, J.-M., and Baron, S. (2012a). Lxra regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* 153, 3211–3223.
- Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J.-M., and Baron, S. (2012b). Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 129–141.

- Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F.Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., and Lobaccaro, J.M. (2011). Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin Ther Targets* 15, 219–232.
- Volle, D.H., Decourteix, M., Garo, E., McNeilly, J., Fenichel, P., Auwerx, J., McNeilly, A.S., Schoonjans, K., and Benahmed, M. (2009). The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 119, 3752–3764.
- Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.M., Verhoeven, G., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007a). The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21, 303–315.
- Volle, D.H., and Lobaccaro, J.M. (2007). Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the “foie gras”, the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 183–189.
- Volle, D.H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Dechelotte, P., Sion, B., Veysiere, G., Benahmed, M., and Lobaccaro, J.M. (2007b). Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 21, 1014–1027.
- Walker, A.K., Yang, F., Jiang, K., Ji, J.-Y., Watts, J.L., Purushotham, A., Boss, O., Hirsch, M.L., Ribich, S., Smith, J.J., et al. (2010). Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev.* 24, 1403–1417.
- Wang, C., JeBailey, L., and Ridgway, N.D. (2002). Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments. *Biochem. J.* 361, 461–472.
- Wang, M.L., Motamed, M., Infante, R.E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010a). Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell Metab.* 12, 166–173.
- Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G.V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., et al. (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4, 209–221.
- Wang, W., Nacusi, L., Sheaff, R.J., and Liu, X. (2005). Ubiquitination of p21Cip1/WAF1 by SCFSkp2: substrate requirement and ubiquitination site selection. *Biochemistry* 44, 14553–14564.
- Wang, Y., Kumar, N., Crumbley, C., Griffin, P.R., and Burris, T.P. (2010b). A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol). *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 917–923.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., and Burris, T.P. (2008). Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 26332–26339.
- Wasko, B.M., Smits, J.P., Shull, L.W., Wiemer, D.F., and Hohl, R.J. (2011). A novel bisphosphonate inhibitor of squalene synthase combined with a statin or a nitrogenous bisphosphonate in vitro. *J. Lipid Res.* 52, 1957–1964.
- Watanabe, M., Nakayama, T., Shiraishi, T., Stemmermann, G.N., and Yatani, R. (2000). Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States. A review. *Urol Oncol* 5, 274–283.
- Weinberg, R.A. (1994). Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin* 44, 160–170.

- Weng, L.-P., Brown, J.L., Baker, K.M., Ostrowski, M.C., and Eng, C. (2002). PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1687–1696.
- White, C. (1909a). On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* *13*, 3–10.
- White, C. (1909b). On the occurrence of crystals in tumours. *J Pathol Bacteriol* *13*, 3–10.
- Whitman, E.J., Groskopf, J., Ali, A., Chen, Y., Blase, A., Furusato, B., Petrovics, G., Ibrahim, M., Elsamanoudi, S., Cullen, J., et al. (2008). PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J. Urol.* *180*, 1975–1978; discussion 1978–1979.
- Whittemore, A.S., Wu, A.H., Kolonel, L.N., John, E.M., Gallagher, R.P., Howe, G.R., West, D.W., Teh, C.Z., and Stamey, T. (1995). Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am. J. Epidemiol.* *141*, 732–740.
- Wiklund, F., Jonsson, B.-A., Brookes, A.J., Strömqvist, L., Adolfsson, J., Emanuelsson, M., Adami, H.-O., Augustsson-Bälter, K., and Grönberg, H. (2004). Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7150–7156.
- Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* *9*, 1033–1045.
- Winter, H., Cheng, K.K., Cummins, C., Maric, R., Silcocks, P., and Varghese, C. (1999). Cancer incidence in the south Asian population of England (1990-92). *Br. J. Cancer* *79*, 645–654.
- Wittekind, C., Compton, C.C., Greene, F.L., and Sobin, L.H. (2002). TNM residual tumor classification revisited. *Cancer* *94*, 2511–2516.
- Wu, X., Wu, J., Huang, J., Powell, W.C., Zhang, J., Matusik, R.J., Sangiorgi, F.O., Maxson, R.E., Sucov, H.M., and Roy-Burman, P. (2001). Generation of a prostate epithelial cell-specific Cre transgenic mouse model for tissue-specific gene ablation. *Mech Dev* *101*, 61–69.
- Xu, J., Stolk, J.A., Zhang, X., Silva, S.J., Houghton, R.L., Matsumura, M., Vedvick, T.S., Leslie, K.B., Badaro, R., and Reed, S.G. (2000). Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res.* *60*, 1677–1682.
- Xu, J., Zheng, S.L., Komiya, A., Mychaleckyj, J.C., Isaacs, S.D., Hu, J.J., Sterling, D., Lange, E.M., Hawkins, G.A., Turner, A., et al. (2002). Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. *Nat Genet* *32*, 321–325.
- Yan, Y., Sheppard, P.C., Kasper, S., Lin, L., Hoare, S., Kapoor, A., Dodd, J.G., Duckworth, M.L., and Matusik, R.J. (1997). Large fragment of the probasin promoter targets high levels of transgene expression to the prostate of transgenic mice. *Prostate* *32*, 129–139.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* *110*, 489–500.
- Yasuda, T., Grillot, D., Billheimer, J.T., Briand, F., Delerive, P., Huet, S., and Rader, D.J. (2010). Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 781–786.

- Yokoyama, S. (1998). Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* *1392*, 1–15.
- Yokoyama, S. (2000). Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta* *1529*, 231–244.
- Yokoyama, S. (2006). ABCA1 and biogenesis of HDL. *J. Atheroscler. Thromb.* *13*, 1–15.
- Yoo, T.K., and Cho, H.J. (2012). Benign prostatic hyperplasia: from bench to clinic. *Korean J Urol* *53*, 139–148.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009). LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* *325*, 100–104.
- Zeng, Y., Opeskin, K., Horvath, L.G., Sutherland, R.L., and Williams, E.D. (2005). Lymphatic vessel density and lymph node metastasis in prostate cancer. *Prostate* *65*, 222–230.
- Zhou, Z., Flesken-Nikitin, A., Corney, D.C., Wang, W., Goodrich, D.W., Roy-Burman, P., and Nikitin, A.Y. (2006). Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res.* *66*, 7889–7898.
- Zhuang, L., Kim, J., Adam, R.M., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest* *115*, 959–968.
- Zhuang, L., Lin, J., Lu, M.L., Solomon, K.R., and Freeman, M.R. (2002). Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res* *62*, 2227–2231.
- Zielie, P.J., Mobley, J.A., Ebb, R.G., Jiang, Z., Blute, R.D., and Ho, S.M. (2004). A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. *J. Urol.* *172*, 1130–1133.

Résumé

De nombreuses études épidémiologiques associent le cholestérol avec l'incidence et le développement du cancer de la prostate. Parmi les acteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol, les récepteurs nucléaires LXR α et LXR β sont identifiés comme d'importants régulateurs intra-cellulaires capables d'ajuster les niveaux d'accumulation de cette molécule. En parallèle, ces récepteurs peuvent exercer des effets anti-prolifératif et pro-apoptotique sur des cellules tumorales prostatiques. L'ensemble de ces données suggère un rôle protecteur des LXRs dans le cadre du cancer de la prostate.

Les objectifs de ces travaux ont été d'étudier les mécanismes moléculaires reliant les LXRs au cycle cellulaire et de comprendre le rôle de ces récepteurs nucléaires dans le processus de la carcinogénèse prostatique.

Nous avons ainsi montré que les LXRs exerçaient leur effet anti-prolifératif sur des cellules murines épithéliales prostatiques (MPECs) notamment *via* des modulations des voies de transduction PI3K/AKT et MAPK. Ces résultats font de ces cellules un modèle d'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet.

Les souris *Lxra* β ^{-/-} nourries avec un régime riche en cholestérol présentent un phénotype de néoplasie prostatique associé à un profil transcriptomique proche de celui de souris modèles de cancer de la prostate démontrant l'effet protecteur des LXRs dans une condition d'hypercholestérolémie.

Enfin, l'expression et l'activité des LXRs et leur gènes cibles ont été étudiées dans un modèle murin de carcinogénèse prostatique, les souris *Pten*^{-/-}, dont l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *Pten* est spécifique de l'épithélium prostatique. De manière intéressante, nous montrons que les LXRs sont activés au cours de la carcinogénèse prostatique et que la perte des LXRs dans les souris *Pten*^{-/-} entraîne une accélération de la progression tumorale.

Au final, ces résultats mettent en lumière que les LXRs peuvent exercer un rôle de barrière limitant la progression tumorale, notamment par l'intermédiaire de leurs gènes cibles codant les cassettes d'efflux de cholestérol, *Abca1* et *Abcg1*.

Mots clés : Cancer, Prostate, LXRs, Cholestérol, PTEN.