



HAL
open science

Nouveaux modèles pour le criblage de modulateurs / perturbateurs des voies de signalisation régulées par les **Liver X receptors**

Allan Fouache

► To cite this version:

Allan Fouache. Nouveaux modèles pour le criblage de modulateurs / perturbateurs des voies de signalisation régulées par les Liver X receptors. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS030 . tel-03021550

HAL Id: tel-03021550

<https://theses.hal.science/tel-03021550>

Submitted on 24 Nov 2020

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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE
LA SANTÉ – AGRONOMIE - ENVIRONNEMENT*

THESE

Présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité :

Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé et Innovation

Par **FOUACHE Allan**

**NOUVEAUX MODELES POUR LE CRIBLAGE DE
MODULATEURS/PERTURBATEURS DES VOIES DE SIGNALISATION
REGULEES PAR LES *LIVER X RECEPTORS***

Soutenue publiquement le 26 Novembre 2018, devant le jury composé de :

Directeurs de thèse : Pr LOBACCARO Jean-Marc
Dr TROUSSON Amalia

Rapporteurs de thèse : Pr CARATO Pascal
Dr GUILLOU Hervé

Examineurs de thèse : Dr GAUTHIER Karine
Dr COXAM Véronique

GReD

-INSERM U1103, Clermont Université, UMR CNRS 6293-

REMERCIEMENTS

Merci à Jean-Marc LOBACCARO et Amalia TROUSSON pour m'avoir accueilli dans l'équipe pendant ces trois années.

Merci à Pascal CARATO et Hervé GUILLOU qui ont accepté d'être mes rapporteurs thèse. Je remercie également Karine GAUTHIER, et Véronique COXAM d'avoir examiné mon travail.

Merci à tous les membres de l'équipe : Laura et Amandine qui animaient nos réunions d'équipe ; Linda, Nada et Guy pour votre bonne humeur communicative, Silvère (le nouvel étudiant de la salle 312) pour ses conseils et son écoute ; Julio pour nos échanges anglo-franco-chiliens toujours instructifs ; Sarah pour les discussions sans queue ni tête entre deux tiroirs de cogélo ; Salwan pour ta jovialité et ta capacité à briser la glace ; et mes nombreux stagiaires : Nina, Michaela, Sonia, Thomas, Marie, Bertrand, Elodie, Marion, Max et d'autres ...

Merci à Jean-Paul et Angélique pour leurs nombreux coups de mains qui m'ont facilité la vie au jour-le-jour.

Merci au couple Lavergne, Maryline pour tes nombreux conseils et coups de pouce en biomol. Les repas de 15h étaient un plaisir. Guillaume, merci pour tes éclaircissements dans le monde obscur et dangereux de la drosophile. Toujours des explications simples et concises à fournir qui m'ont fait gagner un temps considérable. Sacré Guigui !!

Merci à mes confrères de master. Colin et Quentin, le couple le plus mignon que je n'ai jamais rencontré. Les samedis soir étaient mémorables et les jeux encore plus. Merci pour votre soutien et amitié au court de ces années.

Un énorme merci à Cécilia ! Ces bientôt quatre années ensemble ont été un plaisir. Je ne pourrais rêver mieux. Nous voilà lancés dans un grand projet, j'ai foi en nous, rien ne peut nous arrêter !!

Merci à ma mère et mes 2 sœurs, vous m'avez toujours soutenu, du premier jour de mes études jusqu'à aujourd'hui.

COMMUNICATIONS

Communications orales

Journée scientifique du réseau National Alimentation Cancer Recherche (NACRe), Paris, 17 mars 2017. Identification de perturbateurs chimiques alimentaires des Liver X Receptor impliqués dans le cancer de la prostate.

Journée scientifique de l'Association de Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP), Paris, 16 Novembre 2016. *Characterization of Liver X Receptors environmental chemical disruptors involved in prostate cancer.*

Journée scientifique des Récepteurs Nucléaires (JRN), Paris, 9 mai 2016. *Environmental chemical disruptors, LXRs and prostate cancer.*

Journée scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), Clermont-Ferrand, 24 novembre 2015. Identification de perturbateurs chimiques environnementaux impliqués dans le cancer de la prostate comme ligands des *Liver X Receptors*.

Communications affichées

Journées de l'Ecole Doctorale (JED), Clermont-Ferrand, 15 Juin 2018. Mise en place d'outils permettant le criblage des ligands des *Liver X Receptors*.

Les Doctoriales, les karellis, 27-31 mars 2017. Crible des molécules capables d'affecter un des piliers de la physiologie prostatique : les protéines LXRs.

Journées scientifiques du Projet National de Recherche des Perturbateurs Endocriniens (PNRPE), Paris, 21-22 janvier 2016, *Identification of Liver X Receptor environmental chemical disruptors involved in the occurrence of prostate cancer.*

Journée scientifique de l'Association de Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP), Paris, 18 Novembre 2015. Identification de perturbateurs chimique environnementaux des *Liver X Receptor* impliqués dans le cancer de la prostate.

PUBLICATIONS

Une partie de ces travaux ont fait l'objet d'articles en cours de soumission :

Fouache A, Zabaiou N, Trousson A et Lobaccaro JA. *Flavonoids from Algerian propolis differentially modulate Liver X Receptors activity. Structure-function relationship analysis. (Article 1)*

Les articles suivants sont présentés en annexes :

Ouedraogo ZG, Fouache A, Trousson A, Baron S2, Lobaccaro JA. *Role of the liver X receptors in skin physiology: Putative pharmacological targets in human diseases. Chemistry and physics of lipids (2017). Review (Annexe 1)*

Zabaiou N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, Lobaccaro JA. *Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. Chemistry and physics of lipids (2017). Review (Annexe 2)*

Bousset L, Rambur A, Fouache A, Bunay J, Morel L, Lobaccaro JA, Baron S, Trousson A, de Joussineau C. *New Insights in Prostate Cancer Development and Tumor Therapy: Modulation of Nuclear Receptors and the Specific Role of Liver X Receptors. International journal of molecular sciences (2018). Review (Annexe 3)*

RESUME



Nouveaux modèles pour le criblage de modulateurs/perturbateurs des voies de signalisation régulées par les *Liver X Receptors* (LXR α et LXR β).

Les *Liver X Receptors* (LXRs) sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires présents chez l'homme sous deux isoformes LXR α et LXR β . Ces isoformes ont des rôles redondants et spécifiques dans l'homéostasie du cholestérol, des stéroïdes et dans l'immunité. Comme d'autres récepteurs nucléaires, les LXRs sont la cible de ligands exogènes pouvant impacter leur activité. Ce phénomène est à double tranchant. D'une part une modulation précise et spécifique des LXRs conduirait au développement de molécules thérapeutiques. D'autre part, des perturbations inappropriées des voies de signalisation LXRs mèneraient à l'identification de nouveaux *Endocrine Disruptor Chemicals* (EDCs). Dans le cadre de cette thèse, j'ai analysé les modalités de fixation et les activités de ligands flavonoïdes sur les LXRs. Ceci a conduit à la découverte de profils de liaison spécifiques en fonction des activités agonistes/antagonistes. J'ai également pu mettre au point un système de criblage *in vivo* de ligands des LXRs chez le modèle *Drosophila melanogaster*. Cet outil permet la discrimination de ligands agonistes par quantification optique de la fluorescence chez les larves. Dans le but de découvrir des ligands des LXRs spécifique de l'isoforme, j'ai entrepris la construction d'un double système de criblage autorisant l'analyse simultanée de l'action d'une molécule sur LXR α et LXR β . L'ensemble de ces résultats se montrent prometteurs dans la synthèse ou la découverte de molécules thérapeutiques ainsi que dans l'identification d'EDCs.

ABSTRACT

New Models for the Screening of Modulators/Disruptors of Signaling Pathways Regulated by Liver X Receptors (LXRs)

Liver X Receptors (LXRs) are transcription factors among the nuclear receptors superfamily present in humans under two isoforms: LXR α and LXR β . These isoforms have redundant and specific roles in cholesterol homeostasis, steroids, and immunity. Like other nuclear receptors, LXRs are targets of exogenous ligands that can impact their activity. This phenomenon is double-edged. On the one hand, precise and specific modulation of LXRs would lead to the development of therapeutic molecules. On the other hand, inappropriate disturbances of LXRs signaling pathways would lead to the identification of new Endocrine Disruptor Chemicals (EDCs). As part of this thesis, I analyzed the binding way and the activities of flavonoid ligands on LXRs. This led to the discovery of specific binding pattern depending on agonist/antagonist behavior. I have also been able to develop an in vivo screening system for LXRs ligands in the *Drosophila melanogaster* model. This tool allows the discrimination of agonist ligands by optical quantification of fluorescence in larvae. In order to discover LXRs isoforms-specific ligands, I started the construction of a double screening system allowing the simultaneous analysis of molecule activity on LXR α and LXR β . All these results are promising in synthesis or discovery of therapeutic molecules as well as in the EDCs identification.

ABREVIATIONS

LXR : *Liver X Receptor*

NR : *Nuclear Receptor*

ER : *Estrogen Receptor*

AR : *Androgen Receptor*

GR : *Glucocorticoid Receptor*

RXR : *Retinoid X Receptor*

RAR : *Retinoic Acid Receptor*

ROR : *RAR-related Orphan Receptor*

DBD : *DNA binding Domain*

LBD : *Ligand Binding Domain*

LBP : *Ligand Binding Pocket*

LXRE : *LXR Response Element*

AF-1 : *Activating Function 1*

AF-2 : *Activating Function 2*

NCoR : *Nuclear Receptor Co-Repressor*

SMRT : *Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor*

DRIP205 : *Vitamin D Interacting Protein 205*

SRC1 : *Steroid Receptor Coactivator 1*

ASC2 : *Activating Signal Cointegrator-2*

COX2 : *Cyclooxygenase-2*

IL : *Interleukine*

CNRE : *cAMP Negative Response Element*

API : *Apigénine*

QUE : *Quercétine*

GEN : *Genistéine*

LUT : Lutéoline

GAL : Galangine

CYA : Cyanidine

MOR : Morine

HES : Hespérétine

NAR : Naringénine

GPS2 : *G-protein Pathway Suppressor 2*

3 β -HSD : *3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase*

ABCA1 : *ATP-Binding Cassette*

ACT5C : *Actin 5c*

ACTH : *Adrenocorticotropic Hormone*

AD : *Activating domain*

AKT : *Protein Kinase B*

AP1 : *Activator Protein 1*

APOE : *Apolipoprotein E*

ARL7 : *ADP-Ribosylation factor-Like 7*

CETP : *Cholesteryl Ester Transfer Protein*

ChREBP : *Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein*

CYP7A1 : *Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A member 1*

DMSO : *Dimethyl Sulfoxide*

EDC : *Endocrine disruptor chemical*

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*

FASN : *Fatty acid synthase*

G6Pase : *Glucose 6-Phosphatase*

GLUT4 : *Glucose Transporter type 4*

HDL : *High Density Lipoprotein*

HTS : *High Throughput Screening*

IDOL : *Inducible Degradation Of LDL*

INOS : *Inducible Nitric Oxide Synthase*

LDL : *Low Density Lipoprotein*

LDLR : *Low Density Lipoprotein Receptor*

LPL : *Lipoprotein Lipase*

LPS : *Lipopolysaccharide*

LRP1 : *LDL Receptor-related Protein 1*

MSMB : *Beta-Microseminoprotein*

NFkB : *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NKX3.1 : *NK homeobox 1*

PEPCK : *Phosphoenolpyruvate Carboxykinase*

PGE2 : *Prostaglandin E2*

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PLTP : *Phospholipid Transfer Protein*

PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

QSAR : *Quantitative Structure–Activity Relationship*

QUAS : *Q-system Upstream Activating Sequence*

RANKL : *Receptor Activator of Nuclear factor kappa-B Ligand*

RB : *Retinoblastoma*

RCT : *Reverse Cholesterol Transport*

RIP140 : *Receptor-Interacting Protein 140*

RNF145 : *RING Finger Protein 145*

SCAP : *SREBP Cleavage-Activating pProtein*

SCD1 : *Stearoyl-CoA Desaturase-1*

SHP : *Small heterodimer partner*

SIRT1 : *Sirtuin*

SKP2 : *S-phase Kinase associated Protein 2*

SREBP1C : *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory protein*

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

STS : *Steroid Sulfatase*

SULT : *Sulfotransferase*

UAS : *Upstream Activating Sequence*

UCP1 : *Uncoupling Protein 1*

VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

SOMMAIRE

Introduction bibliographique	1
1. Structure des <i>Liver X Receptors</i> (LXRs)	2
1.1. Structure protéique	Erreur ! Signet non défini.
1.1.1. Structure classique des NRs.....	3
1.1.1.1. Régions A/B	3
1.1.1.2. Région C	4
1.1.1.3. Région D	4
1.1.1.4. Région E.....	5
1.1.2. Le domaine de liaison à l'ADN des LXRs	5
1.1.3. Le domaine de liaison au ligand des LXRs	7
2. Mécanisme d'action des LXRs	8
2.1. Les éléments de réponse aux LXRs (LXRE).....	8
2.2. La transactivation	9
2.2.1. Liaison à l'ADN indépendante du ligand	9
2.2.2. Liaison à l'ADN dépendante du ligand	10
2.3. La transrépression	11
2.4. Les modifications post-traductionnelles des LXRs.....	11
2.4.1.1. Acétylations	12
2.4.1.2. O-GlcNacytlation	12
2.4.1.3. Phosphorylation.....	12
2.4.1.4. SUMOylation	13
3. Les ligands des LXRs.....	15
3.1. Endogènes.....	15
3.1.1. Agonistes	15
3.1.2. Antagonistes	16
3.2. Naturels exogènes	17
3.2.1. Agonistes	17
3.2.2. Antagonistes	21
3.3. Composés synthétiques	22
4. Les fonctions physiologiques des LXRs	25
4.1. Métabolisme du Cholestérol.....	25
4.1.1. Excrétion du cholestérol depuis le foie	25
4.1.2. Le transport inverse du cholestérol	25
4.1.3. La biosynthèse du cholestérol	26
4.1.4. <i>Absorption du cholestérol</i>	27
4.2. Métabolisme des acides gras.....	27
4.3. Métabolisme du glucose	28
4.4. Métabolisme des stéroïdes	29
4.4.1.1. Homéostasie des glucocorticoïdes	29
4.4.1.2. Homéostasie des œstrogènes.....	30
4.4.1.3. Homéostasie des androgènes.....	31
4.4.2. Immunité	32
5. La physiopathologie des LXRs.....	33
5.1. Les pathologies métaboliques.....	33
5.1.1. La dyslipidémie	33
5.1.2. Le diabète de type 2	33

5.2. Les pathologies osseuses et articulaires	34
5.2.1. La polyarthrite rhumatoïde	34
5.2.2. L'ostéoporose	35
5.3. Les pathologies cutanées	35
5.3.1. Le psoriasis.....	35
5.3.2. La dermatite atopique	36
5.3.3. Le vitiligo	36
5.4. Les pathologies neurologiques	37
5.4.1. La maladie d'Alzheimer.....	37
5.4.2. La maladie de Parkinson	38
5.4.3. La maladie de Huntington.....	38
5.4.4. La sclérose en plaque.....	38
5.4.5. La sclérose latérale amyotrophique	39
5.4.6. La maladie Niemann-Pick type C1.....	39
5.4.7. Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz.....	40
5.5. Les pathologies cardio-vasculaires	40
5.5.1. L'athérosclérose	40
5.5.2. Les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) myocardiques	41
5.5.3. L'hypertrophie myocardique.....	41
5.6. Les pathologies de la reproduction	42
5.6.1. Chez la femelle	42
5.6.2. Chez le mâle.....	43
5.7. Le cancer	43
5.7.1. Le cancer de la prostate	44
5.7.2. Le cancer du sein	45
5.7.3. Les cancers gastro-intestinaux	45
5.7.4. Le cancer de la vésicule biliaire	46
5.7.5. Le cancer du pancréas	46
5.7.6. Les cancers cutanés.....	47
5.7.7. Les tumeurs hématologiques.....	47
6. Les LXR sont des cibles des perturbateurs chimiques endocriniens (EDCs)	49
6.1. Diéthylstilbestrol.....	50
6.2. Phtalates	51
6.2.1. Diisodecyl phthalate (DIDP) et Diisononyl phthalate (DiNP)	51
6.2.2. Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP).....	51
6.3. Retardateur de flamme	52
6.4. Fumée de cigarette	52
6.5. Ozone	53
6.6. Organostannique : Tributylétain (TBT).....	53
6.7. Organophosphate : tri-m-tolyl Phosphate (TMTP)	54
7. Méthodes de recherche de ligands	55
7.1. In silico.....	55
7.1.1. Méthodes basées sur le ligand	55
7.1.2. Méthodes basées sur la cible	55
7.2. In vitro	56
7.2.1. Méthodes mesurant la distance récepteur-ligands	56

7.2.2. Méthode mesurant la liaison récepteur-ligands	57
7.2.3. Méthode mesurant l'activité transcriptionnelle	58
7.3. <i>In Vivo</i>	59
7.3.1.1. <i>Danio rerio</i>	60
7.3.1.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	60
7.3.1.3. <i>Mus musculus</i>	61
Objectifs	62
Matériel et Méthodes	65
1. Matériel	66
2. Cultures cellulaires	66
3. Transfection transitoires	66
4. Mesure de l'activité luciférase	67
5. Extraction des ARNm sur cellules	67
6. Rétro-transcription.....	68
7. PCR en temps réel sur ADNc.....	68
8. Molecular docking	69
9. Génération de la lignée de drosophile Gal4-LXR α ;UAS-GFP	69
10. Traitement des drosophiles	71
11. Extraction d'ARN sur larve	72
12. Extraction de protéines sur larve totale	72
13. PCR sur ADN plasmidique.	73
14. Recombinaisons homologues	73
15. Digestion enzymatique.....	73
16. Analyse statistiques.....	74
Résultats et discussion.....	75
1. Identification et caractérisation de flavonoïdes ligand des LXR s	76
1.1. Article 1	76
1.2. Résultats complémentaires.....	91
1.2.1. Les flavonoïdes modifient l'expression des gènes cibles des LXR s de façon différentes	91
1.2.2. La liaison et l'action des flavonoïdes sur le LBD des LXR s	92
1.3. Discussion complémentaire	94
2. Développement d'un système de criblage de ligands des LXR s <i>in vivo</i> ..	97
2.1. Mise au point des modalités d'administration des ligands	97
2.2. Amélioration de la lignée Gal4-LXR α ;UAS-GFP par sélection au cours des générations	98
2.3. Capacité de la lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a discriminer l'activité de molécules agonistes des LXR s	99
2.4. Capacité de la lignée Gal4-LXR α ;UAS-GFP à discriminer l'activité de molécules antagonistes des LXR s	101
2.5. Corrélation de la fluorescence perçue sur larve entière avec les niveaux protéiques de GFP	103
3. Développement d'un double système de criblage des ligands des LXR s	105
3.1. Choix du second système simple hybride	105
3.2. Organisation du double système de crible	106
3.3. Construction du système.....	107

3.4. Avantages et possibilités permises par le double système	108
Annexes	112
1. Annexe 1	113
2. Annexe 2	123
3. Annexe 3	128
Références bibliographiques	142

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Structure des *Liver X Receptors* (LXRs)

Les *Liver X Receptors* (LXRs) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (NRs), facteurs de transcription pouvant se lier à l'ADN, potentiellement activables par des ligands et impliqués dans un large spectre de régulations physiologiques (*The Nuclear Receptor FactsBook* 2002; Gronemeyer, Gustafsson, et Laudet 2004; Chambon 2005; Evans 2005).

Avant le clonage des gènes codant les NRs au début des années 1980, c'est biochimiquement que le premier NR fut identifié dans les années 1960. En effet, Elwood Jensen et ses collaborateurs ont montré que l'estradiol était spécifiquement retenue dans les cellules cibles, et que son activité cellulaire était modulée par un récepteur spécifique de haute affinité (Jensen 1962). Quelques années plus tard, le récepteur des glucocorticoïdes humains (GR, NR3C1) était l'un des premiers NRs à être cloné par Ron Evans et ses collègues suivi du récepteur aux œstrogènes (ER α ; NR3A1) par les laboratoires de Pierre Chambon et de Geoffrey Greene (Hollenberg et al. 1985; Greene et al. 1986, 1986). Depuis, le séquençage complet du génome humain a conduit à l'identification de 48 NRs fonctionnels, avec des rôles spécifiques, notamment dans la régulation de nombreux processus biologiquement importants comme la croissance, le développement et l'homéostasie. Cette régulation s'effectue à travers plusieurs mécanismes qui incluent à la fois les actions d'activation ou de répression de la transcription.

La classification des récepteurs nucléaire s'est effectuée par analyse phylogénétiques des séquences (Figure 1). Malgré une organisation structurale hautement conservée, les fonctions physiologiques des NRs et leurs modes d'action sont très variés. C'est ainsi que d'autres systèmes de classifications ont vu les jours notamment ceux basées sur les fonctions physiologiques indiquant que des séquences géniques proches ne signifiaient pas nécessairement des fonctions physiologiques similaires (Figure 2). En effet, à l'exception de DAX1 (NR0B1) et de SHP (NR0B2), les NRs se lient à des séquences spécifiques situées dans les régions promotrices des gènes cibles. Selon le NR, cette fixation peut être sous forme de monomère, d'homodimère et/ou d'hétérodimère avec un des récepteurs de l'acide

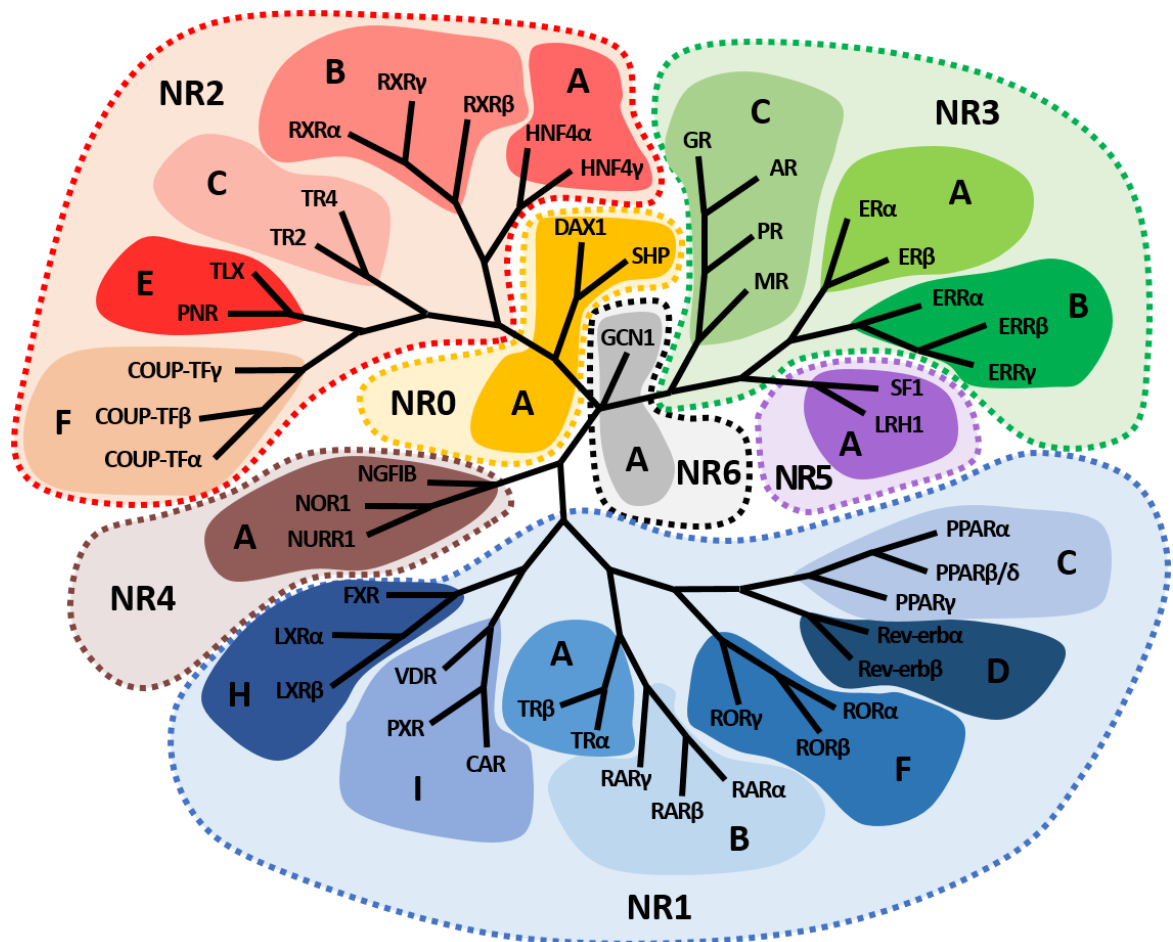


Figure 1 : Classification phylogénétique des récepteurs nucléaires

Les séquences des récepteur nucléaires ont été alignées et un arbre phylogénétiques a été dressé. Les récepteurs nucléaires sont divisés en groupes (NR0-6) et en sous-groupe (A-F).

réinoïque 9-*cis* : RXR (NR1B1-3). Si paradoxalement ces protéines sont qualifiées de « récepteurs », il faut noter que plus de la moitié des 48 NRs n'a encore été associée à un (des) ligand(s). Pour ceux dont un ligand est connu, la liaison du ligand déclenche des changements dans la conformation et la dynamique des récepteurs qui à leur tour régulent le recrutement des corégulateurs et des mécanismes de modification de la chromatine, une composante clé de la signalisation par les NRs. L'action ultime de ces NRs sur les gènes cibles, après la liaison spécifique sur l'ADN, est de modifier le recrutement et/ou l'activité de la machinerie de transcriptionnelle (Roeder 1996).

1.1. Structure classique des NRs

Tous les NRs présentent une structure modulaire caractéristique qui comprend cinq à six régions d'homologie (désignées de A à F, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale) sur la base de séquence et de fonction conservées (Figure 3) (Giguère et al. 1986; Krust et al. 1986). Le domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain* ; DBD ; région C) et le domaine de liaison au ligand (*Ligand-binding domain* ; LBD ; région E) sont les domaines les mieux conservés. Ces deux régions peuvent fonctionner indépendamment, comme l'a bien montré la génération d'un récepteur chimérique dans lequel le DBD de ER a été permutée pour celui de GR. On constate alors que la protéine chimérique se lie à l'œstradiol mais n'active pas les gènes sensibles à l'œstradiol mais ceux sensibles aux glucocorticoïdes (Green et al. 1988).

1.1.1. Régions A/B

Les régions A/B du côté N-terminal contiennent une fonction d'activation transcriptionnelle appelée fonction d'activation 1 (*Activating Function 1* ; AF-1), qui peut fonctionner de manière autonome. Contrairement à l'autre fonction d'activation (*Activating Function 2* ; AF-2 ; située dans le domaine de liaison du ligand - LBD), AF-1 peut agir de manière indépendante du ligand. Aucun marqueur protéique spécifique commun n'a pu être identifié à partir des différentes structures cristallines obtenu à

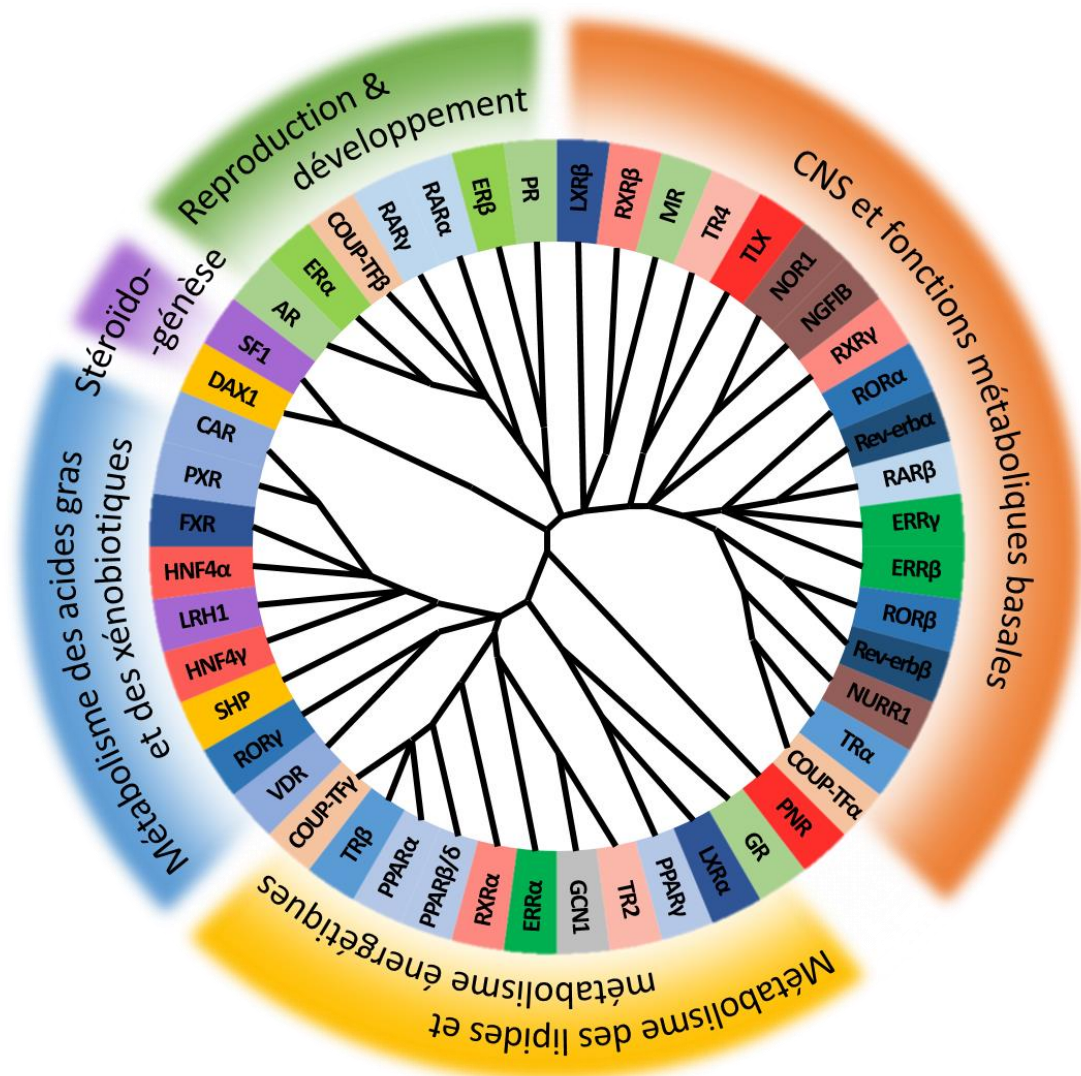


Figure 2 : Classification fonctionnelle des récepteurs nucléaires
Adapté de Bookou, 2006..

partir des différents domaines A/B. En effet, la longueur et la séquence de la région A/B dans les différents NRs sont très variables, révélant une très faible conservation évolutive. De manière intéressante, ce domaine peut être la cible de modifications post-traductionnelles au niveau de sites consensus de phosphorylation par des kinases dépendantes des prolines. De plus, cette région N-terminale peut interagir avec des cofacteurs tels que des coactivateurs ou d'autres facteurs de transcription.

1.1.2. Région C

La région C centrale des NRs ou domaine de liaison de l'ADN (DBD) est le domaine le plus conservé dans la superfamille des NRs (Figure 3). Des études *in vitro* ont démontré que, par cette région, les NRs se lient à des séquences d'ADN spécifiques, appelées éléments de réponse hormonale (HRE, *Hormone responsive element*) (V. Kumar et al. 1986). Des études de résonance magnétique nucléaire et de cristallographie ont été réalisées pour différents DBD de NR, complexées ou non à l'ADN. Ces approches ont révélé que le DBD se compose d'un noyau de 66 résidus hautement conservés rassemblés en deux motifs de doigts de zinc riches en cystéine, de trois hélices α et d'une extension COOH. Il comprend plusieurs séquences peptidiques, appelées boîtes P, D, T et A, qui ont été décrits comme définissant ou contribuant à la spécificité de l'élément de réponse (notamment les 2 dernières cystéines de la boîte P ; (Zilliacus et al. 1994) et à l'interface de dimérisation des DBD. Une autre partie conservée dans le deuxième doigt de zinc est la boîte D, qui dicte l'espacement des demi-sites entre deux récepteurs (cf. chapitre 1.1.3).

1.1.3. Région D

La région D, peu conservée, est considérée comme une charnière entre le DBD et le LBD, permettant la rotation du DBD (Figure 3). Par conséquent, elle pourrait permettre aux différents DBD et LBD d'adopter des conformations différentes sans

Structural Organization of Nuclear Receptors

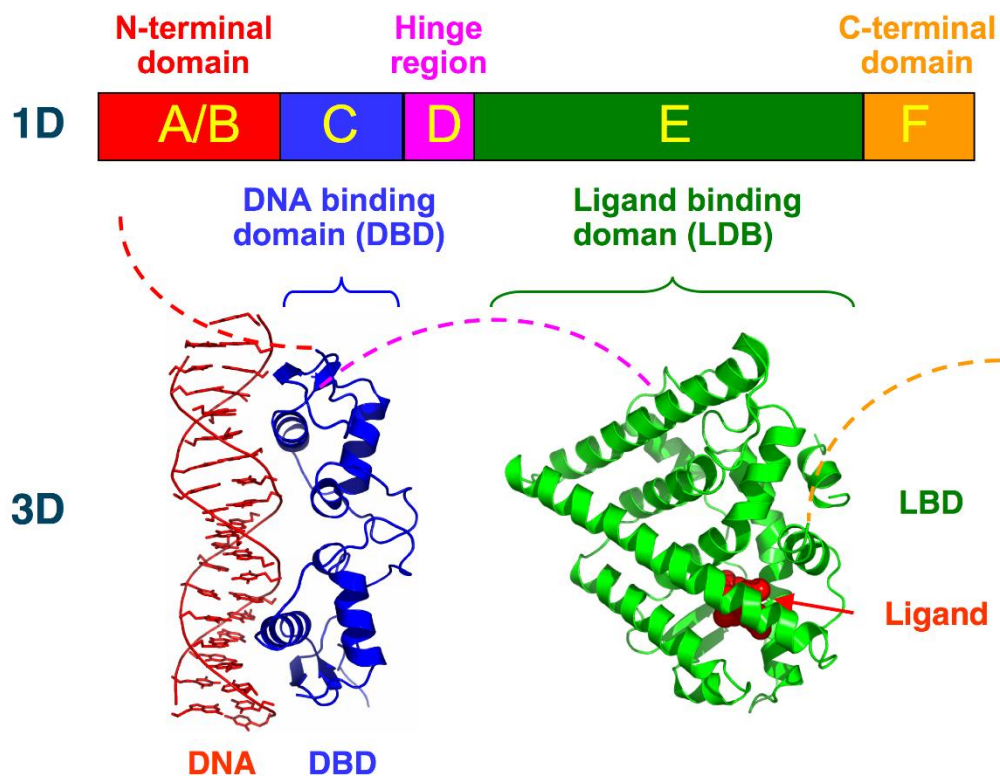


Figure 3 : Organisation structurale des récepteurs nucléaires

Séquence schématique d'acides aminés 1D d'un récepteur nucléaire (partie haute). Structures 3D des régions DBD (liée à l'ADN) et LBD (liée au ligand) du récepteur nucléaire (partie basse).

créer de problèmes d'encombrement stérique. C'est cette région qui recrute majoritairement le corépresseur.

1.1.4. Région E

La région E, appelée aussi domaine de liaison du ligand (LBD, *ligand-binding domain*), est moins conservée que le DBD et est fonctionnellement complexe : elle est notamment responsable de la liaison du ligand et contient une fonction de transactivation ligand-dépendante. Le LBD est organisé avec 11 à 13 hélices alpha arrangées en trois couches avec deux β -turns. L'organisation structurale du LBD définit ainsi une poche hydrophobe (LBP, *ligand-binding pocket*) dans laquelle le ligand de nature lipophile peut venir se fixer. Elle forme un cylindre relativement droit d'une longueur d'environ 17 Å pour un volume accessible de 700 à 800 Å³.

Cette région contient quatre surfaces structurellement distinctes mais fonctionnellement liées (Figure 3) : 1) une surface de dimérisation, qui permet l'interaction avec les LBD partenaires ; 2) la poche de liaison au ligand ; 3) une surface de liaison aux corégulateurs, qui se lie à des complexes protéiques modulant l'activité transcriptionnelle ; 4) une fonction d'activation appelée AF-2, qui induit la transactivation dépendante du ligand. Dans l'AF-2 (séquence extrêmement conservée entre les différents NRs), l'intégralité de l'hélice α H12 est fondamentale pour la transactivation dépendante du ligand et le recrutement de coactivateurs. Au final, les LBD des NRs sont des domaines de signalisation allostérique complexes qui sont capables d'intégrer de multiples zones d'interactions moléculaires structurellement distinctes se chevauchant plus ou moins et modulant l'activation transcriptionnelle (Bourguet, Germain, et Gronemeyer 2000). Actuellement, les structures cristallines LBD de tous les récepteurs NRs ont été obtenues et étudiées.

1.2. Le domaine de liaison à l'ADN des LXR

Comme tous les NRs, les hLXRs se lient à des régions d'ADN spécifiques appelés éléments de réponse aux LXRs (*LXR Response Element* ; LXRE). Ils consistent en une variété de combinaisons de deux demi-sites canoniques de séquence 5'-AGGTCA-3' (Mangelsdorf et al. 1995). Le LXRE le plus commun est la répétition directe (*Direct Repeat* ; DR), AGGTCAⁿAGGTCA (ou son complément inverse TGACCTⁿTGACCT), où n^{1,4} désigne une sélection sans contrainte d'un ou quatre nucléotides (désignés par DR1 et DR4, respectivement). Il existe également des LXRE de type IR1 où les demi-sites sont en répétition inversée et séparés d'un nucléotide (*Inverted Repeat 1* ; IR1 ; AGGTCAⁿTGACCT) (Mak et al. 2002).

A ce jour, seule la structure cristalline de hLXR β DBD a été définie. Elle a été obtenue en cristallographie aux rayons X de l'hétérodimère hRXR α -hLXR β fixé sur un élément de réponse DR4. Celui-ci présente une organisation asymétrique ressemblant à un X en penché en 3' de l'élément de réponse (Figure 4). Le hRXR α DBD occupe le demi-site 5' et le DBD LXR β , le demi-site 3'. Les LBDs de LXR β et RXR α ont leurs positions inversées par rapport aux DBD (d'où l'importance de la région D qui joue le rôle de charnière). Les deux LBD se trouvent dans le même plan que les DBD et l'élément de réponse ADN. En hétérodimère, les LBDs de hLXR β et hRXR α sont bien séparées de leurs DBD respectifs contrairement à d'autres hétérodimères tels que PPAR γ -RXR α (Chandra et al. 2008, 2013). La nature relativement ouverte du complexe hRXR α -hLXR β reflète l'espacement accru des demi-sites DR-4 par rapport à d'autres éléments de réponse (type DR1). Cet espacement permet l'existence d'une extension C-terminale non repliée ne gênant pas l'appariement de l'hétérodimère sur son élément de réponse (Lou et al. 2014).

Les deux DBD des NRs adoptent une organisation classique en doigts de zinc et s'engagent dans les demi-sites AGGTCA (Khorasanizadeh et Rastinejad 2001). Parmi ceux-ci et dans le DBD de hLXR β , la Lys108 forme une liaison hydrogène avec le premier G de AGGTCA; Glu105 forme une liaison hydrogène avec le brin inférieur C qui se couple avec le second G de AGGTCA; Arg112 interagit avec T, et Arg113 forme une liaison hydrogène avec le brin inférieur G qui se couple avec la cinquième base, C du demi-site. Le groupe guanidium de la chaîne latérale Arg139 forme une

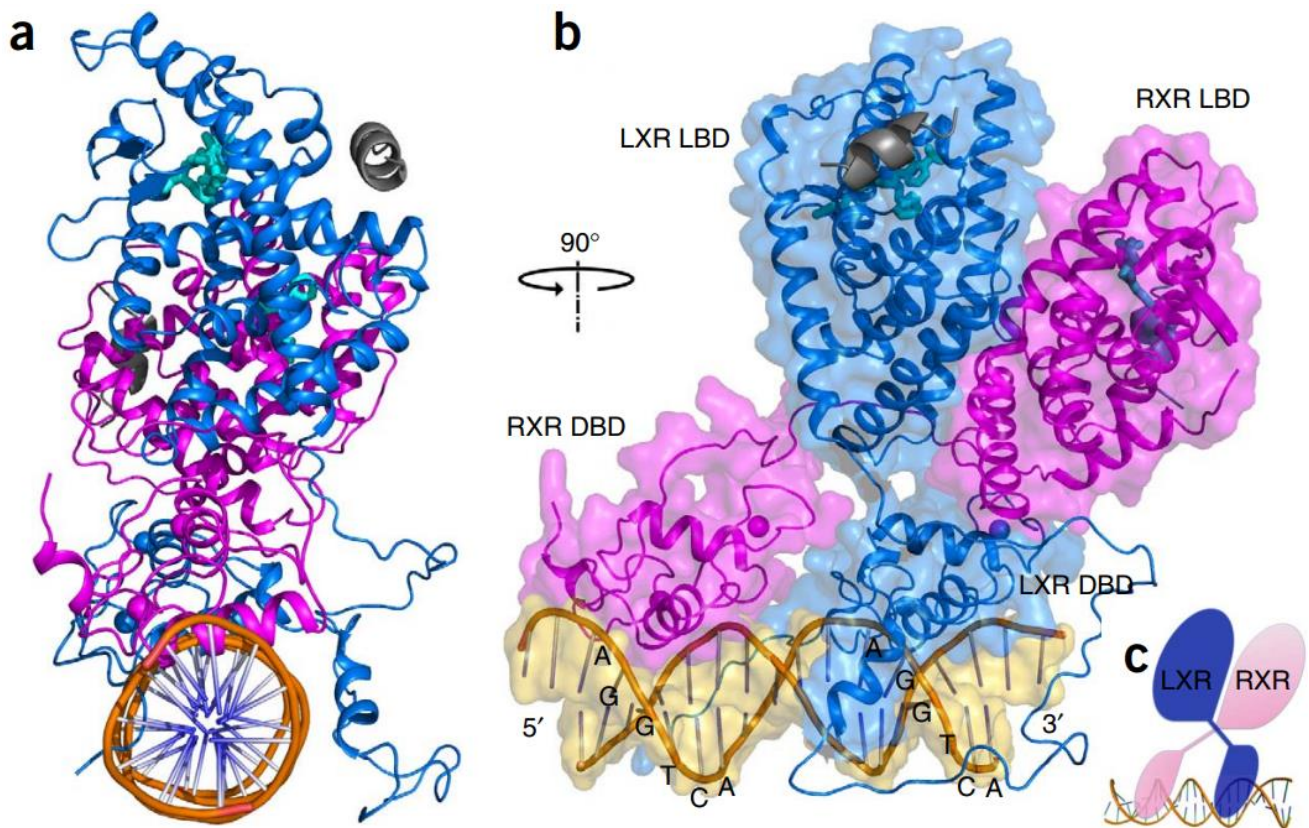


Figure 4 : Organisation de l'hétérodimère RXRα-LXRβ.

Vues d'ensemble du complexe avec LXRβ (bleu) RXRα (magenta), ligands (cyan) et peptide cofacteur (gris) sur l'élément de réponse. (a) Vue suivant la direction de l'ADN (de 5' à 3'). (b) Vue latérale de l'hétérodimère avec les surfaces représentées. (c) Représentation schématique des positions des domaines de liaison à l'ADN et au ligand complexe.

liaison hydrogène avec le brin inférieur T qui se couple avec la sixième base du demi-site AGGTCA et le groupe ribose O3' 2 nucléotides en 3' du demi-site (Figure 5 ; (Lou et al. 2014). hLXR α et hLXR β présentent 75.6% d'identité et les résidus Glu105, Lys108, Arg112, Arg113 et Arg139 sont tous les 5 conservés.

1.3. Le domaine de liaison au ligand des LXRs

L'étude cristallographique comparant les structures de hRXR α en l'absence de son ligand (Bourguet et al. 1995) et hRAR γ en présence de son ligand avait montré le rôle primordial de la fonction AF-2 portée par l'hélice 12 (Renaud et al. 1995). En l'absence de ligand, l'hélice 12 est orientée vers l'extérieur du LBD. La liaison du ligand permet le réarrangement des hélices 10 et 11 en une hélice unique, ce qui a pour conséquence de libérer l'hélice 12 de son contact avec la boucle Ω (entre les hélices 2 et 3). L'hélice 12 se réaligne ainsi contre la poche hydrophobe de liaison du ligand, agissant alors comme un couvercle qui scelle la poche en renforçant les interactions entre le ligand et le LBD. Ce modèle est décrit comme le modèle *mouse trap* (modèle du piège à souris). De même hLXR α adopte une conformation classique en présence de son ligand. Il faut souligner rôle des résidus R305 et T316 dans l'ancrage et la reconnaissance du ligand et l'importance des résidus H421 et W443 dans le basculement de position de l'AF2 et l'activation transcriptionnelle induite par le ligand (Svensson et al. 2003). Encore une fois, chacun de ces résidus joue un rôle central dans la liaison du ligand et le changement conformation engendrée par celui-ci sont conservés entre hLXR α et hLXR β (Figure 6) (Hoerer et al. 2003).

De nombreuses études de cristallographies (7 pour hLXR α -LBD et 17 pour hLXR β -LBD) ont confirmé le rôle crucial de ces acides aminés dans les interactions avec des ligands agonistes et dans l'activation du NR. Néanmoins, d'autres résidus moins conservés entre en hLXR α et hLXR β sont aussi impliqués dans l'ancrage du ligand, selon la taille, la forme ou encore la position du ligand à l'intérieur de cavité hydrophobe.

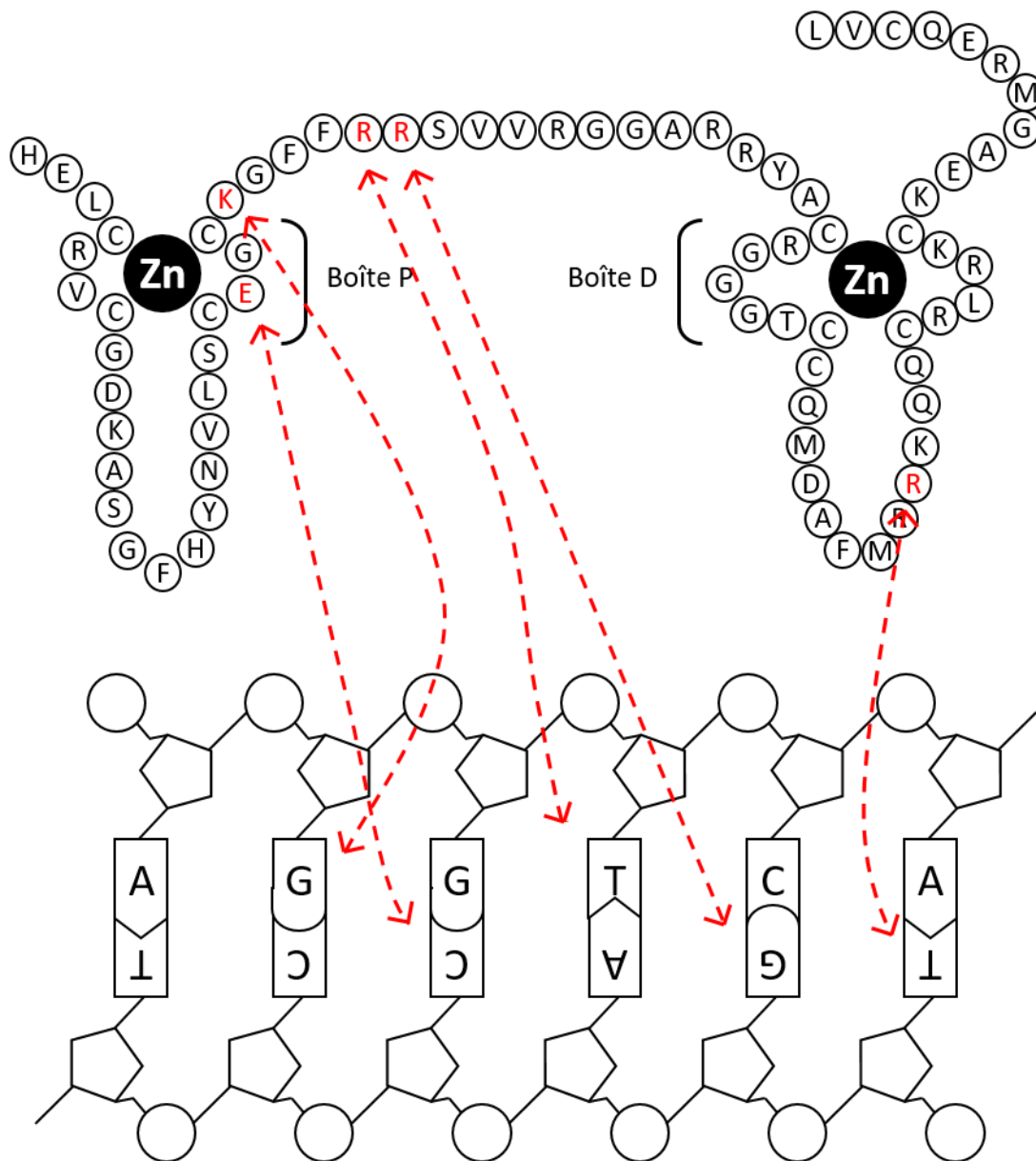


Figure 5 : Modalités de liaison du LBD des LXRs sur l'ADN

Représentation des 2 doigts de zinc impliqués dans la liaison à l'ADN. Les acides aminés représentés en rouge sont ceux interagissant directement avec l'ADN. Adapté de Giguère 1999,.

2. Mécanisme d'action des LXRs

2.1. Les éléments de réponse aux LXRs (LXRE)

Comme décrit dans le chapitre 1.1.2., l'activité du NR implique sa fixation à ses séquences cibles sur l'ADN. Dans le cas des LXRs, le LXRE se compose de deux demi-sites de séquence canonique 5'-AGTTCA-3' dont l'agencement peut varier selon les gènes cibles. Plusieurs LXRE ont été décrits à ce jour.

- DR4 : Les études *princeps* ont montré que LXR α se lie préférentiellement à la séquence 5'-GGTTTAaataAGTTCA-3' appelée DR4 (Willy et al. 1995; Willy et al. 1997) et induit la transcription de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol et la production des acides biliaires. Contrairement à d'autres hétérodimères RXR, l'activation par le ligand se produit lorsque le récepteur RXR occupe la position 5' de l'élément de réponse (DR4). En outre, la fixation du ligand par un seul récepteur (RXR) induit l'activation via le domaine AF-2 de l'autre récepteur (LXR).
- DR1 : la liaison de LXR β à un élément de réponse de type DR1 (AGGTCAaAGGTCA) est possible quelle que soit sa position sur l'élément de réponse, bien qu'avec une affinité légèrement plus élevée lorsque LXR β occupe la position 3' sur le demi site de l'élément de réponse (Feltkamp et al. 1999; Varga et Su 2007). Contrairement à LXR β , l'hétérodimère RXR-LXR α n'est pas capable de se lier à l'élément de réponse de type DR1 (Gronemeyer et Laudet 1995).
- IR1 : Mak et al. ont identifié et caractérisé deux LXREs fonctionnels dans le promoteur proximal du gène humain PLTP (*phospholipid transfer protein*). Le premier correspond à un DR4, alors que le second correspond à une répétition inversée (IR1) (Mak et al. 2002).
- IR0 : Dans le cadre de l'étude des effets protecteurs de l'activation des LXRs vis-à-vis des acides biliaires, l'analyse du promoteur de SULT2A9 (*bile acid detoxifying sulfotransferase 2A9*) chez la souris a révélé la présence d'un

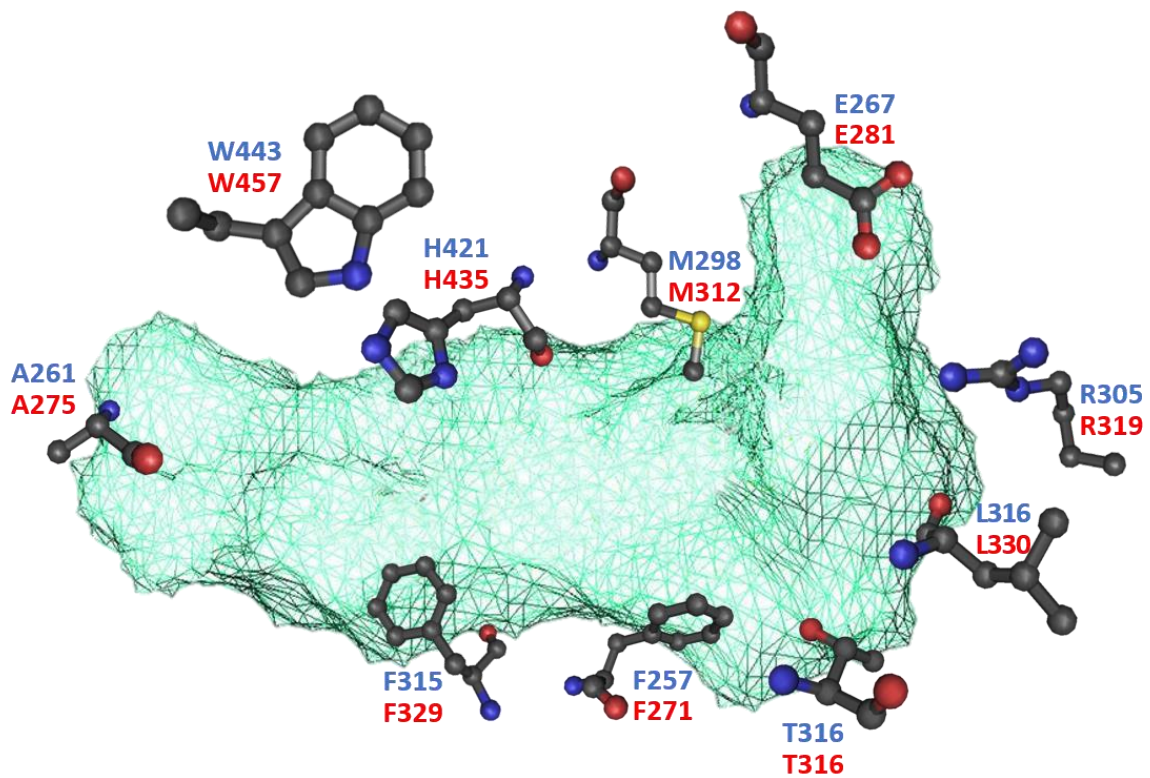


Figure 6 : Poche hydrophobe formée par les acides aminés composant le LBD des LXRs

Le volume quadrillé en turquoise représente la poche hydrophobe des LXRs. Les acides aminés composant cette poche sont indiqués en bleu pour LXR α et en rouge pour LXR β . Adapté de Svensson, 2003.

élément de réponse IR0 correspondant à une répétition inversée non espacée. L'expression de ce gène est activée par le T0901317 et dans le foie de souris mâle (Uppal et al. 2007).

- **DR7** : Afin de d'établir l'importance du rôle du gène Cd36 (*cluster differentiation 36*) dans la stéatose hépatique, un LXRE de type DR7 correspondant à une répétition directe séparée par 7 pb a été identifié. La présence de cette séquence en amont du gène Cd36 permet d'activer la transcription hépatique par le T0901317 chez la souris (Zhou et al. 2008).
- **CNRE** : LXR α peut contrôler la transcription d'un groupe de gènes, dont la rénine, non pas de façon canonique par la liaison d'un oxysterol, mais façon dépendante de l'AMPc (Tamura et al. 2004). Ce contrôle transcriptionnel ne se fait pas sous forme d'hétérodimère avec RXR, mais en monomère sur un élément de réponse appelé CNRE (*cAMP negative response element*). Dans le promoteur du gène de la rénine, cet élément se trouve dans la région proximale (= - 600 pb) et est conservé dans le génome humain et les rongeurs. LXR α et LXR β interagissent physiquement *in vivo* avec le CNRE du promoteur du gène de la rénine. La liaison des LXRs au CNRE corrèle l'état fonctionnel de l'appareil juxtaglomérulaire (Morello et al. 2005).

La capacité de ces LXRE à recruter et fixer l'hétérodimère LXR-RXR a été analysé par CHIP-seq et les fragments d'ADN sur lesquelles le dimère était fixé ont été séquencés. On remarque une certaine variabilité quant aux sites de fixation des LXRs sur la chromatine. Même si les séquences DR4 sont bien représentées, d'autres LXRE sont retrouvés suggérant des modalités de fixation encore inconnues (Figure 7 ; (Pehkonen et al. 2012).

2.2. La transactivation

2.2.1. Liaison à l'ADN indépendante du ligand

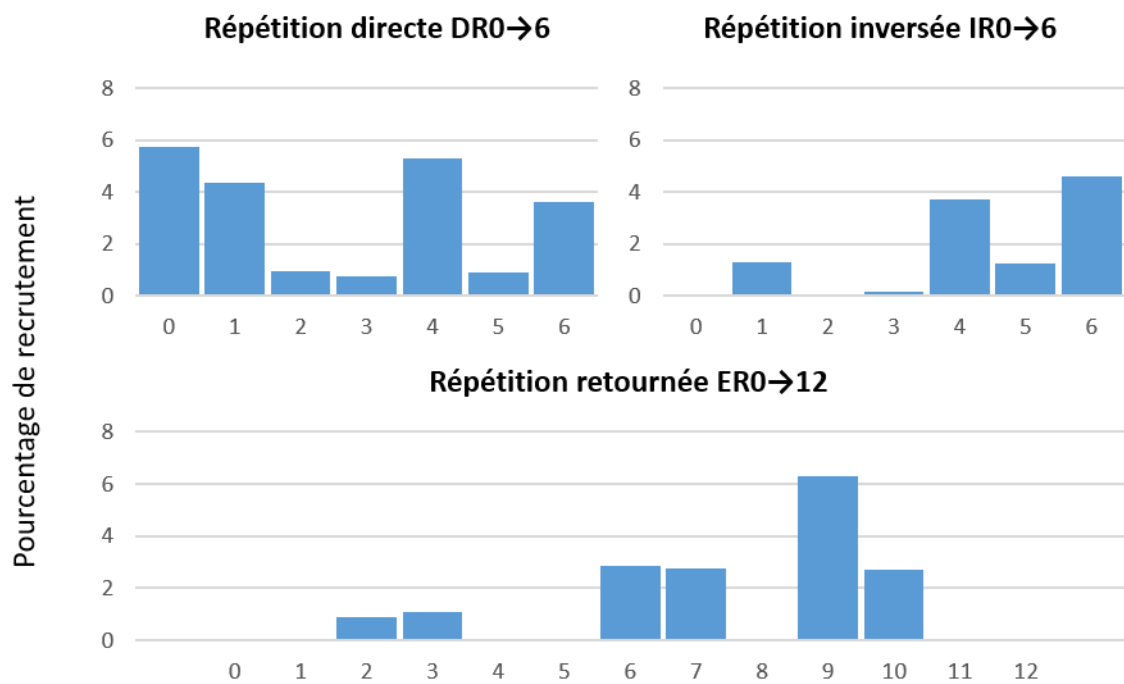


Figure 7 : Séquences LXRE fixées suite à une stimulation T0901317

Des cellules THP-1 (leucémie monocyttaire humaine) ont été traitées ou non avec du T0901317. Les données de ChIPseq entre les conditions DMSO et T0901317 sont comparées afin d'analyser le recrutement des LXRs sur différents. Ces données ont été récupérées des *supplemental data* de Pehkonen et al. 2012.

Selon le modèle conventionnel (Figure 8), en l'absence de ligand, les LXRs sont acétylés (X. Li et al. 2007) au niveau des résidus K432 (LXR α) ou K433 (LXR β) dans le domaine AF2, et constitutivement liés avec RXR à leur LXRE. L'hétérodimère interagit alors avec des corépresseurs, par exemple NCoR ou SMRT (X. Hu et al. 2003), qui bloquent la transcription par le recrutement d'histones désacétylases au travers de l'interaction avec des protéines comme Sin3A (Lazar 2003). L'oxystérol se liant à LXR conduit à des modifications du domaine carboxyterminal et la libération des co-répresseurs. Ce réarrangement provoque la libération de l'hélice 12 qui agit comme un piège bloquant le ligand dans sa poche de liaison et renforce les interactions des coactivateurs tels que ASC-2 (S. Lee et al. 2008) sur le domaine AF-2 (Svensson et al. 2003) et le recrutement d'histones acétylases. Cette cascade d'événements place la chromatine dans un état permissif. De manière concomitante, la sirtuine 1 induit la désacétylation des LXRs. Ceci est suivi par une ubiquitinylation de LXRs et une dégradation par le protéasome.

2.2.2. Liaison à l'ADN dépendante du ligand

En réalité, des expériences récentes utilisant des techniques basées sur de l'immunoprécipitation de chromatine (ChIP et ChIP-seq) ont commencé à questionner la pertinence physiologique ce modèle. Ces études suggèrent que les ligands, les co-facteurs, les corégulateurs et les modifications post-traductionnelles jouent des rôles distincts dans la détermination des sites de liaison génomique des LXRs, appelés cistromes, *in vivo*. De tels cistromes ont été rapportés pour des LXRs endogènes provenant de foie de souris *in vivo* (Boergesen et al. 2012), de macrophages humains (Pehkonen et al. 2012) et de macrophages de souris exprimant des LXRs marqués *in vitro* (Heinz et al. 2010). Le traitement avec l'agoniste T0901317 a identifié 16 000 sites de liaison contre 4000 sites sans T0901317, indiquant une augmentation de la liaison des LXRs après activation par le ligand. Les agonistes des LXRs dans le foie permettraient aux récepteurs de se lier à des sites moins accessibles en raison d'une structure de chromatine plus fermée. L'étude chez les macrophages humains confirme l'augmentation du recrutement de LXRs par activation des ligands et que ces sites de

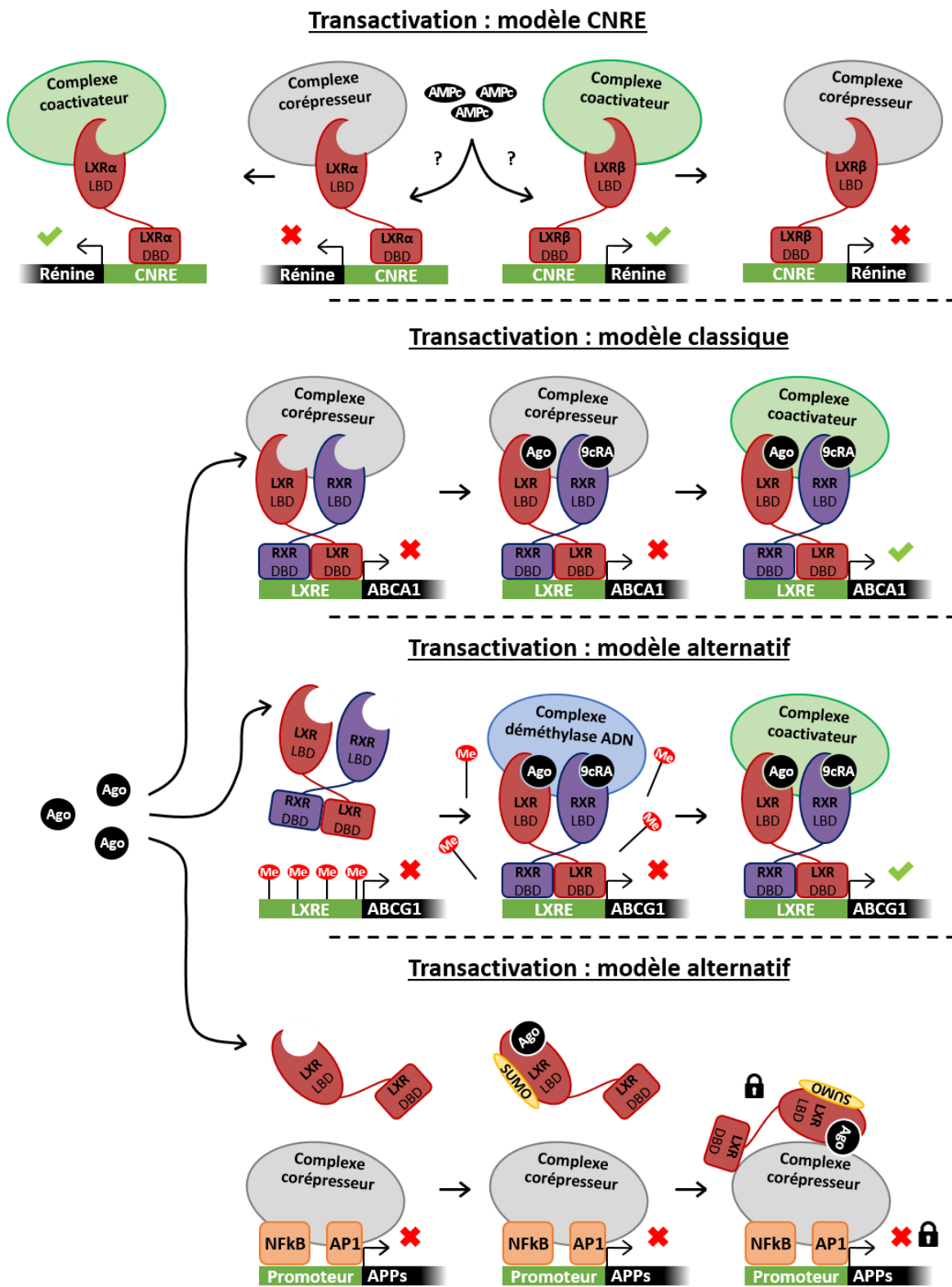


Figure 8: Différents modes d'actions des LXRs

Ce schéma présente les différents mode d'action des LXRs connus à ce jour.

liaison sont distribués dans des zones limitées, appelées points chauds (*hotspots*). En conclusion, ces nouvelles données suggèrent que la liaison des LXRs à une majorité de sites génomiques nécessite l'activation par des ligands (Figure 8), alors que les LXRs constitutivement liés occupent une minorité de sites génomiques (modèle d'action conventionnel). Par exemple, le recrutement des LXRs sur le promoteur du gène ABCG1 semble lié au ligand et nécessite sélectivement le corégulateur GPS2 (*G-protein pathway suppressor 2*), conjointement avec les histones déméthylases (Jakobsson et al. 2009). En conséquence, le recrutement des LXRs dépendant de GPS2 entraîne des changements dans les marques d'histones épigénétiques, provoquant une structure de la chromatine plus ouverte. A l'inverse, les effets transcriptionnels des LXRs sur ABCA1 semblent suivre le mode d'action canonique.

2.3. La transrépression

Les effets transcriptionnels négatifs (transrépressions) des LXRs n'ont été décrits que récemment. Les LXRs ont la capacité d'inhiber l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que NFκB, STAT et certains membres de la famille AP1. Des études sur les macrophages (Ghisletti et al. 2007) et les hépatocytes (Venteclef et al. 2010) ont indiqué que les agonistes des LXRs peuvent déclencher une modification post-traductionnelle par SUMO, permettant ainsi aux LXRs d'entamer une transrépression. Les LXRs SUMOylés se lient au complexe corépresseur NCoR-SMRT au niveau des promoteurs de gènes de réponse inflammatoire, vraisemblablement via les sous-unités GPS2 et/ou la coronine 2A, empêchant ainsi le rejet du complexe de corépresseur et bloquant l'activation du gène cible (Figure 8 ; (Venteclef et al. 2011). Le processus de SUMOylation des LXRs est à ce jour mal compris et se produit à des sites non consensus sur le LBD, par le biais des enzymes SUMO-2/3, mais n'implique pas SUMO-1.

2.4. Les modifications post-traductionnelles des LXRs

2.4.1.1. Acétylations

Les LXRs sont des protéines acétylées au niveau des Lysines K432 (LXR α) ou K433 (LXR β ; Figure 9). L'activité de la désacétylase SIRT1 favorise l'ubiquitinylation du récepteur et sa dégradation par le protéasome, tout en étant un régulateur positif de son activité transcriptionnelle (X. Li et al. 2007). Li et al. ont suggéré que la désacétylation induite par le ligand et la dégradation qui en résulte conduit à la clairance des LXRs des promoteurs, et facilite le prochain cycle de transcription, augmentant ainsi l'expression des gènes cibles. Cette étude a également démontré que les animaux déficients en Sirt1 présentent des niveaux plus élevés de protéines LXR α , une altération du métabolisme lipidique et un mauvais retour hépatique du cholestérol en partie dû à l'expression réduite d'AbcA1 et de la diminution des taux de HDL. Cette hypothèse a été soutenue par une étude dans le muscle squelettique humain où SIRT1 régule l'expression du gène cible lipogénique Srebp1c (Defour et al. 2012).

2.4.1.2. O-GlcNacylation

Si la fixation du glucose dans la LBP des LXRs a été définitivement écartée, une étude sur des cellules hépatiques humaines et un modèle de diabète a montré que les LXR subissent une O-GlcNacylation en réponse au glucose (Anthonisen et al. 2010). Les auteurs proposent que les effets rapportés précédemment par le glucose (Mitro et al. 2007) soient provoqués par sa signalisation en aval, vraisemblablement par des modifications post-traductionnelles. Cette étude soutient également que cette modification affecte l'expression de Srebp1c, bien que les mécanismes exacts par lesquels O-GlcNacylation régule l'activité de LXR ne soient pas éclaircis.

2.4.1.3. Phosphorylation

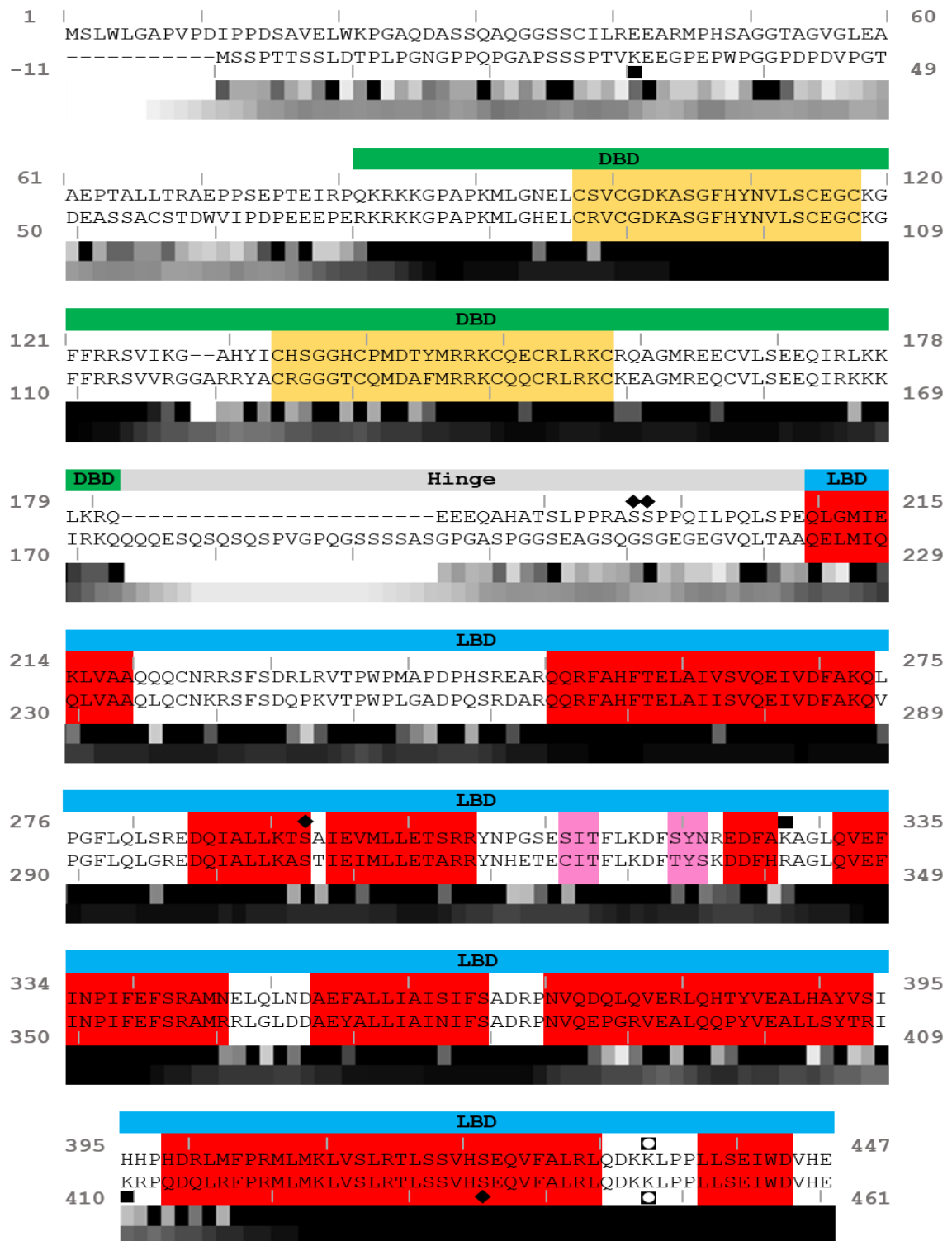


Figure 9: Modifications post-traductionnels des LXRs

Les séquences protéiques de LXRα et LXRβ sont alignées. Sous les séquences l'homologie acide-aminé par acide-aminé est représentée par gradient allant de blanc (faible homologie) à noir (forte homologie). Sous cette ligne, le score d'alignement local est représenté par un gradient allant de blanc (pour une faible homologie locale) à noir (pour une forte homologie locale). Les peptides en jaunes forment les 2 doigt de zinc. Les résidus en rouge forment les hélices. Les symboles carrés noirs représentent des résidus SUMOylés ,les carrés blancs sont des résidus acétylés et les losanges sont les résidus phosphorylés.

hLXR α est phosphorylée sur des sérines à la fois *in vitro* et *in vivo* dans des plaques athérosclérotiques de souris déficientes en ApoE (M. Chen et al. 2006; Torra et al. 2008; C. Wu et al. 2015). Cette phosphorylation module l'activité transcriptionnelle de LXR α en fonction des gènes cibles et est renforcée par les agonistes (Torra et al. 2008; C. Wu et al. 2015). L'inhibition de la phosphorylation de la Ser198 entraîne des changements dans l'expression des gènes régulés en particulier par LXR α (Torra et al. 2008). Le résidu Ser198 est situé dans la région charnière de LXR α et est ciblé par la *casein kinase 2* (Torra et al. 2008). Des études de modélisation moléculaire des peptides suggèrent que la phosphorylation de la Ser198 affecte la conformation de LXR α , influençant le recrutement de cofacteurs, tels que NCoR (Figure 9 ;(Torra et al. 2008; C. Wu et al. 2015).

La phosphorylation de LXR α par d'autres kinases, y compris la protéine kinase A, a également été rapportée sur plusieurs résidus (Ser195, Ser196, Thr290, Ser291) dans les hépatocytes primaires de rat et le foie de souris, bien qu'aucune étude détaillée de mutagenèse n'ait été réalisée. La phosphorylation de LXR α par la protéine kinase A conduit à la répression de l'expression de Srebp1c, causée par une liaison réduite de l'hétérodimère RXR/LXR α à l'ADN, ainsi qu'à un recrutement diminué de coactivateur (SRC-1) et un taux d'occupation accru du corépresseur (NCoR). La régulation de la phosphorylation de LXR α induite par le cholestérol et les oxystérols (Torra et al. 2008) a incité d'autres études à se pencher sur l'effet des kinases régulées par les nutriments. L'oltipraz, un dithiolethione synthétique, atténue la phosphorylation de LXR α au niveau d'un résidu sérine non spécifié dans le foie de souris par l'inhibition de la S6K1 (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*) (Hwahng et al. 2009) conduisant à une réduction de l'expression du gène cible Srebp1c en culture cellulaire.

2.4.1.4. SUMOylation

Ghisletti et al. (Ghisletti et al. 2007) ont initialement démontré que la SUMOylation des LXRs induite par un ligand est nécessaire pour son interaction avec le corépresseur NCoR dans des macrophages primaires de souris et des cellules de

macrophages RAW264.7. Cette modification empêche la libération de NCoR par NFκB (ou AP-1) sur le promoteur des gènes pro-inflammatoires. L'interaction entre les LXRs SUMOylés et NCoR est facilitée par la Coronin 2A qui agit à la fois comme un site d'accueil pour les LXRs et un facteur d'échange pour NCoR (W. Huang et al. 2011). Une étude ultérieure a montré que les formes mutantes des deux LXRs dépourvus de sites accepteurs SUMO (LXR α K328R / K434R et LXR β K410R / K448R) ont une capacité réduite à réprimer des signaux pro-inflammatoire (Figure 9 ; (Pascual-García et al. 2013)).

3. Les ligands des LXRs

3.1. Endogènes

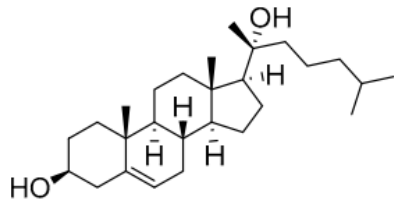
3.1.1. Agonistes

Les oxystérols (Figure 10) sont les ligands endogènes des LXRs (Janowski et al. 1996; Lehmann et al. 1997). Deux familles ont été historiquement identifiées.

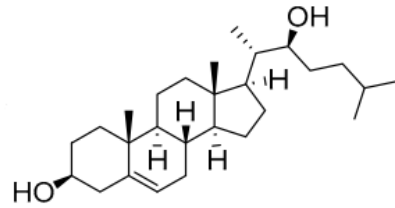
Les dérivés enzymatiquement oxydés du cholestérol en position 20(S)-, 22(R), 24(S), 25-, 27-hydroxycholestérol et 24(S),25-époxycholestérol se lient aux LXRs avec des valeurs de Kd de 0,1 à 0,4 μ M.

- Le 24(S)-hydroxycholestérol, également connu sous le nom de cérébrostérol en raison de son abondance dans le cerveau, est synthétisé par la 24-hydroxylase. C'est un activateur du gène ABCA1 (Ingemar Björkhem 2007; I. Björkhem 2006).
- Le 27-hydroxycholestérol est généré à partir du cholestérol par l'enzyme P450 stérol 27-hydroxylase, codée par CYP27A1. Il peut être oxydé en aldéhyde et en acide carboxylique (acide cholesténoïque) par la 27-hydroxylase. Le 27-hydroxycholestérol et l'acide cholesténoïque sont tous les deux les ligands des LXRs (Pikuleva 2006; C. Song et Liao 2000; X. Fu et al. 2001).
- Le 25-hydroxycholestérol, synthétisé par la 25-hydroxylase, est un puissant régulateur des voies LXRs. Il influence également l'expression des gènes cibles LPL, ABCG5 et ABCG8 (W. Chen et al. 2007).

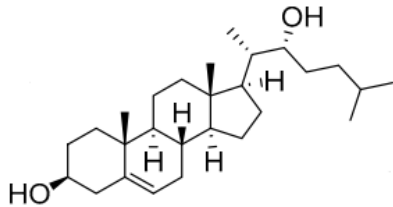
Le deuxième type d'oxystérols activateurs des LXRs sont des intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol et de son métabolisme.



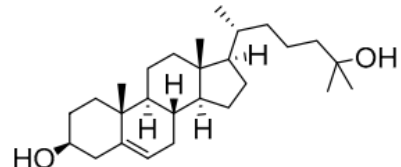
20(S)-Hydroxycholestérol



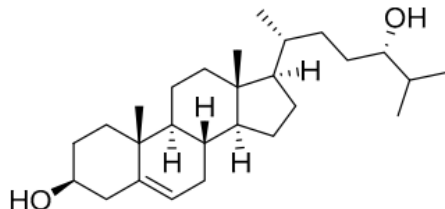
22(R)-Hydroxycholestérol



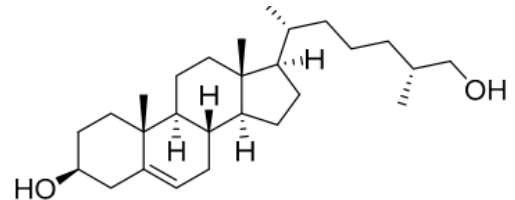
22(S)-Hydroxycholestérol



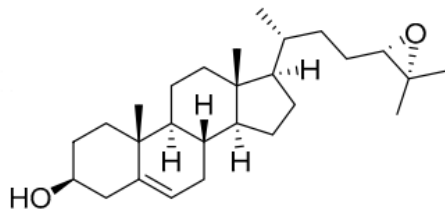
25-Hydroxycholestérol



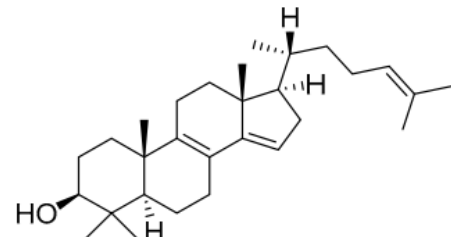
24(S)-Hydroxycholestérol



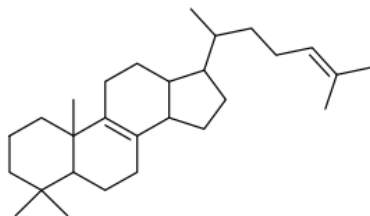
27-Hydroxycholestérol



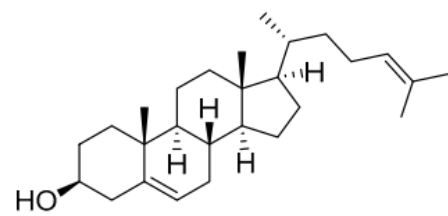
24(S),25-Hydroxycholestérol



FF-MAS



T-MAS



Desmosterol

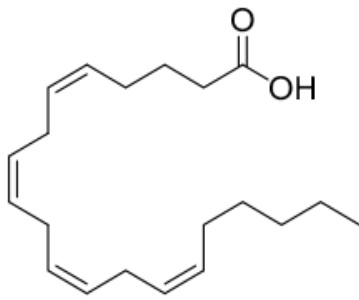
Figure 10 : Ligands endogènes agonistes des LXRs

- 24(S), 25-époxycholestérol est un oxystérol unique qui est produit dans une dérivation de la voie du mévalonate. La perte de 24(S),25-époxycholestérol diminue l'expression des gènes cibles des LXRs comme ABCA1 (Wong et al. 2008). D'autres intermédiaires tels que le desmostérol et le zymostérol activent également les LXRs (Yang et al. 2006).
- Les stérols FF-MAS (4,4-diméthyl-5 α -cholesta-8,14,24-triène-3 β -ol ; intermédiaire de la synthèse du cholestérol dans l'ovaire) et le T-MAS (4,4-diméthyl-5 α -cholesta-8,24-diène-3 β -ol) induisent la méiose des ovocytes via l'activation des LXRs (Terasaka et al. 2003).
- La dendrogenine A (DDA), issue de la réaction d'un dérivé du cholestérol avec l'histamine présente une activité anti-tumorale. Cette molécule lie préférentiellement LXR β (Segala et al. 2017)

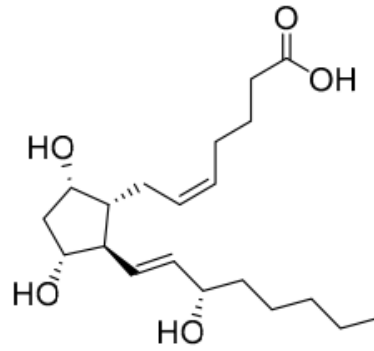
3.1.2. Antagonistes

Plusieurs antagonistes endogènes des LXRs ont été identifiés (Figure 11).

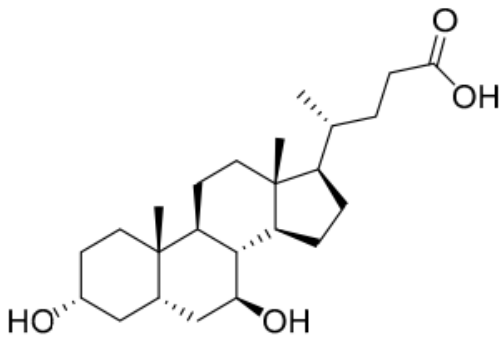
- L'acide arachidonique et d'autres acides gras inhibent de façon compétitive l'activation transcriptionnelle du gène SREBP-1c induite par le T0901317 (ligand agoniste synthétique) dans des cellules d'hépatome de rat en culture. L'arachidonate bloque l'activation d'un promoteur synthétique LXRE dans des cellules HEK293 transfectées. *In vitro*, l'arachidonate et d'autres acides gras insaturés bloquent de façon compétitive l'activation des LXRs (Ou et al. 2001; Yoshikawa et al. 2002). Néanmoins et contrairement aux oxystérols, la preuve de l'activité physiologique de ces antagonistes n'a jamais été démontrée *in vivo*.
- La prostaglandine F_{2 α} (PGF_{2 α}) est l'un des métabolites de la cyclooxygénase sur l'acide arachidonique. La PGF_{2 α} bloque l'activation induite par le T0901317 de LXR α -LBD et de LXR β -LBD de façon dépendante de la dose avec une valeur de IC50 (concentration d'antagoniste requise afin d'inhiber 50% des effets d'un



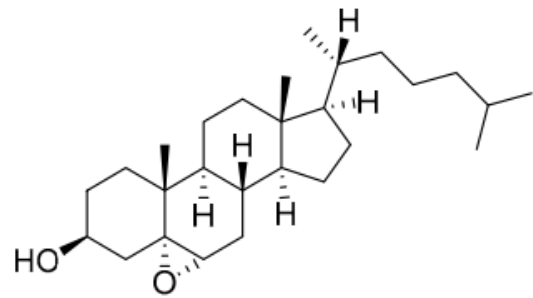
Acide Arachidonique



Prostaglandine F_{2α}



Acide ursodeoxycholique



5,6-Epoxycholestérol

Figure 11 : Ligands endogènes antagonistes des LXRs

agoniste) de 12,6 μM et 15 μM respectivement. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ a également une action antagoniste sur l'activité du promoteur ABCA1 et ABCG1 induite par le T0901317 (Zhuang et al. 2013).

- La protéine SMILE (*small heterodimer partner interacting leucine zipper protein*) a été identifiée comme un corépresseur nucléaire de la famille des récepteurs nucléaires (NRs). L'acide ursodésoxycholique (UDCA) est un acide biliaire augmentant le niveau protéique de SMILE de manière dose-dépendante, et inhibe $\text{LXR}\alpha$ (J.-M. Lee et al. 2014). Le $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholestérol (5,6-EC) est un produit de l'auto oxydation du cholestérol retrouvé dans la circulation sanguine humaine et des lésions athéroscléreuses. Dans un test d'interaction de cofacteur avec les LXRs, le 5,6-EC se lie directement au LBD et perturbe le recrutement de cofacteurs à la fois pour $\text{LXR}\alpha$ et $\text{LXR}\beta$. Le 5,6-EC présente également un comportement antagoniste sur les gènes régulés par les LXRs (Berrodin et al. 2010).

3.2. Naturels exogènes

3.2.1. Agonistes

De nombreux composés purifiés à partir de plantes ou de champignons modulent l'activité des LXRs (Figure 12). Ces composés naturels pourraient offrir une efficacité thérapeutique potentielle tout en minimisant certains effets secondaires, tels que l'hypertriglycéridémie (C. Huang 2014).

- Les phytostérols, y compris l'ergostérol, le brassicastérol, le campestérol, le β -sitostérol, le stigmastérol et le fucostérol sont des stérols naturels et sont les équivalents végétaux du cholestérol et de ses dérivés chez les mammifères. Le traitement des cellules intestinales par des phytostérols augmente l'expression des gènes cibles des LXRs (Plat et Mensink 2002), suggérant que les phytostérols ou leurs métabolites agissent comme des ligands des LXRs et influencent le métabolisme du cholestérol (Plat, Nichols, et Mensink 2005). Stanols et stérols

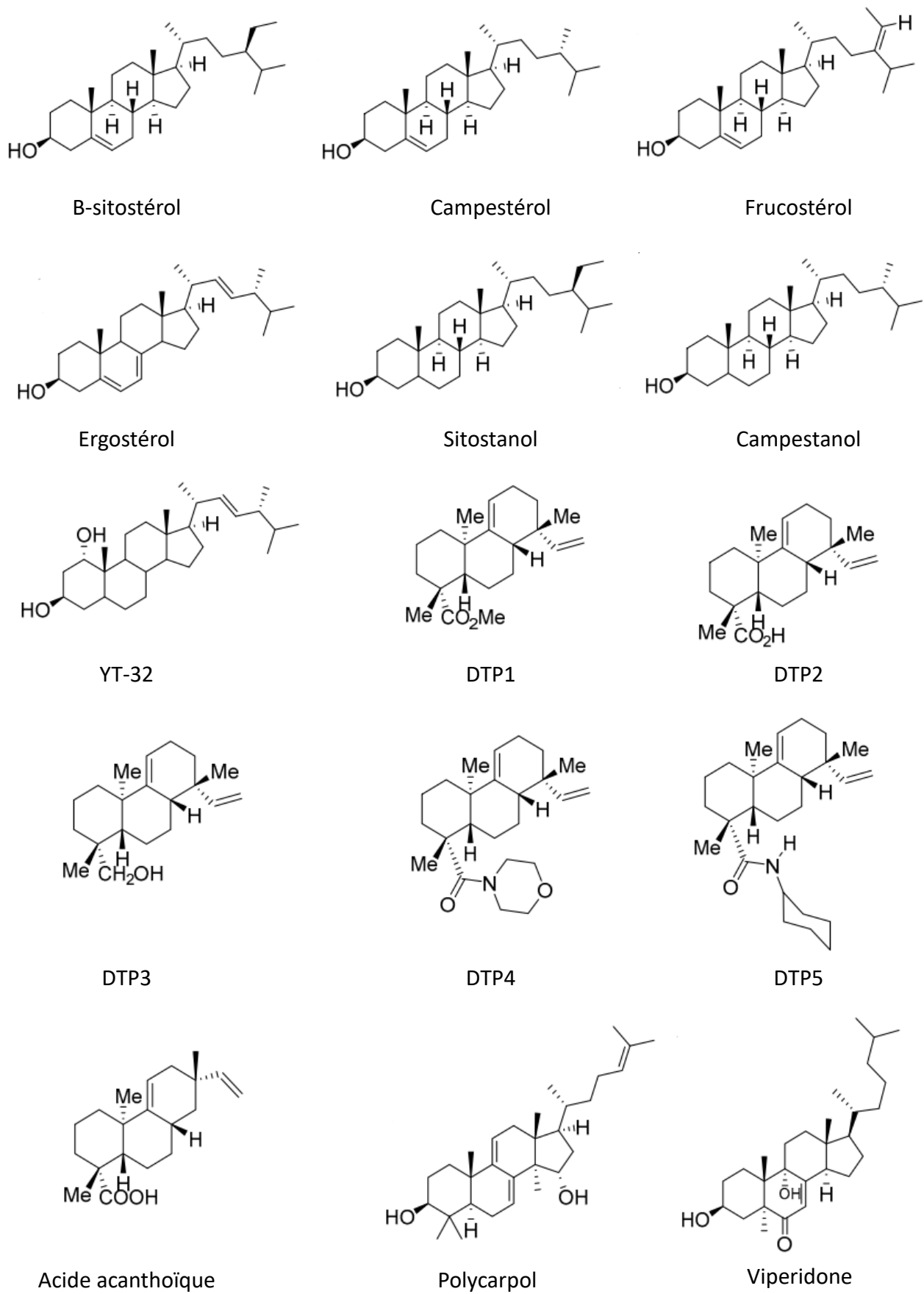


Figure 12: Ligands exogènes naturels agonistes des LXRs (partie 1)

augmentent l'expression intestinale d'ABCA1 (sitostanol, sitostérol, campesterol et fucostérol) et diminuent l'absorption du cholestérol (Plat et Mensink 2002; Plat, Nichols, et Mensink 2005)..

- Le fucostérol, un stérol abondant dans les algues marines, a des effets hypocholestérolémiantes et augmente l'activité plasmatique des lipoprotéines de haute densité (*High Density Lipoprotein* ; HDL). Il induit de manière significative la transactivation de LXR α et de LXR β à 200 μ M dans les cellules HEK 293 (Hoang, Jia, Jun, Lee, Lee, et Lee 2012). Dans les cellules HepG2, le fucostérol (200 μ M) augmente l'expression des ARNm de ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 et de la protéine de transfert des esters de cholestéryle (CETP).
- Le YT-32 ((22E)-ergost-22-ène-1 α ,3 β -diol), dérivé synthétique de l'ergostérol ou du brassicastérol, se lie directement à LXR α et stimule l'interaction de LXR α avec ACTR et DRIP205, deux coactivateurs, à une concentration de 10 μ M. Il active également LXR β avec une valeur EC50 (concentration d'agoniste pour laquelle 50% des effets maximaux sont observés) de 1,1 μ M. Contrairement à l'agoniste synthétique T0901317, le YT-32 inhibe l'absorption du cholestérol intestinal sans augmenter les taux de triglycérides plasmatiques. Ainsi, YT-32 module sélectivement le métabolisme du cholestérol intestinal (Kaneko et al. 2003).
- Les diterpènes (DTP) sont des stéroïdes naturels qui sont largement présents dans les plantes et les insectes. L'acide acanthoïque (AA) est un diterpène pimaradiène, isolé de l'écorce de racine d'*Acanthopanax koreanum Nakai*. AA active LXR α et LXR β et module la fibrose hépatique induite par le CCl₄ chez les animaux en inhibant la translocation de NF κ B. L'AA inhibe également la croissance des cellules stellaires hépatiques de rat (HSC-T6) *via* l'activation des LXRs (Bai et al. 2014). Traves et al. ont rapporté que la stimulation des macrophages avec des diterpènes liés à l'acide acanthoïque (DTP 1-5) induit l'expression des gènes cibles des LXRs et l'efflux de cholestérol à un niveau similaire à celui des agonistes synthétiques GW3965 et T0901317 (Traves et al. 2007).

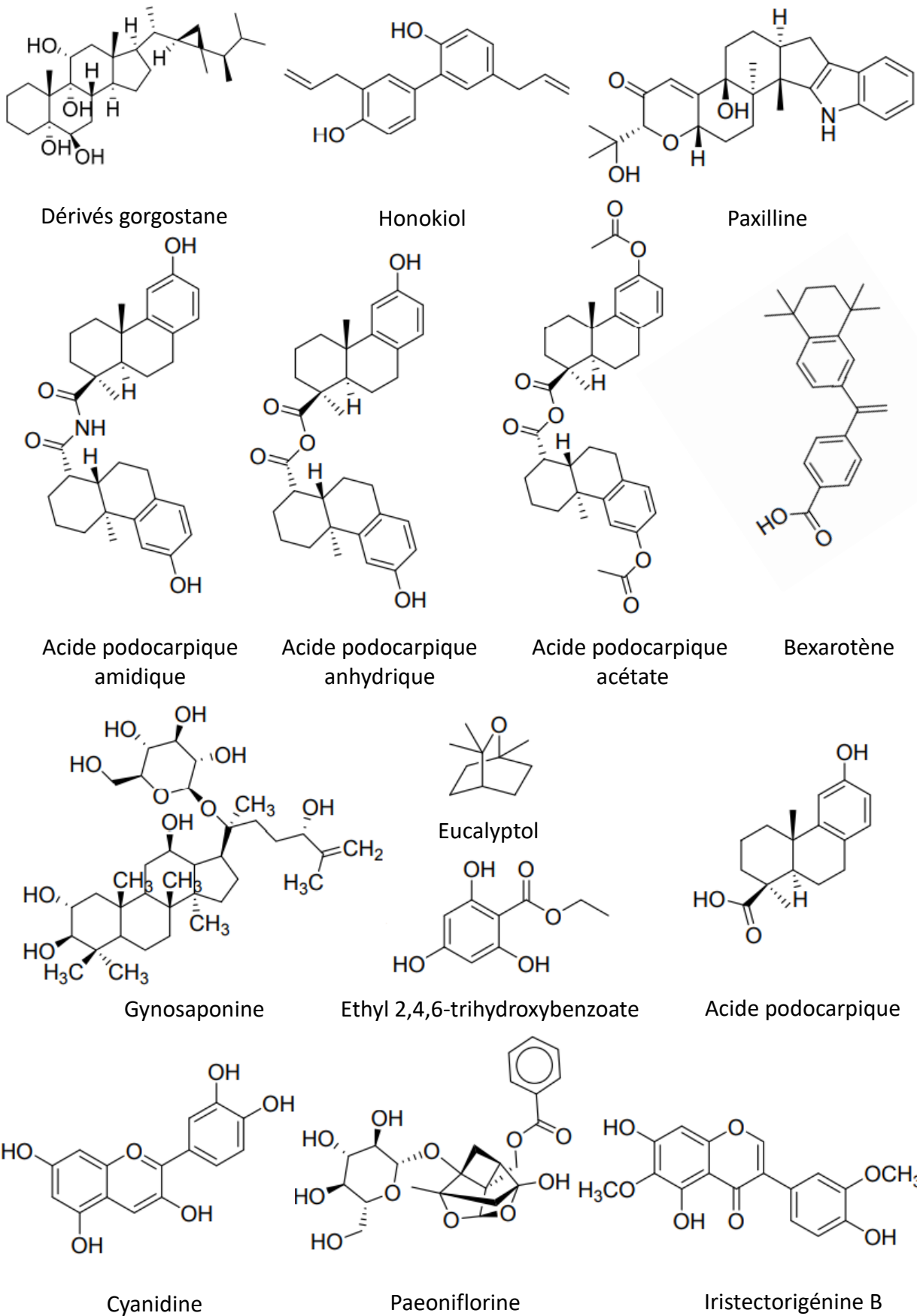


Figure 12 : Ligands exogènes naturels agonistes des LXRs (partie 2)

- La gynosaponine TR1 ((20S)-2 α ,3 β ,12 β , 24(S)-pentahydroxydammar25-ène 20-O- β -D-glucopyranoside), isolée de *Gynostemma pentaphyllum* une plante utilisée dans la phytothérapie chinoise, est un agoniste des LXRs. Elle présente également une activité sélective pour LXR α . Dans les cellules HEK293, la gynosaponine TR1 à une concentration de 10 μ M induit une élévation significative de l'activité de la luciférase régulée par LXR α et de l'expression des gènes ABCA1 et ApoE dans les lignées de macrophages THP-1, ceci favorisant l'efflux de cholestérol (T. H.-W. Huang et al. 2005).
- La riccardine C (RC), isolé de *Blasia pusilla* est un agoniste non stéroïdien naturel de LXR α . RC peut améliorer l'efflux cellulaire de cholestérol dans les macrophages THP-1 et l'expression de ABCA1, ABCG1, et SREBP1c à une concentration de 10 μ M.
- L'acide podocarpique est un agoniste non stéroïdien des LXRs, dérivé des résines végétales. Les dérivés de l'acide podocarpique tels que son dimère anhydride et les imides se lient à la fois à LXR α et à LXR β à des concentrations de 1 à 2 nM. Des études de transactivation dans les cellules HEK293 indiquent que le dimère anhydride a une valeur d'EC50 de 1 nM envers les deux récepteurs. L'imide, plus stable et plus puissant, utilisé chez la souris, augmente les taux de HDL (Singh et al. 2005).
- La taurine (acide 2-aminoéthanesulfonique), qui est abondante dans les fruits de mer, est connue pour ses implications nutritionnelles dans l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose. Hoang et al. ont rapporté que la taurine se lie directement à LXR α dans les cellules CHO-K1, et stimule son activité transcriptionnelle à une concentration de 100 μ M. La taurine réduit aussi les taux de cholestérol cellulaire et de TG dans les hépatocytes en n'induisant pas les gènes de synthèse des acides gras, y compris FAS et SCD1 (Hoang, Jia, Jun, Lee, Hwang, et al. 2012).
- La Paeoniflorin provient de *Paeonia lactiflora* Pall, une plante médicinale avec des effets anti-hyperlipidémiques, neuroprotecteurs et protégeant des fibroses hépatiques. Elle transactive les promoteurs de PLTP, ABCA1 et CYP7A1 (3 gènes

cibles des LXRs) de rat avec des valeurs d'EC50 de 21,6 μM , 11,9 μM et 66 μM respectivement (Lin 2013).

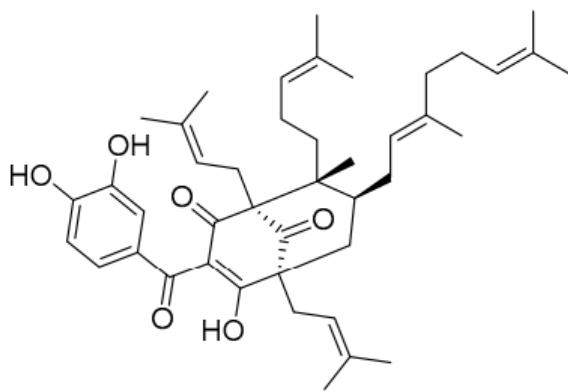
- L'iristectorigénine B, isolée à partir de *Belamcanda chinensis*, induit de manière dose-dépendante l'activité transcriptionnelle des LXRs. L'iristectorigénine B augmente l'efflux de cholestérol sous forme de HDL et réduit la concentration de cholestérol cellulaire dans les macrophages. À une concentration de 10 μM , il augmente de manière significative les niveaux d'expression de l'ARNm ABCA1 et ABCG1 (Jun et al. 2012).
- Le 2,4,6-trihydroxybenzoate d'éthyle (ETB), isolé à partir de *Celtis biondii*. Il se lie et stimule directement aux LXRs stimule leurs activités transcriptionnelles. En effet, l'ETB induit la transactivation de LXR α et de LXR β à 100 μM avec des valeurs d'EC50 de 80,8 et 37,8 μM , respectivement. L'ETB favorise l'efflux de cholestérol sous forme de HDL et diminue la concentration de cholestérol cellulaire dans les lignées cellulaires THP-1, RAW 264.7 de manière dose-dépendante. A une concentration de 100 μM , ETB augmente l'expression de l'ARNm ABCA1 dans les cellules THP-1 et RAW 264,7 (Hoang, Jia, Jun, Lee, Lee, Hwang, et al. 2012).
- La cyanidine, un flavonoïde naturel présent dans de nombreux fruits et légumes, est connue pour réguler le métabolisme des lipides cellulaires. A 100 μM , la cyanidine induit la transactivation des LXRs. Les valeurs Kd de la cyanidine avec LXR α et LXR β ont été mesurées à 2,16 et 73,2 μM , respectivement. La cyanidine active LXR α avec une valeur EC50 de 3,48 μM et LXR β à 125,2 μM . La cyanidine active les gènes cibles des LXRs, y compris ABCA1, SREBP1c et ABCG5 et réduit les concentrations de triglycérides (TG) cellulaire dans les cellules THP-1 et HepG2 (Jia et al. 2013).
- L'hesperetin, également un flavonoïde et présent dans de citron, module les LXRs. Des expérimentations *in vitro* montrent qu'à 10 μM ce flavonoïde induit la transactivation de LXR α , l'augmentation des transcrits ABCA1 et l'élévation de l'efflux de cholestérol dans la lignée de macrophage THP-1 (Iio et al. 2012).

- Le 1,8 cinéole, présent dans notamment dans l'eucalyptus, stimule la transactivation des LXRs. En effet, le traitement des cellules CHO-K1 avec du cinéole induit la transactivation des LXRs. Dans les macrophages RAW264.7, le cinéole est capable de réduire les taux de cholestérol intracellulaire et d'augmenter l'accumulation des ARNm cibles des LXRs. De façon surprenante, dans les hépatocytes stimulés par le cinéole, les gènes sensibles aux LXRs tels que FAS, SREBP1c et SCD1 ont été fortement régulés à la baisse. Ces résultats suggèrent que le cinéole agit comme un agoniste partiel qui active sélectivement les LXRs sans induire la lipogenèse hépatique (Jun et al. 2013).
- La paxilline et l'ergostan-4,6,8,22-tétraène-3-one (un dérivé de l'ergostane) ont également démontré des activités agonistes des LXRs (Bramlett et al. 2003).

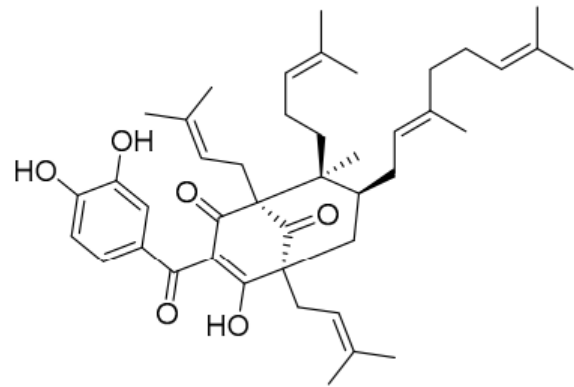
3.2.2. Antagonistes

Bien que le développement de ligands spécifiques des LXRs se soit concentré sur l'identification d'agonistes naturels ou synthétiques « thérapeutiquement utiles », plusieurs antagonistes naturels (Figure 13) ont été décrits dans des rapports récents démontrant leur capacité à réduire les triglycérides et à réduire les stéatoses hépatiques, suggérant l'utilité potentielle de telles molécules comme agents thérapeutiques.

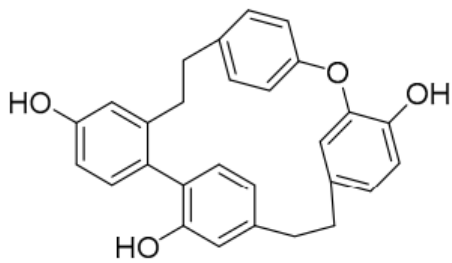
- La guttiférone inhibe l'activité de LXR α avec une valeur d'IC₅₀ de 3,4 μ M et celle de LXR β avec une valeur de 15 μ M, indiquant une sélectivité 5 fois plus importante envers LXR α (Herath et al. 2005).
- La Riccardine F (RF) est un antagoniste non stéroïdien naturel des LXRs isolé de *Blasia pusilla*. A une concentration de 30 μ M, il diminue l'expression de Srebp1c induit par le T0901317 dans les lignée cellulaires HepG2 et THP-1 (Tamehiro et al. 2005).
- La naringénine est un flavonoïde qui peut être trouvé dans les agrumes. Cette molécule présente des activités antagonistes vis-à-vis de LXR α en présence de



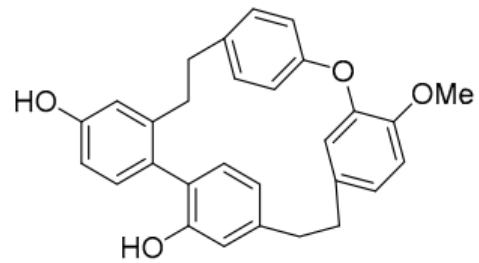
Guttiférone I



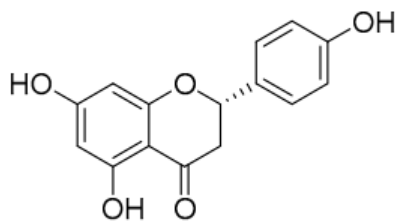
Guttiférone G



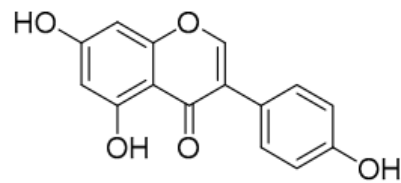
Riccardine C



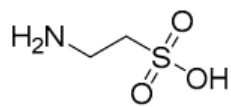
Riccardine F



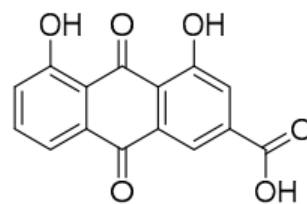
Naringénine



Génistéine



Taurine



Rhéine

Figure 13 : Ligands exogènes naturels antagonistes des LXRs

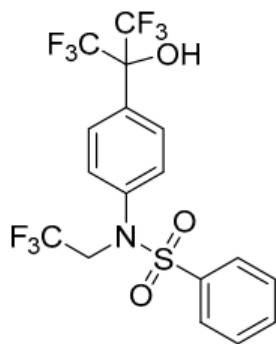
l'agoniste T0901317. L'activité de LXR α est réduite dans des cellules HEK293 stimulées au T0901317. De même, l'accumulation des ARNm ABCA1, ABCG1, HMGR et FAS était diminuée (Goldwasser et al. 2010).

- La génistéine est un flavone dérivée du soja et réduit l'expression de SREBP-1c et ABCA1 en supprimant l'activation de LXR α induite par un agoniste. A l'inverse, LXR β est activé, augmentant l'expression de ABCG5 et ABCG8, et montrant ainsi des actions opposées de la génistéine sur les deux isoformes des LXRs (González-Granillo et al. 2012).
- La morine est un flavonoïde abondamment présent dans les mûres. *In vitro* la 10 μ M de morine inhibe la transactivation des LXRs induite par l'agoniste GW3965 dans les cellules HEK293T. Le traitement de cellules HepG2 avec 25 μ M de morine montre une diminution significative des transcrits cibles SREBP1c, FAS, ABCA1 et ABCG1. De plus, *in vivo*, la morine retarde la stéatose hépatique et diminue les niveaux de triglycérides (Gu et al. 2017).
- La lutéoline est un flavonoïde très présent dans les légumes et ayant été identifié comme antagoniste des LXRs. A 10 μ M, la lutéoline inhibe l'activité des LXRs induite par le T0901317. De plus *in vitro*, 25 μ M de lutéoline diminue significativement les niveaux de transcrits SREBP1C dans les cellules HepG2 (Francisco et al. 2016).
- *Rheum palmatum L.*, ou rhubarbe chinoise, contient la rhéine (acide 4,5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylique) qui présente des activités antagonistes envers les LXRs (Sheng et al. 2011). La rhéine inhibe de manière dose-dépendante l'activité transcriptionnelle de LXR α et de LXR β stimulée induite par le GW3965 (agoniste synthétique)

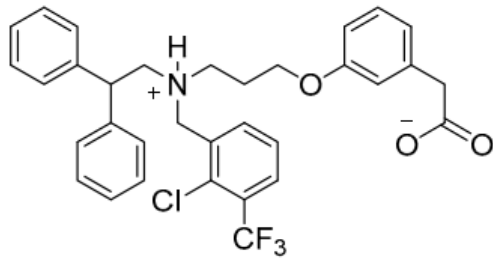
3.3. Composés synthétiques

De nombreuses études prouvant l'efficacité de la modulation des LXRs dans diverses pathologies (cf. chapitre 1.5) ont conduit au développement de nouveaux agonistes puissants des LXRs.

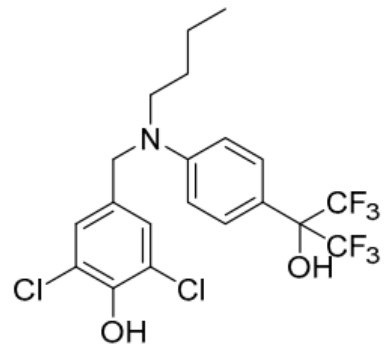
- Parmi les ligands synthétiques mis au point (Figure 14), le dérivé de l'acide cholesténoïque, l'hypocholamide, réduit le cholestérol plasmatique total (C. Song et Liao 2001). L'hypocholamide stimule le transport inverse ou hépatique du cholestérol (cf chapitre 1.4.1.2). L'hypocholamide est un activateur de LXR α relativement spécifique par rapport à LXR β .
- La synthèse de ligand des LXRs en se basant sur le 22R-hydroxycholestérol (agoniste) a mené à la création du 22S-hydroxycholestérol. Celui-ci est capable d'inhiber les effets d'un activateur des LXRs dans différents systèmes (Spencer et al. 2001).
- Le T0901317 est un ligand synthétique non stéroïdien induisant l'expression d'ABCA1. Alors que le T0901317 semble être un activateur des LXRs très efficace, le ligand peut être également un activateur de PXR et de FXR, ainsi qu'un inhibiteur de ROR α et ROR γ (Viennois et al. 2012; Färnegårdh et al. 2003).
- Le GW3965 est un autre ligand non stéroïdien plus sélectif pour les LXRs (Fradera et al. 2010). Le ligand, développé par GlaxoSmithKline, a été testé dans la prévention de l'athérosclérose, des lésions cérébrales induites par l'ischémie et d'autres incidences arthritiques et inflammatoires. Alors que le GW3965 présente une sélectivité accrue, il a été associé à des effets hypertriglycéridémiant chez les souris, ce qui limite fortement à ce jour son utilisation en thérapie humaine (Joseph, Laffitte, et al. 2002; Joseph, McKilligin, et al. 2002).
- Le T0901317 et le GW3965 ont été étudiés intensivement sur leur activation des LXRs, et en tant que tels, plusieurs groupes de recherche académiques et privés ont développé de nouveaux ligands sur leur base. GlaxoSmithKline a continué à développer ces activateurs LXRs avec la synthèse du GSK3987. Il s'est avéré être un puissant agoniste de LXR α et de LXR β et un inducteur d'ABCA1, avec une valeur d'EC50 de 40 nM pour LXR β . Alors que l'efficacité du nouveau ligand est



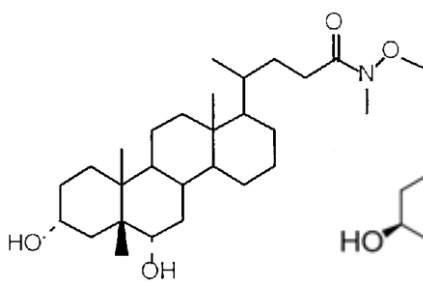
T0901317



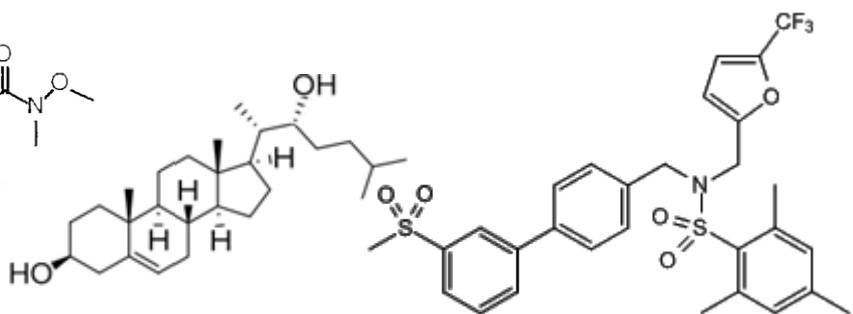
GW3965



GSK9772

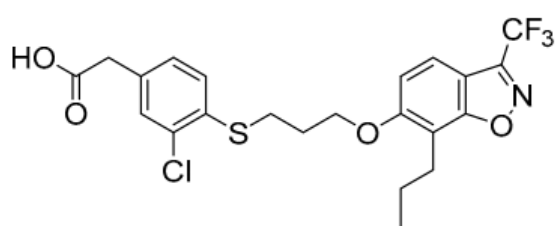


Hypocholamide

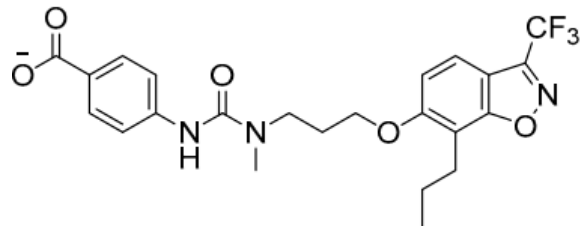


22S-hydroxycholestérol

GSK2033



Urée benzisoxazole



F3MethylAA

Figure 14: Ligands synthétiques des LXRs

presque comparable à celle des agonistes précédemment établis, l'hypertriglycémie, même si plus limitée, reste une préoccupation (Jaye et al. 2005).

- Chao et al. ont développé de nouvelles molécules à partir de modifications du T0901317. Le GSK9772 ainsi généré est un modulateur des LXRs ayant une activité de transrépression de l'expression génique pro-inflammatoire et une transactivation des voies de signalisation lipogéniques, sans accumulation de triglycérides (Chao et al. 2008).
- Lors d'un crible de molécules, les sulfonamides tertiaires ont été identifiées comme de bons candidats pour la liaison au LXRs. La synthèse d'analogues a permis la découverte d'antagonistes. Parmi eux, le GSK2033 s'est montré comme le plus efficace sur ces récepteur nucléaire (Zuercher et al. 2010).
- Fradera et al. ont comparé la liaison de GW3965, d'une benzisoxazole urée (cristallisée dans PDBe : 3IPQ) et d'un dérivé de benzisoxazole (F₃méthylAA ; cristallisé dans PDBe : 3IPS) dans le LBD des LXRs.

4. Les fonctions physiologiques des LXRs

Depuis la découverte des LXRs au milieu des années 1990, c'est l'analyse phénotypique des souris génétiquement modifiées qui a permis d'identifier les fonctions physiologiques régulées par ces récepteurs.

4.1. Métabolisme du Cholestérol

4.1.1. Excrétion du cholestérol depuis le foie

La découverte de l'activation des LXRs par les oxystérols a été le premier indice de leur implication dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol (Figure 15 ; (Janowski et al. 1996). Cette idée a été confirmée par la génération et l'analyse de souris $Lxra^{-/-}$. Les souris dépourvues de $LXR\alpha$ et nourries avec un régime hypercholestérolémiant accumulent des quantités massives de cholestérol dans le foie (Peet et al. 1998). Cette première étude a également identifié le gène codant pour le cytochrome P450 7A1 ($Cyp7a1$), enzyme limitante de la voie de synthèse des acides biliaires, en tant que première cible transcriptionnelle des LXRs. L'étude a montré que la perte de $LXR\alpha$ compromet la conversion du cholestérol en acides biliaires. Des études ultérieures ont révélé que les LXRs stimulent également l'excrétion du cholestérol biliaire directement à travers leurs gènes cibles $Abcg5$ et $Abcg8$ (Yu et al. 2003). Les souris dépourvues d' $Abcg5$ et d' $Abcg8$ ne parviennent pas à augmenter la quantité sécrétée de cholestérol biliaire en réponse au traitement T0901317, suggérant que l'expression d' $AbcG5$ et d' $AbcG8$ est requise pour le trafic de stérols biliaires dépendants des LXRs. L'importance hépatique de $LXR\alpha$ dans l'homéostasie du cholestérol a été renforcée par des études de souris dont le gène $Lxra$ a été supprimé spécifiquement dans le foie. Ces souris ont une altération du transport inverse du cholestérol, de son catabolisme et de son excrétion (Yuan Zhang et al. 2012).

4.1.2. Le transport inverse du cholestérol

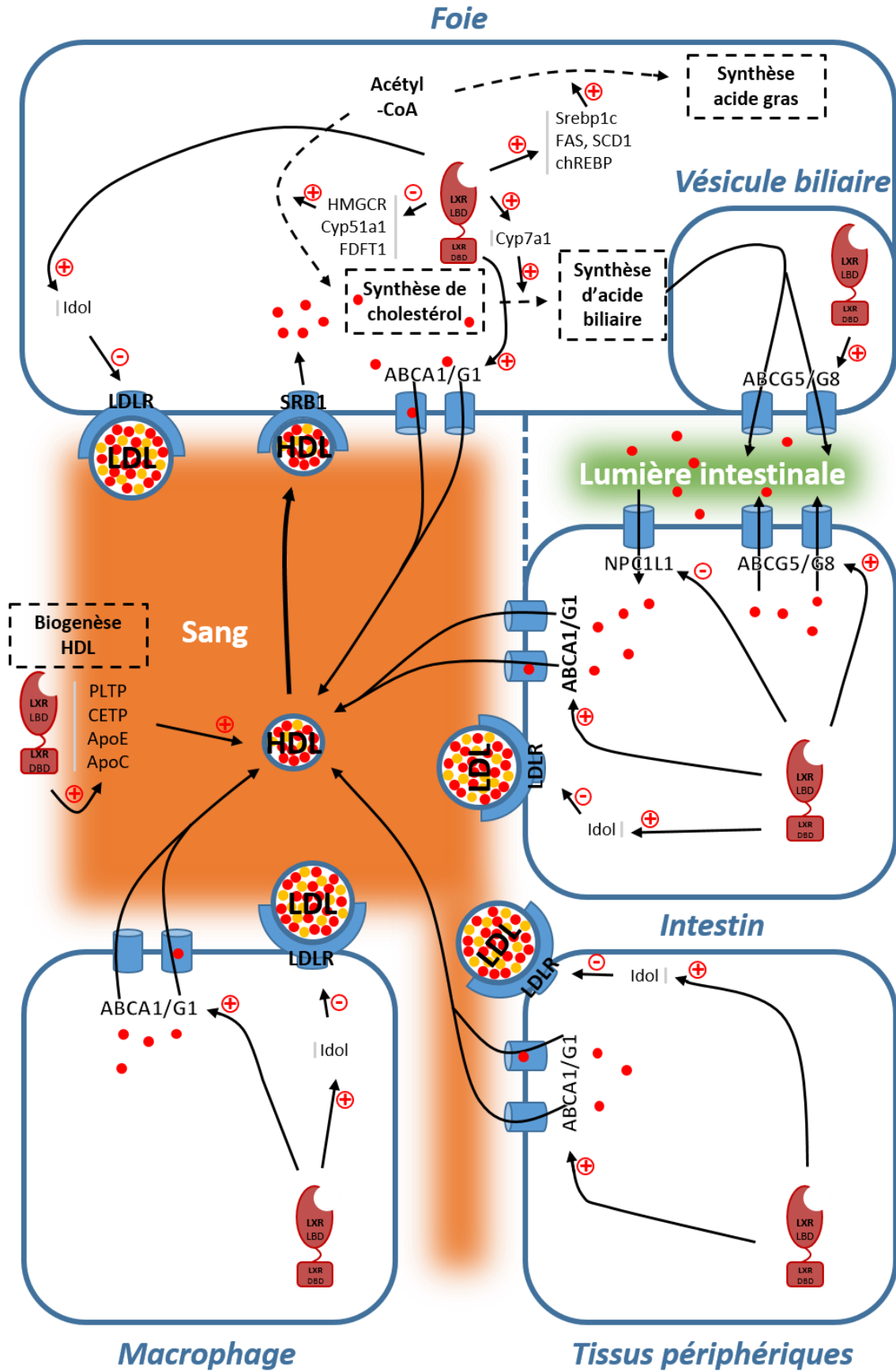


Figure 15: Rôle des LXRs dans l'homéostasie du cholestérol

Le transport inverse ou hépatique du cholestérol (*Reverse Cholestérol Transport* ; RCT ; Figure 15) est un processus par lequel l'excès de cholestérol dans les tissus périphériques est transféré vers les HDL puis transporté vers le foie pour la synthèse et l'excrétion des acides biliaires. L'étape initiale dans le RCT est l'efflux cellulaire de cholestérol, qui implique le transfert du cholestérol libre à l'apolipoprotéine A1 (ApoA1) ou pré- β HDL. Cet efflux est effectué par les transporteurs *ATP-binding cassette*, sous-familles A (ABCA1) et G (ABCG1), deux des premiers gènes cibles des LXR_s identifiés ((Venkateswaran et al. 2000; Kennedy et al. 2005). Des mutations d'ABCA1 chez l'Homme provoquent la maladie de Tangier, un trouble caractérisé par de fortes réductions des taux plasmatiques de HDL et une augmentation de l'accumulation de cholestérol dans les tissus périphériques (Rust et al. 1999; Bodzioch et al. 1999). L'analyse structurale de ABCA1 membranaire a révélé que deux domaines extracellulaires forment un tunnel hydrophobe qui facilite la sortie du cholestérol (Qian et al. 2017). ABCG1 se localise aux endosomes et permet le transport des stérols intracellulaires à l'écart du réticulum endoplasmique (RE ; (Tarling et Edwards 2011). Plusieurs autres cibles des LXR_s sont également impliquées dans le RCT. Par exemple, la protéine ARL7 (*ADP-ribosylation factor-like 7*) transporte le cholestérol du compartiment périnucléaire à la membrane plasmique (Hong et al. 2011; Engel et al. 2004) ; les apolipoprotéines, dont ApoE, ApoC1, ApoC2, ApoC4 et ApoD ; des gènes impliquées dans le remodelage des lipoprotéines (PLTP) (Laffitte, Joseph, et al. 2003), *cholesterylester transfert protein* (CETP) (Luo et Tall 2000) et la lipoprotéine lipase (LPL) (Y. Zhang et al. 2001). Par ces différents effets transcriptionnels, l'activation des LXR_s augmente le RCT (Figure 15).

4.1.3. La biosynthèse du cholestérol

Les LXR_s fonctionnent de concert avec la voie régulée par SREBP2 (*Sterol regulatory element-binding protein 2*) pour maintenir l'homéostasie des taux cellulaires et systémiques stérols. Alors que les LXR_s facilitent l'élimination de l'excès de cholestérol en réponse aux niveaux élevés de cholestérol intracellulaire, SREBP2, à l'inverse, favorise la biosynthèse du cholestérol et son absorption en réponse à de

faibles taux en cholestérol. Les recherches menées au cours des deux dernières décennies ont révélé que ces deux voies principales se régulent l'une l'autre à plusieurs niveaux. SREBP2 contrôle l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol, favorisant l'apparition d'oxystérol et donc l'activation des LXRs (Wong, Quinn, et Brown 2006). Inversement, l'activation des LXRs dans le foie inhibe la biosynthèse du cholestérol par induction de l'E3 ubiquitine ligase RNF145 (*RING finger protein 145*) (L. Zhang et al. 2017). Celle-ci est présente dans la membrane du réticulum endoplasmique et ubiquitinyne SCAP (*Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein*) empêchant le transport de SREBP2 vers le Golgi et son clivage protéolytique et donc son action (L. Zhang et al. 2017).

4.1.4. Absorption du cholestérol

Les niveaux élevés de cholestérol LDL sont un facteur de risque majeur pour l'athérosclérose. Le récepteur des LDL (LDLR), une protéine de surface cellulaire, est essentiel pour l'absorption du LDL et le maintien des taux plasmatiques de cholestérol (Russell et al. 1984). Des mutations du LDLR chez l'Homme ou la souris provoquent une hypercholestérolémie et une athérosclérose accélérée en raison d'une diminution de la clairance des LDL (Brown et Goldstein 1986; S. Ishibashi et al. 1994, 1993). L'expression de LDLR est régulée au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. En réponse à de faibles niveaux de cholestérol, SREBP2 conduit la transcription de LDLR (Hua et al. 1993) et inversement, lors de taux élevé de cholestérol intracellulaire, les LXRs induisent l'expression de IDOL (*inducible degrader of the LDLR*), une *ubiquitine-liguase* E3 dégradant LDLR (Zelcer et al. 2009; Hong et al. 2010; Scotti et al. 2013).

4.2. Métabolisme des acides gras

En plus de leur importance dans la modulation de l'homéostasie du cholestérol comme facteurs hypocholestérolémiants, les LXRs sont également des régulateurs clés de la lipogenèse *de novo* dans le foie (J. J. Repa et al. 2000; Schultz et al. 2000;

Joseph, Laffitte, et al. 2002). L'administration d'agonistes synthétiques des LXRs à des souris augmente les niveaux hépatiques et plasmatiques de triglycérides en raison de la biosynthèse accrue des acides gras et de la sécrétion de VLDL (Schultz et al. 2000). L'activité lipogénique des LXRs est due, dans une large mesure, à l'induction transcriptionnelle du gène codant SREBP1c, un facteur de transcription central de la biosynthèse des acides gras. En outre, les LXRs activent directement la transcription de plusieurs gènes lipogéniques, notamment ceux codant FASN (*Fatty Acid Synthase* ; (Joseph, Laffitte, et al. 2002), SCD1 (*Stearoyl-CoA desaturase-1* ; (Chu et al. 2006) et ChREBP (*Carbohydrate-responsive element-binding protein* ; Cha et al. 2007). De manière intéressante, les LXRs sont également importants par la capacité à agir sur d'autres signaux impliqués dans le contrôle de la transcription de SREBP1C, tels que l'insuline (G. Chen et al. 2004; Tian, Goldstein, et Brown 2016) et les acides gras polyinsaturés (Yoshikawa et al. 2002; Hannah et al. 2001; Yahagi et al. 1999).

En plus de moduler la lipogénèse hépatique, les LXRs régulent également le catabolisme des acides gras dans d'autres tissus. Avec un régime riche en glucides, les souris LXR α -/- présentent une dépense énergétique et une expression d'UCP1 (*Uncoupling Protein 1*) plus élevée dans le tissu adipeux brun que les souris de type sauvage (Korach-André et al. 2011). De même, les souris LXR α -/- sont résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisses et en cholestérol en raison de l'augmentation de la dépense énergétique résultant de la régulation à la hausse des UCP dans les tissus musculaires et adipeux (Kalaany et al. 2005). Les souris ob/ob qui ont une mutation du gène codant la leptine et déficientes en LXR α et LXR β sont protégées de la stéatose hépatique en raison de la lipogénèse altérée dans le foie. La perturbation de la lipogénèse hépatique s'est accompagnée d'une augmentation de la lipogénèse et du stockage des graisses dans les tissus adipeux. De plus, les souris ob/ob et LXRs-/- sont plus sensibles à l'insuline que les souris sauvages, malgré un poids corporel similaire, en raison de l'augmentation de l'activité adipeuse PPAR γ et ChREBP.

4.3. Métabolisme du glucose

Plusieurs études ont suggéré les effets hypoglycémisants puissants des LXR_s (Figure 16). Stulnig et al. ont confirmé que le traitement par un agoniste des LXR_s diminue la néoglucogénèse dans le foie des souris de type sauvage par une forte diminution de l'expression des enzymes clés PEPCK et G6Pase (Stulnig et al. 2002). D'autres rapports ont révélé que l'administration d'agonistes des LXR_s réduit significativement la glycémie et améliore la tolérance au glucose chez les animaux diabétiques, grâce à la régulation coordonnée des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose dans le foie et le tissu adipeux (Laffitte, Chao, et al. 2003; Cao et al. 2003; Grefhorst et al. 2005; Commerford et al. 2007). Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'expression des enzymes néoglucogéniques comprennent l'interaction avec le cofacteur RIP140 (*Receptor-interacting protein 140*) qui est indispensable aux LXR_s pour réprimer la transcription de PEPCK dans le foie (Herzog et al. 2007). En outre, l'activation des LXR_s induit également l'expression de la glucokinase (GK) hépatique augmentant le flux de glucose dans le foie et améliore ainsi son utilisation (Laffitte, Chao, et al. 2003). Dans le tissu adipeux, l'effet antidiabétique des LXR_s provient de la stimulation de l'expression du transporteur de glucose insulino-dépendant GLUT4 qui favorise son absorption et son utilisation (Laffitte, Chao, et al. 2003; Dalen et al. 2003). Ces effets limitent donc la production de glucose hépatique et favorise l'absorption périphérique du glucose. Dans tous les cas, il est évident que les agonistes des LXR_s abaissent les niveaux de glucose seulement en cas d'hyperglycémie (Grefhorst et al. 2005) et pourraient donc être proposés comme agents antidiabétiques.

4.4. Métabolisme des stéroïdes

4.4.1.1. Homéostasie des glucocorticoïdes

La synthèse et la libération des glucocorticoïdes surrénaliens sont étroitement régulées par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Christenson et Strauss 2000; Cummins et al. 2006). A côté de cette régulation classique Cummins et al. ont rapporté que l'activation des LXR_s augmente la sécrétion de glucocorticoïdes en régulant le

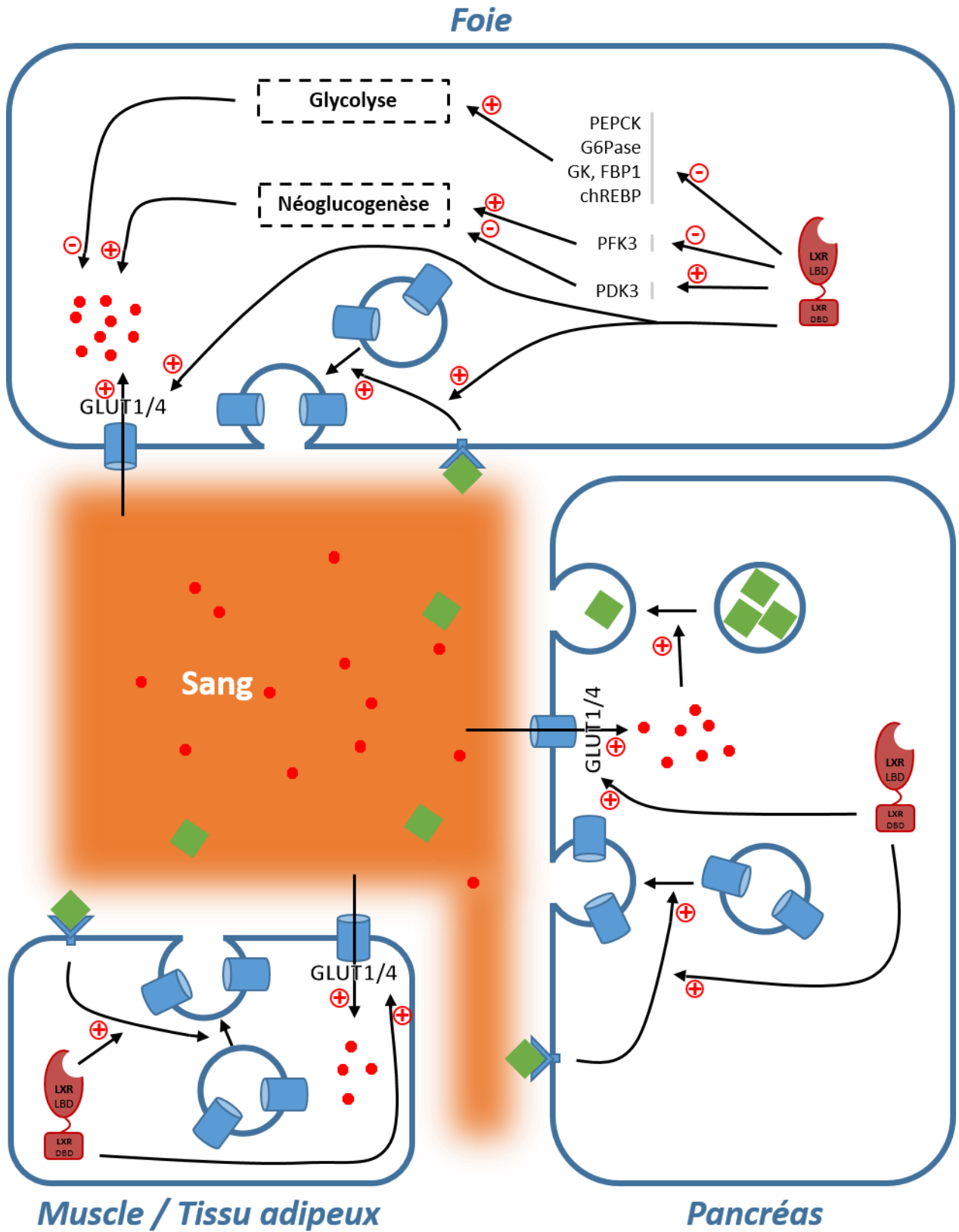


Figure 16: Rôle des LXRs dans le métabolisme des glucides

métabolisme du cholestérol dans la glande surrénale. Les auteurs ont découvert que plusieurs gènes stéroïdogènes clés, y compris StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory protein*), CYP11A1 et 3 β -HSD (*3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase*), sont fortement induits par LXR α . De façon remarquable, l'expression de chacun de ces gènes est élevée dans les cellules surrénales dérivées à la fois des souris de type sauvage traitées avec T0901317 et des souris LXR α -/- (Cummins et al. 2006; Jefcoate 2006). En effet LXR α réprime l'expression basale de StAR à travers le recrutement de corépresseurs (Cummins et al. 2006). LXR α a donc été considéré comme une « soupape de sécurité » empêchant la trop forte accumulation de cholestérol dans les cellules stéroïdogènes (Volle et al. 2007).

L'activation des LXRs peut également augmenter le taux de glucocorticoïdes en élevant la concentration sérique d'ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*) par deux mécanismes distincts (Figure 17). Nilsson et al. ont constaté que le niveau d'ACTH est augmenté à la fois dans les lignées cellulaires hypophysaires et chez les souris traitées au GW3965. Ceci semble s'expliquer par l'inhibition de l'expression de la 11 β -HSD (*11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1*), une enzyme augmentant les taux de glucocorticoïdes actifs dans l'hypophyse et augmentant le rétrocontrôle négatif de la glucocorticoïdogénèse surrénalienne. La diminution de 11 β -HSD améliore ainsi la production hypophysaire d'ACTH (M. Nilsson et al. 2007). Dans une autre étude, Matsumoto et al. ont rapporté que POMC (*pituitary proopiomelanocortin*), le précurseur de l'ACTH, est un gène cible des LXRs. Le traitement avec T0901317 augmente l'expression de l'ARNm du gène POMC à la fois *in vivo* et *in vitro* et est aboli en absence de LXR α (Matsumoto et al. 2009).

4.4.1.2. Homéostasie des œstrogènes

Les œstrogènes circulants sont principalement produits dans l'ovaire et jouent un rôle important dans la physiologie (Yager et Davidson 2006; S. Nilsson et Gustafsson 2002). Cependant, les œstrogènes représentent également un facteur de risque pour le cancer du sein. Les thérapies anti-œstrogénique sont donc efficaces

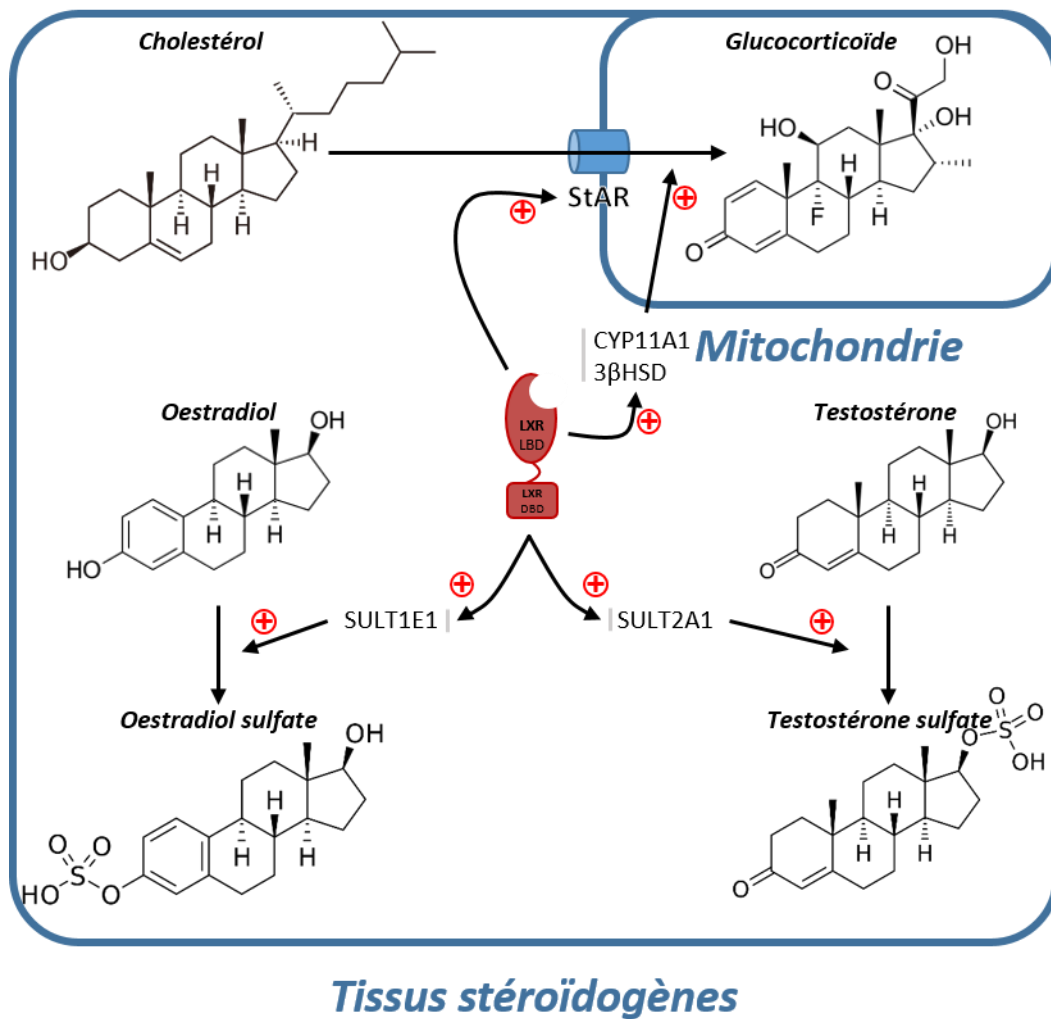


Figure 17: Rôle des LXRs dans le métabolisme des stéroïdes

pour le traitement des cancers du sein. Une voie métabolique critique pour désactiver les œstrogènes est la sulfatation par SULT1E1 (*estrogen sulfotransferase* ; Figure 17 ; (Pasqualini 2009). Les œstrogènes sulfatés ne peuvent pas se lier à ER α ou ER β et perdent ainsi leurs activités hormonales (W. C. Song 2001). Gong et al. ont montré que les LXR α contrôlent l'homéostasie des œstrogènes en régulant l'expression hépatique de SULT1E1. L'activation pharmacologique des LXR α entraîne l'induction hépatique de SULT1E1 et la suppression du gène SULT1E1 chez les souris a aboli ces effets (Gong et al. 2007). Ces résultats ont révélé un nouveau mécanisme contrôlant l'homéostasie des œstrogènes *in vivo* et ont des implications pour le développement de médicaments dans le traitement du cancer du sein et d'autres troubles endocriniens cancéreux liés aux œstrogènes. À l'inverse, les travaux de l'équipe ont montré que le T0901317 augmentait la transcription des gènes stéroïdogènes ovariens et l'augmentation des taux circulants d'œstradiol (Mouzat et al. 2009).

4.4.1.3. Homéostasie des androgènes

Les androgènes, dont la testostérone et la dihydrotestostérone, sont essentiels pour la différenciation masculine et l'acquisition des caractères sexuels secondaires (Kempnaers, Peters, et Foerster 2008). L'équipe avait montré que les LXR α testiculaires contrôlent la synthèse de testostérone (Volle et al. 2007). L'effet du T0901317 est supprimé dans les souris n'ayant pas de LXR α . Comme pour la glande surrénale et l'ovaire, les LXR α activent les enzymes de la stéroïdogénèse. Paradoxalement, Uppal et al. ont précédemment rapporté que SULT2A1, responsable de la sulfatation (et donc de l'inactivation) des androgènes, est un gène cible des LXR α (Figure 17 ; (Uppal et al. 2007). Lee et al. ont montré que l'activation des LXR α *in vivo* abaisse l'activité androgénique en induisant SULT2A1. À l'inverse, l'activation des LXR α inhibe l'expression de STS (*Steroid Sulfatase*) qui active les androgènes dans la prostate (J. H. Lee et al. 2008). Comme pour les surrénales, il semble que les récepteurs LXR α agissent comme des verrous pour bloquer toute augmentation anormale de cholestérol.

4.4.2. Immunité

L'activation des LXRs antagonise NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) et réduit la réponse de macrophages différenciés murins exposés aux lipopolysaccharide (LPS), à la fois *in vitro* et dans un modèle expérimental de dermatite (Joseph et al. 2003). Par la suite, un mécanisme de transrépression (cf. chapitre 1.2.3) fut identifié. Ainsi les LXRs se lient à des complexes corépresseur sur les promoteurs de gènes cibles pro-inflammatoires (Figure 18) comme NFκB et AP1 (*activator protein 1* ; (Ghisletti et al. 2007)).

La libération de cytokines en réponse aux LPS est différente en fonction de la durée de pré-incubation avec des agonistes des LXRs. Des temps courts (1h) inhibent la libération de cytokines pro-inflammatoires (Birrell et al. 2007; Myhre et al. 2008; Higham et al. 2013), tandis que des temps longs (48h) potentialisent l'impact de ces cytokines (Asquith et al. 2013; Landis, Patel, et Capone 2002; M. Ishibashi et al. 2013). Les LXRs semblent donc temporiser la réponse immunitaire (Fontaine et al. 2007). Le traitement de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains en une seule dose ou tout au long de la différenciation a montré de nombreuses différences dans la libération des chimiokines et cytokines (Geyerregger et al. 2007; Hanley et al. 2010). L'ensemble de ces données renforce l'idée que le moment et la durée de l'incubation de l'agoniste des LXRs sont cruciaux pour déterminer la réponse.

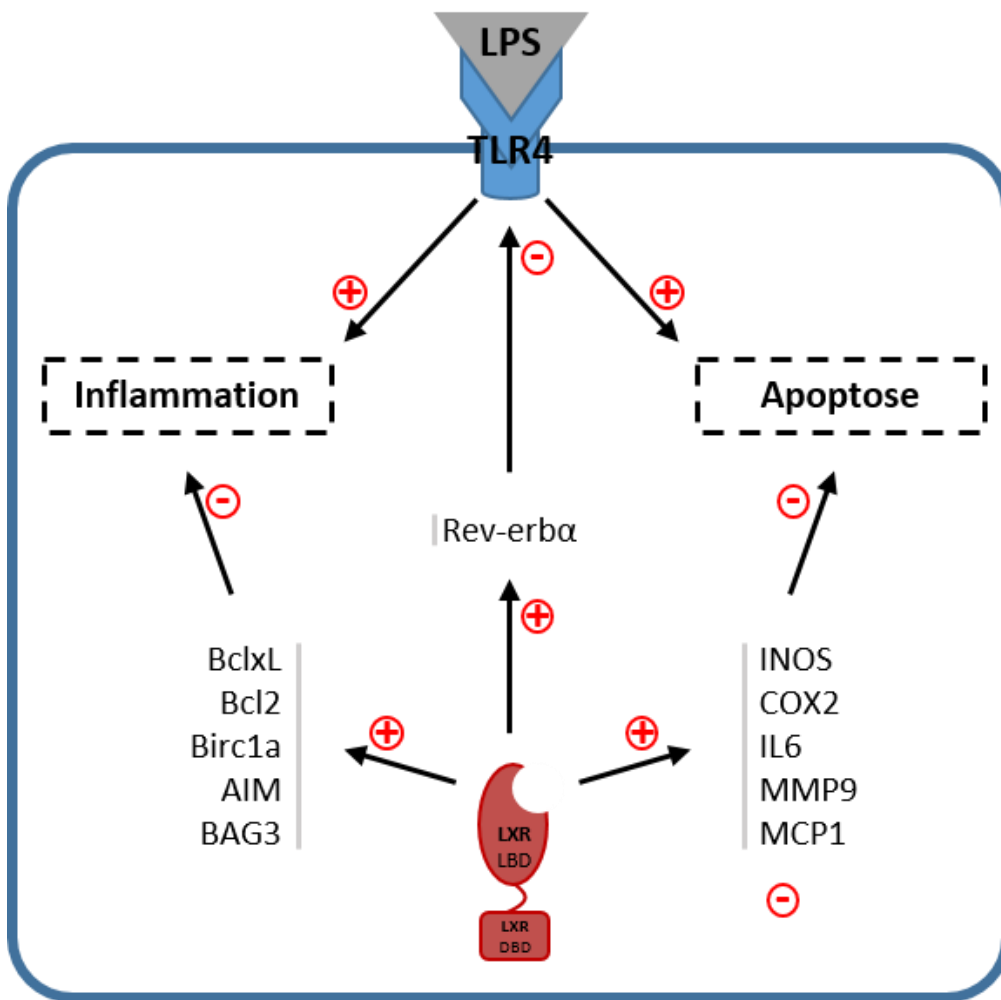


Figure 18: Rôle des LXRs dans l'immunité

5. La physiopathologie des LXRs

Les LXRs, de par leurs grandes variétés de fonctions biologiques, sont impliqués dans un grand nombre de pathologies. Dans des contextes pathologiques, la modulation des LXRs pourrait présenter une opportunité intéressante. Les pathologies reliées aux LXRs sont résumées dans la figure 19.

5.1. Les pathologies métaboliques

5.1.1. La dyslipidémie

La dyslipidémie est une pathologie caractérisée par des niveaux anormaux de lipides dans le sang. Classiquement ces lipides sont représentés par le LDL, le HDL et les triglycérides. Les LXRs, comme présenté précédemment, ont un rôle central dans la modulation de ces composés.

Etant donné l'effet puissant des agonistes des LXRs sur la formation de HDL, l'efflux de cholestérol et l'absorption du cholestérol intestinal, ces composés pourraient être considérés comme une nouvelle option thérapeutique pour les patients présentant une hypercholestérolémie et/ou un faible niveau de HDL. Cependant, les effets secondaires possibles existent ; les plus importants d'entre eux étant la stéatose hépatique et/ou l'hypertriglycéridémie. Ainsi, des modulateurs des LXRs spécifiques ayant peu ou pas d'effet sur la lipogenèse seraient-ils nécessaires.

5.1.2. Le diabète de type 2

Plusieurs études ont démontré que les agonistes des LXRs réduisent la concentration de glucose dans le plasma et augmentent la sensibilité à l'insuline dans différents modèles animaux de diabète et de résistance à l'insuline. Par exemple, l'administration de l'agoniste LXR T0901317 ou GW3965 réduit la concentration en

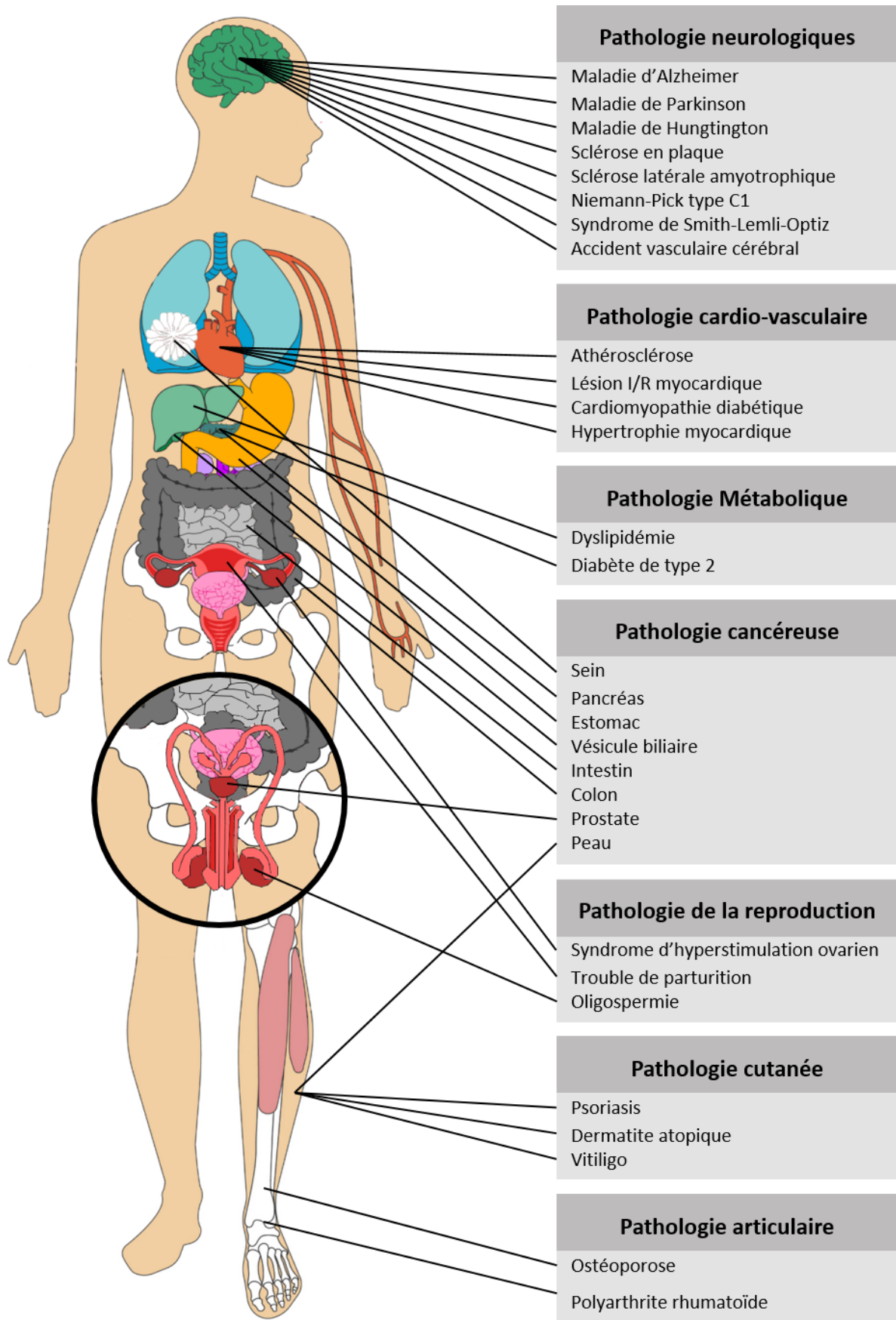


Figure 19: Les pathologies reliées aux LXR

glucose plasmatique chez les souris db/db mais pas chez les animaux témoins (Cao et al. 2003; Loffler et al. 2006) ; (Laffitte, Chao, et al. 2003)Grefhorst et al. 2005).

Dans le pancréas, le nombre de cellules β des îlots de Langerhans est contrôlé par l'équilibre entre les processus de prolifération et l'apoptose. Des études antérieures ont montré les îlots pancréatique d'animaux diabétiques présentaient des taux accrus de SREBP1c, de LXR α et LXR β (Kakuma et al. 2000; Choe et al. 2007). Une glycémie élevée synergise les effets d'une activation pharmacologique des LXRs (Choe et al. 2007). Ceci semble s'expliquer par une promotion de la translocation du LXR α du cytoplasme vers le noyau, entraînant une plus forte réponse aux ligands, (Helleboid-Chapman et al. 2006). De plus, les taux plasmatiques d'oxystérols, sont fortement augmentés chez les patients diabétiques (Murakami et al. 2000). Ces données souligne le rôle des LXRs dans le diabète de type 2.

5.2. Les pathologies osseuses et articulaires

5.2.1. La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire auto-immune dont l'étiologie est inconnue dans environ 1% de la population. Les thérapies actuelles ne sont efficaces que chez une faible proportion de patients. Le traitement au T0901317 de chondrocytes articulaires d'arthrose humain et de cultures d'explants de cartilage a provoqué la dégradation du protéoglycane (un compoant majeur de la matrice extracellulaire). LXR β est l'isoforme prédominante dans le cartilage et les souris déficientes en LXR β présentent une dégradation accrue des protéoglycanes et une production augmentée de PGE2 (un des principal facteur de pro-arthritique) dans le cartilage articulaire (N. Li et al. 2010). Le traitement d'explants de cartilage humain avec le GW3965 réprime la dégradation induite par les cytokines et la perte de protéoglycanes du tissu. De plus, l'activation des LXRs inhibe de façon spectaculaire la production de PGE2 induite par les cytokines. Le GW3965 administré à des souris arthritiques diminue la production de cytokines inflammatoires et atténue la sévérité clinique et histologique de la pathologie (Park et al. 2010).

5.2.2. L'ostéoporose

L'os est un tissu qui est remodelé en permanence par deux types cellulaires : les ostéoblastes qui fabriquent la matrice osseuse et les ostéoclastes qui la dégradent. L'équilibre entre l'activité ostéoblastique et ostéoclastique est essentiel au bon fonctionnement du tissu. Le T0901317 diminue les marqueurs de formation osseuse dans les ostéoblastes primaires de souris C57BL/6J (Prawitt et al. 2011). Des co-cultures d'ostéoblastes/clastes où le GW3965 réprime l'expression de RANKL dans les ostéoblastes inhibant la différenciation des ostéoclastes (Kleyer et al. 2012). En utilisant un modèle d'ostéoporose postménopausique induite par l'ovariectomie, le GW3965 altère également la signalisation RANKL *in vivo*.

Le GW3965 réprime aussi la production de cytokines inflammatoires induite par le LPS dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse et spécifiquement dans les lignées immatures (Robertson Remen et al. 2013). Ces effets anti-inflammatoires dans l'os suggèrent que l'activation de ces récepteurs pourrait réduire une érosion destructive de l'os (Hardy et Cooper 2009).

5.3. Les pathologies cutanées

L'épiderme humain et murin exprime des quantités élevées de LXR α et LXR β (Kömüves et al. 2002) suggérant un rôle important dans l'homéostasie cutanée. L'application atopique de 22R-hydroxycholestérol restaure l'homéostasie épidermique dans un épiderme hyperprolifératif (Schmuth et al. 2004). Le GW3965 réduit l'épaisseur de la peau et atténue l'inflammation cutanée dans les modèles murins d'inflammation cutanée irritante et allergique (Fowler et al. 2003). Ces effets sont abolis chez les souris déficientes en LXR β , suggérant un rôle prédominant de cette isoforme.

5.3.1. Le psoriasis

Une diminution significative de l'expression de LXR α a été décrite dans les lésions psoriasiques par rapport aux peaux saines (Mehta et al. 2013). De plus, le *knock-down* de LXR α dans les kératinocytes humains sains reproduit un profil transcriptomique similaire à celui observé dans des lésions psoriasiques (Gupta et al. 2010).

5.3.2. La dermatite atopique

Des dysfonctionnements primaires et secondaires de la barrière cutanée coexistent dans la dermatite atopique (Schmuth et al. 2015), indiquant que la restauration de la barrière cutanée peut être utile dans la prise en charge thérapeutique de telles maladies. Dans le modèle murin de dermatite, la perte d'eau transépidermique a été altérée par un traitement topique avec des agonistes des LXRs (B. Kim et al. 2012) entraînant une hyperplasie et une réduction de l'inflammation (Hatano et al. 2010).

Les activateurs pharmacologiques des LXRs par voie orale ont été conçus pour le traitement de la dermatite atopique (Zheng et al. 2016). L'un d'eux, VTP 38543 développé par *Vitae Pharmaceuticals* comme traitement topique de l'eczéma ou de la dermatite atopique. Le VTP-38543 fait actuellement l'objet d'essais cliniques pour évaluer l'innocuité, la tolérabilité et l'efficacité chez des patients adultes atteints de dermatite atopique légère à modérée.

5.3.3. Le vitiligo

Le vitiligo est un trouble pigmentaire cutané courant caractérisé par des zones de peau dépigmentée manquant de mélanocytes fonctionnels. L'expression des transcrits de LXR α est augmentée dans les mélanocytes de patients atteints par rapport aux témoins (R. Kumar et al. 2012). L'utilisation de siARN contre LXR β dans les mélanocytes humains a révélé que LXR β est un acteur majeur dans le contrôle de la mélanogenèse (C. S. Lee et al. 2013).

5.4. Les pathologies neurologiques

Dans le SNC, les isoformes de LXR α et LXR β sont présentes, cependant, LXR β est l'isoforme la plus abondante dans le SNC (Whitney et al. 2002). Les souris LXR β -/- présentent de nombreuses anomalies sévères telles que la perte de neurones, la prolifération des astrocytes, la désorganisation des gaines de myéline et l'accumulation de dépôts lipidiques (L. Wang et al. 2002) dans le SNC. L'étude de différentes maladies neurodégénératives montrent une implication possible des LXRs et leur intérêt comme cible pharmacologique.

5.4.1. La maladie d'Alzheimer

L'accumulation de cholestérol dans le SNC augmente le risque de développer la maladie d'Alzheimer ((Rebeck 2004). Elle est caractérisée par une dégénérescence neuronale progressive, une gliose, un dépôt extraneuronal de peptides amyloïdes β (A β) formant des plaques (Selkoe 1991; Ballard et al. 2011). L'absence de LXR α ou de LXR β chez un modèle murin de la maladie entraîne une augmentation du dépôt amyloïde. De plus, l'activation pharmacologique des LXRs diminue la réponse inflammatoire aux peptides amyloïde β fibrillaire (fA β). D'un autre côté, les cellules dépourvues des LXRs présentent une expression plus élevée des gènes inflammatoires suggérant que les LXRs agissent comme des inhibiteurs endogènes de la réponse inflammatoire innée induite par fA β (Zelcer et al. 2007) dans le SNC. Un LXRE, a été détecté dans le gène codant pour DHCR4 (3- β -hydroxysterol Δ -24-reductase), un catalyseur de la conversion du desmostérol en cholestérol ayant des effets neuroprotecteurs (Yongjun Wang et al. 2008). D'autre part, l'inhibition spécifique de cette enzyme augmente la susceptibilité cellulaire à développer a maladie d'Alzheimer (Cecchi et al. 2008). Enfin, toutes ces études ont suggéré que l'activation des LXRs pourrait être utile dans le traitement de cette pathologie.

5.4.2. La maladie de Parkinson

La microgliose, l'astrogliose, la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques, sont des symptômes de la maladie de Parkinson ((Dauer et Przedborski 2003). Les souris knock-out mâles LXR β montrent une dégénérescence des motoneurones après 7 mois (Andersson et al. 2005). De plus, le déficit en LXR β dans un modèle murin de la maladie de parkinson exacerbe des altérations des neurones dopaminergiques (Y. Dai et al. 2012).

5.4.3. La maladie de Huntington

Cette pathologie est caractérisée par une expansion polyglutaminique située à l'extrémité N-terminale d'une protéine exprimée de manière ubiquitaire connue sous le nom de huntingtine. Il a été démontré que la voie de biosynthèse du cholestérol est altérée dans les cerveaux de souris atteintes de la maladie (Valenza et al. 2005). Récemment, il a été rapporté que la huntingtine (sauvage) pouvait se comporter en coactivateur des LXRs. En outre, la surexpression de la huntingtine mutante a des effets négatifs sur les gènes cibles LXRs tels qu'ABCA1. Cet effet est partiellement contré par l'activation des LXRs par un ligand synthétique (Futter et al. 2009).

5.4.4. La sclérose en plaque

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie inflammatoire caractérisée par une démyélinisation des axones du SNC. Une étude a montré que le T0901317 supprime l'expression des interleukines IL-23 et IL-17 dans les cultures primaires de cellules gliales dans un modèle murin de SEP (Xu et al. 2009). De plus, l'administration de cet agoniste avant le début de la maladie bloque son développement en supprimant la prolifération des lymphocytes T et la libération de cytokines (Hindinger et al. 2006). Cui et al. ont effectué des expériences avec le GW3965 montrant que celui-ci atténué la SEP chez les souris de type sauvage mais pas chez les souris LXR $^{-/-}$ (Cui et al. 2011).

En 2016, une étude portant sur 7 patients atteints de SEP appartenant à la même famille a permis l'identification d'un SNP dans la séquence codante de LXR α . La substitution de l'arginine 415 (très conservée au sein des récepteurs nucléaires) en glutamine déstabiliserait l'hétérodimère LXR-RXR (Z. Wang et al. 2016).

Collectivement, ces études suggèrent que les ligands des LXRs peuvent être des cibles thérapeutiques utiles pour le traitement de la SEP.

5.4.5. La sclérose latérale amyotrophique

Une étude réalisée chez des souris mâles LXR β ^{-/-} a montré une dégénérescence des motoneurones liée à l'accumulation de lipides dans la moelle épinière. La dégénérescence progresse avec l'âge vers une paralysie (Andersson et al. 2005). La dégénérescence chronique des motoneurones est associée à la sclérose latérale amyotrophique (SLA ; (Cutler et al. 2002). Chez les souris LXR β ^{-/-}, le début de l'invalidité se situe entre 3 et 7 mois. À l'âge de 7 mois, ces souris ont un contrôle musculaire réduit et des problèmes de coordination motrice associée à l'accumulation de lipides. L'homéostasie du cholestérol dans le cerveau est fondamentale et parce que les LXRs y jouent un rôle prédominant (cf. chapitre 1.4.1), ils peuvent être une cible pour le traitement de cette maladie neurodégénérative.

Enfin une étude en 2018 a permis d'identifier des SNPs dans la séquence de LXR α . La substitution d'une thymine en cystéine à l'état homozygote a été associée avec une manifestation plus précoce (-7.8 ans) de la maladie (Mouzat et al. 2018).

5.4.6. La maladie Niemann-Pick type C1

La protéine Niemann-Pick type C1 (NPC1) est fondamentale dans le trafic intracellulaire du cholestérol. La mutation de NPC1 entraîne l'accumulation de

cholestérol non estérifié, de sphingomyéline et de glycolipides dans les lysosomes des neurones et des cellules gliales. L'accumulation de ces lipides dans le SNC provoque une ataxie, une dysarthrie, une dysphagie et, dans les cas graves, une démence et des crises d'épilepsie. Repa et al. ont démontré que l'activation des LXRs dans un modèle murin de la maladie NPC1 augmente l'excrétion de cholestérol du cerveau, ralentit l'inflammation, retarde la neurodégénérescence, et finalement prolonge la durée de vie des animaux atteints (Joyce J. Repa et al. 2007).

5.4.7. Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz

Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) est caractérisé par le déficit en DHCR7 (*7-dehydrocholesterol-reductase*). Les sujets affectés sont incapables de synthétiser correctement le cholestérol. La supplémentation en cholestérol après la naissance est l'approche actuelle; cependant, l'absence de cholestérol *in utero* conduit à des malformations développementales. Le traitement *in utero* avec un agoniste LXRs d'un modèle de souris femelle SLOS (*Dhcr7*^{-/-}), augmente l'expression placentaire de ABCA1, favorisant ainsi les transferts de cholestérol mère-fœtus, suggérant une potentiel thérapie *in utero* de SLOS (Lindegaard et al. 2008).

5.5. Les pathologies cardio-vasculaires

5.5.1. L'athérosclérose

De nombreuses études montrent que le traitement avec des agonistes des LXRs entraîne une atténuation de l'athérosclérose *in vivo* (X.-Y. Dai et al. 2008; Kratzer et al. 2009; Levin et al. 2005; Peng et al. 2008, 2009; Quinet et al. 2009; Terasaka et al. 2003). Ces traitements s'accompagnent soit d'une augmentation des taux de TG, soit d'effets sur la lipogenèse. Les agonistes LXRs sont également des régulateurs négatifs des principaux gènes inflammatoires TNF α , IL1b, IL6, COX2, iNOS et NFkB, conduisant à une inhibition de la formation des plaques/lésions athéroscléreuses

(Morales et al. 2008; Sironi et al. 2008; Bensinger et al. 2008; Geyeregger et al. 2009; Fowler et al. 2003; Hatano et al. 2010).

5.5.2. Les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R) myocardiques

Des études antérieures ont démontré que LXR α et LXR β sont tous deux exprimés dans le système cardiovasculaire, où ils peuvent jouer un rôle important dans la protection contre les lésions myocardiques (Lei et al. 2013). Wang et al. ont démontré que le T0901317 améliore la survie fonctionnelle des cellules souches mésenchymateuses transplantées dans le myocarde infarci et a un effet bénéfique sur la réparation cardiaque et l'amélioration fonctionnelle après un infarctus (Yabin Wang et al. 2014). Dans un modèle I/R, LXR α , mais pas LXR β , est significativement surexprimé. De plus, l'activation de LXR α au lieu de LXR β joue un rôle cardioprotecteur dans la lésion I/R (He et al. 2014).

5.5.3. L'hypertrophie myocardique

L'activation des LXRs par le T0901317 atténue l'hypertrophie myocardique *in vivo* (Kuipers, Li, et al. 2010). L'activation de LXR α réprime le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS ; régulateur positif de la pression sanguine) en réduisant l'expression de la rénine, de AT1R (*angiotensin receptor type 1*) et de ACE (*angiotensine conversion enzyme*) dans le cœur et les reins (Kuipers, van der Harst, et al. 2010). De plus, Wu et al. signalent que LXR α est régulée positivement dans les cœurs hypertrophiques subissant une surcharge de pression ventriculaire gauche. L'administration de T0901317 supprime l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'angiotensine II et le LPS en inhibant la signalisation de NF- κ B chez la souris. LXR α et LXR β peuvent inhiber la signalisation NF- κ B, tandis que LXR α est plus sensible aux stimuli hypertrophiques (S. Wu et al. 2009). Des travaux de Cannon et al. démontrent que l'activation des LXRs par l'agoniste AZ876 réduit significativement les augmentations du poids, de fibrose et de dysfonctionnement cardiaque induites

par des constriction aortiques sans affecter la pression sanguine (Cannon et al. 2015).

En conséquence, les LXR_s représentent une cible moléculaire potentielle pour les thérapies anti-hypertrophiques. Leur potentiel cardioprotecteur demande la mise au point de ligands plus spécifiques.

5.6. Les pathologies de la reproduction

5.6.1. Chez la femelle

Les LXR_s répriment la stéroïdogénèse dans les cellules lutéales ovariennes humaines (Drouineaud et al. 2007). En parallèle, le traitement des souris LXR^{-/-} par des gonadotrophines conduit à un syndrome d'hyperstimulation ovarien (OHSS), imitant les complications observées chez certaines femmes ayant recours à une fécondation *in vitro* (Mouzat et al. 2009).

Les LXR_s sont fortement exprimés dans le placenta de la souris et de l'homme au cours du développement. Ceci suggère un rôle crucial de LXR_s dans différentes activités placentaires telles que la production d'hormones, la tolérance fœto-maternelle, le métabolisme des lipides et la parturition (Marceau et al. 2005). De plus, l'endogline (ENG), un gène majeur impliqué dans l'implantation placentaire est un gène cible des LXR_s (Henry-Berger et al. 2008). Ainsi une expression inappropriée des LXR_s peut contribuer à des complications majeures de la grossesse.

LXR_β joue un rôle crucial dans la capacité contractile de l'utérus de souris (Mouzat et al. 2007). En effet, une anomalie de l'activité contractile induite par l'ocytocine a été observée chez des souris dépourvues de LXR_β. Ces résultats impliquent que LXR_β est nécessaire pour l'induction des contractions. LXR_β est donc une nouvelle cible possible pour prévenir les malformations de la parturition chez les femmes.

5.6.2. Chez le mâle

Les souris mâles LXR^{-/-} présentent une baisse de fertilité à l'âge de 5 mois et une infertilité complète à 9 mois (Frenoux et al. 2004). L'accumulation d'esters de cholestérol induit une désorganisation de l'épithélium de l'épididyme (Saez et al. 2007) favorisant l'apoptose des cellules épithéliales (Ouvrier et al. 2009). En parallèle, les souris LXR β ^{-/-} présentent une accumulation d'ester de cholestérol dans les cellules de Sertoli et une diminution de la prolifération des cellules germinales. Les souris LXR α ^{-/-} présentent une diminution de la synthèse de testostérone et une diminution de la concentration plasmatique en LH ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules germinales (Volle et al. 2007; Robertson et al. 2005). Par conséquent, la coopération de LXR α et LXR β maintient à la fois la structure et la fonction des testicules. En 2014, une étude a montré une corrélation positive entre la réduction du nombre de cellules germinales et la diminution des taux de transcrits des LXRs dans les biopsies testiculaires de patients présentant divers degrés d'azoospermie (Rondanino et al. 2014). La perturbation de la signalisation LXRs dans l'appareil reproducteur mâle pourrait être considérée comme un facteur de risque impliqué dans la stérilité prématurée observée chez certains hommes.

5.7. Le cancer

Les ligands des LXRs peuvent affecter la croissance tumorale. Les agonistes synthétiques perturbent la coalescence des radeaux lipidiques (A. J. C. Pommier et al. 2010), la localisation des récepteurs aux facteurs de croissance, et la tubulogénèse (Noghero et al. 2012). Ces perturbations ont un impact anti-angiogéniques et traduisent l'action des ligands des LXRs sur le transport du cholestérol et le métabolisme des cellules endothéliales. De plus, compte tenu de l'expression ubiquitaire des LXRs et de leurs fonctions pléiotropes, les traitements avec des ligands peuvent affecter directement ou indirectement la croissance tumorale, à la fois par voie

systémique et par la modification du microenvironnement tumoral (Villablanca et al. 2010).

5.7.1. Le cancer de la prostate

Les effets des ligands LXR sur les cellules cancéreuses ont été largement étudiés dans des modèles de cancer de la prostate. Le traitement au T0901317 inhibe la prolifération de cellule de cancer prostatique et la formation de tumeurs. Cet effet passe par la réduction de l'expression de SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) levant ainsi l'inhibition de p27 (Fukuchi, Hiipakka, et al. 2004). Le knock-out des LXRs dans les cellules épithéliales de la prostate murine a démontré leur rôle dans l'inhibition de la signalisation des facteurs de croissance, des voies de régulation du cycle cellulaire et dans la médiation des effets des agonistes synthétiques (Bousset et al. 2018). Les niveaux d'ABCA1 diminuent au cours de la carcinogenèse de la prostate et la diminution de l'expression d'ABCA1 augmente la prolifération cellulaire (Fukuchi, Kokontis, et al. 2004). L'activation des LXRs augmente l'expression d'ABCA1 dans les cellules cancéreuses de la prostate, fournissant un autre lien mécanistique entre l'activation des LXRs et la régulation de la prolifération cellulaire. L'équipe a montré que l'activation des LXRs augmentait l'expression de ABCG1, perturbant la coalescence des radeaux lipidiques et bloquant la signalisation « pro-survie » AKT1 (A. J. C. Pommier et al. 2010). L'invalidation de FASN (autre gène cible des LXRs) annule les effets anti-prolifératifs induit par des ligands synthétiques LXRs dans une lignée cellulaire prostatique (K. H. Kim et al. 2010). Les effets des agonistes des LXRs sur l'expression du gène SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*) dans les cellules cancéreuses de la prostate relie également les fonctions des LXRs dans le métabolisme lipidique et l'inflammation avec des effets anti-tumoraux (W. Fu et al. 2014). Les traitements au ligand synthétique GW3965 augmentent les niveaux de et la mort cellulaire, et diminuent la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires. Des expériences d'interférence ARN dirigés contre SOCS3 bloquent la réponse des cellules aux traitements avec des agonistes des LXRs. Des souris déficientes en LXRs nourries avec un régime riche en cholestérol présentent une néoplasie au sein de

l'épithélium prostatique, caractérisée par l'inhibition des protéines suppresseurs de tumeur NKX3.1 MSMB une activation de l'expression de facteur pro-oncogéniques tels que les Cyclines D1 et D2 (A. Pommier et al. 2013).

5.7.2. Le cancer du sein

L'activation des LXRs bloque la prolifération des cellules tumorales, que leur statut en récepteurs des œstrogènes soit positif (ER+) ou négatif (ER-) (Fukuchi, Kokontis, et al. 2004; Gong et al. 2007; Vedin et al. 2009; El Roz et al. 2012; Nguyen-Vu et al. 2013). L'expression de SKP2 diminue après le traitement par le T0901317 ainsi que celle de E2F2, un membre de la famille des facteurs de transcription régulateurs du cycle cellulaire (Nguyen-Vu et al. 2013). Dans les cellules cancéreuses du sein ER+, les traitements avec des agonistes des LXRs réduisent l'expression des transcrits et des protéines ER α , perturbant ainsi la voie de croissance centrale des cellules tumorales hormono-dépendantes (Vedin et al. 2009). Ces traitements bloquent également la prolifération induite par des facteur de croissance via la voie PI3K-Akt dans les lignées cellulaires de cancer du sein humain (Steffensen et al. 2006). Dans d'autres études, des effets systémiques des agonistes des LXRs activent l'expression de SULT1E1 (enzyme qui désactive les œstrogènes dans le foie) inhibant la prolifération œstrogéno-dépendante des cellules épithéliales utérines et la formation de tumeurs mammaires (Gong et al. 2007). Il a également été montré que le traitement des macrophages avec des ligands des LXRs réduit la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose de cellules cancéreuses du sein (El Roz et al. 2013).

5.7.3. Les cancers gastro-intestinaux

La β -caténine est un médiateur clé de la signalisation Wnt, une voie fréquemment mutée dans le cancer du côlon, et les LXRs interagissent avec la β -caténine et bloquent sa transactivation sur ses gènes cibles (Uno et al. 2009). L'activation des LXRs par des agonistes synthétiques inhibe également la prolifération

des cellules du cancer du côlon. Les traitements par ligand des LXRs diminuent les quantité protéiques de SKP2, de CDK (*cyclin dependent kinase*) et c-MYC (Vedin, Gustafsson, et Steffensen 2013; Lo Sasso et al. 2013). Les coupes tissulaires des animaux LXR^{-/-} ont montré des niveaux plus élevés de marqueurs de prolifération par rapport aux contrôles de type sauvage, et, comme prévu, les traitements avec GW3965 ont réduit les marqueurs de prolifération dans les cellules du côlon (Vedin, Gustafsson, et Steffensen 2013). Dans un modèle de xénogreffe tumorale, la surexpression de LXR α bloque la formation de tumeurs en augmentant l'apoptose et en diminuant la prolifération (Lo Sasso et al. 2013).

5.7.4. Le cancer de la vésicule biliaire

Les souris LXR β ^{-/-} présentent une inflammation et des lésions prénéoplasiques de la vésicule biliaire qui évoluent en cancer chez des animaux âgés. Ce phénotype est spécifique de LXR β et a été observé uniquement chez les femelles. L'ovariectomie et l'élimination de la production d'œstrogènes chez ces animaux empêche la formation des lésions néoplasiques (Gabbi et al. 2010). Le rôle de LXR β est encore souligné par une étude qui a trouvé une association de variations génétiques dans le gène LXR β avec un risque accru de cancer de la vésicule biliaire (Sharma et al. 2013).

5.7.5. Le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas fait partie des cancers les plus meurtriers, et les traitements par des agonistes des LXRs sont efficaces pour bloquer la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la formation de colonies dans les lignées cellulaires du cancer du pancréas (Candelaria et al. 2014). Des co-traitements avec l'agent chimiothérapeutique de référence, la gemcitabine, ont montré un effet additif sur l'inhibition de la prolifération cellulaire. Dans les lignées cellulaires et les échantillons cliniques, LXR β semble être l'isoforme prédominante. Le traitement par un agoniste baisse les niveaux protéiques de SKP2 et EGFR. L'EGFR est souvent

surexprimé dans les cellules tumorales pancréatiques et les inhibiteurs de l'EGFR sont approuvés cliniquement pour le traitement du cancer du pancréas en association avec la gemcitabine (Troiani et al. 2012). Ces découvertes initiales des effets des agonistes de LXR sur les cellules cancéreuses pancréatiques suggèrent une application potentielle de ces ligands, soit seuls, soit en combinaison avec les traitements actuels du cancer du pancréas.

5.7.6. Les cancers cutanés

La liaison d'APOE, un des gènes cibles des LXRs, à son récepteur LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) a des effets anti-métastatiques dans les cellules de mélanome (Pencheva et al. 2012). Le traitement de cellules de mélanome avec des agonistes LXRs augmente l'expression d'ApoE et diminue l'invasion tumorale et la dissémination métastatique (Pencheva et al. 2014). Ces effets sont transmis par LXR β . La sécrétion d'APOE par les cellules stromales semble jouer un rôle important (El Roz et al. 2013). Les traitements avec des agonistes LXRs sont efficaces pour supprimer la croissance de tumeurs résistantes aux agents chimiothérapeutiques cliniquement approuvés (dacarbazine et vémurafénib). De plus l'activation pharmacologique des LXRs présente des effets antitumoraux additifs aux chimiothérapies classiques.

5.7.7. Les tumeurs hématologiques

Les tumeurs hématologiques se développent à partir des différentes cellules sanguines et sont séparées en plusieurs types : i) leucémies ; ii) lymphomes et iii) myélomes. Dans le cas de la leucémie, l'activation des LXRs inhibe la prolifération et la survie cellulaire induite par les cytokines (IL-2 et IL-7) via une diminution de la phosphorylation de la protéine RB (RetinoBlastome) et de l'expression de la protéine *Cyclin B* (Geyeregger et al. 2009). Dans les cellules de myélome multiple, les

traitements aux agonistes des LXRs inhibent la signalisation des gènes cibles de Hedgehog, diminuant ainsi la croissance clonogénique tumorale (Agarwal et al. 2014).

6. Les LXR sont des cibles des perturbateurs chimiques endocriniens (EDCs)

Un agent perturbateur chimique endocrinien (EDC ; *endocrine disrupting chemicals*) est défini par l'*Environmental Protection Agency* (EPA) des États-Unis comme «un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, l'action de liaison ou l'élimination des hormones naturelles présentes dans le corps responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du processus de développement». La compréhension des mécanismes par lesquels les perturbateurs endocriniens exercent leurs effets s'est améliorée. On pensait à l'origine que les EDCs agissaient principalement par l'intermédiaire des récepteurs hormonaux nucléaires : les récepteurs aux œstrogènes (ER), les récepteurs androgènes (AR), les récepteurs de la progestérone, les récepteurs thyroïdiens et les récepteurs des rétinoïdes. Aujourd'hui, la recherche montre que les mécanismes sont beaucoup plus larges. Ainsi les perturbateurs endocriniens agissent-ils via les récepteurs nucléaires, les récepteurs non-stéroïdiens comme les récepteurs des neurotransmetteurs (sérotonine, dopamine, noradrénaline), les récepteurs orphelins, des voies enzymatiques impliquées dans la biosynthèse et/ou le métabolisme des stéroïdes, et de nombreux autres mécanismes qui convergent vers les systèmes endocriniens et reproducteur. Une substance perturbatrice du système endocrinien est donc tout composé, naturel ou synthétique, qui altère les systèmes hormonaux (Figure 20).

Le groupe des perturbateurs chimiques endocriniens est très hétérogène et comprend des produits naturels ou chimiques synthétiques utilisés comme solvants/lubrifiants industriels et leurs sous-produits biphényles polychlorés (BPC), biphényles polybromés (PBB), dioxines, plastiques (bisphénol A), plastifiants (phtalates), pesticides (dichlorodiphényltrichloroéthane), fongicides (vinclozoline) et agents pharmaceutiques (DES). Le défi pour identifier de telles molécules réside dans la diversité chimique. Il est donc difficile de prédire si un composé peut ou non exercer des actions de perturbation endocrinienne. Néanmoins, les EDCs tels que les dioxines, les PCB, les PBB et les pesticides contiennent souvent un fragment phénolique qui imite les hormones stéroïdes naturelles et permet aux EDCs d'interagir avec les récepteurs d'hormones stéroïdiennes en tant qu'agonistes ou antagonistes.

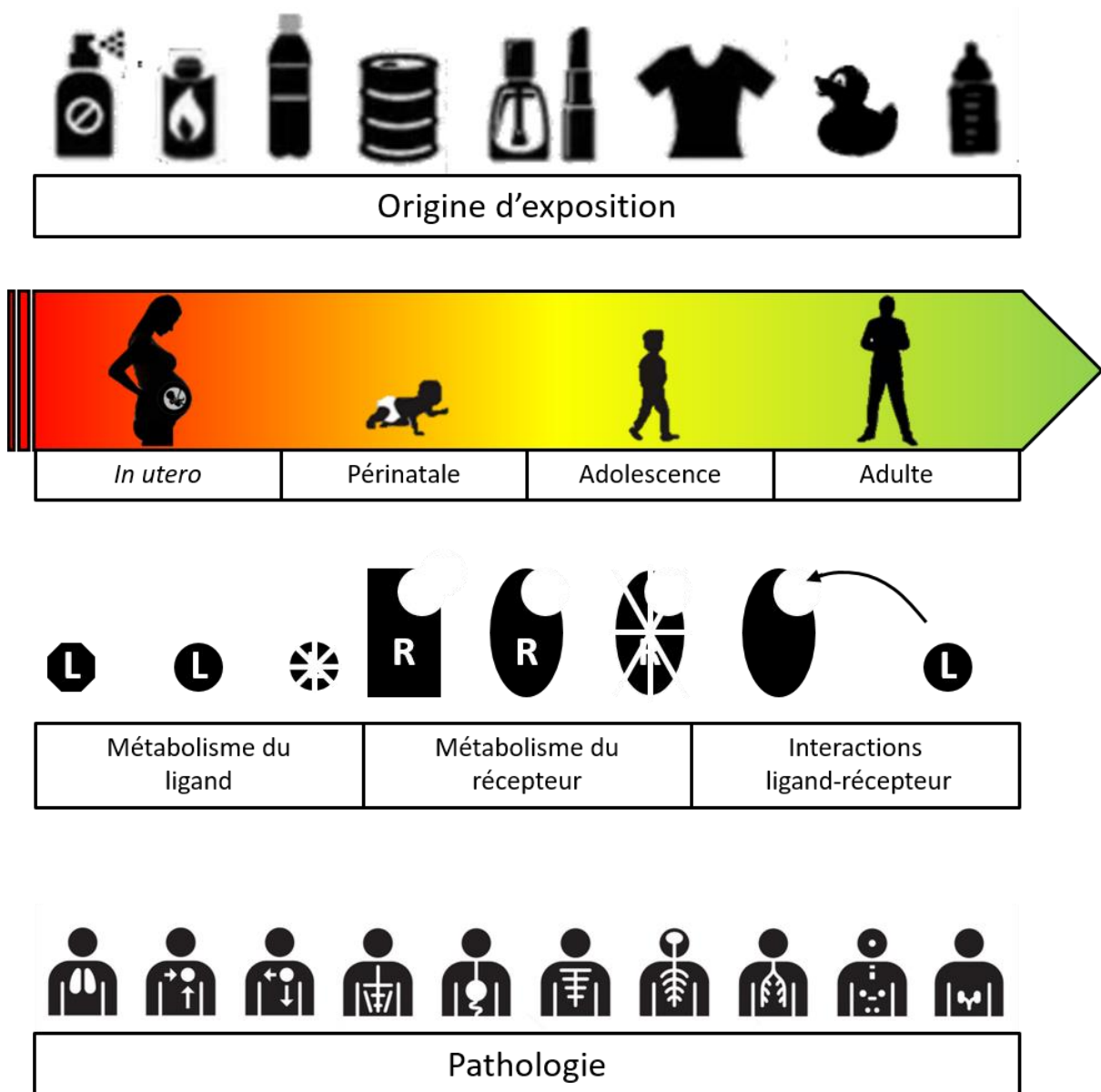


Figure 20: Mode d'action des EDCs

Les sources d'exposition aux perturbateurs endocriniens sont diverses et varient considérablement d'un pays à l'autre. La situation évolue constamment parce que certains EDCs ont été interdits il y a des décennies et d'autres plus récemment, avec des différences significatives entre les pays. Certains EDCs ont été conçus pour avoir de longues demi-vies (bénéfique pour leur utilisation industrielle) mais ils se sont avérés être très préjudiciables à la faune et aux humains. Parce que ces substances ne se désintègrent pas facilement, certaines interdites il y a des décennies restent détectables à des niveaux élevés dans l'environnement, et elles peuvent être détectées dans pratiquement tous les animaux ou humains testés (Porte et al. 2006). Les voies d'exposition classiques sont orales (principalement), respiratoires et/ou cutanées (Figure 20).

Comme mentionné précédemment, la définition d'EDCs s'élargit intégrant à présents les perturbateurs des voies LXR. Ces récepteurs, par leur rôle central sur l'homéostasie du cholestérol, ont un fort impact sur les taux d'hormones stéroïdienne et donc sur les fonctions endocriniennes. Aujourd'hui, plusieurs perturbateurs des voies LXR ont été identifiés. Comme expliqué plus haut, ces molécules sont d'origine diverse et leur structure diverge grandement rendant difficile la prédiction leurs effets. Il y a fort à parier qu'un nombre de ces molécules reste à découvrir.

6.1. Diéthylstilbestrol

Le diéthylstilbestrol (DES ; Figure 21) est un oestrogène synthétique utilisé dès 1938 pour la prévention des fausses couches. La survenue de nombreuses malformations génitales a provoqué son interdiction en France en 1977. Des études ultérieures ont montré que le DES affecte les fonctions du testicule. Des souris LXR-/- traitées quotidiennement au DES les 5 premiers jours après la naissance montrent à 10 jours une diminution de la masse corporelle par rapport aux contrôles sauvages. Ces expériences ont mis en évidence le rôle protecteur des LXR chez les souris

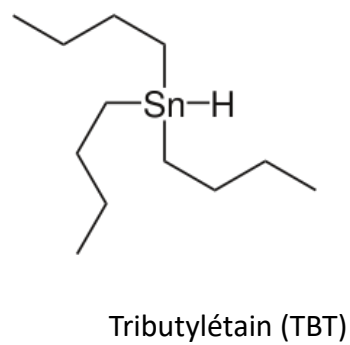
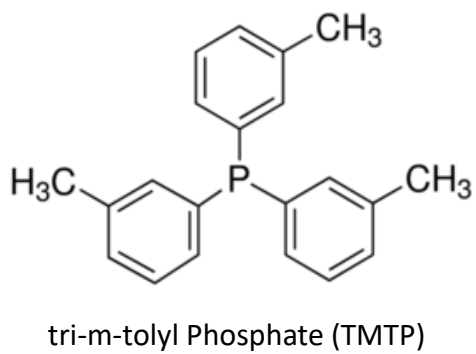
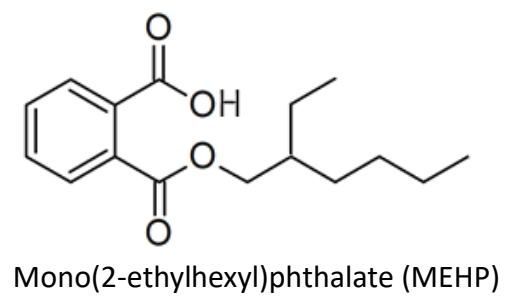
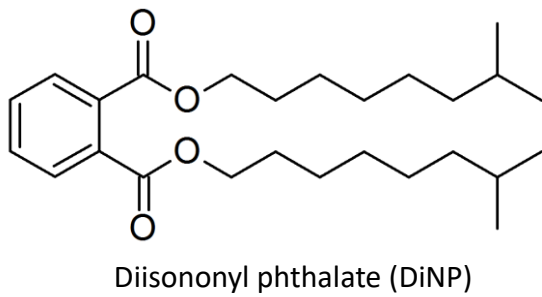
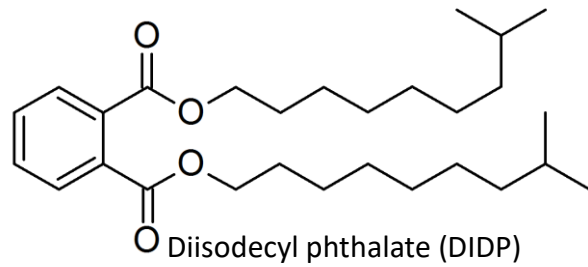
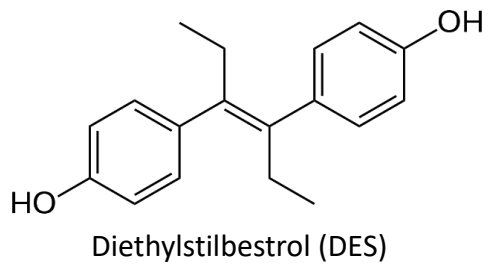


Figure 21: Les EDCs ligand des LXRs

sauvages. Le mécanisme moléculaire n'a pas été clairement identifié (Oumeddour et al. 2014).

6.2. Phtalates

Les esters de phtalates sont des composés utilisés comme plastifiants. Environ 3 millions de tonnes d'esters phtaliques sont produits chaque année dans le monde entier et se retrouvent dans de nombreux produits courants comme les PVC, les sacs en plastique, les emballages alimentaires, les cosmétiques, les peintures industrielles et les transfusions sanguines (Heudorf, Mersch-Sundermann, et Angerer 2007). En raison de la nature non covalente de leur liaison avec les plastiques, les phtalates peuvent facilement être détachés et ingérés (Kavlock et al. 2002).

6.2.1. Diisodecyl phthalate (DIDP) et Diisononyl phthalate (DiNP)

En combinant des méthodes de modélisation moléculaire *in silico* et SPR (*Surface plasmon resonance*) *in vitro*, une étude a pu démontrer l'impact du DIDP et du DiNP (Figure 21) sur le LBD des LXR α avec des affinités de $4,32 \cdot 10^{-7} \text{M}$ et $1,20 \cdot 10^{-7} \text{M}$ respectivement. De plus, ces molécules ont des effets inhibiteurs sur les gènes cibles des LXR α Srebp1c et LXR α dans une lignée humaine cancéreuse du foie (HepG2) (Mozzicafreddo et al. 2015).

6.2.2. Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)

Une étude réalisée sur les testicules et ovaires de fœtus humains âgés de 7 à 12 semaines a montré l'impact de certains phtalates sur le développement embryonnaire. Des fœtus humains ont été exposés à 10^{-4}M de MEHP (Figure 21) pendant 72h *in vitro*. Des analyses par qPCR montrent une activation de LXR α associée à une stimulation de la transcription des gènes cibles LXR α comme Srebp1c, Scd1 et

Fasn indiquant une activité agoniste (Muczynski et al. 2012). Les auteurs mentionnent que les taux de MEHP dans le cordon ombilical sont de l'ordre du micromolaire.

6.3. Retardateur de flamme

Le *firemaster 550* (FM550 ; Figure 21) est un mélange ignifuge qui est l'un des retardateurs de flamme les plus couramment utilisés dans les meubles et les produits pour bébés. L'exposition humaine à ce mélange commercial, constitué de composants bromés et organophosphorés, est répandue. Le FM550 semble s'accumuler dans le tissu placentaire après une exposition gestationnelle. Parce que le placenta est une source importante d'hormones et de neurotransmetteurs pour le cerveau foetal en développement, il peut être une cible à considérer dans le contexte de la neurotoxicité développementale. Lors d'une étude visant à identifier les mécanismes d'action possibles du FM550 dans le cerveau antérieur foetal et le placenta, des rates gestantes ont été exposées par voie orale à du FM550. Les analyses RNA-seq montre une forte activation de la voie LXR/RXR (Rock et al. 2018).

6.4. Fumée de cigarette

Le tissu cutané est la première barrière protectrice des agressions extérieures. La couche externe de la peau, la couche cornée, est formée par des cornéocytes entourés d'une matrice lipidique (cholestérol, céramide et acides gras). Par conséquent, l'homéostasie des lipides et, en particulier du cholestérol, dans la peau est d'une grande importance et ABCA1 y joue un rôle clef. Parmi les nombreux facteurs qui ont été associés aux maladies de la peau, la fumée de cigarette est l'un des plus toxiques. Des kératinocytes humains (HaCaT) ont été placés dans un incubateur avec de la fumée de cigarette. L'expression des transcrits de LXR α et LXR β ainsi que d'ABCA1 augmente dès 50 minutes d'exposition suivie d'une augmentation des quantités protéiques d'ABCA1 après 6h d'incubation. Ces résultats expliquent

comment le tabac modifie les niveaux de cholestérol de la peau et affecte ainsi les fonctions des tissus cutanés (Sticozzi et al. 2010).

6.5. Ozone

Même si il ne peut pas être considéré directement comme un EDC, l'ozone (O_3) a été identifié comme un perturbateur des LXR α . L' O_3 , lorsqu'il est inhalé, interagit avec le cholestérol des membranes des cellules épithéliales des voies respiratoires produisant des oxystérols chimiquement réactifs. L'exposition *in vitro* de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBE16) à l' O_3 entraîne la formation des oxystérols époxycholestérol- α , époxycholestérol- β , secostérol A et secostérol B (Seco A et Seco B), dans les lysats cellulaires et les milieux de culture. De même, le liquide de lavage broncho-alvéolaire obtenu à partir de volontaires humains exposés à l' O_3 contient des taux élevés de ces oxystérols. Ces oxystérols dérivés de l' O_3 ont un effet pro-inflammatoire et augmentent l'activité de NF κ B. Le mécanisme par lequel l' O_3 parvient à former des oxystérols est inconnu. Des expériences de co-précipitation de Seco A ont montré des contacts avec LXR α . De même, des expériences de co-traitement de cellules 16HBE utilisant Seco A et le T0901317 ont montré une diminution de l'accumulation des transcrits d'ABCA1 et de Srebp1c par rapport à une stimulation avec le T0901317 seul, indiquant une inhibition de l'activité des LXR α (Speen et al. 2016).

6.6. Organostannique : Tributylétain (TBT)

Les organostanniques font partie de la classe des contaminants environnementaux obesogènes car ils activent PPAR γ , un régulateur essentiel de l'adipogenèse. Le tributylétain (TBT ; Figure 21) est un puissant modificateur de la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes de la moelle osseuse humaine (BM-MSc) et un régulateur négatif de la formation osseuse. Les LXR α , PPAR γ et RXR α , de par leurs rôles dans l'homéostasie osseuse, ont été

analysés sur leur interaction avec le TBT. Des agonistes des RXRs (bexarotène, LG100268), et de PPAR γ (rosiglitazone) ont été utilisés sur des cellules BM-MSc sur une durée de 10 jours. Dès le 2^{ème} jour, les transcrits de LXR α , ABCA1 et Srebp1c sont augmentés de façon indépendante du traitement à la rosiglitazone (PPAR γ -indépendant) et de façon dépendant du bexarotène (RXR-dépendant) (Baker et al. 2015). Ces résultats suggèrent une action agoniste du TBT sur l'hétérodimère LXR/RXR.

6.7. Organophosphate : tri-m-tolyl Phosphate (TMTP)

En combinant des méthodes de modélisation moléculaire *in silico* et *in vitro*, une étude a démontré l'interaction du tri-m-tolyl Phosphate (TMTP ; Figure 21) sur le LBD des LXRs avec des affinités de $4,38.10^{-8}M$. De plus, cette molécule a des effets inhibiteurs sur les gènes Srebp1c et LXR α dans la lignée HepG2 (Mozzicafreddo et al. 2015).

7. Méthodes de recherche de ligands

7.1. In silico

Différentes méthodes de calcul ont émergé afin de comprendre et de modéliser les activités fonctionnelles des modulateurs des NRs au niveau moléculaire. Généralement, ces approches informatiques peuvent être classées dans deux catégories, les approches basées sur les ligands ou sur les récepteurs.

7.1.1. Méthodes basées sur le ligand

Ces méthodes reposent sur le principe central de similarité-propriété, ou QSAR, qui stipule que des molécules similaires doivent présenter des propriétés similaires (Johnson et Maggiora 1990) et donc les calculs de similarité chimique sont au cœur du criblage virtuel basé sur le ligand (Willett 2003). En conséquence, toutes les molécules dans une base de données peuvent être notées par rapport à la similarité avec un ou plusieurs ligands bioactifs, puis classées pour refléter la probabilité d'être actives. Après cette procédure, les molécules les mieux notées sont sélectionnées pour les tests expérimentaux. Ces approches basées sur les pharmacophores sont intéressantes pour les isoformes de NRs où un ligand doit être spécifique (Riggs et Hartmann 2003; Viennois et al. 2012).

7.1.2. Méthodes basées sur la cible

Les méthodes de criblage virtuel basées sur les cibles dépendent de la disponibilité des informations structurales, déterminées expérimentalement ou obtenues par calcul au moyen de techniques de modélisation d'homologie (Shoichet 2004; Klebe 2006). Ces méthodes visent à fournir, d'une part, une bonne approximation de la conformation et de l'orientation attendues du ligand dans la cavité protéique (*docking*) et, d'autre part, une estimation raisonnable de son affinité de liaison (*scoring*). La superposition de différents modèles 3D permet de multiples

corrections du site actif et des calculs et estimations toujours plus précis (Vigers et Rizzi 2004). A mesure que le nombre de complexes protéine-ligands disponibles augmente, les méthodes de *docking* appréhendent de mieux en mieux l'orientation des ligands dans la cavité protéique permettant dans certains cas d'y prédire l'activité (Fradera et Mestres 2004).

En conclusion, dans la majorité des cas les cribles *in silico* basés sur le ligand permettent d'émettre des hypothèses quant à leurs effets. A l'inverse, les approches basées sur la cible (donc le récepteur) permettent d'appréhender la capacité d'un ligand à pénétrer le LBD, à s'y stabiliser et à y interagir. Lorsqu'un ligand est sélectionné suite à son analyse *in silico*, il est alors testé afin d'établir son profil d'action. Ces tests sont généralement, dans un premier temps, réalisés *in vitro*.

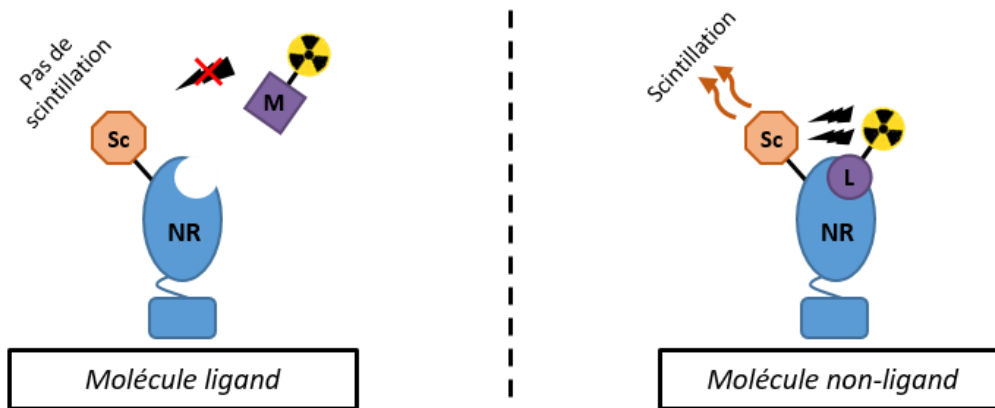
7.2. In vitro

Historiquement, la mesure de l'affinité d'un ligand pour son récepteur, on utilisait la méthode dite de Scatchard où on mesure la saturation du récepteur à l'équilibre. Cette méthode est valable pour de fortes affinités ($\sim 1\text{nM}$) mais n'est en revanche pas utilisable pour les NRs dont l'affinité pour le ligand est plus faible ($\sim 1\mu\text{M}$). Dans ce cas les ligands, le plus souvent hydrophobes, se fixent avec une très forte affinité sur le support de l'expérience. D'autres méthodes, indirectes, ont donc dû être développées, se concentrant sur le LBD des NRs.

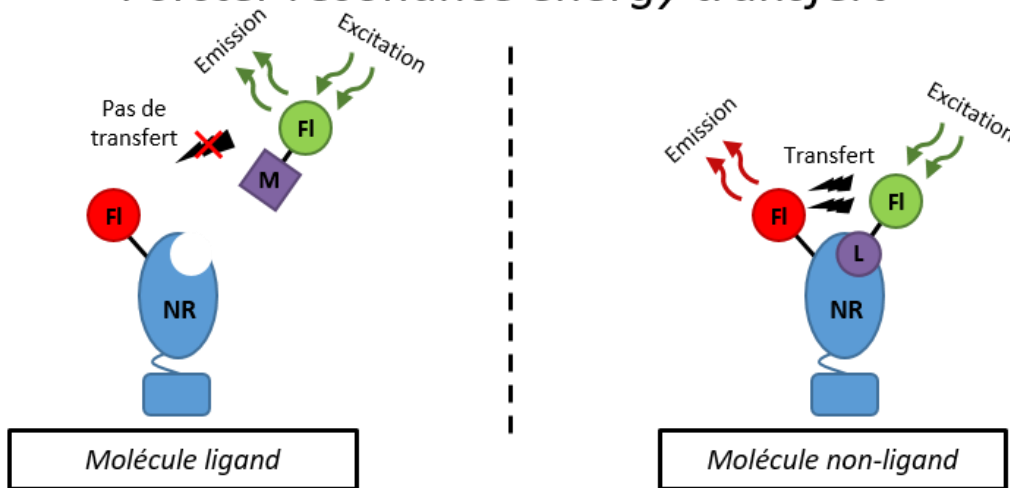
7.2.1. Méthodes mesurant la distance récepteur-ligands

Dans un SPA (*Scintillation proximity Assay* ; Figure 22), un ligand radiomarqué est incubé avec un récepteur équipé d'un scintillant (ex : fluorochrome). Plus le ligand est proche du récepteur, plus le transfert d'énergie du radioligand vers le scintillant est important, générant un signal plus fort. Cette méthode a évolué en de puissants outils

Scintillation Proximity Assay



Förster resonance energy transfert



Fluorescence polarisation

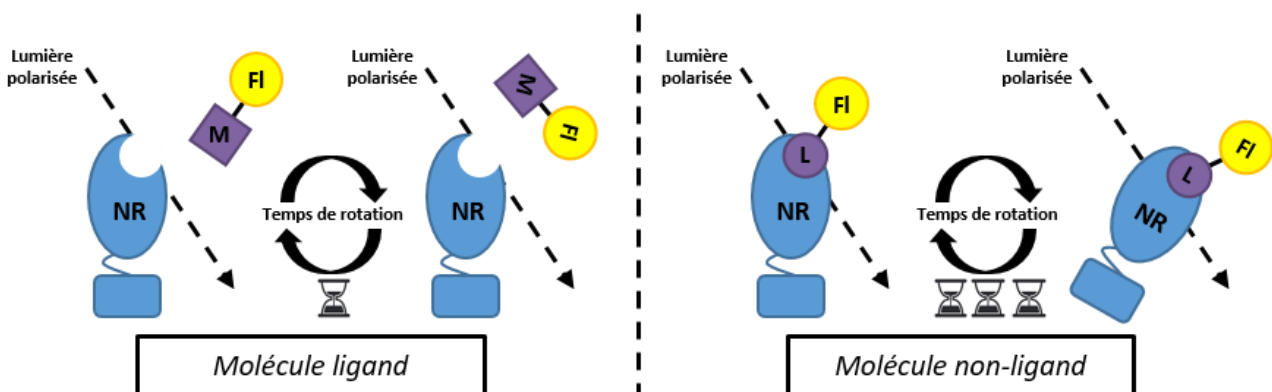


Figure 22: Méthodes de crible de ligand

pour les criblages de ligand à haut débit (HTS: *High throughput screening*) en raison de sa polyvalence (Glickman, Schmid, et Ferrand 2008).

Le FRET (*Förster resonance energy transfert*; Figure 22) est un test où le récepteur ainsi que le ligand sont marqué d'un fluorochrome. A l'aide d'un faisceau, l'excitation d'un premier fluorochrome va provoquer l'excitation du second par transfert d'énergie. Plus la distance récepteur-ligand est petite, plus le transfert d'énergie est efficace, permettant au second fluorochrome d'émettre un signal plus fort (Burke et al. 2003). Cette méthode est plus classiquement utilisée pour les tests de recrutement des coactivateurs en HTS (*High throughput screening*; (Y. Song, Madahar, et Liao 2011).

Cependant, même si ces méthodes se sont montrées efficaces pour le criblage à haut débit, elles possèdent deux défauts. Le premier concerne la nécessité de marquer les deux acteurs du complexe (récepteur et ligand). Ceci entraîne soit des coûts plus importants (achat des fluorochromes, synthèse des radio-ligands), soit une complexification des manipulations (nécessité de greffer des protéines fluorescentes pouvant altérer le comportement des récepteurs). Son second défaut est que ces méthodes ne permettent de conclure qu'au rapprochement des couples récepteur-ligand et non à leur liaison, et encore moins à leur action.

7.2.2. Méthode mesurant la liaison récepteur-ligands

Le test FP (*Fluorescence Polarization*; Figure 22) repose le marquage du ligand par un fluorochrome. Celui est excité par une lumière polarisée provoquant une rotation dans le plan de polarisation. Un ligand lié à son récepteur possédant une vitesse de rotation beaucoup plus lente, c'est ce délai qui permettra d'estimer la quantité de complexe récepteur-ligand (Burke et al. 2003). Un inconvénient des dosages FP est leur niveau élevé de bruit de fond provoquant une diminution de la sensibilité. La taille des complexes récepteur-ligand dans le cadre de l'étude des NRs

(>10kDa) engendre une vitesse de rotation trop lente pour être efficacement applicable (Cali et al. 2008). De plus cette technique ne permet de se prononcer que sur la liaison du ligand au récepteur et non sur son action.

7.2.3. Méthode mesurant l'activité transcriptionnelle

Lorsque l'impact d'un ligand sur un récepteur est analysé, c'est l'effet de cette molécule sur le comportement transcriptionnel du récepteur qui est au centre de l'attention. Afin de mesurer ces effets, des systèmes mettant en jeu des protéines chimériques ont vu le jour.

Le système « simple hybride » UAS/Gal4 repose sur la fusion du LBD d'un récepteur nucléaire avec le DBD de Gal4 (appelé Gal4-NR). La partie Gal4 se fixe sur sa séquence cible UAS (*Upstream Activating Sequence*) en amont d'un gène rapporteur. Ce système, dérivé de la levure, a été mis au point dans une lignée cellulaire humaine, les cellules HeLa (Kakidani et Ptashne 1988; Webster et al. 1988). Ce système présente, en absence de ligand, un niveau basal transcriptionnel. Ainsi la liaison d'un ligand agoniste provoque le changement conformationnel du LBD permettant le relargage des corépresseurs et le recrutement des coactivateurs et donc de la machinerie transcriptionnelle. A l'inverse, en présence d'un ligand antagoniste, la diminution du niveau basal transcriptionnel peut être observée (Figure 23).

Dans les systèmes « double hybride » la partie Gal4-NR est conservée. Des corégulateurs fusionnés avec le domaine d'activation (AD ; *Activation Domain*) transcriptionnel VP16 sont ajoutés. Ainsi, la liaison d'un agoniste au LBD induit la formation d'un complexe. La présence de VP16 AD dans ce complexe favorise l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle et améliore la transcription du gène rapporteur (T. Chen et al. 2003).

L'avantage du système simple hybride sur le double hybride est sa plus grande simplicité. Le fait de s'appuyer sur les corégulateurs endogènes cellulaires permet de s'affranchir de la construction d'une deuxième protéine chimérique. A l'inverse, le

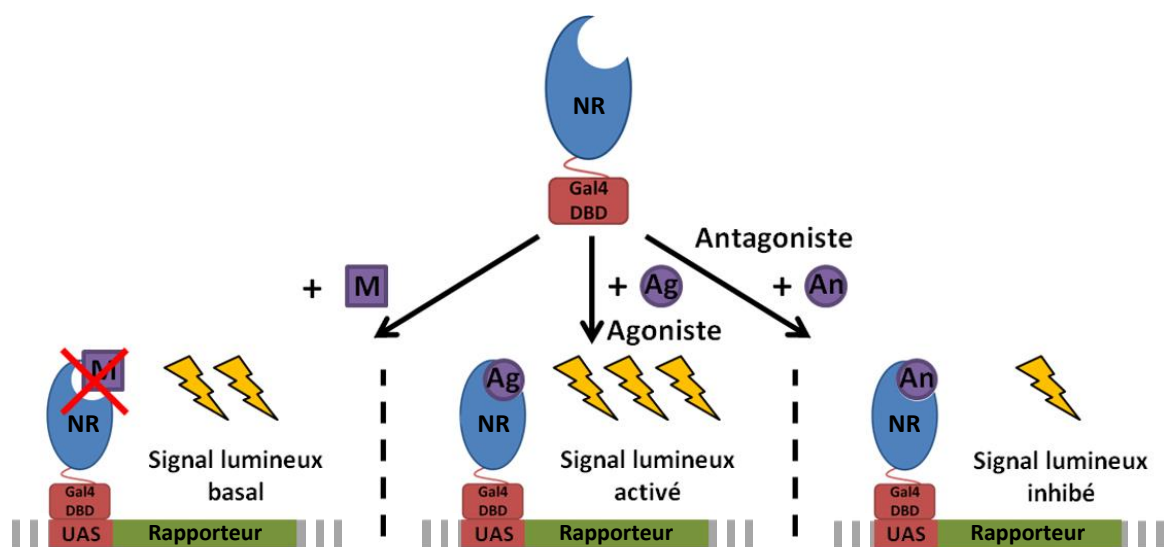


Figure 23: Système simple hybride UAS-Gal4

La partie LBD d'un récepteur nucléaire (NR; Bleue) est fusionnée avec le DBD de Gal4 (rouge). Le DBD de Gal4 se fixe sur la séquence UAS permettant la transcription du rapporteur (vert). La variation de l'activité luciférase permet de déterminer si la molécule testée (violet) est un agoniste (Ag), un antagoniste (An) ou n'agit pas sur le LBD des LXR.

système double hybride s'emploie dans le cadre de la caractérisation précise des effets d'un ligand.

L'utilisation de récepteurs chimériques peut entraîner des biais dus à des changements conformationnels subtils. De plus, des interactions protéine-protéine transmises par des régions autres que le LBD du récepteur d'intérêt peuvent être perdus (Stanley et al. 2006). Cependant, grâce à sa robustesse et sa reproductibilité, le système est largement utilisé dans l'identification et la caractérisation de ligands de récepteurs nucléaires (Paguio et al. 2010).

Le système simple hybride par sa plus grande facilité de construction et de mise en œuvre est préférentiellement utilisé pour la génération de modèles transgéniques. Même si principalement utilisé en système cellulaire de transfection transitoire, l'établissement de lignées stables permet des expérimentations plus aisées et reproductibles. De telles lignées existent déjà pour l'analyse de l'action de ligands sur certains récepteurs nucléaires tels que les récepteurs aux œstrogènes (Balaguer et al. 2001).

Le succès de ces modèles cellulaires encourage la généralisation de l'utilisation de pareils systèmes dans d'autres modèles d'étude.

7.3. In Vivo

Si les méthodes *in vitro* permettent de définir les caractéristiques biochimiques de la liaison ligand-récepteur, les études *in vivo* sont indispensables pour appréhender les effets globaux d'un xénobiotique sur un organe, les interactions entre organes, et les mécanismes moléculaires activés en aval de la liaison ligand-récepteur. Plusieurs modèles ont donc été développés.

7.3.1.1. Danio rerio

Le poisson-zèbre constitue un modèle animal intéressant, grâce à sa taille, son développement ex-utérin, sa fécondité, son développement rapide et son large arsenal d'outils génétiques facilement disponibles. De plus, les embryons, les nouveau-nés et les individus adultes absorbent facilement les composés de leur environnement aqueux et tolèrent le DMSO, excipient souvent utilisé pour dissoudre les ligands des NRs. L'inconvénient majeur de ce modèle par rapport à d'autres est son coût d'entretien. En effet, l'élevage en aquarium est onéreux et requiert une certaine expertise (Dooley et Zon 2000; Fishman 2001). Leurs NRs et cofacteurs sont phylogénétiquement conservés, de sorte que dans la plupart des cas examinés, une réponse aux ligands semblables entre les espèces a été observée (Machuca et al. 1995; Ulisse et al. 1996). Des études ont pu démontrer l'efficacité des systèmes « simples hybrides » avec les récepteurs nucléaires PPAR α , ROR γ et Rev-erba. En effet le traitement de ces animaux avec des ligands agonistes montre une augmentation de la transcription des gènes rapporteurs (Tiefenbach et al. 2010).

7.3.1.2. Drosophila melanogaster

La drosophile est un modèle d'étude intéressant d'abord pour son temps de génération d'une dizaine de jours (Figure 24) ainsi que pour son nombre restreint de chromosome facilitant les études génétiques. L'ensemble du génome de la drosophile a été séquencé et annoté, et plus de 60% des gènes humains ont des orthologues fonctionnels chez *D. melanogaster* (Bernards et Hariharan 2001; Celniker et Rubin 2003; Bier 2005). Ce modèle bénéficie également d'une gamme complète d'outils génétiques (Venken et Bellen 2005; Matsushima et al. 2007). Bien que les drosophiles ne puisse pas être conservées sous forme congelée, il est facile et rapide d'entretenir de nombreuses souches et avec des stocks aisément accessibles auprès du *Bloomington Stock Center* (Matthews, Kaufman, et Gelbart 2005). De plus, une base

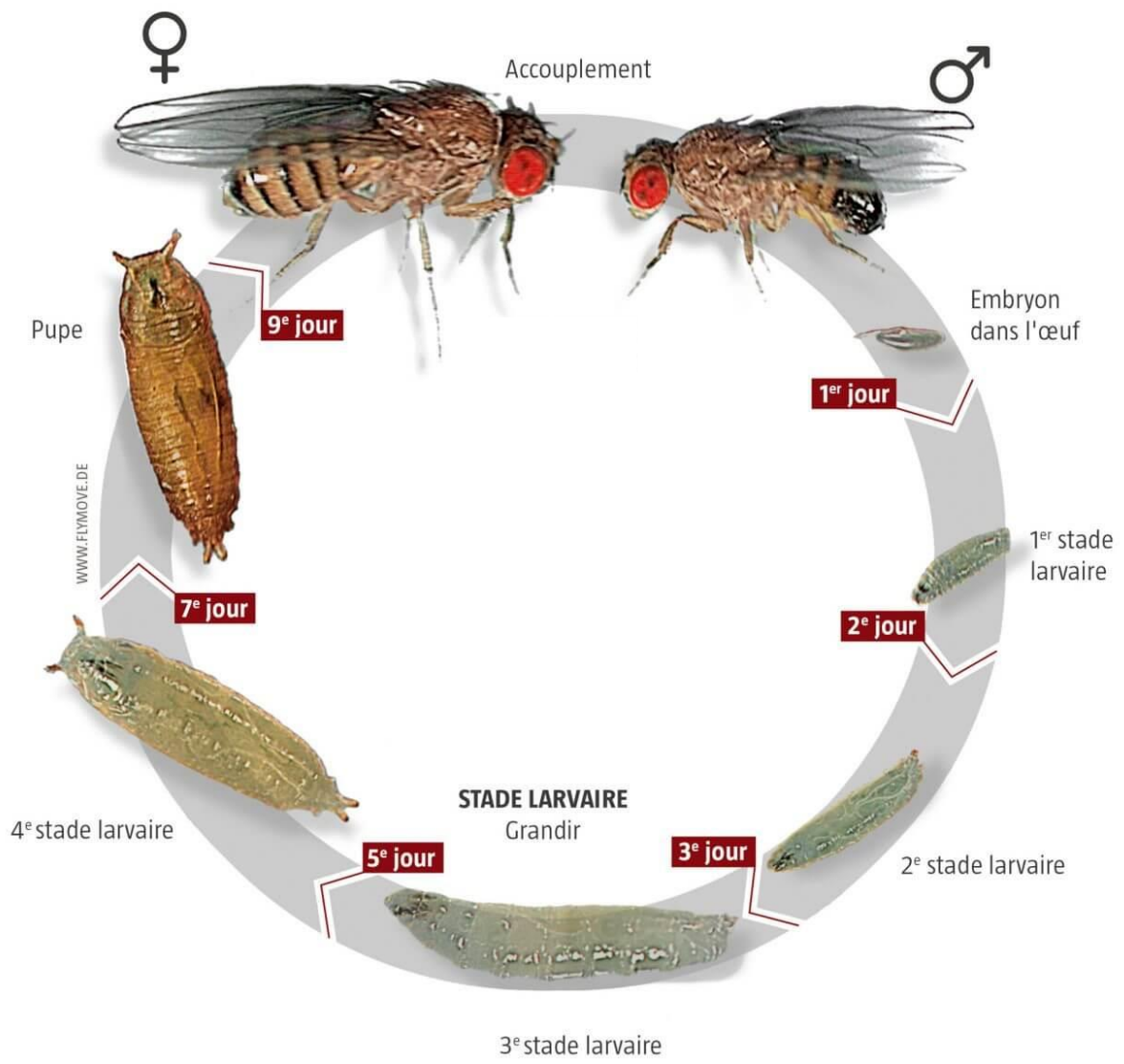


Figure 24: Cycle de vie de la drosophile

de données exhaustive sur sa génétique et sa biologie moléculaire est disponible avec des rapports phénotypiques détaillés (Drysdale et FlyBase Consortium 2008).

En 2000, le système simple hybride a été utilisé dans la drosophile pour permettre une induction aiguë de différents gènes dans des tissus précis en utilisant des promoteurs spécifiques (Han, Stein, et Stevens 2000). Cette étude a montré que les coactivateurs endogènes de la drosophile sont suffisants pour permettre l'activation transcriptionnelle du gène rapporteur. A ce jour, des drosophiles chimériques pour de nombreux NRs ont été produites (King-Jones et Thummel 2005), mais pas pour les LXRs.

7.3.1.3. *Mus musculus*

Les modèles murins sont phylogénétiquement beaucoup plus proches de l'homme et de nombreuses pathologies humaines peuvent être reproduites dans ce modèle. Cependant, le criblage de molécules est difficilement envisageable chez la souris pour des considérations éthiques et des questions matérielles. Cette espèce doit alors être considérée comme un modèle final de validation de certaines molécules préalablement retenues. De plus, la mise en place d'animaux transgéniques murins reste à ce jour difficile même si elle a été largement facilitée par l'avènement du système Crip/Cas9. Des systèmes « simple hybride » existent déjà et fonctionnent chez la souris, permettant d'évaluer l'activité d'un récepteur nucléaire *in vivo* à l'échelle de l'organisme entier (Nagel, Hagelbarger, et McDonnell 2001). En utilisant cette technique, Solomin et al. ont pu identifier un site alors inconnu de l'action des NRs RXR/RAR dans la moelle épinière (Solomin et al. 1998). Par cette approche cette équipe a isolé une nouvelle région du système nerveux central sensible aux rétinoïdes (Mata De Urquiza, Solomin, et Perlmann 1999) pouvant l'efficacité de ce système en modèle murin.

OBJECTIFS

Comme nous présenté dans la partie bibliographique, les *Liver X Receptors* (LXRs) sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces protéines se caractérisent par une organisation bipartite avec un domaine de liaison à l'ADN (DBD) ainsi qu'un domaine de liaison au ligand (LBD). D'abord orphelins, LXR α et LXR β ont été identifiés en tant que récepteurs aux oxystéroïls, des dérivés oxydés du cholestérol. Leurs rôles dans la physiologie humaine passent par la régulation de processus tels que l'inflammation, l'homéostasie du cholestérol et des stéroïdes. Ces deux isoformes, bien que semblables (78% d'homologie), possèdent des profils d'expression et des fonctions à la fois redondants et spécifiques. La modulation de ces protéines clés dans certains mécanismes est à double tranchant. Elle pourrait permettre de corriger certaines pathologies mais au prix d'effets secondaires.

De plus, ces dernières années ont été marquées par la découverte d'un grand nombre de molécules « stéroïdo-mimétiques » capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires provoquant divers effets néfastes. Ces molécules, d'origine exogène, sont nommées *Endocrine disrupting chemicals* (EDCs) et sont suspectées de causer diverses pathologies notamment reproductives. Ainsi les LXRs, par le biais de leurs rôles centraux dans de nombreux processus, sont-ils la cible d'interrogation quand à possibilité d'actions d'EDCs sur leurs voies de signalisation ainsi que de nombreuses recherches sur le développement de ligands spécifique à visée thérapeutique.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux ligands, une classe de molécules déjà représenté parmi les ligands des LXRs est analysée : les flavonoïdes. Ces molécules, en plus d'être structurellement très variées sont largement présentes dans l'environnement végétal. Ainsi la découverte de ligands intéressants conduirait à des purifications plus aisées. La caractérisation des modalités de fixation *in silico* des flavonoïdes dans le LBD de LXRs permettrait la prédiction des effets d'un flavonoïde en fonction de sa structure chimique et de son action dans la poche hydrophobe.

Dans le cadre de l'identification d'EDCs capables de perturber les voies LXRs ou dans l'optique du développement de ligands à visée thérapeutique, la mise au point

d'outils de crible est nécessaire. En effet, même s'il existe d'ores et déjà des systèmes capables de tester des ligands des LXRs, actuellement aucun d'eux ne permet l'évaluation des effets *in vivo*.

Le crible d'un grand nombre de molécules est inenvisageable chez la souris pour des raisons éthiques et matérielles. Ainsi, le modèle *Drosophila melanogaster*, par son temps de génération court et ses nombreux outils génétiques, est choisi. Les systèmes de criblage *in vitro* sont transposés *in vivo*.

Comme mentionné plus haut, les isoformes LXRs possédant des fonctions spécifiques, ainsi que des fonctions redondantes capables de se compenser, il devient primordial de savoir quelle isoforme est impactée par un ligand testé. La majorité des cribles réalisés à ce jour sont menés en système dit « UAS-Gal4 » où le LBD d'un récepteurs (ici LXR α ou LXR β) est fusionné au DBD du Gal4. Ce dernier vient alors se fixer sur une séquence spécifique UAS en amont d'un rapporteur de l'activité transcriptionnelle (luciférase ou protéine fluorescente). Récemment, un système très proche a été identifié, QUAS-QF, fonctionnant sur le même principe. La particularité de ce système est qu'il n'interagit nullement avec le premier permettant la mise au point d'un double système de criblage sans croisement des signaux rapporteurs.

L'objectif de cette thèse était triple :

- Dans un premier temps, en combinant des approches *in vitro* et *in silico*, nous avons cherché caractériser les modalités d'action de flavonoïdes sur le LBD des LXRs.
- Dans un second temps, nous avons développé un système de criblage *in vivo* en utilisant la drosophile comme modèle.
- Dans un troisième temps, nous avons tenté de mettre en place un double système de ciblage pour l'analyse simultanée des deux isoformes des LXRs.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

La quercétine (QUE), l'apigénine (API), la galangine (GAL), la naringénine (NAR), le GW3965, 22R-hydroxycholestérol (22R-HC) et le 22S-hydroxycholestérol (22S-HC) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (L'Isle D'Abeau, France). T0901317 a été acheté chez Cayman (Montigny-le-Bretonneux, France). Les ligands ont été dilués dans du DMSO (Sigma-Aldrich) à une concentration de 10^{-3} M et conservés à -20°C . Les plasmides Gal4-hLXR α , Gal4-hLXR β , UAS-Luc, SRC1-VP16, DRIP205-VP16, SMRT-VP16 ainsi que NCoR-VP16 ont été généreusement données par Pr Makishima M. (Kaneko et al. 2003). Les plasmides « QF » (#46128), « UAS » (#24343), « QUAS » (#24351), « GFP » (#46163), « RFP » (#17787), « CFP » (#15214) et « SV40ter » (#104878) ont été fournis par Addgene.

2. Cultures cellulaires

Des cellules HeLa, dérivées de métastases du cancer du col de l'utérus (ATCC® CCL-2), ont été cultivées à 37°C et 5% de CO_2 dans du Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies, St Aubin, France) contenant 100 mg/ml de pénicilline/streptomycine (Life Technologies), additionné de 10% de sérum de veau foetal (FCS, Biowest, Nuallié, France; appelé par la suite milieu "complet").

3. Transfection transitoires

Des cellules HeLa ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits (1,25 x 10^4 cellules par puits; Dutscher, Brumath, France) dans un milieu complet. Le jour suivant, les cellules sont transfectées en utilisant l'agent de transfection cationique JetPRIME® (Polyplus transfection, Souffelweiersheim, France) dans un milieu Opti-MEM® (Life Technologies) avec du sérum et en suivant les recommandations du fabricant (0,1 μg d'ADN pour 0,2 μl de réactif JetPRIME® par puits). Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec les divers ligands ou véhicules (DMSO, Sigma Aldrich, Isle d'Abeau, France) dans du DMEM blanc sans

sérum. Vingt-quatre heures après l'induction, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et lysées dans 12µl de tampon de lyse 1X (Reporter Lysis Buffer, Promega, Charbonnières-les-Bains, France).

4. Mesure de l'activité luciférase

L'activité de la luciférase a été analysée à l'aide d'un luminomètre s Micro LumatPlus LB96V (Berthold Technologies, Thoiry, France). Cinquante µl de Genofax A (Yelen, Ensues-la-Redonne, France) contenant de la luciférine, de l'ATP et un tampon ont été injectés par le dispositif sur 10µl de l'échantillon testé. Les mesures ont été effectués sur 10 secondes et les résultats ont été exprimés en unités lumineuses relatives (RLU) et normalisés sur les quantités de protéines totales.

Les 2µl échantillons restants ont été utilisés pour la quantification protéique On ajoute 150µl de réactif 1X de protéine Bio-Rad (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). Le mélange a été incubé pendant 5 min dans l'obscurité. La densité optique (DO) est mesurée à 595 nm avec le spectrophotomètre à microplaques MultiskanGO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlande)

5. Extraction des ARNm sur cellules

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 12 puits ($1,5 \times 10^5$ cellules / puits; Dutscher) dans un milieu complet. Le jour suivant, les cellules ont été sevrées dans du DMEM sans sérum pendant dix heures, puis traitées dix-sept heures avec divers ligands ou le véhicule dans le milieu divers sans sérum. Les cellules sont lysées dans 500 µl de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), puis 100 µl de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement puis laissé pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé 10 minutes à 14000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est prélevée, puis un volume de 250 µl d'isopropanol lui est ajouté. Le mélange est vigoureusement agité puis placé à -20°C pendant 1h pour précipiter les ARN. Une centrifugation (8 min ; 14000 rpm) est réalisée et les culots

ARN sont lavés dans 500 µl d'éthanol 70 % puis laissés séchés à l'air libre et dissout dans 20 µl d'H₂O bidistillée. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie (à 260 nm) grâce au Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, North Carolina, USA).

6. Rétro-transcription

La rétro-transcription transforme les ARN totaux en ADN complémentaires (ADNc). Deux µg d'ARN totaux sont dénaturés à 65°C pendant 5 minutes en présence de 50 nmoles d'amorces hexanucléotidiques (Random primers, Promega), puis placés 5 minutes dans la glace. Le mélange est ensuite placé à 37°C pendant 1 h avec 200 unités de transcriptase inverse M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Promega), de 2,5 mM de dNTP (Promega) et de RNAsine recombinante (Promega) dans du tampon M-MLV-RT (Promega ; Tableau 2). Les ADNc obtenus sont dilués au 1/40 dans de l'eau stérile pour une analyse par PCR.

7. PCR en temps réel sur ADNc

La réaction est réalisée dans un volume de 15 µl contenant 40ng d'ADNc, 7.5 pmol de chaque amorce et 7.5 µl de MESA Green PCR (Mastermix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France), suivant les conditions d'amplification (Tableau 1, 2 et 3). L'amplification est réalisée via un Mastercycler Realplex (Eppendorf, LePecq, France) et l'accumulation relative des ARN est calculée par la méthode des $\Delta\Delta C_t$ en utilisant le gène de ménage Actine comme référence. Les séquences des amorces sont indiquées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les qPCR sur cellules humaines

ARN cible	Amorces		Tm
ABCA1	sens	GCACTGAGGAAGATGCTGAAA	60°C
	antisens	AGTTCCTGGAAGGTCTTGTTCAC	
Srebp1c	sens	GGAGCCATGGATTGCACATT	60°C
	antisens	GCTTCCAGAGAGGAGGCCAG	
Fasn	sens	CCCCAACCTGAGATCCCA	60°C
	antisens	TTGATGCCACGTTGCC	
Actine	sens	AGAGCTACGAGTGCCTGAC	60°C
	antisens	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les qPCR sur larves entières

ARN cible	Amorces		Tm
Gal4	sens	TTCCTCGAGAAGACCTTGACA	60°C
	antisens	ATTCCGGCGATACAGTCAAC	
GFP	sens	GGCAGACAAACAAAAGAATGG	60°C
	antisens	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC	
Actine	sens	GTGCCCATCTACGAGGGTTA	60°C
	antisens	GCCATCTCCTGCTCAAAGTC	

Tableau 3 : Programme PCR classique utilisé

Nombre de cycles	1 cycle	40 cycles			1 cycle		
Température	95,0°C	95,0°C	Tm	68,0°C	95,0°C	60,0°C	95,0°C
Durée (mm:ss)	02:00	00:15	00:15	00:20	00:15	00:15	00:15

8. Molecular docking

La capacité des ligands à se lier dans la poche de liaison des LXRs a été évaluée par docking moléculaire par le biais d'Autodock Vina (Trott et Olson 2010) (version 1.5.6). Toutes les molécules ont été récupérées de la base de données Pubchem et enregistrées sous forme de fichiers pdbqt. Les structures tridimensionnelles de LXR α (ID PDB: 3IPQ; (Fradera et al. 2010) et LXR β (PDB ID:1PQ6; (Färnegårdh et al. 2003) ont été obtenues sur Protein Data Bank (Berman et al. 2000) et leur fichier pdbqt ont été préparés par le retrait des ligands et des molécules d'eau co-cristallisées. Ensuite la zone de calcul pour le docking à été délimitée au domaine de liaison au ligand avec une taille de 30x30x30 Å. Les affinités de liaison prédites ont été calculées grâce à l'équilibre des constantes de dissociation résultant de l'équation :

$$\Delta\Delta G = \Delta G^{\text{Flavonoid}} - \Delta G^{\text{GW3965}} = RT \ln\left(\frac{Kd^{\text{Flavonoid}}}{Kd^{\text{GW3965}}}\right)$$

$$Kd^{\text{Flavonoid}} = \left(e^{\frac{(\Delta G^{\text{Flavonoid}} - \Delta G^{\text{GW3965}})}{RT}} \right) Kd^{\text{GW3965}}$$

Où Kd^{GW3965} a une valeur de 14nM et 22nM pour LXR α et β respectivement; ΔG^{GW3965} vaut 11.9kcal/mol et 12.3kcal/mol pour LXR α et β respectivement (Mitro et al. 2007); $R = 8.314 \text{ J/mol/K}$ ou $2.39 \times 10^{-4} \text{ kcal/mol/K}$ et $T = 298.15$. Toutes les images ont été obtenues en utilisant PyMOL software (Python Molecular Graphics – version 2.1.1).

9. Génération de la lignée de drosophile Gal4-LXR α ; UAS-GFP

La mise en place du système simple hybride UAS-Gal4 in vivo réclame un modèle d'étude flexible et pratique. Pour ces raisons, le modèle *Drosophila melanogaster*, avec ses quatre paires de chromosome (3 autosomes et 1 gonosome) a été choisi. Un plasmide contenant la séquence codant la protéine de fusion Gal4-LXR α sous l'influence d'un promoteur fort et ubiquiste, celui de l'actine 5c. Ce plasmide

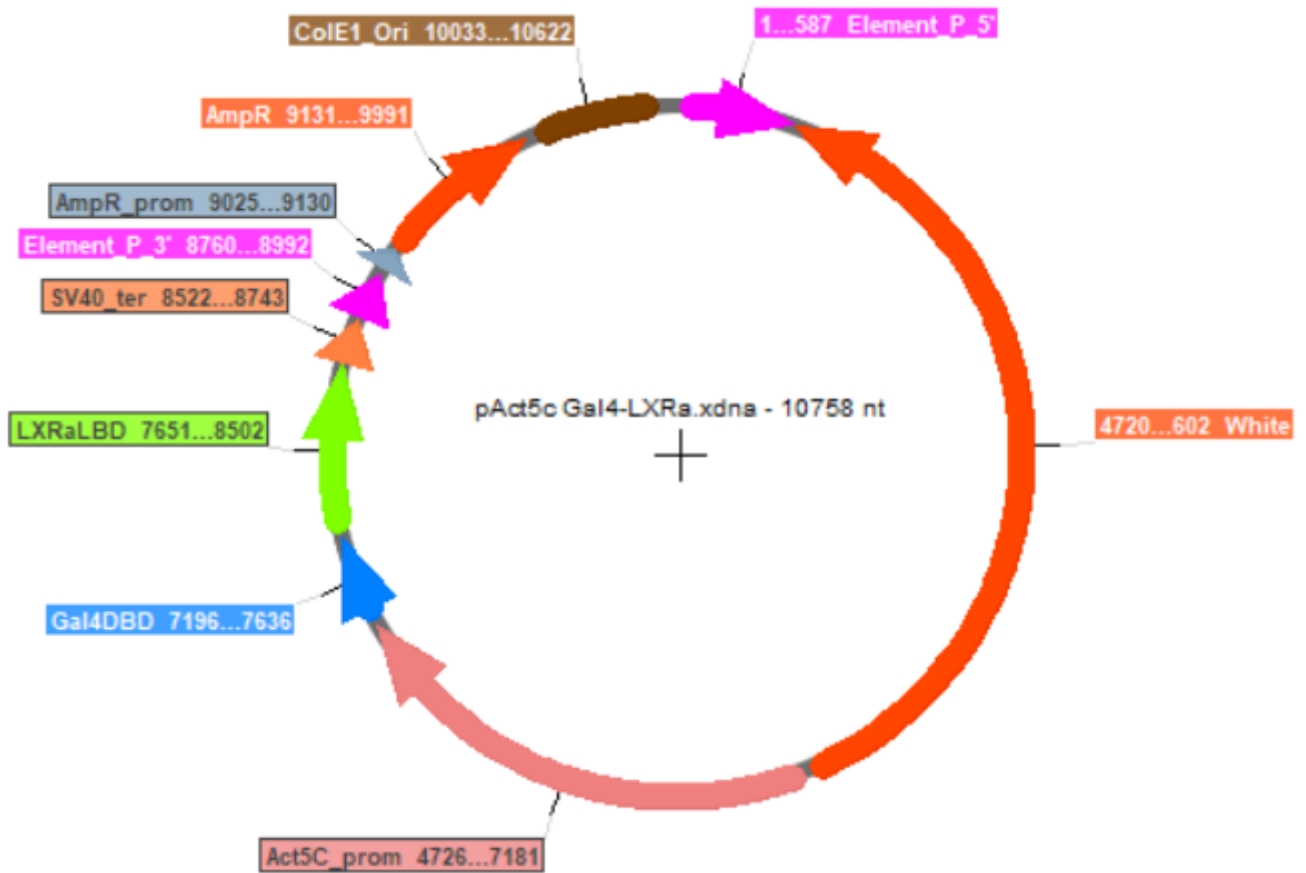


Figure 24 : Plasmides utilisés pour la transformations des lignées de drosophiles

La séquence Gal4-LXRα a été amplifiée à partir du plasmide pCMV-Gal4-LXRα généreusement donné par le Pr. Makishima (Nihon University of Tokyo) et décrit dans (Kaneko et al, 2003). Cette séquence a été sous-clonée dans pAct5c (Addgene #37382) et a été injectée dans des œufs de drosophiles.

contient également des éléments P permettant l'insertion dans le génome de la drosophile ainsi qu'un gène white ayant pour effet de colorer les yeux en rouge, et permettant de suivre le transgène au fil des générations (Figure 25).

Ainsi, un transformant a pu être généré et ses descendants ont été croisés entre eux afin d'obtenir des individus homozygotes en suivant la ségrégation du transgène de sélection white se manifestant par des yeux orange à l'état hétérozygote et rouge en homozygote. Une vérification par qPCR a été réalisée.

L'étape suivante consistait donc à amener le gène rapporteur du système : UAS-GFP. Des lignées drosophiles homozygotes « UAS-GFP » existent déjà et sont aisément accessibles (Bloomington Stock ID : 32184). Les drosophiles homozygotes « Gal4-LXR α » sont donc croisées avec des drosophiles homozygotes « UAS-GFP » générant une descendance F1 hétérozygote pour les deux parties du système. La fluorescence basale étant assez réduite, il a été décidé de passer le système simple hybride à l'état homozygote.

Afin de générer de telles drosophiles, le chromosome ayant intégré le transgène Gal4-LXR α doit être connu. La transgénèse par élément P permet une insertion aléatoire dans le génome entraînant la méconnaissance de la localisation précise du transgène Gal4-LXR α (+white). Afin de savoir sur quel chromosome est situé le transgène, des drosophiles homozygotes « Gal4-LXR α (+white) » ont été croisées avec des drosophiles à chromosomes balanceurs. Cette dernière lignée a la particularité d'avoir un allèle dominant et létal à l'état homozygote, spécifique de chaque chromosome. La ségrégation du chromosome 2 au cours des générations est suivie par la présence du phénotype « Aile courbées » (allèle CyO) et celle du chromosome 3 par le phénotype « Soies courtes » (allèle TM6). Si le transgène se situe sur les chromosomes sexuels alors la ségrégation du transgène sera dépendante du sexe et si le transgène ne ségrége ni avec les chromosomes 2 et 3 ni avec les chromosomes sexuels alors il sera situé sur le chromosome 4 (peu probable en raison de sa taille très réduite). Dans la figure 26, seuls les chromosomes 2 et 3 sont représentés par soucis de simplicité. Lors du croisement des drosophiles à chromosomes balanceurs avec la lignée « Gal4-LXR α », seuls les descendants (F1)

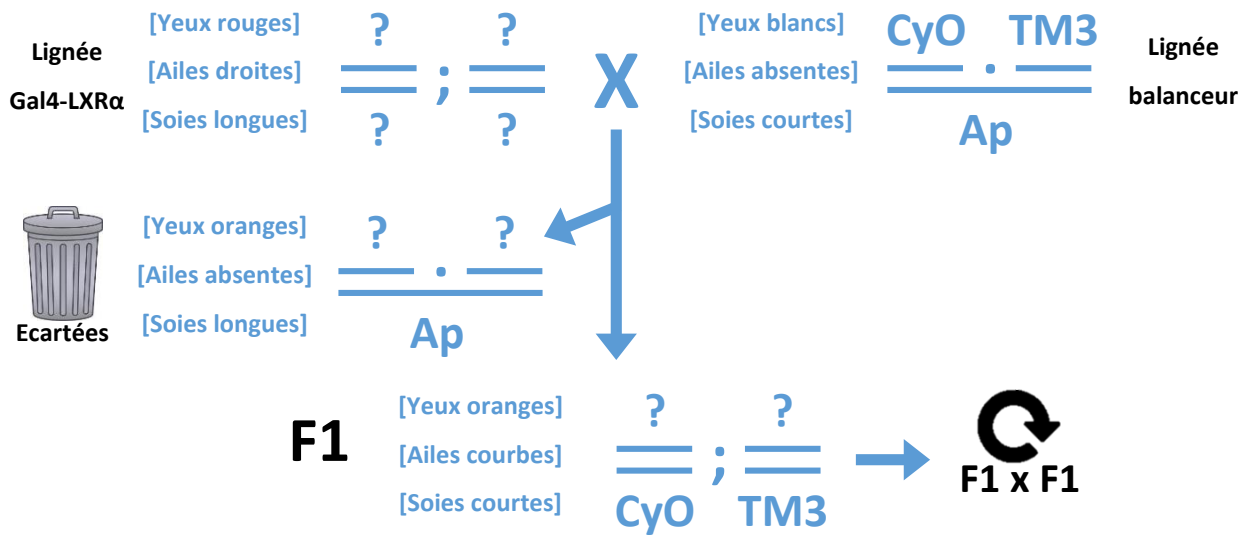


Figure 25 : Croisement permettant de définir la localisation du transgène Gal4-LXRα

La lignée Gal4-LXRα a été croisée avec la lignée balancer. Les tirets horizontaux schématisent les chromosomes 2 et 3. Les allèles CyO (caractère : ailes courbes), TM3 (caractère : soies courtes) et Ap (caractère : sans ailes) sont dominant et létaux au stade embryonnaire.

Tableau 4 : Effectif de la génération F2 en fonction du phénotype

Yeux	[blancs]						[orange]						[rouges]											
	[droites]		[courbes]		[droites]		[courbes]		[droites]		[courbes]		[droites]		[courbes]									
Ailes	[longues]		[courtes]		[longues]		[courtes]		[longues]		[courtes]		[longues]		[courtes]									
Soies	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]	[♂]	[♀]		
Eff.	21	18	23	20	22	25	18	21	24	18	19	22	22	20	26	23	45	44	39	36	0	0	0	0

Tableau 5 : Effectif de la génération F2 en fonction du phénotype parmi les individus aux yeux rouges

[Yeux rouges]	Ailes	[droites]	164	100%
		[courbes]	0	0%
	Soies	[droites]	89	54,3%
		[courbes]	75	45,7%
	Sexe	[♂]	84	51,2%
		[♀]	80	48,8%

présentant des yeux orange (Gal4-LXR α hétérozygote), les ailes courbées (CyO hétérozygote) et les soies courtes (TM6 hétérozygote) ont été sélectionnés et croisés entre eux. A la génération suivante (F2), les individus aux yeux rouges (Gal4-LXR α homozygote) présentaient tous la disparition du caractère « aile courbées » (sans allèle CyO) indiquant ainsi la position du transgène Gal4-LXR α sur le chromosome 2 (Tableau 4 et 5).

La lignée « Gal4-LXR α » homozygote sur le chromosome 2 a donc été croisée avec une lignée UAS-GFP homozygote sur le chromosome 3 (Figure 27). Les descendants F1 présentant des yeux orange (marque de la présence de Gal4-LXR α à l'état hétérozygote) avec des ailes courbées (chromosome balancier 2) et des soies courtes (chromosome balancier 3) ont été sélectionnés et croisés entre eux. Dans la génération suivante (F2), les individus aux yeux rouges avec les ailes droites et les soies longues ont été conservés et analysés par qPCR révélant leur état homozygote pour Gal4-LXR α et UAS-GAL4. La lignée simple hybride étant établie à l'état homozygote, ceci permet une plus grande facilité d'entretien ainsi qu'un signal basal logiquement plus important.

10. Traitement des drosophiles

Les ligands testés sont administrés aux drosophiles par le biais de l'alimentation. Les ligands, déjà solubilisés dans du DMSO, sont dilués dans de l'eau contenant 100mg/mL d'extrait de levure (Sigma-Aldrich ; L'Isle D'Abeau, France). Vingt-cinq larves au stade 2 sont placées dans un puits d'une plaque 96 puits (Dutscher, Brumath, France) préalablement rempli de 100 μ l du mélange ligand-extrait de levure. La plaque est placée à 25°C pour 24h. Après incubation les larves sont lavées au PBS1X 2 fois et sont placées sous une loupe binoculaire à fluorescence (Zeiss Stemi 305 ; St-Just-St-Rambert ; France). Un faisceau lumineux à 488nm est dirigé vers les larves et la fluorescence GFP est visualisée. Les prises de vue sont réalisées par le logiciel lentscope software (version 1.8.2) avec un temps d'exposition

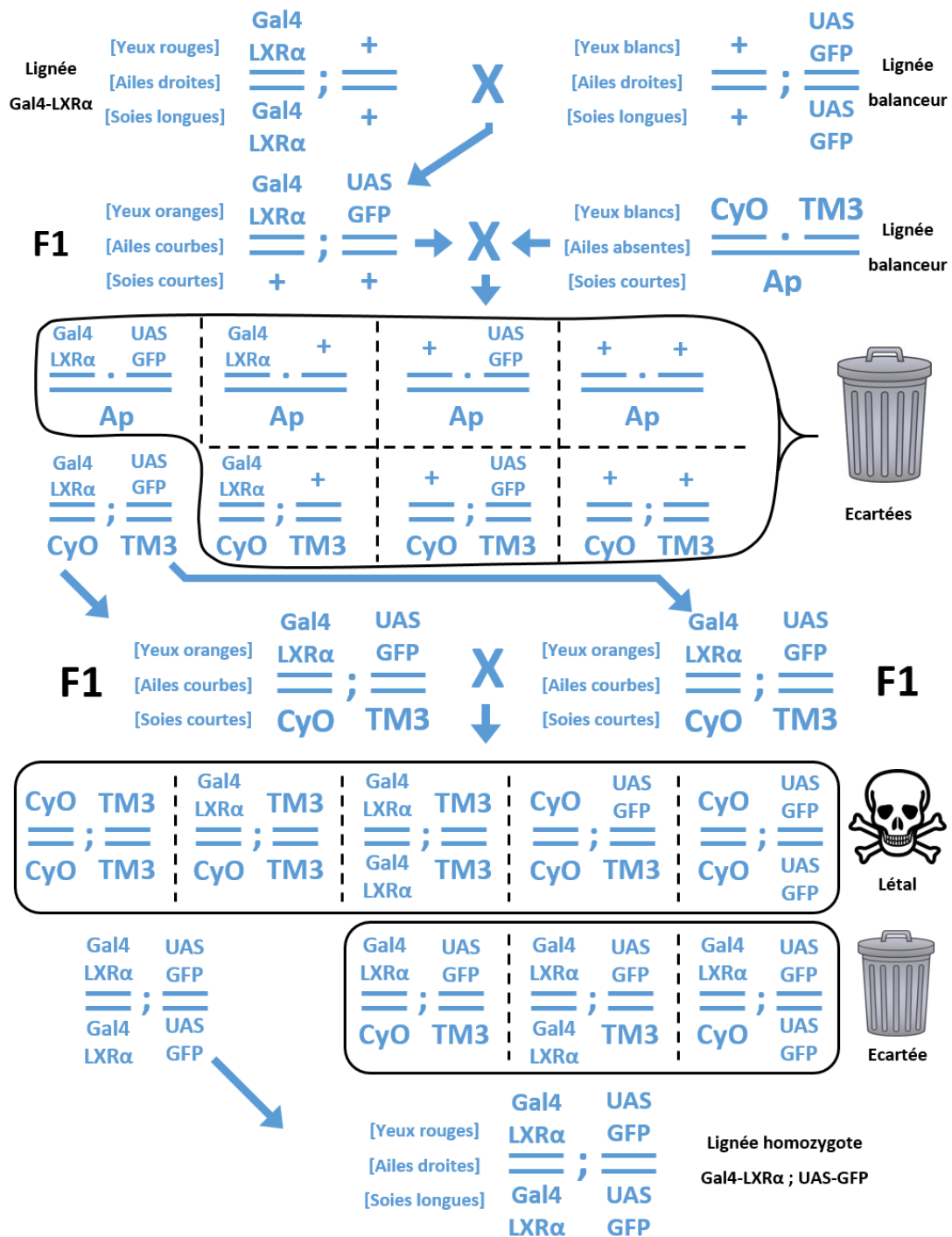


Figure 26 : Génération de la lignée Gal4-LXRα;UAS-GFP à l'état homozygote
 La lignée Gal4-LXRα est croisée avec la lignée UAS-GFP. Les descendants hétérozygotes pour les transgènes Gal4-LXRα et UAS-GFP sont à leur tour croisés avec la lignée balaceur afin de pouvoir suivre la ségrégation des chromosomes et de générer une lignée homozygote. Les tirets horizontaux schématisent les chromosomes 2 et 3. Les allèles CyO (caractère : ailes courbes), TM3 (caractère : soies courtes) et Ap (caractère : sans ailes) sont dominant et létaux au stade embryonnaire.

d'une seconde. La quantification de la fluorescence totale des larves est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (version 1.8.0)

11. Extraction d'ARN sur larve

Quinze larves sont placées dans un tube eppendorf sur glace où elles sont broyées à l'aide de billes magnétiques. Les cellules sont lysées dans 250 µl de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), puis 50 µl de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement puis laissé pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être centrifugé 10 minutes à 14000 rpm à 4°C. La phase aqueuse est prélevée, puis un volume de 125 µl d'isopropanol lui est ajouté. Le mélange est vigoureusement agité puis placé à -20°C pendant 1h pour précipiter les ARN. Une centrifugation (8 min ; 14000 rpm) est réalisée et les culots ARN sont lavés dans 250 µl d'éthanol 70 % puis laissés séchés à l'air libre et dissout dans 20 µl d'H₂O bidistillée. Les ARN sont quantifiés par spectrophotométrie (à 260 nm) grâce au Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, North Carolina, USA).

12. Extraction de protéines sur larve totale

Vingt-cinq larves sont placées dans un tube eppendorf sur glace où elles sont broyées à l'aide de billes magnétiques. Le broyat est mélangé à 100µl d'une solution d'extraction (30 mM Hepes-KOH pH 7.6, 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 20% Glycerol) ainsi qu'à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (promega) puis centrifugé 1 minute à 600g. Le surnageant est conservé pour les analyses par western blot. Les protéines totales sont dénaturées au SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-ECL (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France). Les membranes sont incubées sur la nuit avec les anticorps primaires : GFP (ab13970, abcam) ; Gal4(DBD) (ab135397, Abcam) et Actine (A2066, Sigma Aldrich). L'anticorps secondaire est ajouté (P.A.R.I.S, Compiègne, France) pour une incubation d'une heure. La détection du signal peroxydase est réalisée par le

Western Lightning System kit (PerkinElmer, Villebon sur Yvette, France). La quantification de l'intensité des bandes obtenues est réalisée à l'aide du logiciel Image Studio Lite (version 5.2)

13. PCR sur ADN plasmidique.

La réaction est réalisée dans un volume de 25 µl contenant 50ng d'ADN, 12,5 pmol de chaque amorce et 12.5 µl de Q5 High Fidelity 2X Master Mix (NEB, Evry, France), suivant les conditions d'amplification (Tableau 6 et 7). L'amplification est réalisée via un Mastercycler Pro PCR (Eppendorf, LePecq, France). Les séquences des amorces sont indiquées Tableau 1. Les produits d'amplification sont déposés sur gel d'agarose à 1%.

14. Recombinaisons homologues

La réaction est réalisée dans un volume de 20 µl contenant un maximum 0,5pmol d'ADN total plasmidique. La proportion d'un fragment d'assemblage dans le mix ADN est inversement proportionnelle à sa taille. Puis 10µl de Gibson Assembly Master Mix (NEB, Evry, France) et jusqu'à 10µl d'H₂O sont ajoutés. Le mélange est incubé quatre heures à 50°C. Les produits d'assemblage sont ensuite amplifiés par PCR avant d'être déposés sur gel d'agarose à 1%.

15. Digestion enzymatique

La réaction est réalisée dans un volume de 20 µl contenant 2µl de Buffer C, 0.2µl de BSA acétylée, 0.5µl d'enzyme de restriction (NotI, Promega) et 1µg d'ADN total et jusqu'à 16,3µl d'H₂O. L'ensemble est incubé 6h à 37°C. Les produits de digestion subissent ensuite une ligation. Cette réaction nécessite 8µl d'ADN total (la proportion d'un fragment d'assemblage dans le mix ADN est inversement

Tableau 6 : Amorces qPCR utilisées pour la construction plasmidique

Amplicon	Amorces		Ti	Tf
Gal4-LXR α	sens	gctagcATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC	64°C	71°C
	antisens	gccaccgctaccgcctccaccggatccaccgcctccogctTTCGTGCACATCCCAGATCT		
LXR β	sens	attaccgcctcctccCGGAATTCGGTACCGTCG	64°C	71°C
	antisens	tccgccaccgctaccgcctccaccggatccaccgcctccogctCTCGTGGACGTCCCAGA		
QF	sens	taccgagctcggatcccaacATGCCACCCCAAGCGC	66°C	77°C
	antisens	tgcacggtaccgaattccggGAGGAGCGGTAATGC		
GFP-SV40	sens	ccgatatccgccaccaATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCA	65°C	77°C
	antisens	ggaagttttcgcgctgTACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC		
RFP	sens	gttaacagatcgggATGGGTGCTGTTTCTCCAA	62°C	71°C
	antisens	aactcatcaatgtatcttcatgtctgTTACTTGTACAGCTCGTCCATG		
CFP	sens	ttgaggagaaccaggaccATGGTGAAGCAAGGGCGAG	65°C	76°C
	antisens	aatgtatcttatcatgtctgtcattaCTGTACAGCTCGTCCA		
10xUAS	sens	gcggccgcAAGCTTGCATGCCTGCA	63°C	75°C
	antisens	tgaaaagtctctctcttactcatTGGTGGCGGATATCGG		
10xQUAS	sens	ggcgccCCGAGCGCATCCACA	64°C	75°C
	antisens	atgtttttggcatcttccatCCCCGATCTGTAAACGAA		
SV40	sens	CAGACATGATAAGATACATTTGATGAGTT	63°C	63°C
	antisens	TACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC		
Gal4-LXR α -P2A	sens	gctagcATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC	64°C	78°C
	antisens	ATTCGGCGATACAGTCAAC		
QF-LXR β -P2A	sens	taccgagctcggatcccaacATGCCACCCCAAGCGC	65°C	77°C
	antisens	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC		
CFP-SV40	sens	ttgaggagaaccaggaccATGGTGAAGCAAGGGCGAG	65°C	76°C
	antisens	TACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC		
UAS-GFP-SV40	sens	gcggccgcAAGCTTGCATGCCTGCA	63°C	75°C
	antisens	TACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC		
QUAS-RFP-SV40	sens	ggcgccCCGAGCGCATCCACA	64°C	75°C
	antisens	TACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC		
Gal4-LXR α -QF-LXR β -CFP-SV40	sens	gctagcATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC	64°C	71°C
	antisens	TACCACATTTGTAGAGGTTTACTTGC		
UAS-GFP-QUAS-RFP	sens	gcggccgcAAGCTTGCATGCCTGCA	63°C	75°C
	antisens	ggcgccCCGAGCGCATCCACA		
Linker-12xHis-P2A	Sens 1	agcggaggcgggtggatccgggtggaggcggtagcggtgCGGGAGGTTCCCACC	63°C	79°C
	Sens 2	CACGGATCCGGAGCTacaaaatttcagcctgctcaaacaggctggAGATGTTGAGGAGAA		
	Antisens 1	AGTCCGGATCCGTGgtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtGGTGGGAACCTCCGC		
	Antisens 2	ctattatcagggtcctgggTTCCTCAACATCT		
Linker-12xHis-P2A	Sens 1	agcggaggcgggtggatccgggtggaggcggtagcggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtGGTGGGAACCTCCGC	63°C	79°C
	Sens 2	TTGATACCAAGGACGatgacgataaaggatccggagctacaaaTTCAGCCTGCTCAAA		
	Antisens 1	CGTCCCTGGTATCAAtatcatggtcttttgtatctccgtcggtgTCTTTCGTATCGGAA		
	Antisens 2	ctattatcagggtcctgggtctctcctcaacatctccagcctgTTGAGCAGGCTGAA		

Table 7 : Programmes PCR utilisés pour la construction plasmidique

Nombre de cycles	1 cycle				5 cycles			25 cycles			1 cycle		
	95,0°C	95,0°C	Ti	68,0°C	95,0°C	Tf	68,0°C	95,0°C	60,0°C	95,0°C			
Durée (mm:ss)	02:00	00:15	00:15	00:30 par kb	00:15	00:15	00:30 par kb	00:15	00:15	00:15			

proportionnelle à sa taille), 1µl de buffer et 1µl de T4 DNA liguase (Promega). Après une incubation à 4°C sur la nuit, l'assemblage est ensuite amplifié par PCR avant d'être déposés sur gel d'agarose à 1%.

16. Analyse statistiques

Les t-test, et les one-way ANOVA sont réalisés par le logiciel GraphPadPrism 6 pour évaluer la significativité de différence entre les groupes comparés. Une différence est considérée significative lorsque la valeur p est en dessous de 0,05.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Identification et caractérisation de flavonoïdes ligand des LXRs

1.1. Article 1

Flavonoids from Algerian propolis differentially modulate Liver X Receptors activity. Structure-function relationship analysis.

Fouache A^{1,2} et al.

¹ Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, F63001, Clermont-Ferrand, France.

² Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France

Abstract

Liver X receptors (LXRs) α (NR1H3) and β (NR1H2) have been involved in the regulation of many physiological processes such as the control of cholesterol homeostasis, as well in the control of the apoptosis and proliferation balance. These receptors are thus promising therapeutic targets in various pathologies such as dyslipidemia, atherosclerosis, diabetes and/or cancers. Propolis is a resinous mixture that honey bees produce by mixing saliva and beeswax with exudate gathered from tree buds, sap flows, or other botanical sources and is used as a sealant for unwanted open spaces in the hive. Propolis has been studied for his antibacterial and anti-inflammatory and has been known for containing high concentration of flavonoids. Some of these molecules have already been described as LXR ligands. From double-hybrid experiments, four flavonoids have been identified as LXR modulators. In silico, molecular docking suggests parculiar binding pattern between agonistic and antagonistic molecules. Altogether, these results allow a better understanding of the ligand binding pocket of LXR α/β . They also improve our knowledge about flavonoid mechanism of action, permitting the selection and development of better LXR selective ligands.

Key-words

LXR; Flavonoid; Propolis; Galangin; Quercetin; Apigenin; Naringenin

Abbreviations

T0901317, T09; naringenin, NAR; Quercetin, QUE; Apigenin, API; Luteolin, LUT; Galangin, GAL; Cyanidin, CYA; liver X receptors, LXRs ; Ligand binding domain, LBD ; Ligand binding pocket, LBP.

Introduction

Natural products have demonstrated to be a reliable source of biologically active molecules playing a critical role in pharmacology. Many of these natural products have been proven to be useful for medicinal purposes. Among them, propolis is a natural substance collected by honeybees from plants and trees and use it to protect their hives from enemies. Propolis is widely used in folk medicines in many regions of the world (Ghisalberti 1979). It has been reported to have various biological activities such as antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and anticancer (Kujumgiev et al. 1999). Recent research has highlighted that propolis prevents such illnesses such as heart disease, diabetes and cancer (Zabaiou et al. 2017)

Flavonoids, one of the main groups of phenolic compounds in propolis, are the key compounds for estimation of propolis quality. These lipophilic compound vary in concentration depending on the geographic origin and ecosystem of plant sources (Nieva Moreno et al. 1999) and will affect the biological activity of propolis (Kujumgiev et al. 1999). Beyond using natural products as dietary supplements, identification of novel natural product ligands for a given receptor provides pharmacological tools and unique insight for drug design.

The liver X receptors LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2) are members of the nuclear receptor superfamily, originally identified as orphan receptors (Willy et al.

1995). As it, they both have a DNA- and a ligand-binding domain (DBD and LBD, respectively). In their canonical activity both LXRs bind with one of the RXR on specific DNA sequences and are considered repressing the transcription in absence of any ligand. In the liganded configuration RXR-LXR allows the transcriptional regulation of their bona fide target gene by recruiting co-activators (for a review see (Maqdasy et al. 2016). Activating ligands are received in the hydrophobic pocket and interact with LXR. This allows the release of co-repressors and recruitment of co-activators. Screening of LXR ligands has been challenging; nevertheless Mangelsdorf's group definitively demonstrated that oxidized derivatives of cholesterol, named cholesterol, are the true activating ligands of these receptors (Janowski et al. 1996). For the last decade, following phenotype analyses of Lxr-deficient mouse models as well as genetic studies in Human, LXRs have been at the bulk of active pharmacological investigations to discover new modulating molecules: indeed deregulations of signaling pathways controlled by these nuclear receptors have been directly associated to numerous metabolic, neurological and/or cancer diseases(Maqdasy et al. 2016); it has thus been tempting to hypothesize that modulating LXR activity could prevent and/or treat the associated pathologies, such as dyslipidemia, atherosclerosis, diabetes and cancer (Joseph, McKilligin, et al. 2002; Tangirala et al. 2002; Cao et al. 2003).

Based on that, we have hypothesized that flavonoids present in Algerian propolis could regulate LXRs pathways. We first tested the selected molecules tested in cell culture using the chimeric reporter gene UAS-luciferase and a fusion protein consisting of the LBD of LXRs fused to the DBD of GAL4 (Kaneko et al. 2003). Then we checked whether these molecules could fit in the binding pocket of LXRs by molecular docking and which modifications they could induce in each LXR.

Materials and methods

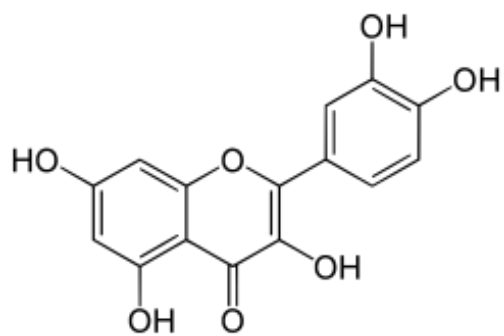
Materials

Quercetin (QUE), Apigenin (API), Galangin (GAL) and Naringenin (NAR) were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle D'Abeau, France; Figure 1). T0901317 was purchased Cayman (Montigny-le-Bretonneux, France). Ligands were diluted in DMSO (Sigma-Aldrich) at a concentration of 10⁻³M and conserved at -20°C. The plasmids used Gal4-hLXR α , Gal4-hLXR β , and UAS-Luc have been described elsewhere (Kaneko et al. 2003).

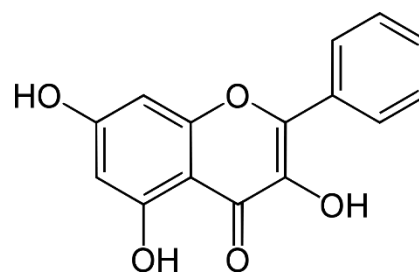
Cell Culture and transfection assays

HeLa cells, derived from cervical cancer metastases (ATCC® CCL-2), were cultured at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies, St Aubin, France) containing 100 mg/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Biowest, Nuallié, France; called thereafter complete medium).

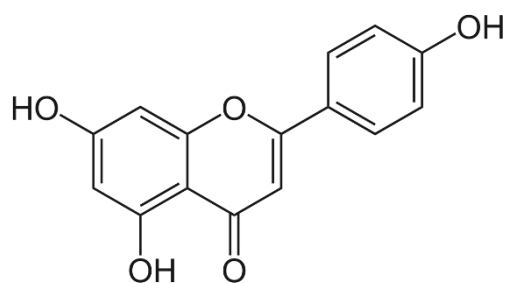
For transient transfection, HeLa cells were seeded in 96-well plates (1.25x10⁴ cells / well; Dutscher, Brumath, France) in complete medium. The next day, cells were transfected using the cationic transfection agent JetPRIME® (Polyplus transfection, Souffelweiersheim, France) in Opti-MEM® medium Reduced Serum Media (Life Technologies) with serum and following the recommendations of the manufacturer (0.1 μ g DNA for 0.2 μ l of JetPRIME® reagent per well). Twenty-four hours after transfection, cells were treated with the various molecules or vehicle (DMSO, Sigma Aldrich, Isle d'Abeau, France) in serum-free white DMEM. Twenty-four hours after induction, cells were washed with PBS 1X and lysed in 12 μ l of lysis buffer 1X (Reporter Lysis Buffer, Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Luciferase activity was assayed using a luminometer Micro LumatPlus LB96V Microplate Luminometer (Berthold Technologies, Thoiry, France). Fifty μ l of Genofax A (Yelen, Ensues-la-Redonne, France) containing luciferin and buffer were injected by the device on 10 μ l of the



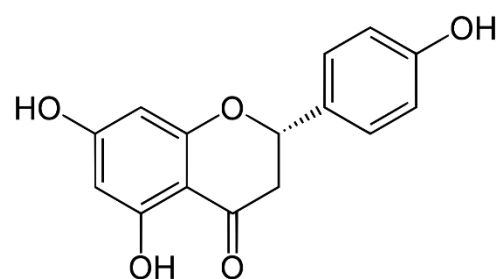
Quercetin



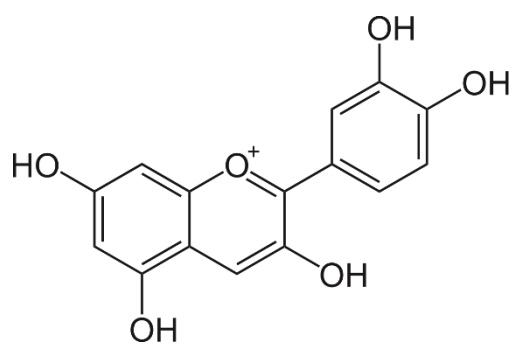
Galangin



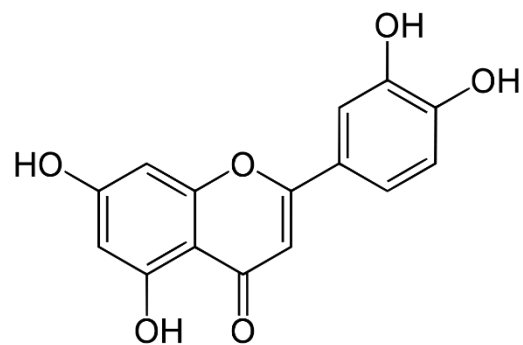
Apigenin



Naringenin



Cyanidin



Luteolin

Figure 1. Molecular structure of the tested flavonoids.

sample assayed. Counting was performed on 10 seconds and the results were expressed in relative light units (RLU) and normalized by mg of proteins.

The remaining 2 μ l samples were assayed for proteins by adding 150 μ l of Bio-Rad reagent 1X Protein Assay (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). The mix was incubated for 5 min in the dark. The optical density (OD) is measured at 595 nm with the Microplate Spectrophotometer MultiskanGO (Thermo Scientific, Vantaa, Finland)

Quantitative real-time PCR

Cells were seeded in 12-well plates (1.5x10⁵ cells / well; Dutscher) in complete medium. The next day, cells were weaned into serum free DMEM for ten hours and then treated seventeen hours with the various ligands or vehicle in the medium without serum. Total RNA extraction was performed using TRizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as indicated by the manufacturer and reverse transcribed with hexanucleotide primers (Random primers, Promega) using 200 units of reverse transcriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Promega), 2.5 mM dNTPs (Promega) and recombinant RNAsin (Promega) in buffer M-MLV-RT (Promega). The cDNAs obtained were diluted 1:40 in sterile water for PCR analysis. Reactions were performed in a volume of 15 μ l containing 40 ng of cDNA, 7.5 pmol of each primer and 7.5 μ l of MESA Green PCR (Mastermix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France).

Molecular docking

Assay of the capability of some flavonoids to bind LXR α or β was performed using molecular docking through Autodock Vina (Trott et Olson 2010) (version 1.5.6). All flavonoid molecules were retrieved from Pubchem database and saved as pdbqt files. The three-dimensional structure of LXR α (PDB ID:3IPQ; (Fradera et al. 2010) and LXR β (PDB ID:1PQ6; (Färnegårdh et al. 2003) was obtained from Protein Data Bank (Berman et al. 2000) and its pdbqt file was prepared removing water molecules, all ligands included in the crystal and considering polar hydrogen atoms. Then, the

docking grid box was created around the oxysterols-binding site with a size of 30x30x30 Å. Theoretical hydrogens bound are calculated thanks to PyMOL software (Python Molecular Graphics – version 2.1.1). LXR crystallographic files retrieved were complexed with the agonist LXR ligand GW3965. Molecular re-docking of GW3965 in LXR α and LXR β gave the same result as previous publications (Fradera et al. 2010; Färnegårdh et al. 2003) validating the method. Predicted binding affinities were expressed throughout as equilibrium dissociation constants, resulting from the equation:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{Flavonoid}} - \Delta G_{\text{GW3965}} = RT \ln \left(\frac{K_d^{\text{Flavonoid}}}{K_d^{\text{GW3965}}} \right)$$

$$K_d^{\text{Flavonoid}} = \left(e^{\frac{(\Delta G^{\text{Flavonoid}} - \Delta G^{\text{GW3965}})}{RT}} \right) K_d^{\text{GW3965}}$$

In these equations, K_d^{GW3965} has a value of 14nM and 22nM for LXR α et β respectively; ΔG^{GW3965} has a value of 11.9kcal/mol and 12.3kcal/mol for LXR α et β respectively (Mitro et al. 2007); $R = 8.314 \text{ J/mol/K}$ or $2.39 \times 10^{-4} \text{ kcal/mol/K}$ and $T = 298.15$. All models and images were rendered using PyMOL software (Python Molecular Graphics – version 2.1.1).

Results

UAS-Gal4 system discriminates transcriptional activity of 4 flavonoids Quercetin (QUE), Apigenin (API), Galangin (GAL) and Naringenin (NAR) on LXR α / β -LBD.

Some flavonoids were selected based on their quantity and bioactivity in algerian propolis. Hence Quercetin (QUE; (Wided, Hassiba, et Mesbah 2014), Apigenin (API ; (Segueni et al. 2016)), Galangin (GAL; (Benguedouar et al. 2015) and Naringenin (NAR; (Mesbah et Samia 2011) are assayed. To test whether these selected flavonoids could bind LXR α or LXR β and eventually affect their transcriptional activities, Gal4-chimeric receptor assay was used. Because luciferase is activated only by the Gal4-chimera receptor, the potentially confounding effects of endogenous

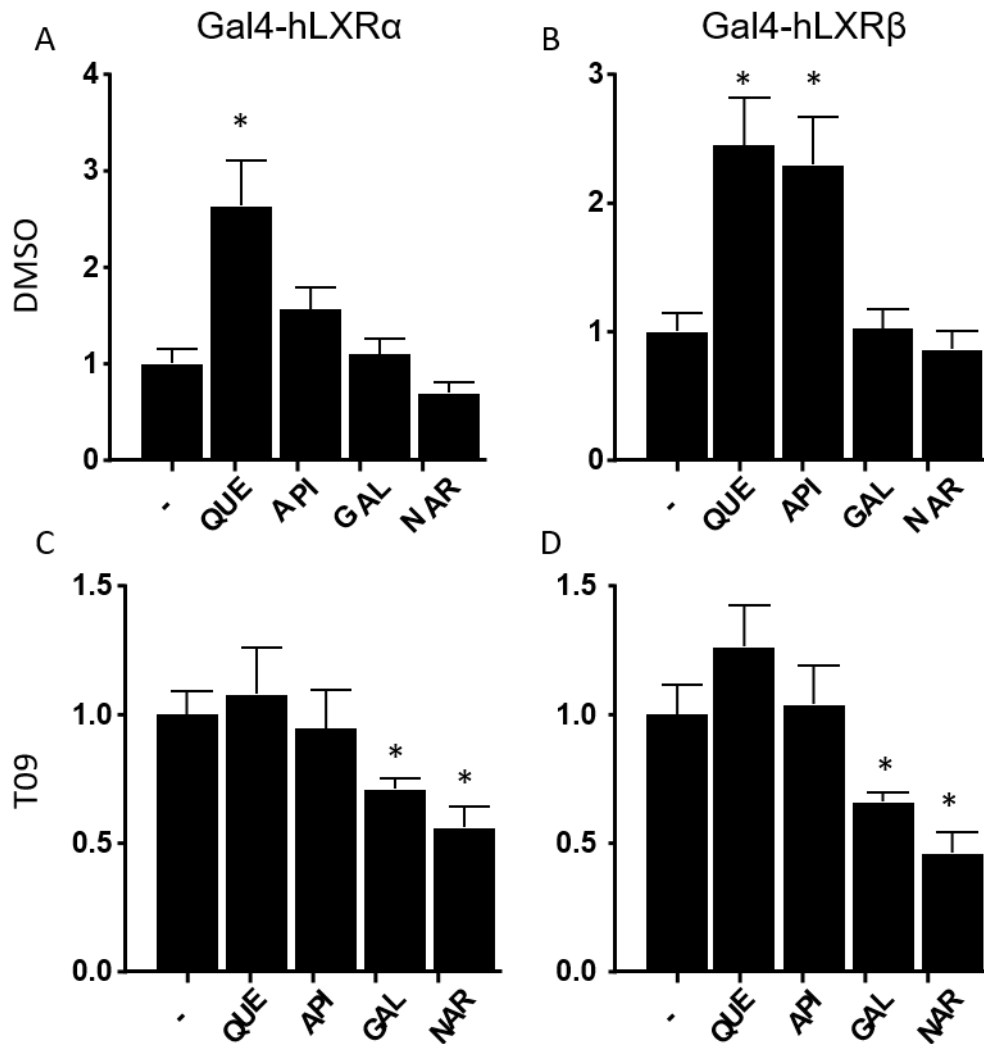


Figure 2. Effect of flavonoids on luciferase activity regulated by LXRs. HeLa cells were co-transfected with Gal4-hLXR α -LBD (A and C) or Gal4-hLXR β -LBD (B and D) and UAS-Luc reporter vector, for 24h. Then cells were treated 24h with various flavonoids (10-5M) with (C and D) or without (A and B) T0901317 (T09; 10-7M). Luciferase levels were normalized to total proteins. Graphs represent luciferase induction between T09 induced and basal condition. Histograms are normalized to 1 for the DMSO (A and B) or T0901317 (C and D) condition without the flavonoids. Mean \pm SEM of three independent experiments performed in octuplicate. According to the t-test: * $p < 0.05$ relative to T09/DMSO ratio condition. QUE, Quercetin; API, Apigenin; GAL, Galangin; NAR, Naringenin.

receptors have been eliminated. Effects were analyzed in basal condition, i.e. without the canonical ligand T0901317 (compared to DMSO control set to 1) to check whether these compounds could have an agonistic activity with the LXRs. The luciferase activity was also measured in activated condition, i.e. in presence of 10⁻⁷M T0901317 (compared to T0901317 control set to 1), to identify any antagonistic activity of the tested compounds (Figure 2).

When used alone at 10⁻⁵M, QUE exhibits similar agonistic activities on hLXR α -LBD when compared to control (DMSO) condition (2.6-fold induction; $p = 0.028$) and hLXR β -LBD (2.5-fold induction; $p = 0.022$). API shows an agonistic activity only with hLXR β -LBD (2.3-fold induction; $p = 0.030$ respectively).

Interestingly, GAL significantly inhibits luciferase activity induced by 10⁻⁷M T0901317 on hLXR α -LBD and hLXR β -LBD (71%; $p = 0.039$ and 66%; $p = 0.045$ respectively). Similarly, NAR an already described natural antagonist, also significantly inhibits T0901317-induced luciferase activity on hLXR α -LBD and hLXR β -LBD (56%; $p = 0.020$ and 60%; $p = 0.017$ respectively).

In human cell culture, flavonoids affect accumulation of LXR target genes

In order to evaluate flavonoids effects on accumulation of LXR target mRNAs, HeLa cells were treated with QUE, API, GAL and NAR at 10⁻⁵M in addition or not of 10⁻⁷M T0901317. Accumulation of bona fide target mRNA were measured. DMSO treatment had basally no effect and was set to 1 (Figure 3).

As expected from previous experiments, QUE and API got an agonistic activity on the expression of ABCA1 LXR target gene (4.3-fold induction, $p = 0.014$; 3.2-fold induction, $p = 0.016$, respectively). As expected from the previous luciferase assays, GAL and NAR have an antagonistic activity when used in co-treatment with T0901317 (51%; $p = 0.013$ and 57%; $p = 0.024$ respectively). Unexpectedly, sreb1c transcript did not show any significant variation induced by the compounds in combination or not with T0901317. Conversely, FASN transcript accumulation was higher after the basal

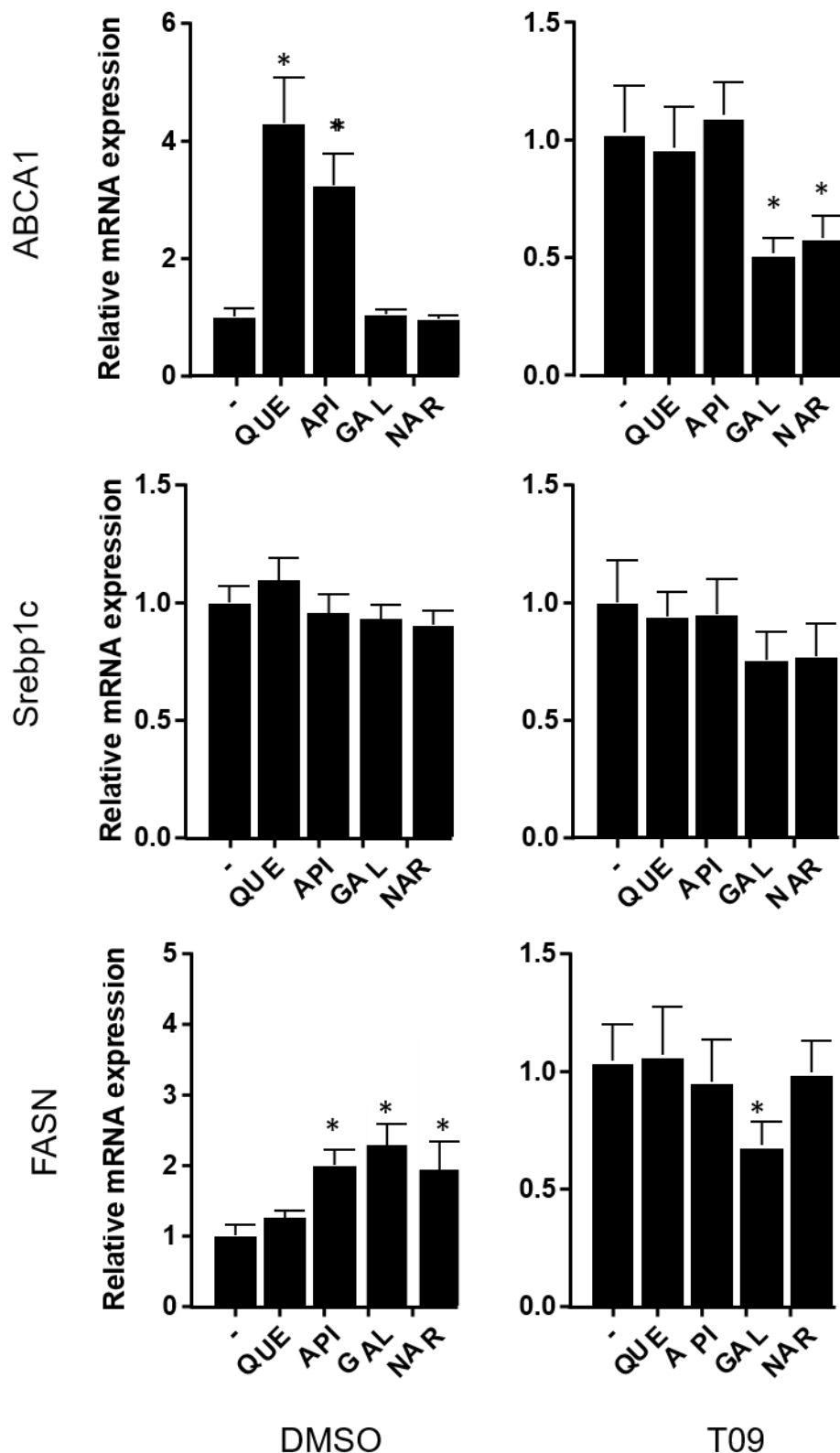


Figure 3. Activity of Flavonoids on mRNA accumulation of LXRs targets genes. HeLa cells were incubated with vehicle (DMSO 1/1000), T0901317 (T09; 10^{-7} M), and/or flavonoids 10^{-5} M. Seventeen hours later, HeLa cells were harvested, total RNA extracted and RT-qPCR performed. Accumulation levels were normalized to actin. Graphs represent the relative levels of mRNA accumulation ratio between T09 induced and basal condition. Histograms are normalized to the T09/DMSO ratio condition. Mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. According to the t-test: *** $p < 0.005$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ relative to T09/DMSO ratio condition. QUE, Quercetin; API, Apigenin; GAL, Galangin; NAR, Naringenin.

treatment with API, GAL and NAR (2.0-, $p = 0.023$, 2.2-, $p = 0.020$; 1.9-fold induction; $p = 0.050$ respectively).

Molecular docking of flavonoids ligand behavior shows specific amino-acid pattern interaction

PDB file of hLXR α -LBD (3IPQ) hLXR β -LBD (1PQ6) were retrieved and Autodock Vina was used for docking and PyMOL for visualization (Tableau 1). Cyanidin (CYA) was added as control of agonistic activity (Figure 4, Table 1 ; Jia et al. 2013) and luteolin as control of antagonistic activity (Figure 5 ; Francisco et al. 2016). As already described for other LXRs ligands or other nuclear receptors (for a review see(Jin et Li 2010), ligand stabilization of the flavonoids in the binding pocket mainly passes through hydrophobic interactions. Hydrogen bound are however also observed. A summary of the various amino-acid that are recruited by the ligands and their hydrogen bounds within ligand-binding pockets are reported in Table 1. ΔG energy was also calculated and used to measure the theoretical constant of dissociation (Kd).

The agonist CYA fits in both ligand-binding pocket of hLXR α and hLXR β . Its position in the pocket differs from one isoform to the other in upside-down manner, affecting establishment of hydrogen bound. In both cases T302/316 (hLXR α /hLXR β) is recruited. M298 is implicated in the α isoform while L274 and R305 are required in the β isoform. The known antagonist LUT is able to locate in both ligand-binding pockets of hLXR α / β and its position is roughly conserved. Indeed, in both receptors F257/271 (hLXR α /hLXR β) is recruited. E267 and R305 is implicated in the α isoform while S278 are required in the β isoform.

Regarding the new tested agonists, QUE also able to fit within both ligand-binding pockets in similar position with slight rotation of C ring. It binds to M298/312 and T302/316 on both isoform. A a bond is formed with L260 in hLXR α while this bound is done with S242 in hLXR β . API inserts both LXRs LBD and varying by a strong

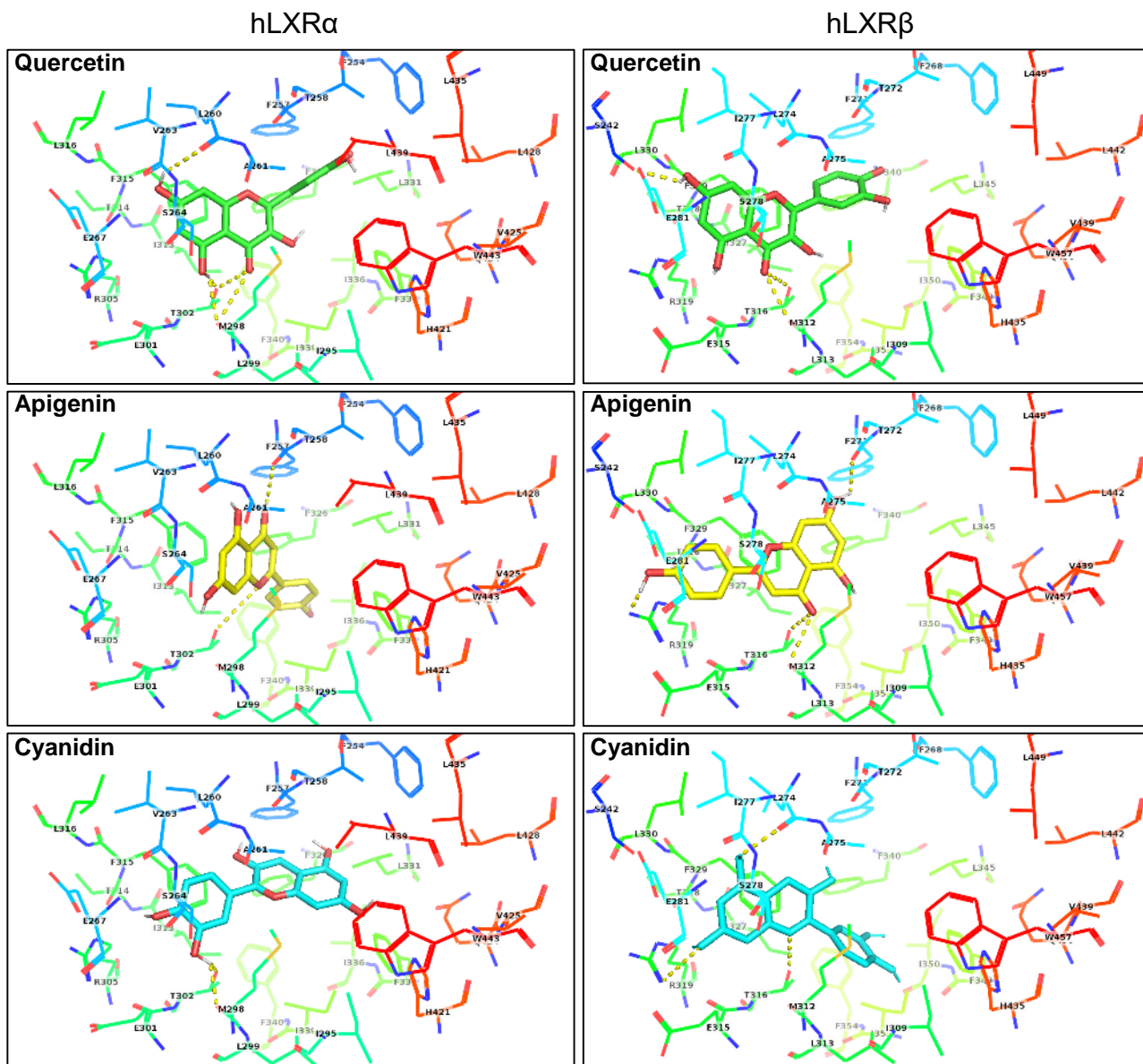


Figure 4. Three-dimensional representation of agonist flavonoids in LXR α or LXR β ligand-binding pocket. The ligand binding pockets (hLXR α , left side ; hLXR β , right side) are represented in line style. Ligands are presented in stick style with quercetin in the upper panel, apigenin in the middle panel and cyanidine in the down panel. Theoretical H-bonds are represented with yellow dotted line and are summarized in Table1.

rotation on horizontal axis. Both hLXRs establish interactions with T302/316 from the 2 isoforms and form specific bound on F257 of hLXR α or M298 of hLXR β .

For the antagonists, GAL is restricted to the entrance of the hLXR α ligand-binding pocket, while NAR is more deeply inserted in the hLXR β ligand-binding pocket. In both case, GAL does not make any hydrogen bond with the amino acids. NAR follows a similar conformation as GAL. Indeed, it fits superficially in both ligand binding pockets and establishes only few H-bonds such as F257/271 in both isoforms.

ΔG of each complex, which allows to determine the thermodynamic potential that is minimized when a system reaches a chemical equilibrium, is calculated by the software and is presented in table 1. The two three dimensional structures of LXRs (3IPQ and 1PQ6) are originally bound to GW3965. Since we could calculate ΔG and retrieve K_d (see methods) of this compound, it become possible to establish K_d prediction. Results are presented in Table 1. We observed, for API, QUE, NAR and GAL, K_d calculated (from micromolar range) are in accordance with activity assayed through gal4 system (Figure 1).

Discussion

Similarity between steroids and flavonoids have already been remarked. So far, studies on structure-activity have not established a clear link (Miksicek 1995; Zand et al. 2000). These similarities let hypothesize on the ability of flavonoids to bind steroid receptor. Data obtain through double hybrid experiments (Figure 2) confirm this hypothesis for both LXR. Even if these flavonoids have a very high similarity among them, little change on hydroxyl group position can perform a switch between an agonist and an antagonist profile. For example, removal of in third node of the C-ring is able to transform the agonistic activity of Quercetin to the antagonistic activity of Luteolin. The same modification can be observed by pushing back the B ring of the agonist Apigenin to transform it to the antagonist naringenin. Available LXR antagonists are scarcer than agonist (Huang 2014) mainly due to the fact that pharmaceutical companies have been more interested in the development of LXR activating molecules. Our experiments

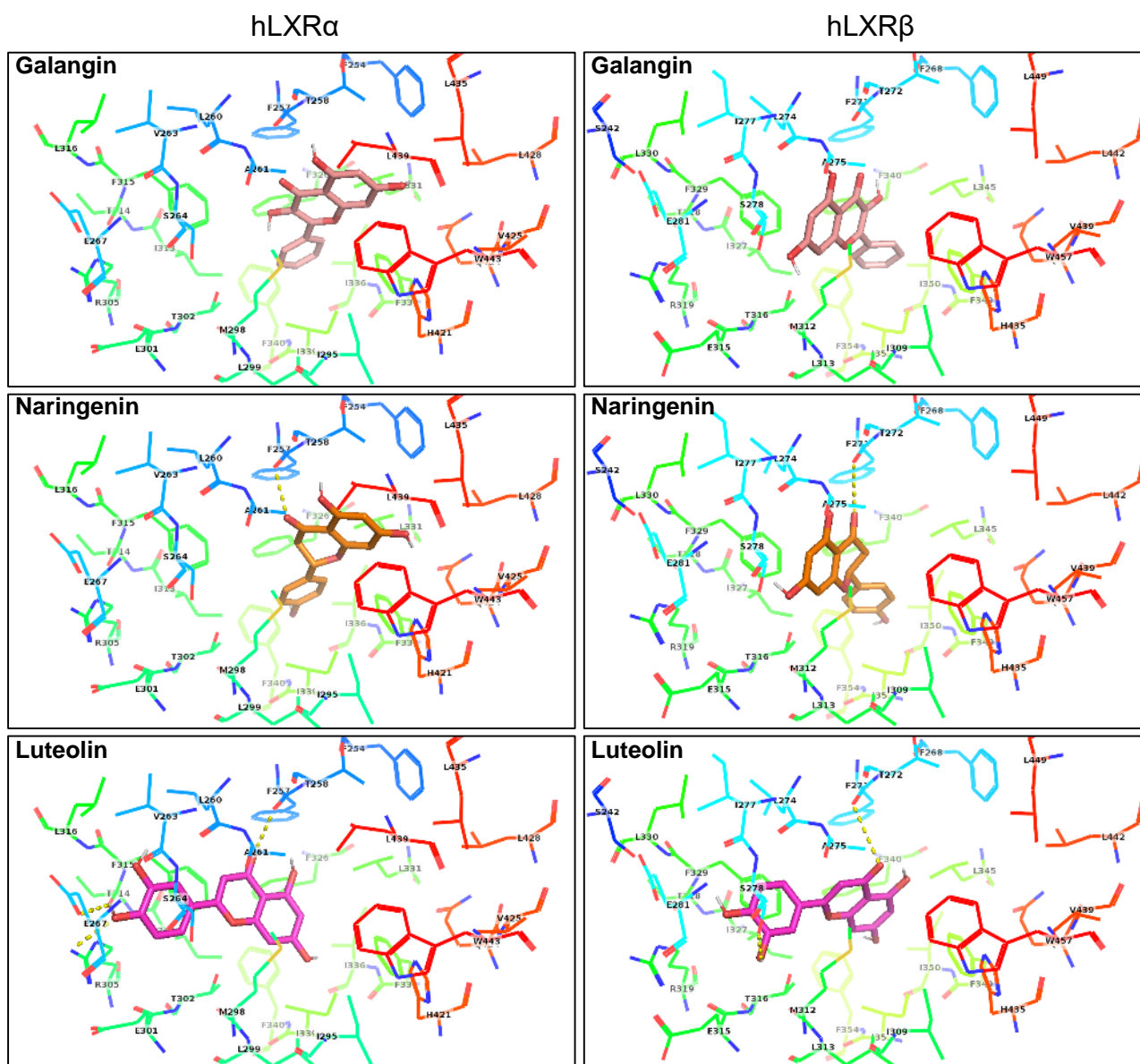


Figure 5. Three-dimensional representation of agonists flavonoids in LXR α or LXR β ligand-binding pocket. The ligand binding pockets (hLXR α , left side ; hLXR β , right side) are represented in line style. Ligands are presented in stick style with galangin (upper panel), naringenin (middle panel), luteolin (down panel). Theoretical H-bonds are represented with yellow dotted line and are summarized in Table1.

show that naringenin and galangin present an antagonistic profile in response to T0901317 treatment. The absence of effect on these molecule on basal condition suggest that the antagonistic power rely on competition with agonist to occupy the LXR pocket. Altogether, it seems that hydroxyl radicals at position 5, 7 and 4' (figure 6) are necessary to allow the molecule entering deeply in the ligand-binding pocket. Indeed, the lack of -OH at position 4' makes NAR to stay weakly fit in the pocket. Interestingly this "minimal" structure (API) allows the activation of hLXR α . Comparing API, which only activates hLXR α in our model, and QUE, which activates hLXR α and hLXR β , it could be hypothesized that hydroxyl groups in 3 and 3' positions discriminate the specificity. LXR α/β ligand binding pockets are quite wide and form a cylinder of 17Å long with a volume of 700-800Å³ for an average ligand volume of 300Å³. Moreover, these hydrophobic pocket are known to have a good mobility (Färnegårdh et al. 2003). Consequently, flavonoids with their 300-400Å³ could fit in the pocket and be stabilized through hydrophobic interaction. Nature of interaction between ligand and receptor in the ligand binding pocket are still poorly understood. However, hydrophobic bound are supposed to play a huge role in ligand stabilization but not in receptor modification (Patil et al. 2010). These hydrogen bound are believed to take that function (D. Chen et al. 2016). In the Table 1 are summarized hydrogen bound established between ligand and receptor. Among these amino-acid, T302/316 (hLXR α /hLXR β) seems to play a critical role in the expression of an agonistic activity. Conversely, F257/271 (hLXR α /hLXR β) is implicated in both naringenin and luteolin antagonism. Here, galangin antagonistic power seem to only rely on ligand binding pocket occupancy.

Beside the two-hybrid system screening and the molecular modeling analysis, we analyzed the impacts of flavonoids in cell culture on LXR-target genes involved in lipid homeostasis. The results partially correlate the previous analyses. Indeed, API and QUE increase the accumulation of Abca1, while they do not modify the levels of the T0901317 induction. Likewise, Abca1 accumulation is significantly reduced when T0901317 is incubated with GAL and NAR, demonstrating their antagonistic activity ex vivo. Concerning genes implicated in lipogenesis such as Srebp1c and Fasn, encoding the sterol-response element binding protein 1 and the fatty acid synthase respectively, results are less clear. While Srebp1c accumulation if modified by none of the

Table 1 : Theoretical hydrogen bond formed between flavonoids and LBD amino-acids

Residues		Quercetin		Apigenin		Cyanidin		Galangin		Naringenin		Luteolin	
hLXR α	hLXR β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
-	S242		X										
F257	F271			X						X	X	X	X
L260	L274	X					X						
S264	S278											X	
E267	E281										X		
M298	M312	X	X		X	X							
T302	T316	X	X	X	X	X	X						
R305	R319						X					X	
ΔG° (kcal/mol)		-8.5	-9.2	-9.0	-9.2	-8.6	-8.6	-8.5	-9.2	-8.9	-9.2	-9.1	-9.0
Kd (mM)		4.36	4.13	1.88	4.13	3.68	11.37	4.36	4.13	2.22	4.13	1.58	5.79

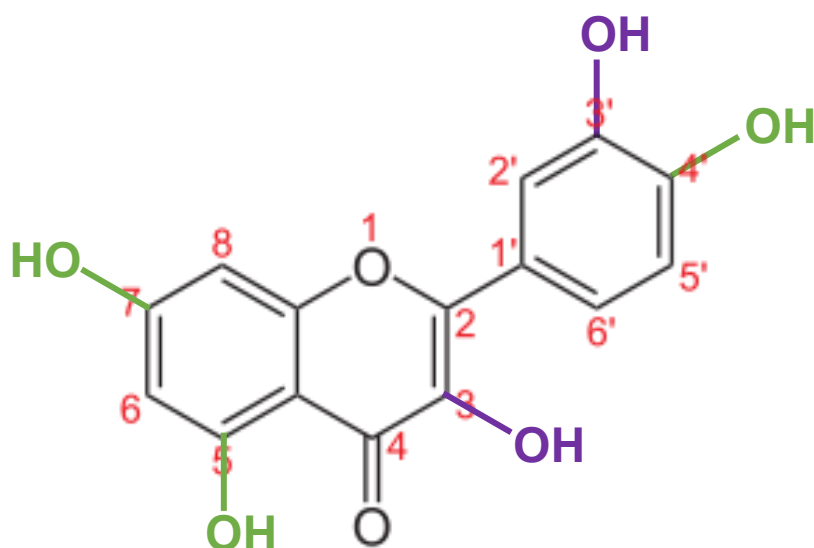


Figure 6. Chemical structures of hLXR α / β flavonoids. The specific backbone of flavonoids is represented in black. Numbering of the carbon is indicated in red. The hydroxyl groups (-OH) necessary for the molecule to adequately fit the ligand-binding pocket are drawn in green. The specific -OH groups necessary for hLXR β vs. hLXR α activation are depicted in purple.

flavonoids, Fasn amount is increased by API and not QUE, suggesting that in these cells, this gene is mainly targeted LXR α and not LXR β . Paradoxically, GAL and NAR basally increase the levels of Fasn while NAR acts as an antagonist in presence of T0901317. These kind of profile were already observed for luteolin (Francisco et al. 2016) or other flavonoids (Y. Hu et al. 2013). As these experiments were performed in cell culture, it cannot be excluded that other metabolic pathways are targeted, which modify indirectly Fasn expression. If this is shown in animal models, flavonoids could thus be considered as new good candidate for the development of specific agonist with hypocholesterolemic properties together with less lipogenic effect, as shown for other synthetic LXRs ligands (J. J. Repa et al. 2000; Joseph, McKilligin, et al. 2002).

In conclusion, our data point out that flavonoids contain numerous putative LXR ligands. These compound are present in great quantities in propolis and in various proportion depending on geographical harvesting (Zabaiou et al. 2017). Propolis could thus have various effects on LXRs pathways and could be a cheap and easily accessible source of molecules, targeting LXR pathways and usable in various diseases (Viennois et al. 2012).

Acknowledgements

We are grateful to the lab members of Baron & Lobaccaro's lab for their helpful scientific discussion.

Funding

This study was supported by Fond Européen de Développement Régional (FEDER), Plan National de Recherche sur les Perturbateurs Endocriniens (13-MRES-PNRPE-1-CVS043), Projet Hubert Curien Tassili 16-MDU-956 and Plan-Cancer 2017 (JMAL), Région Auvergne (SB) and Contrat Nouveau-Chercheur Région Auvergne (AT). AF is recipient of a doctoral grant from Région Auvergne-Rhône Alpes; NZ, is recipient of a grant from Projet Hubert Curien (PHC) Tassili 16-MDU-956 and PROFAS-B from the French Embassy in Algeria. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Reference

- Benguedouar, L., M. Lahouel, S. Gangloff, A. Durlach, F. Grange, P. Bernard, et F. Antonicelli. 2015. « Algerian ethanolic extract of Propolis and galangin decreased melanoma tumour progression in C57BL6 mice ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 33e Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), 142 (6, Supplement 1): S294. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2015.04.053>.
- Berman, Helen M., John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, et Philip E. Bourne. 2000. « The Protein Data Bank ». *Nucleic Acids Research* 28 (1): 235-42. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- Cao, Guoqing, Yu Liang, Carol L. Broderick, Brian A. Oldham, Thomas P. Beyer, Robert J. Schmidt, Youyan Zhang, et al. 2003. « Antidiabetic Action of a Liver x Receptor Agonist Mediated by Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2): 1131-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210208200>.
- Chen, Deliang, Numan Oezguen, Petri Urvil, Colin Ferguson, Sara M. Dann, et Tor C. Savidge. 2016. « Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing ». *Science Advances* 2 (3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>.
- Färnegårdh, Mathias, Tomas Bonn, Sherry Sun, Jan Ljunggren, Harri Ahola, Anna Wilhelmsson, Jan-Ake Gustafsson, et Mats Carlquist. 2003. « The Three-Dimensional Structure of the Liver X Receptor Beta Reveals a Flexible Ligand-Binding Pocket That Can Accommodate Fundamentally Different Ligands ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (40): 38821-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304842200>.
- Fradera, Xavier, Diep Vu, Olaf Nimz, Robert Skene, David Hosfield, Robert Wynands, Andrew J. Cooke, et al. 2010. « X-Ray Structures of the LXRA α LBD in Its Homodimeric Form and Implications for Heterodimer Signaling ». *Journal of Molecular Biology* 399 (1): 120-32. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.005>.
- Francisco, Vera, Artur Figueirinha, Gustavo Costa, Joana Liberal, Isabel Ferreira, Maria C. Lopes, Carmen García-Rodríguez, Maria T. Cruz, et Maria T. Batista. 2016. « The Flavone Luteolin Inhibits Liver X Receptor Activation ». *Journal of Natural Products* 79 (5): 1423-28. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00146>.
- Ghisalberti, E. L. 1979. « Propolis: A Review ». *Bee World* 60 (2): 59-84. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>.
- Hu, Yun, Yaqi Yang, Yanjun Yu, Gesi Wen, Nana Shang, Wei Zhuang, Dihan Lu, et al. 2013. « Synthesis and Identification of New Flavonoids Targeting Liver X Receptor β Involved Pathway as Potential Facilitators of A β Clearance with Reduced Lipid Accumulation ». *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (15): 6033-53. <https://doi.org/10.1021/jm301913k>.
- Huang, Cheng. 2014. « Natural Modulators of Liver X Receptors ». *Journal of Integrative Medicine* 12 (2): 76-85. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60013-3](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60013-3).
- Janowski, B. A., P. J. Willy, T. R. Devi, J. R. Falck, et D. J. Mangelsdorf. 1996. « An Oxysterol Signalling Pathway Mediated by the Nuclear Receptor LXR Alpha ». *Nature* 383 (6602): 728-31. <https://doi.org/10.1038/383728a0>.

Jia, Yaoyao, Minh Hien Hoang, Hee-Jin Jun, Ji Hae Lee, et Sung-Joon Lee. 2013. « Cyanidin, a Natural Flavonoid, Is an Agonistic Ligand for Liver X Receptor Alpha and Beta and Reduces Cellular Lipid Accumulation in Macrophages and Hepatocytes ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (14): 4185-90. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.030>.

Jin, Lihua, et Yong Li. 2010. « Structural and functional insights into nuclear receptor signaling ». *Advanced drug delivery reviews* 62 (13): 1218-26. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.007>.

Joseph, Sean B., Elaine McKilligin, Liming Pei, Michael A. Watson, Alan R. Collins, Bryan A. Laffitte, Mingyi Chen, et al. 2002. « Synthetic LXR Ligand Inhibits the Development of Atherosclerosis in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11): 7604-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.112059299>.

Kaneko, Emi, Morihiro Matsuda, Yukio Yamada, Yoji Tachibana, Ichihiro Shimomura, et Makoto Makishima. 2003. « Induction of Intestinal ATP-Binding Cassette Transporters by a Phytosterol-Derived Liver X Receptor Agonist ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36091-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304153200>.

Kujumgiev, A, I Tsvetkova, Yu Serkedjieva, V Bankova, R Christov, et S Popov. 1999. « Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin ». *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3): 235-40. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7).

Maqdasy, Salwan, Amalia Trousson, Igor Tauveron, David H. Volle, Silvère Baron, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2016. « Once and for All, LXR α and LXR β Are Gatekeepers of the Endocrine System ». *Molecular Aspects of Medicine* 49: 31-46. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.001>.

Mesbah, L., et A. Samia. 2011. « Bioavailability and Pharmacokinetic of the Algerian Propolis Constituent Naringenin in Rats after Oral Administration ». *Planta Medica* 77 (12): PA11. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1282207>.

Miksicek, Richard J. 1995. « Estrogenic Flavonoids: Structural Requirements for Biological Activity ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208 (1): 44-50. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43830>.

Mitro, Nico, Puiying A. Mak, Leo Vargas, Cristina Godio, Eric Hampton, Valentina Molteni, Andreas Kreuzsch, et Enrique Saez. 2007. « The Nuclear Receptor LXR Is a Glucose Sensor ». *Nature* 445 (7124): 219-23. <https://doi.org/10.1038/nature05449>.

Nieva Moreno, M. I., M. I. Isla, N. G. Cudmani, M. A. Vattuone, et A. R. Sampietro. 1999. « Screening of Antibacterial Activity of Amaicha Del Valle (Tucumán, Argentina) Propolis ». *Journal of Ethnopharmacology* 68 (1-3): 97-102.

Patil, Rohan, Suranjana Das, Ashley Stanley, Lumbani Yadav, Akulapalli Sudhakar, et Ashok K. Varma. 2010. « Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing ». *PLoS ONE* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>.

Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein, et D. J. Mangelsdorf. 2000. « Regulation of Mouse Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Gene (SREBP-1c) by Oxysterol Receptors, LXRA and LXRbeta ». *Genes & Development* 14 (22): 2819-30.

Segueni, Narimane, Amar Zellagui, Fairouz Moussaoui, Mesbah Lahouel, et Salah Rhouati. 2016. « Flavonoids from Algerian propolis ». *Arabian Journal of Chemistry* 9 (septembre): S425-28. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.05.013>.

Tangirala, Rajendra K., Eric D. Bischoff, Sean B. Joseph, Brandee L. Wagner, Robert Walczak, Bryan A. Laffitte, Chris L. Daige, et al. 2002. « Identification of Macrophage Liver X Receptors as Inhibitors of Atherosclerosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11896-901. <https://doi.org/10.1073/pnas.182199799>.

Trott, Oleg, et Arthur J. Olson. 2010. « AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading ». *Journal of computational chemistry* 31 (2): 455-61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

Viennois, Emilie, Kevin Mouzat, Julie Dufour, Laurent Morel, Jean-Marc Lobaccaro, et Silvère Baron. 2012. « Selective Liver X Receptor Modulators (SLiMs): What Use in Human Health? ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (2): 129-41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.036>.

Wided, Kbsa, Rouibah Hassiba, et Lahouel Mesbah. 2014. « Polyphenolic Fraction of Algerian Propolis Reverses Doxorubicin Induced Oxidative Stress in Liver Cells and Mitochondria ». *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 27 (6): 1891-97.

Willy, P. J., K. Umesono, E. S. Ong, R. M. Evans, R. A. Heyman, et D. J. Mangelsdorf. 1995. « LXR, a Nuclear Receptor That Defines a Distinct Retinoid Response Pathway ». *Genes & Development* 9 (9): 1033-45.

Zabaiou, Nada, Allan Fouache, Amalia Trousson, Silvère Baron, Amar Zellagui, Mesbah Lahouel, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2017. « Biological Properties of Propolis Extracts: Something New from an Ancient Product ». *Chemistry and Physics of Lipids* 207 (Pt B): 214-22. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>.

Zand, Rachel S. Rosenberg, David J.A. Jenkins, et Eleftherios P. Diamandis. 2000. « Steroid Hormone Activity of Flavonoids and Related Compounds ». *Breast Cancer Research and Treatment* 62 (1): 35-49. <https://doi.org/10.1023/A:1006422302173>.

1.2. Résultats complémentaires

1.2.1. Les flavonoïdes modifient l'expression des gènes cibles des LXRs de façon différentes

Dans le cadre de l'étude de l'impact des flavonoïdes sur les voies LXRs, nous avons réalisé une analyse de l'accumulation des gènes cibles des LXRs. On remarque que même si en système UAS-Gal4 des comportements agonistes/antagonistes sont similaires entre deux flavonoïdes, l'effet sur les gènes cibles n'est pas nécessairement le même. Par exemple, l'apigénine et la quercétine montrant des activités agonistes en système UAS-Gal4 (figure 1 de l'article) n'ont pas les mêmes effets sur le gène cible FASN (figure 2 de l'article).

Comme discuté dans l'article, ce phénomène peut s'expliquer par l'action du flavonoïde sur d'autres voies de signalisations qui ne dépendent pas des LXRs. De plus, plusieurs études tendent à montrer que deux ligands agonistes (ou antagonistes) ne génèrent pas le même profil au niveau des gènes cibles. Dans le cas des LXRs, il est possible d'exploiter les résultats de RNAseq disponibles. Ainsi, en étudiant le GW3965 et le T0901317, deux agonistes très documentés des LXRs, on remarque que les cellules traitées par ces deux molécules n'ont pas les mêmes profils d'expression géniques (Vedin et al. 2009; Rébé et al. 2009; Savic et al. 2016).

Une explication possible est que les interactions des molécules avec le LBD des LXRs soient subtilement différentes et induisent un placement différent de l'hélice H12, et donc un recrutement différent d'un même coactivateur. Plusieurs complexes récepteurs-ligands obtenus par cristallographie aux rayons X pour le GW3965 et le T0901317 dans le LBD des LXRs sont disponibles. En alignant les deux complexes, nous avons pu montrer l'existence de légères différences dans le positionnement de l'hélice H12 (PDBe : 4DK7 et 1PQ6 ; Figure 28). Ainsi, même si les hélices H1 à H10 s'alignent-elles quasi-parfaitement, on remarque que les plus grandes différences commencent à l'extrémité C-terminale de H11 provoquant le pivotement de H12

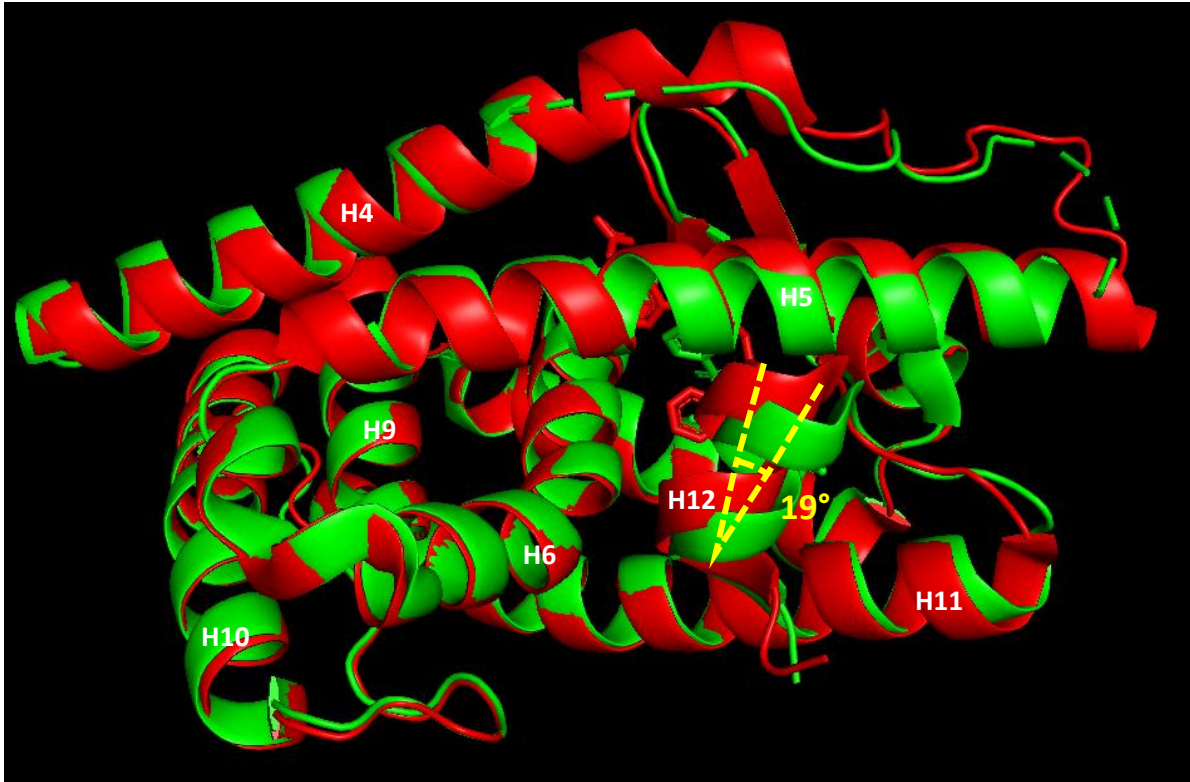


Figure 28 : Alignement structural de 2 complexes LXR β -T0901317 et LXR β -GW3965

Les hélices sont nommées par un « H » suivie du numéro de l'hélice de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les structures cristallographiques sont issues de la « *Protein Data Bank europe* » (PDBe; codes 4DK7 et 1PQ6). Cette image a été générée sur PyMOL.

d'environ 19°. Ceci a pour conséquence de modifier la surface d'interaction du complexe récepteur-ligand avec les corégulateurs et donc de faire varier leurs affinités.

Pour étayer cette théorie, des tests en double hybride ont été réalisés en cellule HeLa permettant d'apprécier la capacité du T0901317 et du GW3965 à recruter différents corégulateurs (Figure 29). On observe que le T0901317 entraîne le recrutement des coactivateurs (SRC-1 et DRIP205) et le relargage des corépresseurs (NCoR et SMRT) sur le LBD des LXRs. En revanche, même si le GW3965 est capable d'engendrer le recrutement de coactivateurs, il n'affecte pas la liaison avec les corépresseurs. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature (Albers et al. 2006). L'exemple illustré par les cas du T0901317 et du GW3965 montre que la liaison d'une molécule à son récepteur entraîne un positionnement particulier de l'hélice H12 ainsi qu'un profil de recrutement des corégulateurs propres ce qui pourrait expliquer les différences d'accumulations des ARNm observés dans la figure 3 de l'article.

1.2.2. La liaison et l'action des flavonoïdes sur le LBD des LXRs

Comme présenté dans la figure 5 de l'article, différents acides aminés ont pu être identifiés dans la liaison et l'action des flavonoïdes. Compte tenu de la petite taille de ces flavonoïdes (220 Å³ à 256 Å³ vs. 332 Å³ pour le T0901317) et a flexibilité du LBD (Färnegårdh et al. 2003), plusieurs positionnements des molécules sont possibles dans la poche. Les orientations présentées sont les plus probables au regard des énergies de liaison calculées. Cette variabilité dans le positionnement du ligand dans le LBD des LXRs est appuyée par l'étude différentielle de deux cristallographies au rayon X obtenues sur LXRβ renfermant le T0901317 (PDE : 1UPV et 1PQ6). En observant la position du T0901317 dans la poche de liaison au ligand d'une expérience à une autre, on peut aisément observer des différences (Figure 30). Les flavonoïdes testés, avec une taille plus réduite, pourraient donc eux aussi adopter plusieurs conformations.

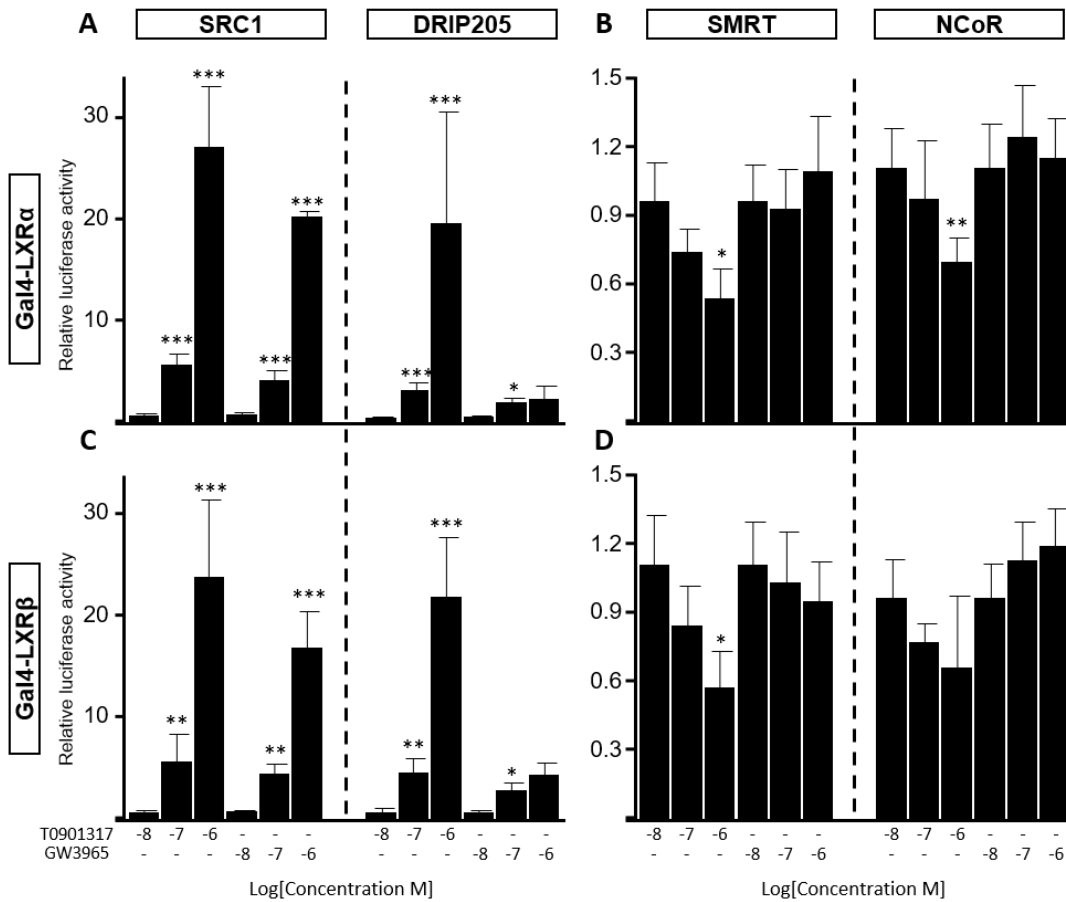


Figure 29 : Recrutement des corégulateurs induit par la liaison du T0901317 ou du GW3965 sur le LBD des LXRs

Des cellules HeLa ont été transfectées avec 3 plasmides : Gal4-LXRα (A et B) ou Gal4-LXRβ; SRC1/DRIP205-VP16 (coactivateurs; A et C) ou SMRT/NCoR-VP16 (corépresseurs; B et D); UAS-Luc. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été incubées pendant 24h avec les ligands agonistes T0901317 ou GW3965. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs obtenues sur 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des tests ANOVA *one-way* ont été réalisés avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,005$ par rapport à la condition 10^{-8} M correspondante.

Pour ce type d'analyse, une double approche de recherche des ligands est possible. D'abord, l'approche de *docking* présentée en figure 4 et 5 de l'article nous renseigne sur le positionnement général d'une famille de molécules (ici les flavonoïdes) dans la cavité. En effet, même si comme dit précédemment, le positionnement d'une molécule peut varier, ces changements sont assez faibles. Ces molécules se situent dans la même zone du LBD (entre les feuillets β et l'hélice H3).

Une deuxième approche, celle-ci basée sur le ligand, peut alors être entreprise. Lorsque l'on s'attarde sur le cas de la quercétine (agoniste) et de la lutéoline (antagoniste), on s'aperçoit que l'existence d'un groupement hydroxyle en position 3 du cycle C semble être cruciale dans l'action du ligand sur le récepteur. En effet, le *docking* montre que cet ajout de groupement hydroxyle provoque un basculement dans le même plan et à 180° de la molécule permettant l'interaction avec l'acide aminé T302/T316, un résidu suspecté d'être important dans l'activation du récepteur par les flavonoïdes dans cette étude (Tableau 1 de l'article).

Par souci de simplicité, seuls deux ligands flavonoïdes des LXRs déjà décrits sont présentés dans cet article. Cependant d'autres flavonoïdes ont été décrits comme ligands des LXRs ou du moins suspectés. Le *docking* de la morine, un antagoniste des LXRs *in vitro et in vivo* (Gu et al. 2017), est ainsi présenté en Figure 31. L'établissement de liaisons hydrogènes théoriques sur le résidu F257 dans LXR α (Figure 32) renforce l'hypothèse selon laquelle les effets antagonistes passent par l'établissement d'une liaison hydrogène avec F257/271 (Tableau 1). Sur l'isoforme LXR β , aucune liaison hydrogène théorique ne permet d'expliquer les effets antagonistes constatés. On peut imaginer que les effets antagonistes de la morine, comme pour la galangine (tableau 8), passent par l'encombrement de la poche de liaison au ligand, empêchant le récepteur d'être activé par un ligand agoniste.

L'étude d'un autre flavonoïde, la génistéine (Figure 31), a montré que cette molécule semble inhiber LXR α tout en activant LXR β (González-Granillo et al. 2012). L'analyse *in silico* de l'ancrage de la génistéine dans le LBD des LXRs montre en effet des modalités de liaison différentes dans la cavité (Figure 32). On remarque que la génistéine, comme d'autres ligands flavonoïdes (Tableau 8), établit des liaisons

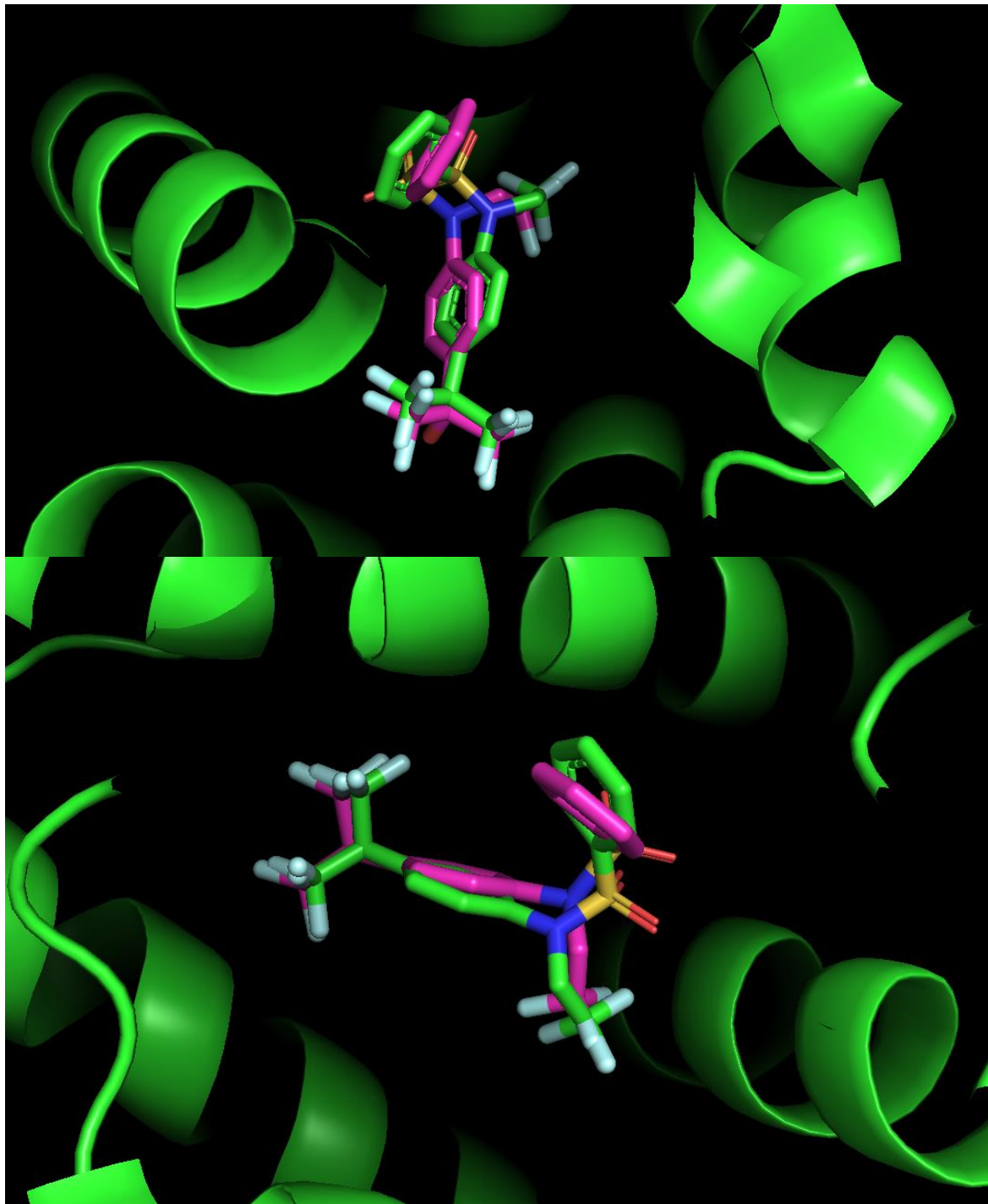


Figure 30 : Alignement structural de 2 complexes LXR β -T0901317

Les structures cristallographiques de 2 complexes LXR β -T0901317 sont issues de la « *Protein Data Bank europe* » (PDBe; codes 1UPV et 1PQC). Le positionnement du T0901317 de 1UPV est représenté en vert et celui de 1PQC en magenta. Ces images ont été générées sur PyMOL.

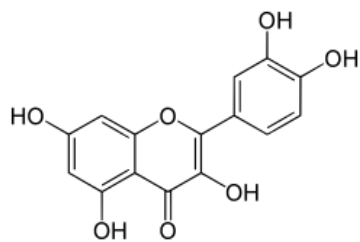
hydrogènes théoriques avec T316 de LXR β mais pas avec son équivalent T302 de LXR α .

Un autre flavonoïde caractérisé, l'hespérétine (Figure 31) que l'on retrouve sous forme d'oside dans les fruits du genre *Citrus*, présente une activité agoniste sur les LXR s (Iio et al. 2012). Comme pour d'autres agonistes flavonoïdes (apigénine, quercétine), l'hespérétine semble bel et bien se lier dans la poche des LXR s en interagissant avec T302/T316 par le biais de liaisons hydrogènes (Figure 32 ; Tableau 8).

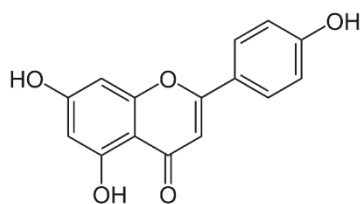
Même si de nombreux flavonoïdes présentent une activité sur les LXR s , l'analyse en système simple hybride UAS-Gal4 a permis d'identifier des molécules sans activité particulière. C'est le cas de la chysine et de la pinocembrine (Figure 31), deux flavonoïdes avec lesquelles aucune activité n'a pu être décelée jusqu'à une concentration de 10⁻⁵M. Les analyses de *docking* appuient ces résultats avec des valeurs d'énergie libre trop élevées ($\Delta G^\circ > -7.0$) pour permettre la prédiction d'un K d (Tableau 8).

1.3. Discussion complémentaire

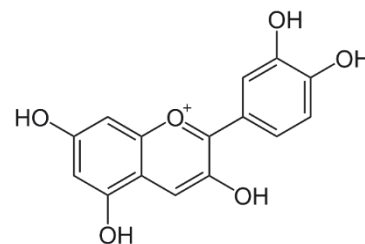
Comme présenté en introduction, la recherche préliminaire de ligands des LXR s *in silico* s'appuie sur deux approches, l'une basée sur le récepteur (cible). Les données précédentes tendent à montrer que le modèle de *docking* utilisé lors de ces études est fiable. Il permet d'appréhender les effets d'un flavonoïde en fonction de ses modalités de liaisons dans le LBD. De plus, les K d prédits sont en accord avec ce qui a été observé en système simple hybride ou dans la littérature (Figure 1 et Tableau 1 de l'article). L'analyse QSAR permettrait de dégager des relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur activité biologique. Plusieurs facteurs seraient alors à prendre en compte : le volume, la polarité, les axes de torsion ou l'hydrophobicité (Mekenyan 2002).



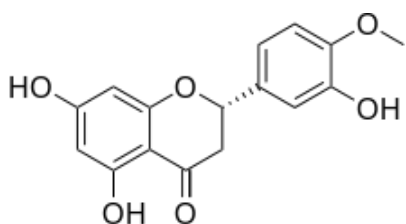
Quercétine



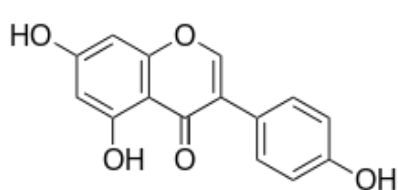
Apigénin



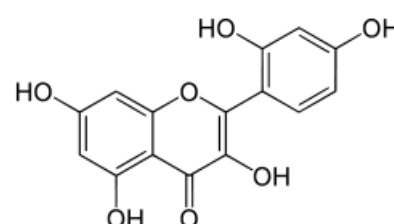
Cyanidine



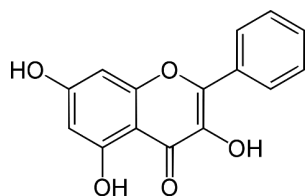
Hespérétine



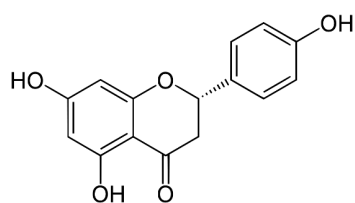
Génistéine



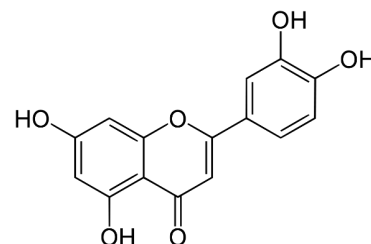
Morine



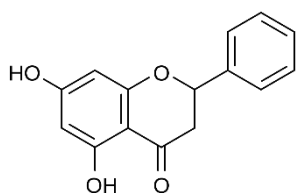
Galangine



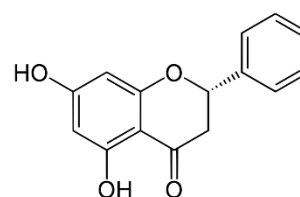
Naringénine



Lutéoline



Chrysin



Pinocembrine

Figure 31 : Représentations semi-développées des flavonoïdes utilisés dans l'étude

Les flavonoïdes ont déjà été considérés comme des bases moléculaires intéressantes dans la synthèse de nouveaux ligands. Dans le cadre de développement de médicaments pour la maladie d'Alzheimer, une base flavonoïde a été envisagée (Y. Hu et al. 2013). L'obtention d'un flavonoïde de synthèse présentant une activité activatrice sur ABCA1 similaire à celle du GW3965 est très encourageante. Cependant, la synthèse de telles molécules s'avère onéreuse alors que les flavonoïdes sont une vaste famille de molécules abondamment présente dans le monde végétal. Ainsi les végétaux sont-ils des sources intéressantes de flavonoïdes.

La propolis est un composé produit par les abeilles et utilisée par celles-ci pour ses propriétés physiques (construction de la ruche) et antibactérienne. La propolis est connue pour concentrer les flavonoïdes par les abeilles. De plus, la propolis brute est aisément récupérable, se conserve beaucoup plus longtemps (plusieurs mois à l'air libre) et plus facilement que les fruits et légumes. Cette préservation plus aisée est permise notamment grâce aux propriétés antifongiques et antibactériennes intrinsèques de la propolis (Zabaiou et al. 2017) ; Annexe 2). Cette longue période de préservation fait de la propolis un composé de choix en médecine alternative pour de nombreuses pathologies dont certaines reliées aux LXRs, qu'elles soient neurologiques (Farooqui et Farooqui 2012), métaboliques (Al-Hariri 2011; Mujica et al. 2017) ou inflammatoires (Chirumbolo 2015). Enfin, les effets et le contenu en flavonoïdes de la propolis étant grandement influencés par la végétation environnante, chaque variation géographique présente des opportunités intéressantes.

En conclusion, les flavonoïdes sont une famille de molécules intéressantes dans la recherche de nouvelles classes de ligands des LXRs. En plus de leur structure et de leur taille rappelant celle de leurs ligands endogènes, ils possèdent des propriétés hydrophobes leur permettant d'entrer facilement dans le LBD des LXRs. L'analyse de différentes molécules a permis de montrer le potentiel des flavonoïdes à avoir des activités agonistes, antagonistes et, encore plus intéressant, spécifiques des isoformes. Le développement d'outils de prédiction *in silico* ouvre de nombreuses

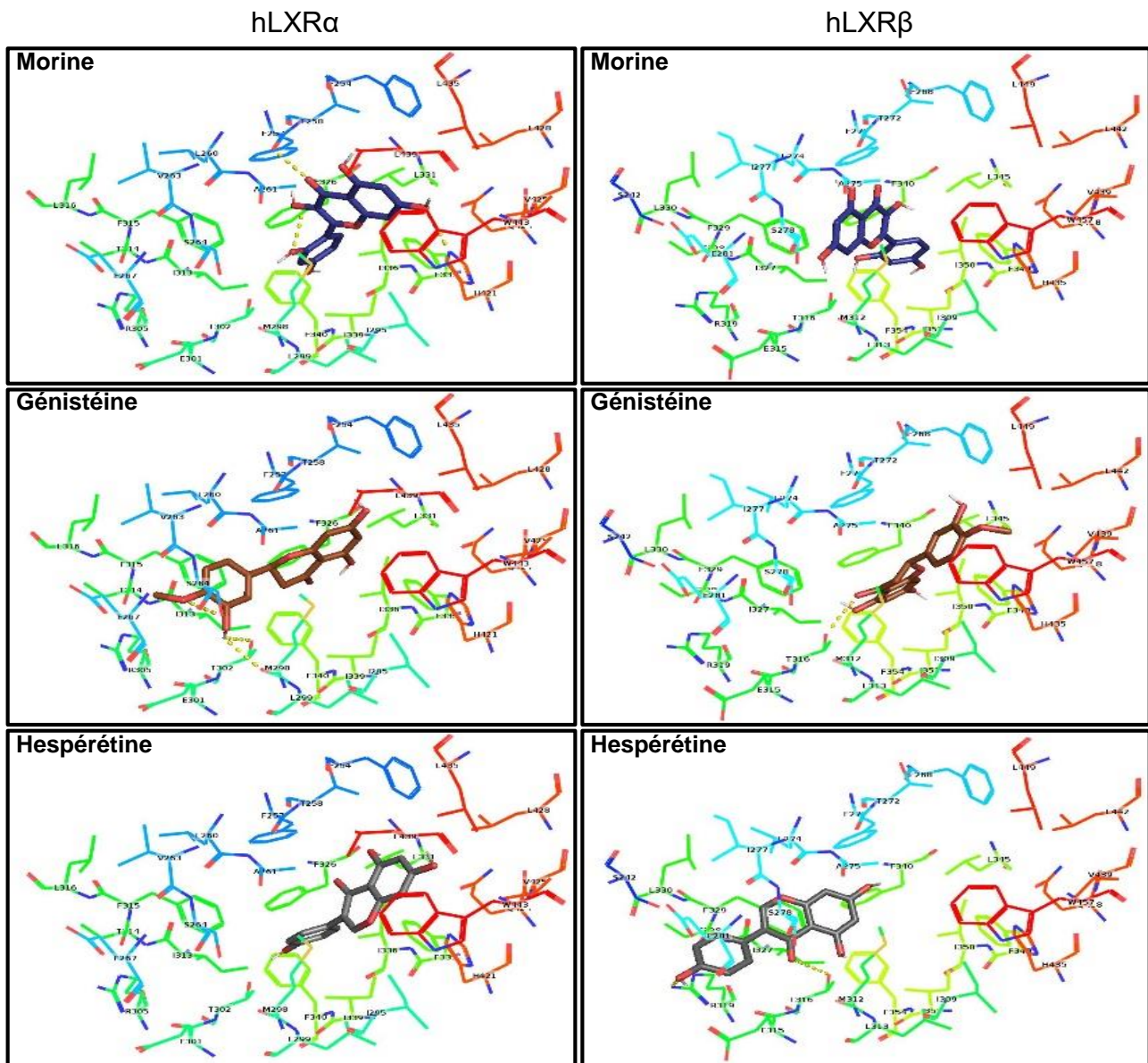


Figure 32 : Représentation tridimensionnelle du *docking* de 3 flavonoïdes dans le LBD des LXRs

Les acides aminés entourant le LBD sont représentés en *line style*. Le LBD de LXR α est à gauche et celui de LXR β à droite. La morine (panneau haut), la génistéine (panneau intermédiaire) et l’hespérétine (panneau du bas) sont représentés en *“sticks line”*. Les liaisons hydrogènes théoriques sont présentées en traits pointillés jaunes et sont repris dans le tableau 1. Ces images ont été réalisées sur PyMOL.

Tableau 8 : Résumé des liaisons hydrogènes théoriques établies entre les flavonoïdes et le LBD des LXRs

Résidues		Quercétine		Apigénine		Cyanidine		Hesperetine		Génistéine		Galangin		Naringenin		Lutéoline		Morine	
hLXR α	hLXR β																		
-	S242		X																
F257	F271			X										X	X	X	X	X	
L260	L274	X																	
S264	S278							X									X		
E267	E281																X		
M298	M312	X	X		X	X		X											
T302	T316	X	X	X	X	X	X	X	X		X								
R305	R319										X						X		
ΔG° (kcal/mol)		-8,5	-9,2	-9,0	-9,2	-8,6	-8,6	-8,4	-8,6	-8,5	-8,7	-8,5	-9,2	-8,9	-9,2	-9,1	-9,0	-7,7	-8,9
Kd (μ M)		4,36	4,13	1,88	4,13	3,68	11,37	5,17	11,37	4,36	9,61	4,36	4,13	2,22	4,13	1,58	5,79	16,84	6,86

possibilités dans la recherche de ligands. L'abondance de ces molécules dans l'environnement fait d'elles des cibles faciles d'étude et d'analyse.

Cependant, les flavonoïdes en tant que ligands des LXRs ne sont pas exempts de défauts.

D'abord, leur petite taille rend possibles plusieurs positionnements dans le LBD et donc des interactions moins précises ; ceci peut se traduire par des affinités plus faibles pour les LXRs (de l'ordre du micromolaire). Hu et al ont en effet montré que les molécules les plus actives générées lors de la fabrication de flavonoïdes synthétiques sont les plus volumineuses (Y. Hu et al. 2013). En effet, comme pour le T0901317 ou le GW3965, la grande taille de ces agonistes permet de mieux verrouiller le positionnement et donc l'interaction du ligand dans la poche.

Le second défaut est que l'humain est exposé aux flavonoïdes depuis des millions d'années, ainsi l'organisme les reconnaît facilement et les métabolise rapidement. Ceci se traduit par une durée de demi-vie faible dans l'organisme comparée aux molécules synthétiques. Cette dernière propriété peut néanmoins être vue comme un avantage. En effet le foie, organe de détoxification par excellence, peut être insensible à un flavonoïde tandis que des organes périphériques pourraient être impactés. Ainsi, ceci permettrait de contourner une partie des effets secondaires des ligands des LXRs.

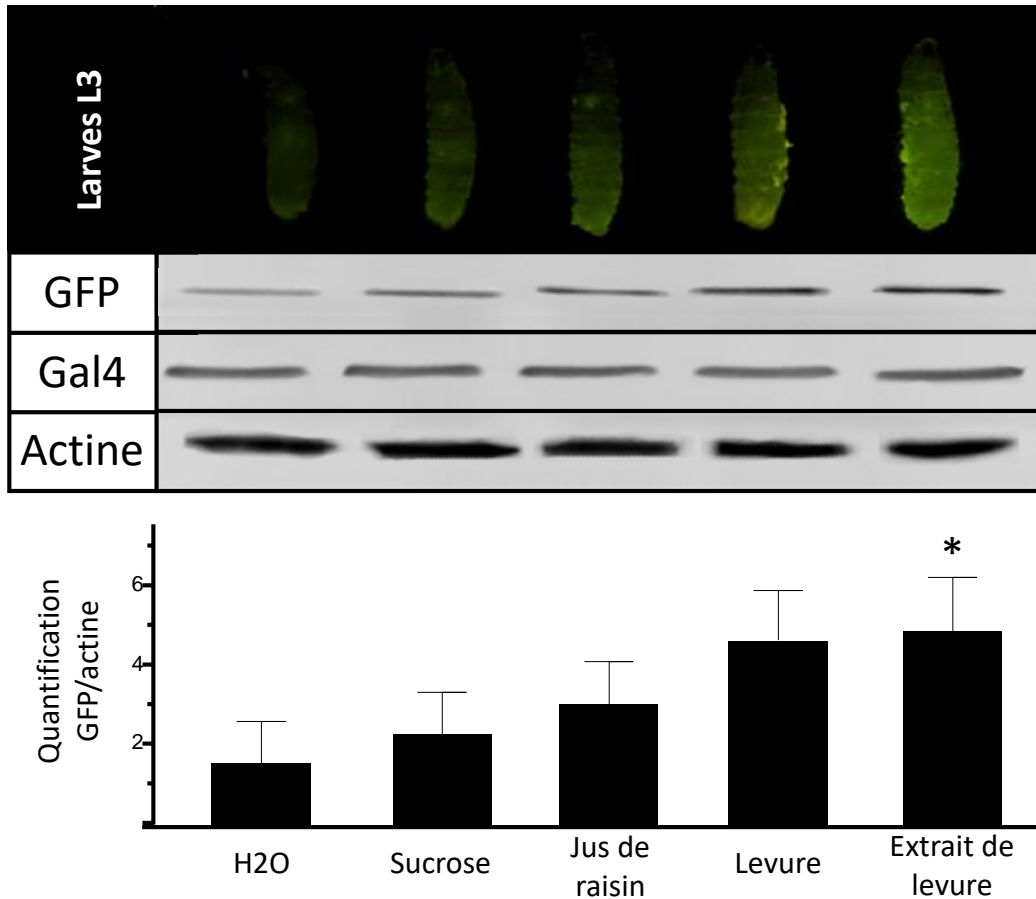


Figure 33 : Tests des différentes nourritures utilisées pour l'administration des ligands

La lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a été traitée 24h avec 10^{-4} M de T0901317 solubilisé dans du DMSO et dilué dans de l'H₂O, du D-sucrose (1M), du jus de raisin, des levures en suspension ou des extraits de levures en suspension. Les images ont été capturées avec un temps d'exposition de 1 seconde sous une loupe binoculaire. Les protéines de larves totales ont été extraites et étudiées par *western blot*. Les histogrammes reflètent les quantités de GFP, Gal4 ou actine mesurée par *western blot* au cours de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des t-tests ont été menés avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport à la condition H₂O.

2. Développement d'un système de criblage de ligands des LXR α *in vivo*

Comme développé en introduction, le modèle *Drosophila melanogaster* est intéressant par sa facilité d'entretien et de transgénése. Ce modèle a donc été choisi pour la transposition du système simple hybride *in vivo*. Après avoir établi une lignée de drosophile « *Gal4-LXR α ;UAS-GFP* » homozygote (cf : Matériel et méthodes) la mise au point du modèle a été entreprise.

2.1. Mise au point des modalités d'administration des ligands

Une fois la lignée étant établie, il faut mettre au point les modalités d'administration des ligands. Le grand nombre de drosophiles à traiter ainsi que leur taille réduite rend peu envisageable l'injection directe. La dilution des molécules dans la nourriture a donc été choisie. Cependant, à l'âge adulte, les drosophiles se nourrissent peu, à l'exception des femelles en période de ponte. Le stade larvaire a donc été préféré car c'est à cette période que la drosophile se nourrit le plus. Ce stade présente également l'avantage de s'affranchir de l'obstruction du signal rapporteur par la cuticule présente chez l'adulte.

Plusieurs types de nourritures ont été testés. Les jeunes larves ont été traitées avec 10^{-4} M de T0901317 dilué dans divers véhicules comme l'H₂O, le D-sucrose à 1M, le jus de raisin, la suspension de levure ou la suspension d'extrait de levure. L'induction de la fluorescence est constatée visuellement, l'expression du transcrit GFP est vérifiée par RT-qPCR et la protéine détectée par *western blot* (Figure 33). On peut remarquer que l'utilisation d'un véhicule à base d'extrait de levure est la solution la plus efficace. Cependant même si une augmentation des niveaux de GFP est constatée, ces niveaux restent relativement faibles par rapport à ce qui est observé *in vitro* (x9.2 *in vitro* vs x5.9 *in vivo*). De plus, ces résultats montrent une grande variabilité. Ce phénomène peut s'expliquer par la forte mortalité induite par le traitement par le T0901317. En effet, le suivi de mortalité des drosophiles en fonction de la concentration croissante de T0901317 (Figure 34) montre une diminution drastique de la survie des larves (Génération G0) à des concentrations supérieures ou égales à 10^{-4} M.

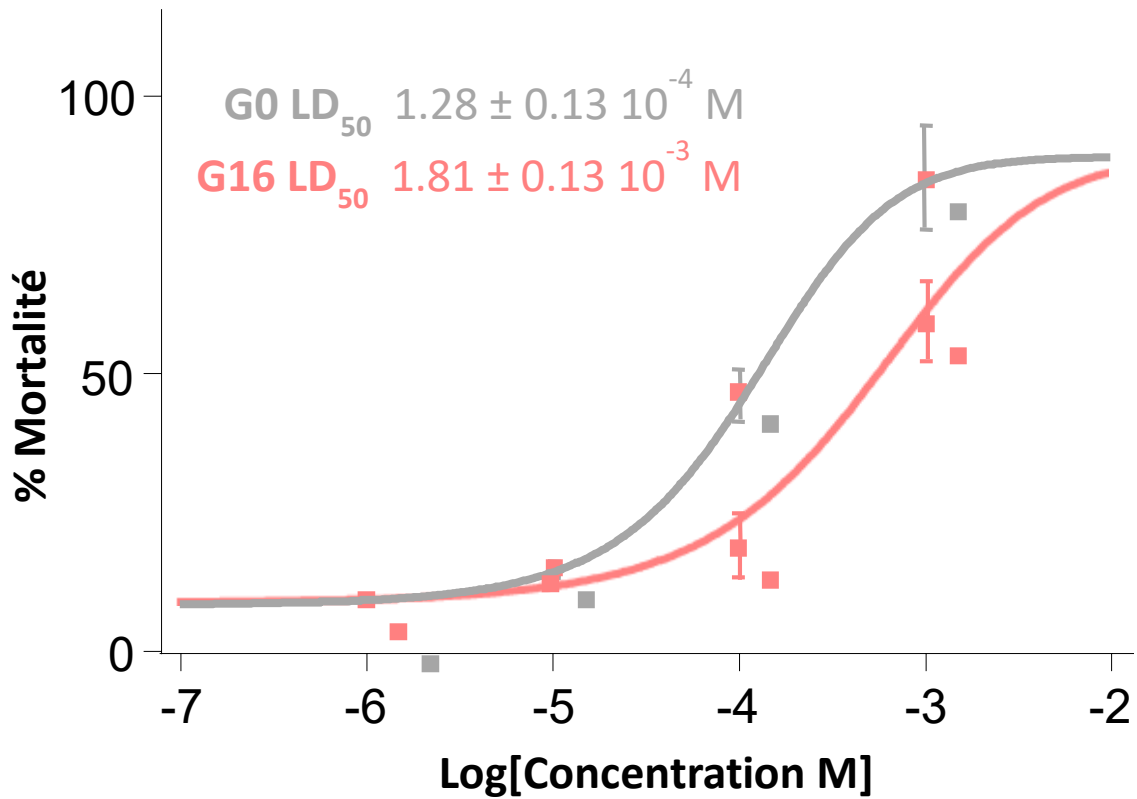


Figure 34 : Etude de la toxicité du T0901317 au cours des générations

La lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a été traitée avec 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M ou 10^{-3} M de T0901317 solubilisé dans du DMSO et dilué dans des extraits de levure en suspension. La mortalité des larves a été mesurée après 24h de traitement. Les doses létales pour lesquelles 50% ont été retrouvés morts (LD₅₀) sont calculées et présentées. Ces données sont le fruit de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM),

2.2. Amélioration de la lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP par sélection au cours des générations

Une sélection des drosophiles survivantes aux traitements T0901317 à 10^{-4} M a été effectuée au fil des générations sur trois critères. Le premier est la survie, le second est la faculté à répondre à la stimulation T0901317 et le troisième est le maintien des niveaux basaux de GFP. Cette pression de sélection est maintenue au cours de 16 générations et contrôlée en ARN toutes les deux générations et en *western blot* toutes les quatre générations (Figure 35). On constate alors l'établissement d'une lignée avec une production de protéine de fusion Gal4-LXR α et des niveaux basaux de GFP inchangés mais avec une nette augmentation de l'aptitude du T0901317 à activer le système aussi bien au niveau ARN (Figure 35C) qu'au niveau protéique (Figure 35D). Des expériences ultérieures montrent que le maintien de cette sélection sur les générations suivantes n'entraîne pas d'amélioration significative du fonctionnement du système. La survie au T0901317 est également renforcée d'un facteur 10 (Figure 34 ; Larves G16).

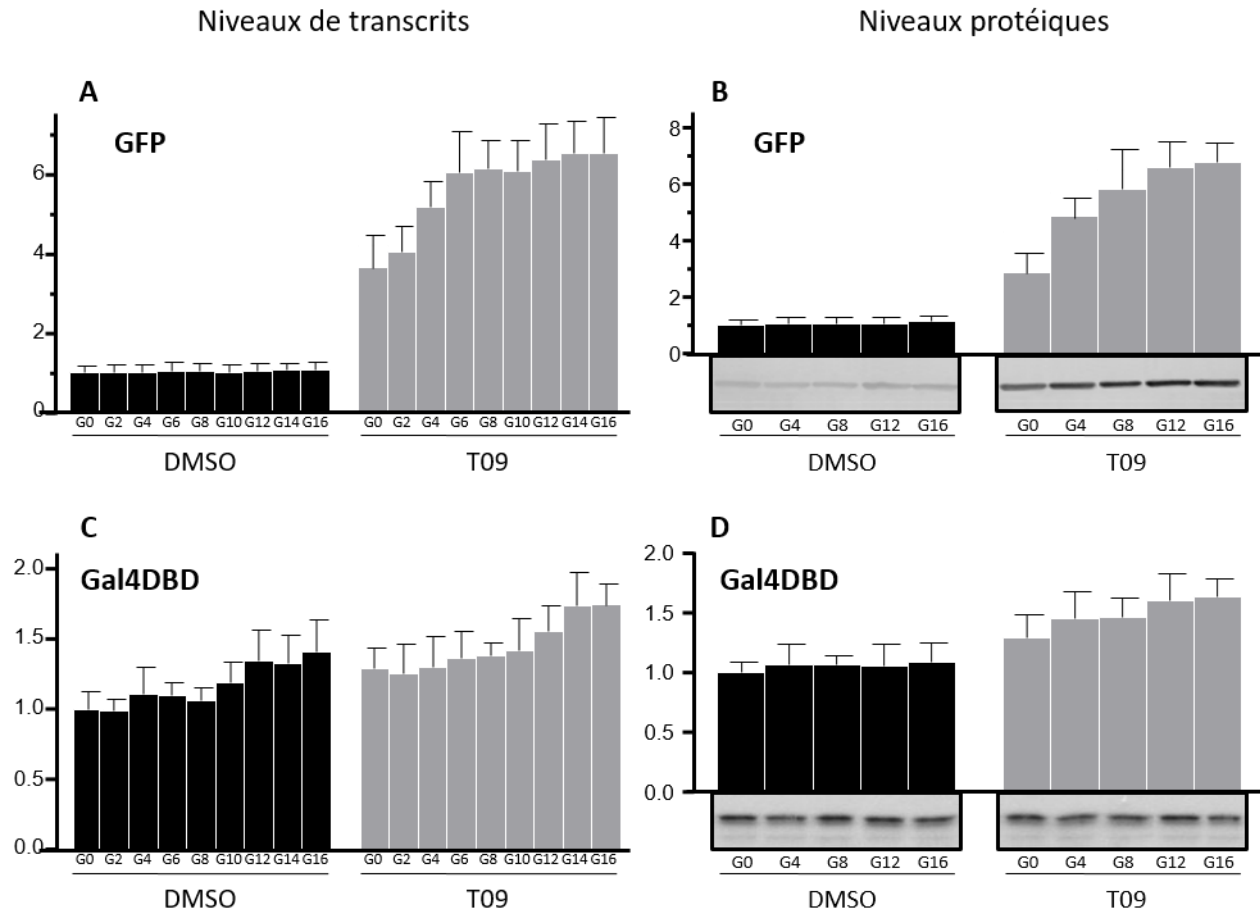


Figure 35 : Sélection des drosophiles au cours des générations

Plusieurs générations (G) de la lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP ont été traitées 24h avec 10^{-4} M de T0901317 solubilisé dans du DMSO et dilué dans des extraits de levures en suspension. Les protéines (B et D) et les ARNm (A et C) de larves totales ont été extraites et étudiées par *western blot* ou RTqPCR. Les niveaux de GFP (A et B) et de Gal4 (C et D) ont été quantifiés. Les histogrammes résultent de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des t-tests ont été menés avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport à la génération G0.

2.3. Capacité de la lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP à discriminer l'activité de molécules agonistes des LXRs

La lignée nouvellement établie a été testée sur sa capacité à répondre à l'induction d'autres ligands agonistes tels que le GW3965 et le 22R-hydroxycholestérol (Figure 36). Le GW3965 est capable d'induire la production de GFP à un niveau légèrement inférieur à celle du T0901317. Cependant, le 22R-hydroxycholestérol ne parvient pas à induire une augmentation significative. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons. D'abord, le ligand peut être métabolisé avant son action sur le récepteur chimérique. En effet, chez la drosophile, l'ecdysone (Figure 37) est l'hormone centrale régissant de nombreux mécanismes physiologiques tels que la croissance, la métamorphose ou encore la reproduction (Schweddes et al. 2012). L'ecdysone et ses métabolites sont très proches structurellement des oxystérols, ainsi certaines enzymes du métabolisme de l'ecdysone pourraient agir sur le 22R-hydroxycholestérol. De plus, il existe de nombreuses similitudes entre les récepteurs LXRs et le récepteur à l'ecdysone, supportant l'idée de voies métaboliques conservées entre les deux espèces (Ollikainen et al. 2006). Cette difficulté à atteindre le seuil de significativité s'explique également par une variabilité interindividuelle prononcée représentée par un écart-type moyen (SEM) important. Ce phénomène pourrait être expliqué par la liaison au LBD des LXRs de l'ecdysone ou d'oxystérol endogène. Pour mettre à l'épreuve cette hypothèse, la voie de synthèse du cholestérol de la drosophile a été ciblée. Le cholestérol étant le précurseur à la fois des oxystérols et de l'ecdysone, le blocage de sa synthèse pourrait avoir un impact sur les niveaux basaux de GFP dans le système simple hybride. Nous avons utilisé la simvastatine, un bloquant pharmacologique de *HMG-CoA-reductase*.

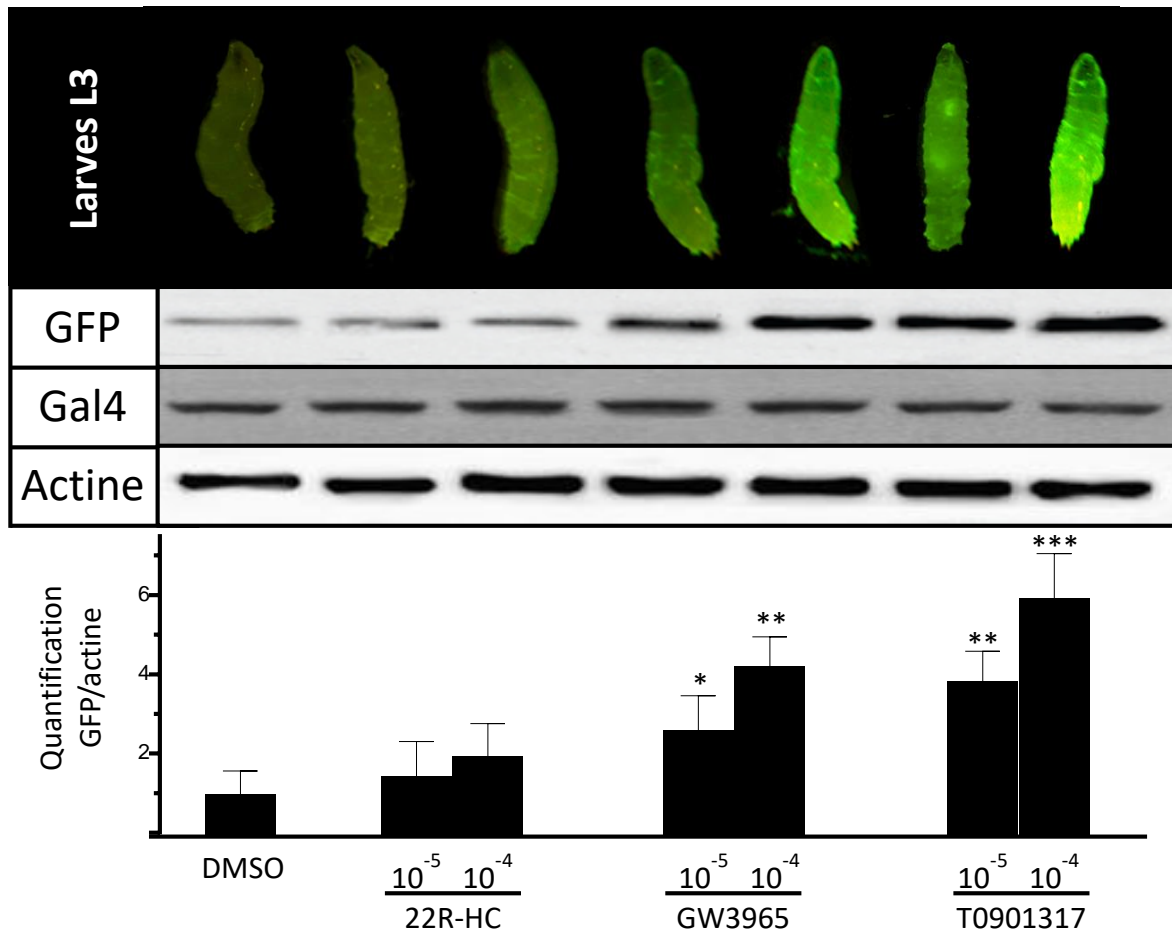


Figure 36 : Tests de ligands agonistes des LXRs

La lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a été traitée 24h avec 10^{-5} M ou 10^{-4} M de T0901317, 22R-hydrocholestérol (22R-HC) ou GW3965 solubilisé dans du DMSO et dilué dans des extraits de levures en suspension. Les images ont été capturées avec un temps d'exposition de 1 seconde sous une loupe binoculaire. Les protéines de larves totales ont été extraites et étudiées par western blot. Les histogrammes reflètent les quantités de GFP, Gal4 ou actine mesurée par western blot au cours de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des t-tests ont été menés avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$ par rapport à la condition DMSO.

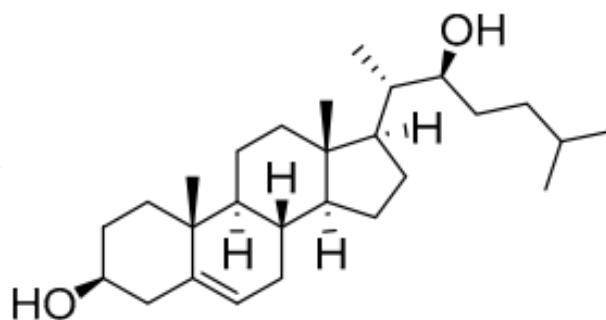


Figure 38 : Ecdysone

On remarque que le traitement à la simvastatine seule, bien qu'elle induite une certaine mortalité, permet de diminuer la variance des niveaux basaux de GFP (Figure 38). De plus, lors du co-traitement des drosophiles avec de la simvastatine et le 22R-hydroxycholestérol, on observe une activité agoniste significative en comparaison aux drosophiles ayant reçu seulement la simvastatine.

Ces résultats suggèrent que les voies métaboliques de l'ecdysone semblent interférer avec les oxystérols. La raréfaction de l'ecdysone et des oxystérols endogènes suite aux traitements avec la simvastatine montre une diminution des niveaux basaux. Ce constat supporte l'hypothèse selon laquelle ces stérols lient LXR α .

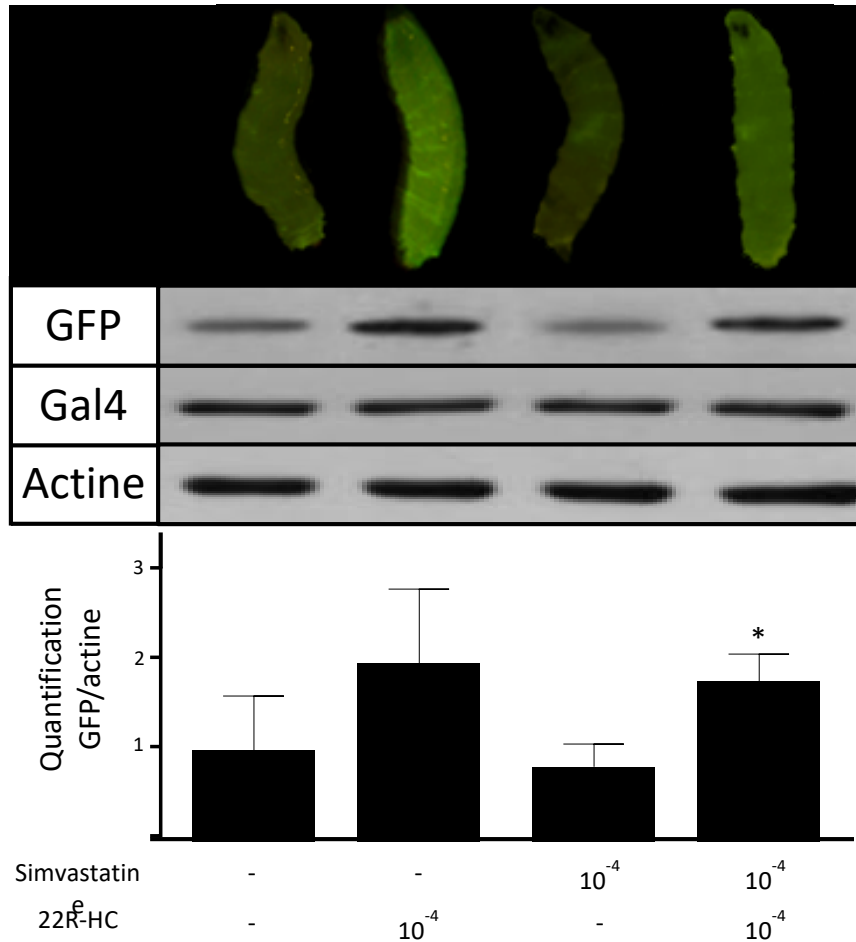


Figure 38 : La simvastatine permet la potentialisation des effets agonistes du 22R-hydroxycholestérol

La lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a été traitée pendant 24h avec 10^{-4} M de 22R-hydroxycholestérol (22R-HC) et 10^{-4} M de simvastatine solubilisés dans du DMSO et dilués dans des extraits de levures en suspension. Les images ont été capturées avec un temps d'exposition de 1 seconde sous une loupe binoculaire. Les protéines de larves totales ont été extraites et étudiées par *western blot*. Les histogrammes reflètent les quantités de GFP et d'actine mesurées par *western blot* au cours de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des t-tests ont été menés avec * $p < 0,05$ par rapport à la condition simvastatine

2.4. Capacité de la lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP à discriminer l'activité de molécules antagonistes des LXRs

L'observation d'une activité antagoniste est plus complexe, en effet le traitement de drosophiles à l'aide d'un antagoniste seul ne contribue qu'à baisser le niveau basal. Etant donné, le niveau déjà faible d'activité transcriptionnelle, l'abaisser plus semble difficile. De plus, à cause de la variabilité interindividuelle vraisemblablement imputable aux stérols endogènes (voir précédemment), de subtiles diminutions ne parviennent pas à atteindre le seuil de significativité. De fait, le 22S hydroxycholestérol ne parvient pas à diminuer de façon significative les niveaux basaux de GFP (Figure 39). De plus, lorsqu'on active le système simple hybride à l'aide de l'agoniste T0901317, le co-traitement avec le 22S-hydroxycholestérol est insuffisant pour exhiber une activité antagoniste significative.

De façon similaire à ce qui a été réalisé avec le 22R-hydroxycholestérol, un co-traitement avec la simvastatine a été entrepris. On observe alors que le traitement simultané avec du 22S-hydroxycholestérol et de la simvastatine diminue la variance et amène la valeur p à 0.065, pour une diminution de 38% (Figure 40). De plus, en ajoutant le T0901317 pour activer le système, le 22S-hydroxycholestérol parvient à montrer une activité antagoniste significative. Afin de prouver que ce système est capable de discriminer une activité antagoniste envers les LXRs, il faudrait choisir une molécule s'éloignant de la structure stéroïdienne afin de limiter les hypothétiques effets du métabolisme. Le GSK2033, un antagoniste des LXRs mis au point par Tocris et déjà publié pourrait être testé (Bonney et Siegenthaler 2017).

Dans le but de déceler plus facilement une activité antagoniste, plusieurs stratégies pourraient être entreprises. La première consisterait à réaliser un co-traitement des drosophiles avec un agoniste permettant une élévation du niveau de GFP qu'une activité antagoniste pourrait diminuer significativement (déjà testée avec le T0901317). Toutefois cette approche pose le problème de la toxicité induite par l'administration simultanée de ces deux molécules. Une deuxième stratégie

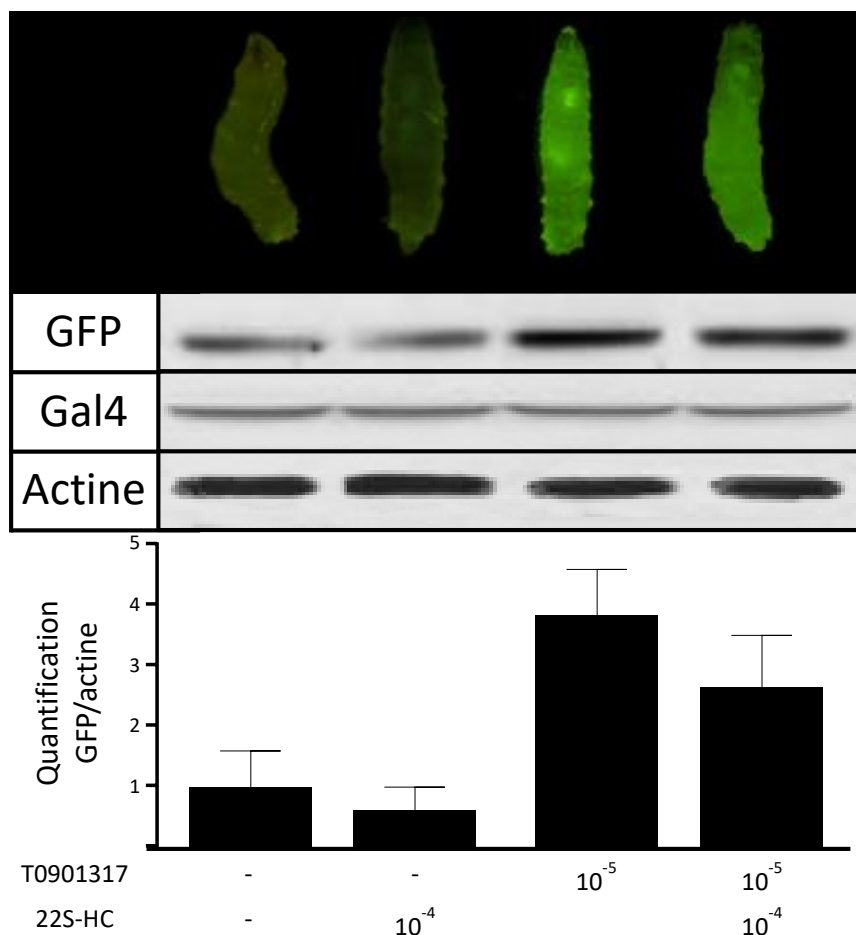


Figure 39 : Test d'un ligand antagoniste des LXR

La lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a été traitée 24h avec 10^{-5} M de T0901317 et/ou 10^{-4} M de 22S-hydrocycholestérol (22S-HC) solubilisé dans du DMSO et dilué dans des extraits de levure en suspension. Les images ont été capturées avec un temps d'exposition de 1 seconde sous une loupe binoculaire. Les protéines de larves totales ont été extraites et étudiées par *western blot*. Les histogrammes reflètent les quantités de GFP et d'actine mesurées par *western blot* au cours de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des t-tests ont été menés avec * $p < 0,05$ par rapport à la condition T0901317.

consisterait en la diminution de la variabilité du niveau basal de GFP. Les expériences réalisées avec la simvastatine montrent des résultats encourageants, cependant le traitement à grande échelle des drosophiles pourrait s'avérer toxique et onéreux. Il serait plus envisageable de se concentrer sur l'alimentation. En appauvrissant le régime des drosophiles en cholestérol on pourrait s'affranchir des effets néfastes de la simvastatine constatés sur la survie. Enfin, une dernière stratégie consisterait en l'implantation de la partie UAS-GFP du système dans un environnement chromatinien plus permissif autorisant des niveaux basaux plus élevés. Ceci serait possible par le croisement de la lignée Gal4-LXR α avec d'autres lignées UAS-GFP. En effet, ces lignées sont nombreuses (*Bloomington Stock Center*) différant par leurs zones d'ancrage génomique, leurs niveaux basaux et leurs profils d'expression.

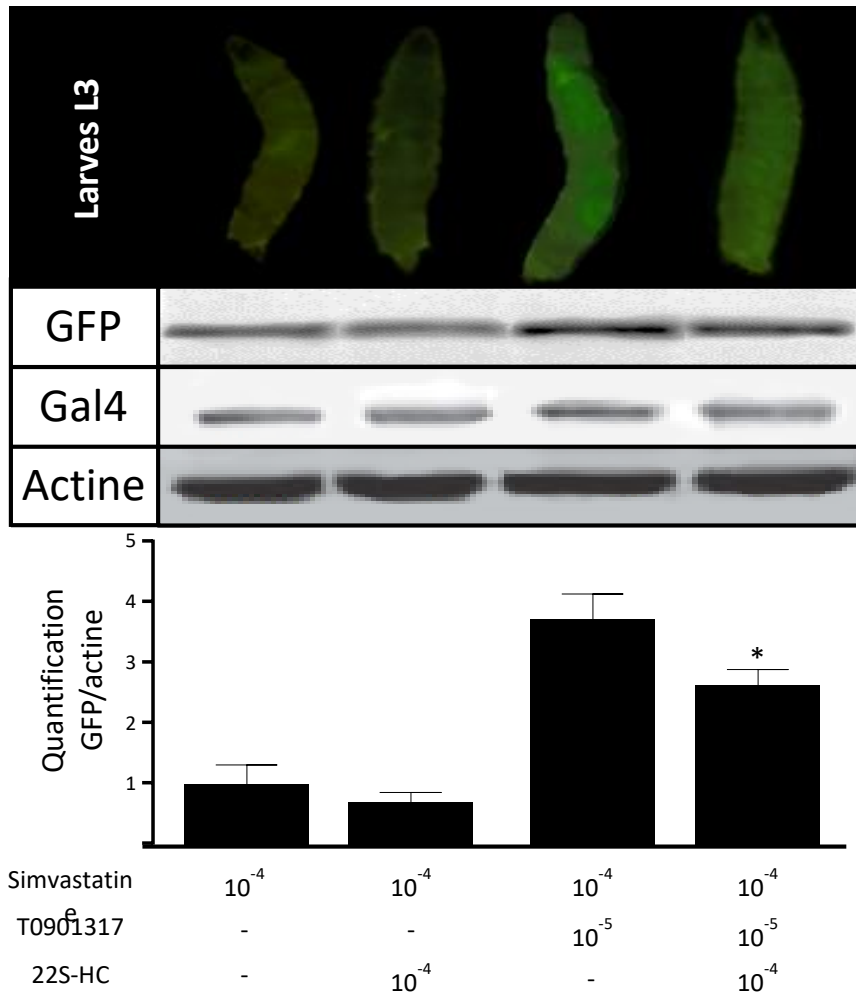


Figure 40 : La simvastatine permet la potentialisation des effets antagonistes du 22S-hydroxycholestérol

La lignée Gal4-LXR α ; UAS-GFP a été traitée 24h avec 10^{-5} M de T0901317 et/ou 10^{-4} M de 22S-hydroxycholestérol (22S-HC) et 10^{-4} M de simvastatine solubilisés dans du DMSO et dilués dans des extraits de levures en suspension. Les images ont été capturées avec un temps d'exposition de 1 seconde sous une loupe binoculaire. Les protéines de larves totales ont été extraites et étudiées par *western blot*. Les histogrammes reflètent les quantités de GFP et d'actine mesurées par *western blot* au cours de trois expériences indépendantes. Les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM). Des t-tests ont été menés avec * $p < 0,05$ par rapport à la condition T0901317+simvastatine.

2.5. Corrélation de la fluorescence perçue sur larve entière avec les niveaux protéiques de GFP

Le paramètre primordial à privilégier lors de la mise en place d'un système de criblage de molécules à grande échelle est le temps. Pour toutes les expériences réalisées précédemment, l'interprétation des résultats s'est basée sur l'analyse de l'intensité des bandes GFP obtenus par *western blot*. Cependant, cette méthode, effectuée sur un grand nombre d'échantillons s'avère coûteuse et chronophage et donc inadaptée au criblage. L'étude directe de la fluorescence sur larve entière pourrait être une bonne alternative.

Afin de savoir si cette méthode de quantification est réalisable, nous avons cherché à corréler l'intensité des bandes de GFP obtenues par *western blot* avec la fluorescence totale des larves (Figure 41). En utilisant toutes les données disponibles, le coefficient de corrélation s'élève à $R^2=0.8863$ (Figure 41A). Ce bon score ne semble cependant pas s'appliquer aux « faibles » intensités de fluorescence (de 0 à 35% de la fluorescence maximale mesurée), où ce coefficient diminue à $R^2=0.4373$ (Figure 41C). Afin d'améliorer ce score, nous avons quantifié seulement les larves en position latérale (la plus fréquente) lors des photographies, ce qui permet de s'affranchir d'un potentiel effet de position. Sur toutes les données restantes le coefficient s'élève à $R^2=0.9617$ (Figure 41B) et se maintient à $R^2=0.8197$ sur les faibles intensités (Figure 41D) manifestant une amélioration notable.

En conclusion, nous avons pu mettre en place un modèle de criblage de molécules *in vivo* chez la drosophile, plus simple à mettre en place que chez la souris, notamment pour des questions éthiques. La lignée de drosophile établie est stable et est capable de discriminer une activité agoniste de ligands tels que le T0901317 ou le GW3965. Cependant, à l'heure actuelle aucune activité antagoniste basale de molécules synthétiques comme le 22S-hydroxycholestérol n'a pu être observée. Des expérimentations ultérieures restent à mener afin de perfectionner le système. La

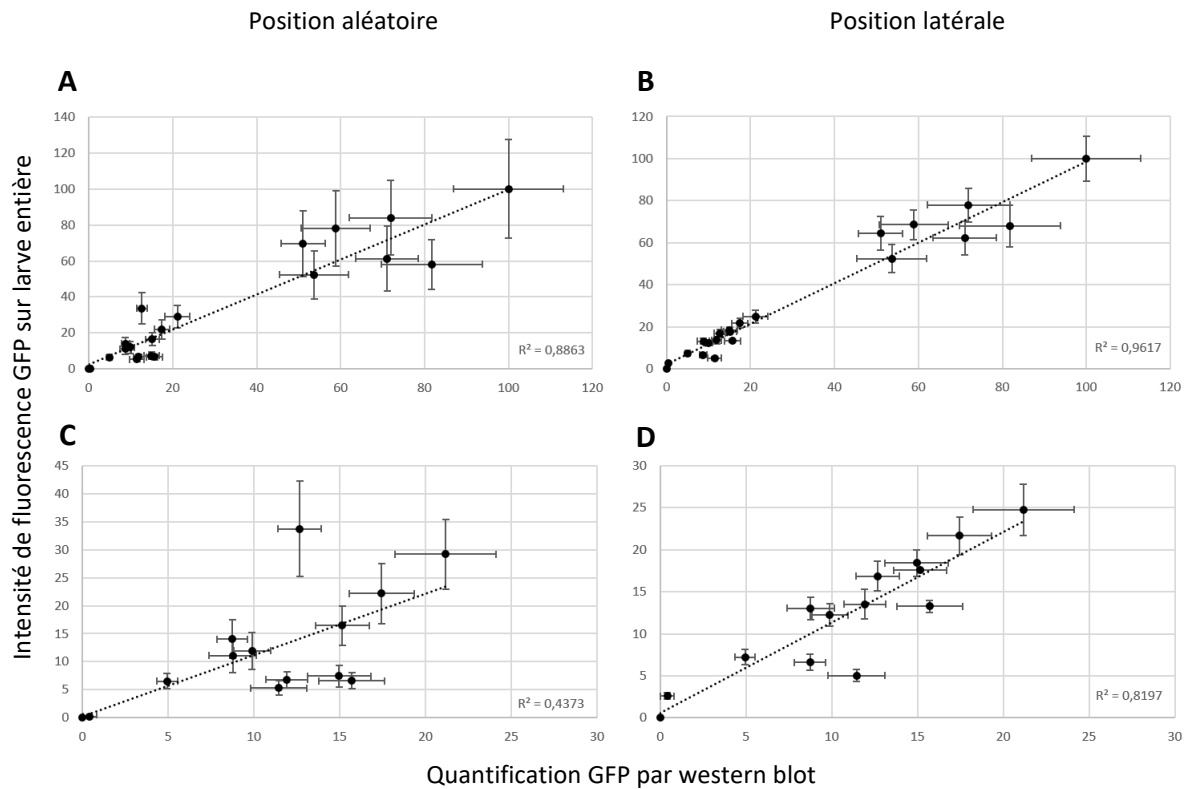


Figure 41 : Corrélation entre la quantification de la GFP par fluorescence et par *western blot*

Chaque expérience réalisée précédemment a été utilisée pour identifier une éventuelle corrélation entre la fluorescence mesurée sur la larve entière (via photos à la loupe binoculaire) et la mesure d'intensité des bandes GFP obtenues par *western blot*. Les graphiques A et C montrent la corrélation à partir de toutes les photos disponible et les graphiques B et D montrent la corrélation à partir de photos où les larves étaient en position latérale. Dans les graphiques A et B la corrélation est établie sur toutes les intensités de fluorescence. Sur les graphes C et D, seules les intensités de fluorescence inférieures à 30% sont utilisées pour calculer le coefficient de corrélation.

possibilité de la visualisation et de la quantification directe des effets des molécules sur les LXRs *in vivo* offre des perspectives très prometteuses.

Cette étude et d'autres ont montré qu'il était possible de faire fonctionner le système simple hybride avec des récepteurs nucléaires humains grâce aux coactivateurs et corépresseurs endogènes de drosophile (Han, Stein, et Stevens 2000). De plus, des analyses bio-informatiques montrent que les domaines d'interactions entre corégulateurs et récepteurs nucléaires sont conservés entre les deux espèces (Davis et al. 2011) et que le *switch* relargage/recrutement de corégulateurs est également présent chez la drosophile (Glass et Rosenfeld 2000). Même si le système simple hybride est suffisant, les analyses possibles *in vivo* nécessitent le développement d'un système en double hybride. En effet le croisement de cette lignée déjà établie avec des drosophiles portant un transgène codant pour le domaine d'activation de VP16 et le domaine d'interaction de différents corégulateurs des LXRs permettrait d'observer *in vivo* le recrutement des coactivateurs et des corépresseurs en fonction des ligands utilisés. Ceci constituerait un pas de plus dans la caractérisation des effets d'une molécule *in vivo*.

3. Développement d'un double système de criblage des ligands des LXR

Comme présenté en introduction les isoformes des LXRs ont des fonctions à la fois redondantes et spécifiques. La modulation de l'activité d'une isoforme possède des intérêts pharmacologiques indéniables. A ce jour, les tests de criblages moléculaires disponibles ne font l'étude que d'un seul récepteur nucléaire à la fois. L'étude dissociée de LXR α et LXR β ne permet pas d'estimer la préférence endogène d'un ligand pour l'un ou l'autre des récepteurs. En effet, la séquestration du ligand ainsi que la durée de demi-vie du complexe récepteur-ligand d'une isoforme peuvent empêcher/favoriser la liaison à l'autre isoforme. Le développement d'un modèle favorisant le crible simultané des deux isoformes s'avère alors intéressante dans l'identification de ligands spécifiques.

3.1. Choix du second système simple hybride

Pour les récepteurs nucléaires, le système simple hybride UAS-Gal4 est une méthode de choix ayant déjà fait ses preuves. Cependant, cette méthode ne permet le crible que d'un seul récepteur à la fois. En 2010, l'étude de *Neurospora crassa*, a permis l'identification d'un système très proche structurellement de UAS-Gal4 (Figure 42). Nommé système QUAS-QF, il est constitué d'un facteur de transcription comprenant un domaine d'activation (AD) et un domaine de liaison à l'ADN (DBD) permettant la liaison aux séquences QUAS (Potter et al. 2010). Ce système fonctionne dans les cultures cellulaires de mammifères et *in vivo* chez la drosophile (Potter et al. 2010). L'avantage de ce système par rapport à d'autres (comme LexA-LexAop) est qu'il n'interfère pas avec le système UAS-Gal4. En effet, des expériences réalisées *in vitro* en cellules HeLa et S2 (drosophile) montrent que la co-transfection des deux systèmes n'entraîne pas d'activation croisée : la présence de QF n'augmente pas/peu l'expression de la luciférase en aval du promoteur UAS, et la présence de Gal4 n'a pas/peu d'impact sur celle en aval des séquences QUAS. A partir des plasmides, nous avons pu reproduire ces résultats en culture cellulaire (Figure 43).

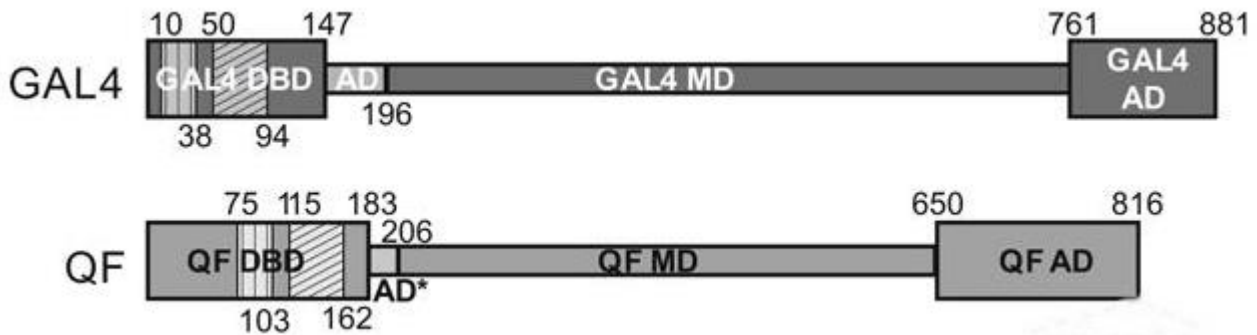


Figure 42 : Schéma représentatif des protéines Gal4 et QF entières

Les structures de Gal4 et QF se partage en un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine médian (MD) et un domaine d'activation (AD). Les 2 représentations sont à l'échelle. Les numéros affichés indiquent le nombre d'acides aminés de chaque domaine soulignant les homologies structurelles. Adapté de Riabinina et al, 2016

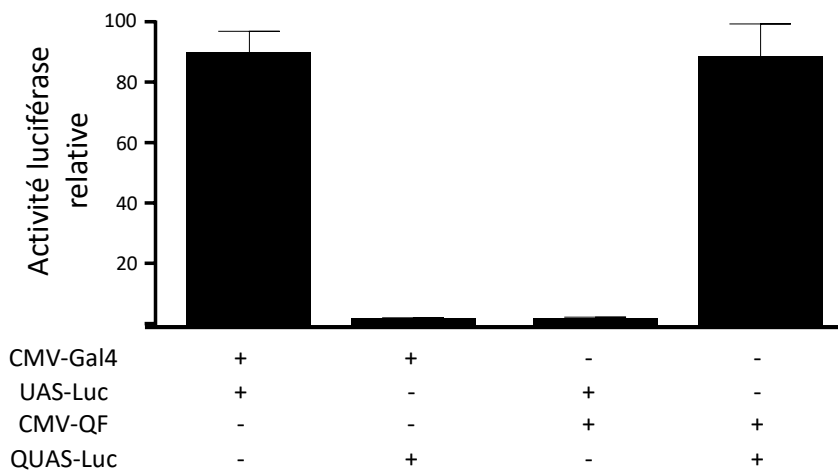


Figure 43 : Interactions entre les systèmes Gal4-UAS et QF-QUAS

Des cellules HeLa ont été transfectées avec 2 plasmides : pCMV-Gal4 ou pCMV-QF et UAS-Luc ou QUAS-Luc. La transfection a été réalisée sur 24h puis les cellules ont été incubées pendant 24h. Les histogrammes représentent la moyenne des valeurs obtenues sur 3 expériences indépendantes et les barres d'erreurs expriment l'écart-type moyen (SEM).

3.2. Organisation du double système de crible

Par analogie avec le système UAS-Gal4, le système QUAS-QF doit être adapté à l'étude des récepteurs nucléaires. Pour cela, nous devons créer une protéine chimérique contenant le domaine de liaison au ligand du récepteur nucléaire et le domaine de liaison à l'ADN de QF (Figure 44 ; (Riabinina et Potter 2016)). De façon identique à Gal4, seule la partie DBD du QF sera conservée.

Le double système de criblage doit être simple et compact afin de l'utiliser dans différents modèles *in vitro* (transfection transitoire ou stable) et *in vivo* (drosophile et souris). Ce système doit contenir au moins :

- une protéine de fusion contenant le LBD de LXR α : Gal4(DBD)-LXR α (LBD) ;
- une protéine de fusion contenant le LBD de LXR β : QF(DBD)-LXR β (LBD) ;
- un rapporteur de l'activité de la protéine de fusion contenant le DBD de Gal4 : UAS-GFP ;
- un rapporteur de l'activité de la protéine de fusion contenant le DBD de QF : QUAS-RFP.

L'activité de la voie LXR α sera représentée par la fluorescence de la GFP et l'activité de la voie LXR β sera représentée par la fluorescence de la RFP.

L'utilisation d'un tel système demande plusieurs prérequis :

Tout d'abord un *tag* Histidine sera ajouté en C-terminal de Gal4-LXR α et un *tag* FLAG est ajouté en C-terminal de QF-LXR β , ceci afin de pouvoir doser par immunohistochimie l'accumulation des protéines chimériques.

De plus, afin de pouvoir comparer les modulations des voies LXR α /LXR β , Gal4-LXR α et QF-LXR β doivent être produits de façon équimolaire. Dans ce but, les séquences codantes des deux protéines sont mises l'une après l'autre séparées par une séquence non traduite en protéine P2A (Yuancheng Wang et al. 2015). Ceci

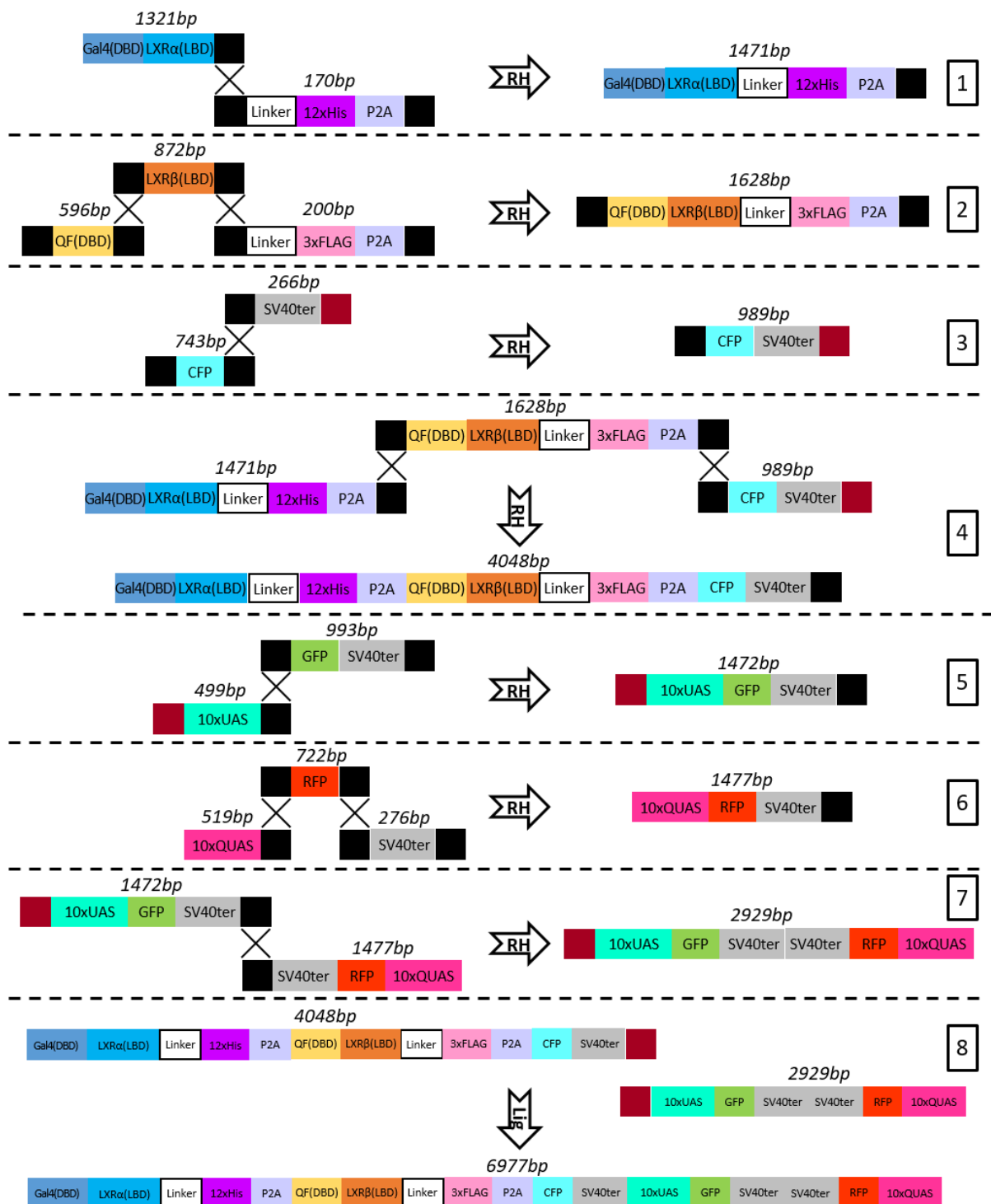


Figure 44 : Schéma récapitulatif des constructions réalisées

Chaque fragment a été généré par PCR à partir de plasmides provenant de Addgene. Dans un premier temps les fragments ont été assemblés par recombinaison homologue (RH). Les extrémités 5' et 3' noires sont les séquences de chevauchement de 10bp chacune (soit des zones de recombinaison homologue de 20bp pour une meilleure spécificité). Les extrémités 5' et 3' marron sont des zones où un site de restriction unique (NotI) sera ajouté par PCR afin de procéder à la dernière étape de l'assemblage (8) par ligation (Lig). Les nombres encadrés servent de repère pour les figure suivantes (Figure X et Y). Les nombre en italique indique les longueurs respectives des fragments.

permet l'utilisation d'un seul promoteur pour une production égale des deux protéines chimérique.

Afin de s'assurer que les protéines de fusions sont bien produites, une CFP est ajoutée en aval, séparée elle aussi, par une séquence P2A. En plus de son rôle de contrôle de production, la CFP permet la normalisation.

Enfin les deux rapporteurs UAS-GFP et QUAS-RFP sont placés à la suite et en sens opposé afin d'empêcher les influences inter-promoteurs. Enfin des séquences terminatrices « SV40ter » permettent de faciliter la fin de la transcription et de stabiliser les ARNm (Figure 44).

Organisé comme présenté en figure 44, ce double système peut être placé dans différents plasmides d'expression pour différents modèles d'étude. Ces plasmides devront contenir un promoteur fort et ubiquiste à placer en amont des séquences des protéines chimériques. Par exemple, pour des cellules de mammifère un plasmide « pCMV » avec le promoteur du cytomégalo virus sera utilisé. Dans le cadre de mutagenèse dirigée en cellules de mammifères, le ciblage du locus Rosa26 par un plasmide pROSA26 pourrait être utile (Figure 47). Pour les drosophiles un plasmide « pAct5C » avec le promoteur de l'actine 5C pourra être utilisé.

3.3. Construction du système

La construction du plasmide a été réalisée par recombinaison homologue. Les parties homologues sont ajoutées par PCR. Les briques de base du système ont été amplifiées à partir de plasmides disponibles chez *Addgene*. La figure 45 montre le résultat des PCR avec de longues amorces nucléotidiques permettant l'ajout des zones de recombinaison homologue. Une fois vérifiés par digestion avec des enzymes de restriction, les amplicons ont été assemblés par recombinaison homologue et analysés sur gel d'agarose (figure 46). L'assemblage final (n°8 ; Figure 44) a été réalisé par digestion des extrémités par l'enzyme de restriction NotI suivie d'une ligation. La migration du produit de ligation montre la création d'un construit plus long

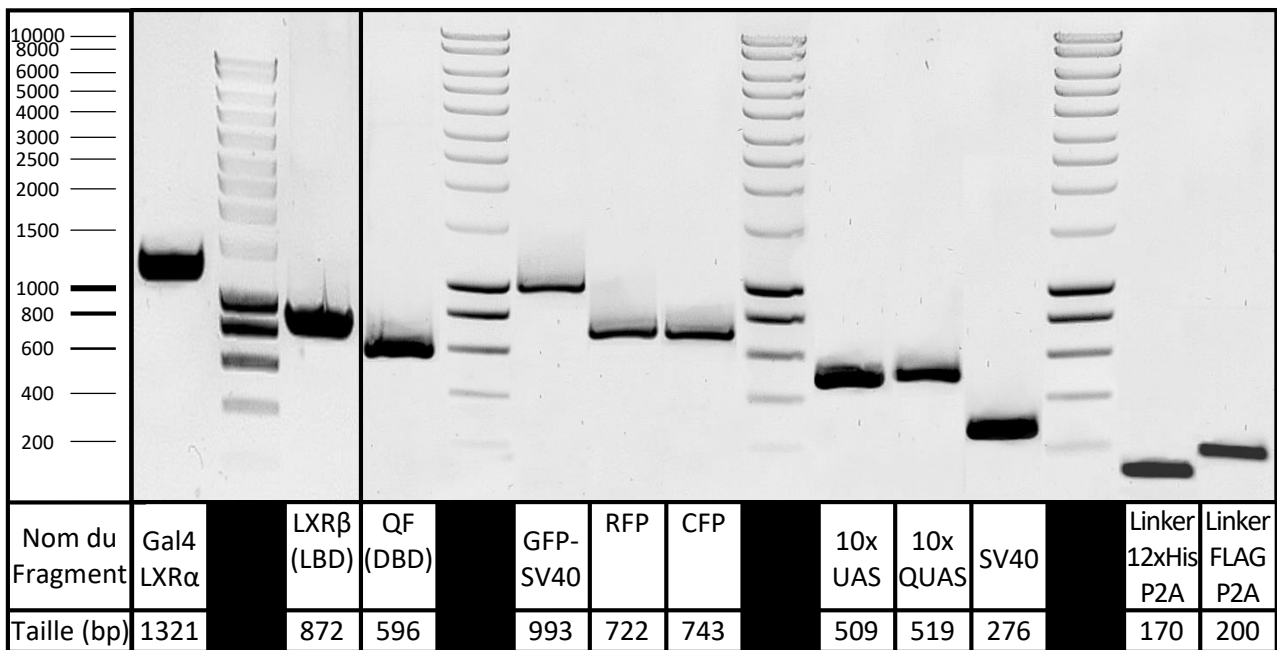


Figure 45 : Génération des fragments de la construction

Migration sur gel d'agarose 1% des produits de PCR générés à partir de plasmides Addgene afin de procéder à un assemblage ultérieur. Les amorces et les paramètres PCR sont listés dans la figure X de la partie matériel et méthodes. Dans la partie basse du tableau sont présentes les tailles attendues des amplicons.

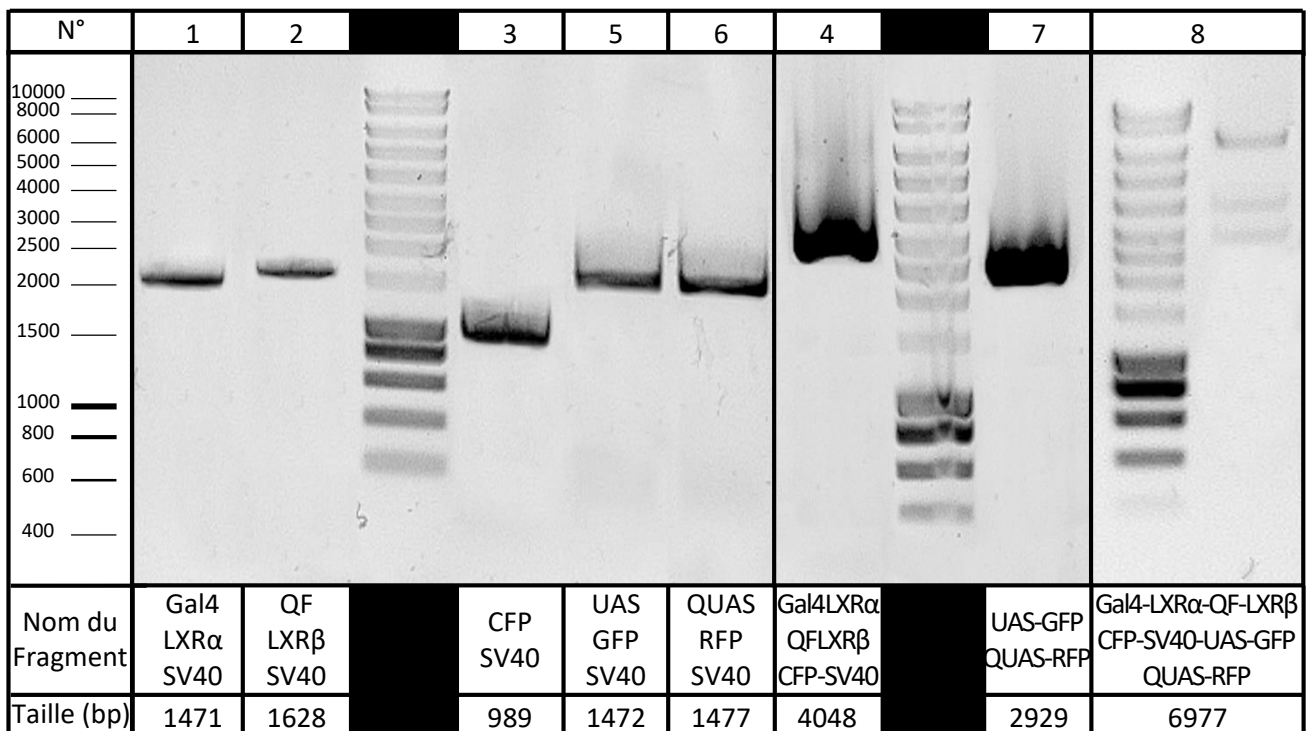


Figure 46 : Réalisation des étape de l'assemblage

Migration sur gel d'agarose 1% de l'assemblage des produits de PCR par recombinaison homologue (N°1-7). Les produits de recombinaisons homologues sont amplifiés par PCR et mis à migrer sur des gel d'agarose 1%. Les amorces et les paramètres PCR sont listé dans la figure X de la partie matériel et méthodes. Dans la manipulation N°8, les fragment sont assemblés après digestion préalable avec une enzyme de restriction puis ensuite soumis à une ligation. Dans la parties basse du tableau sont présentés les tailles attendues des assemblages.

et aux dimensions attendues. Afin de pouvoir le conserver et l'amplifier ultérieurement, le fragment a été intégré à un vecteur d'expression bactérien et l'ensemble a été utilisé pour transformer des souches *Escherichia coli*. Les PCR sur colonies indiquent que sur les 50 clones formés, un semble capable de produire le plasmide dans son intégralité. Cependant lors des tentatives d'amplification, aucune n'a permis l'isolation du fragment d'intérêt.

Même si dans le cadre de cette thèse, le système n'a pu être mis en place *in fine*, la construction est établie et pourra être utilisée dans des expérimentations futures. Le système UAS-Gal4 et dans une moindre mesure pour l'instant, le système QUAS-QF sont très utilisés. La présence de systèmes rapporteurs diversifiés tels que ceux utilisant des luciférases ou des galactosidases/peroxydases en aval de séquence UAS/QUAS pourraient être envisagés pour des applications *in vitro* plus sensibles.

3.4. Avantages et possibilités permises par le double système

Un double système de crible compacté en un seul construit de 7 kb permet la génération de modèles animaux en une seule transgénése. Un grand nombre de molécules agonistes ou antagonistes pourrait être donc testées sur modèle cellulaire. Ensuite, les molécules identifiées seraient testées *in vivo* en modèle de drosophile. Enfin, pour aborder un pré-criblage des molécules utilisables chez l'Homme, le modèle murin pourrait être utilisé. Ce plan de ciblage en trois parties possède l'avantage d'utiliser le même système entre les modèles, amenuisant les biais méthodologiques. De plus, l'écartement d'un grand nombre de molécules sélectionnées *in vitro* par le modèle *in vivo* de drosophile permettrait de tester un nombre très restreints de molécules en modèle murin afin de répondre aux exigences d'expérimentation animale (règle des 3R).

La présence de contrôles internes au système permet de nombreuses vérifications. Les quantités de protéines chimériques produites sont quantifiables

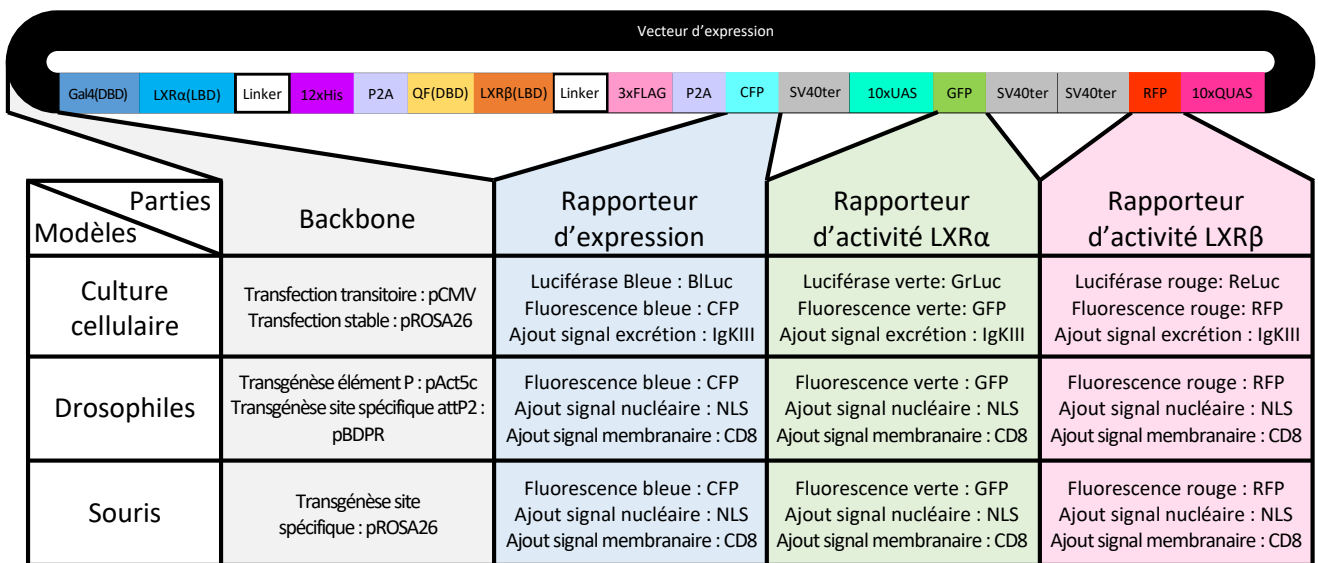


Figure 47 : Possibilités permises par le double système de criblage réalisé

rapidement d'abord par un rapporteur d'expression (ici la CFP), puis par l'ajout de marqueur tels que les histidines (12xHis pour Gal4-LXR α) ou FLAG (pour LXR β) pour des immunoprécipitations. De plus, l'expression des rapporteurs d'activité GFP (pour LXR α) et RFP (pour LXR β) est visualisable par fluorescence mais aussi, peut être ciblée par la large gamme anticorps disponibles.

Le construit a été arrangé de façon à pouvoir permettre de grandes modulations afin de l'adapter à différents modèles cellulaires ou animaux. D'abord, sa structure en un bloc permet un sous-clonage facile dans d'autres plasmides. Puis, le regroupement des trois rapporteurs de nature fluorescente (1 d'expression CFP ; deux d'activité GFP et RFP) en 3' de la construction permettrait leur remplacement, en un bloc, par des rapporteurs d'autres natures tels que bioluminescent, biochimique... (Figure 47). Afin de pouvoir permettre une utilisation dans des modèles d'espèces différentes, les séquences ont subi une optimisation de leurs codons (*codon-optimization*) permettant une expression maximale pour chacun des modèles. De plus, les séquences terminatrices « SV40ter » et les séquences de clivage P2A sont connues pour fonctionner chez nos espèces d'intérêt (Liu et al. 2017; Pfeiffer, Truman, et Rubin 2012).

Grâce à cette malléabilité, dans un premier temps, un modèle cellulaire pourrait être développé. Lors de l'utilisation de gènes rapporteurs, les protéines fluorescentes sont souvent préférées car elles sont plus simples d'utilisation puisqu'elles ne nécessitent que l'excitation à une certaine longueur d'onde pour être visualisées. Cependant, les signaux fluorescents ont facilement tendance à saturer et ne montrent pas une grande sensibilité. A l'inverse, les luciférases sont beaucoup plus sensibles mais nécessitent un substrat chimique : la luciférine. Ainsi, en modèle cellulaire, lorsqu'il est facile d'ajouter un substrat au milieu de culture, cette technique est favorisée. Dans sa version classique, la luciférase « *Firefly* » est produite dans le cytoplasme cellulaire. Ce paramètre oblige une lyse cellulaire à chaque expérimentation et nécessite un grand nombre de cellules dans le cas d'étude cinétique. Il est aujourd'hui possible d'ajouter, en N-terminal, un court et puissant peptide d'excrétion à la luciférase (Güler-Gane et al. 2016). Ce type de peptides est

également déjà naturellement retrouvé dans les séquences de luciférase chez certaines espèces montrant des efficacités remarquables (Stern et al. 2007). Certains de ces peptides ont déjà été testés avec succès sur des luciférase. A chaque mesure, seul le milieu de culture peut être récupéré et analysé permettant des économies de temps, et d'argent.

Dans le cadre du double système de criblage, plusieurs luciférase seraient nécessaires afin de remplacer les GFP, RFP et CFP. De nombreuses luciférase, stables et fonctionnant dans différents organismes et émettant à différentes longueurs d'ondes ont été découvertes. Une luciférase « verte » émettant à 540nm (Amaral, Prado, et Viviani 2012); la luciférase « rouge » émettant à 615 nm (Caysa et al. 2009) et la luciférase bleue émettant à 490nm (Trowell et al. 2016) pourraient être utilisées. L'utilisation de luciférase sécrétées dans le milieu de culture et émettant à des longueurs d'onde distinctes serait très intéressant dans l'établissement de lignées cellulaires stables pour le criblage de molécules affectant les LXRs.

Dans le but de développer des modèles de criblage *in vivo*, la drosophile est un modèle intéressant. L'analyse de la modulation des LXRs dans tout l'organisme fournira des informations précieuses sur la biodisponibilité des ligands. Le modèle drosophile, régi par des règles éthiques moins strictes, permettra le test de nombreuses molécules. Ce modèle sera aussi particulièrement intéressant dans la recherche de ligands non seulement spécifique de chaque isoforme mais aussi avec un ciblage tissulaire. Comme discuté précédemment, les essais thérapeutiques des ligands des LXRs ont conduit à des effets néfastes aussi bien sur le foie que sur le système nerveux. Un meilleur ciblage tissulaire s'avérerait être un atout crucial pour le développement de molécules thérapeutiques. De plus, dans le sens où de nombreux EDCs sont découverts chaque jours, l'analyse *in vivo* de l'impact de certaines molécules pourrait être mis en parallèle avec des expositions humaines.

La réussite de ce type de système ouvre la porte à la transposition de cet outil à d'autres récepteurs nucléaires. Par exemple, il est envisageable d'utiliser cet outil



afin d'étudier en simultané l'activité ligand-dépendante des deux isoformes des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β . Leurs rôles opposés dans la survenue de certain type de cancer hormono-dépendant (prostate, sein...) font d'eux de parfaits candidats   l'application de ce double système (Bousset et al. 2018) ; Annexe 1).

ANNEXES



Review

New Insights in Prostate Cancer Development and Tumor Therapy: Modulation of Nuclear Receptors and the Specific Role of Liver X Receptors

Laura Bousset ^{1,2,†}, Amandine Rambur ^{1,2,†}, Allan Fouache ^{1,2,†}, Julio Bunay ^{1,2} ,
Laurent Morel ^{1,2}, Jean-Marc A. Lobaccaro ^{1,2,*} , Silvère Baron ^{1,2,*}, Amalia Trousson ^{1,2,‡}
and Cyrille de Jossineau ^{1,2,‡}

¹ Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, F63001 Clermont-Ferrand, France; laura.bousset@uca.fr (L.B.); amandine.rambur@uca.fr (A.R.); allanfouache76@gmail.com (A.F.); julio.bunay_noboa@uca.fr (J.B.); laurent.morel@uca.fr (L.M.); amalia.trousson@uca.fr (A.T.); cyrille.de_jossineau@uca.fr (C.d.J.)

² Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France

* Correspondence: j-marc.lobaccaro@uca.fr (J.-M.A.L.); silvere.baron@uca.fr (S.B.);
Tel: +33-473-407-416 (J.-M.A.L.); +33-473-407-412 (S.B.);
Fax: +33-473-407-042 (J.-M.A.L.); +33-473-178-387 (S.B.)

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.

Received: 29 June 2018; Accepted: 9 August 2018; Published: 28 August 2018



Abstract: Prostate cancer (PCa) incidence has been dramatically increasing these last years in westernized countries. Though localized PCa is usually treated by radical prostatectomy, androgen deprivation therapy is preferred in locally advanced disease in combination with chemotherapy. Unfortunately, PCa goes into a castration-resistant state in the vast majority of the cases, leading to questions about the molecular mechanisms involving the steroids and their respective nuclear receptors in this relapse. Interestingly, liver X receptors (LXR α /NR1H3 and LXR β /NR1H2) have emerged as new actors in prostate physiology, beyond their historical roles of cholesterol sensors. More importantly LXRs have been proposed to be good pharmacological targets in PCa. This rationale has been based on numerous experiments performed in PCa cell lines and genetic animal models pointing out that using selective liver X receptor modulators (SLiMs) could actually be a good complementary therapy in patients with a castration resistant PCa. Hence, this review is focused on the interaction among the androgen receptors (AR/NR3C4), estrogen receptors (ER α /NR3A1 and ER β /NR3A2), and LXRs in prostate homeostasis and their putative pharmacological modulations in parallel to the patients' support.

Keywords: prostate cancer; metastasis; LXRs; androgens; estrogens; cholesterol; oxysterols; signaling pathway

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) rarely appears before the age of 40 years and is diagnosed in men of approximately 70 years old. Already known risk factors include age, family history, ethnicity, and internal steroid hormones levels, whilst there are also emerging carcinogenic factors, including diet, lifestyle, and exposure to xenobiotics. PCa requires androgens for growth, and androgen deprivation has, for decades, been the principal strategy to treating advanced disease. The increased incidence of PCa in many countries has been partly attributed to changes in diagnostic methods. Despite its

controversy, introduction of the prostate-specific antigen (PSA) assay as a screening method during the last decade has led to an increase in incidence. However, this alone does not explain the observed continuing rise. Besides, epidemiological studies have also pointed out that environmental factors could influence PCa risks, even though they are difficult to define [1]. PCa is the paradigm of the endocrine-related tumors, together with breast cancer. Various hormones, mainly steroids and their respective nuclear receptors (NRs), have a prominent role in the development of PCa. Hence, unusual levels of testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in prostate tissue are suspected to increase the risk of developing cancer [2], and estrogens are believed to have an important role as well [3,4].

NRs are part of a superfamily encompassing 48 members within humans. As DNA-binding proteins, they can control the transcription of genes whose products are fundamental for important physiological functions (for a review see Evans and Mangelsdorf [5]). Schematically, NRs are composed of three major independent functioning domains (Figure 1): a N-terminal involved in the regulation of the non-ligand dependent transcriptional activity, a central DNA-binding domain, and a C-terminal ligand-binding domain carrying a potential ligand-binding pocket controlling the ligand-dependent transcriptional activation function [6].

The steroid receptors are within the cytoplasm in the absence of a ligand and are bound to heat shock proteins that impede the shuttling to the nucleus (Figure 1).

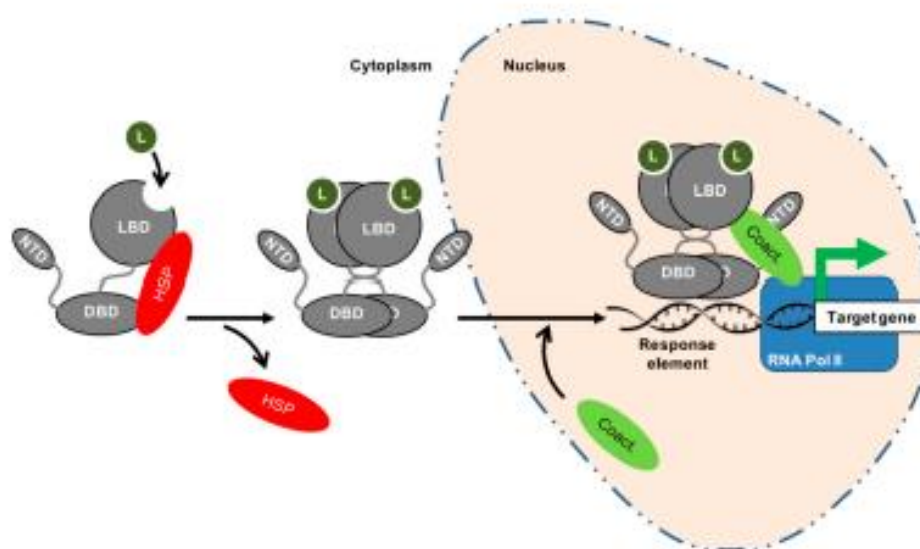


Figure 1. Schematic structure and functioning of steroid receptors. Nuclear receptors are composed of an N-terminal domain (NTD), a DNA-binding domain (DBD) responsible of the binding to the DNA-target sequences usually located within the promoters of the targets genes and a C-terminal ligand-binding domain (LBD), which is specific to the molecule. Canonically, it is admitted that steroid receptors are located within the cytoplasm in the absence of hormone, bound to heat shock proteins (HSP) that impede shuttling to the nucleus. The binding of the steroid (L) allows the chaperones to unbind from the receptor and migrate to the nucleus after a homodimerization. The binding of co-activators (Coact.) makes the recruitment of the transcriptional machinery possible, along with the RNA polymerase II (RNA Pol II), the transcription of the target gene, and the physiological effects.

However, other types of NR, such as the liver X receptors (LXR α /NR1H3 and LXR β /NR1H), function in a heterodimer with retinoid X receptors (RXRs, the receptor for 9-cis retinoic acid, NR2B1-3). In such signaling systems, the heterodimer complex resides bound to DNA in the absence of a ligand, with transcription blocked by the presence of co-repressors (Figure 2).

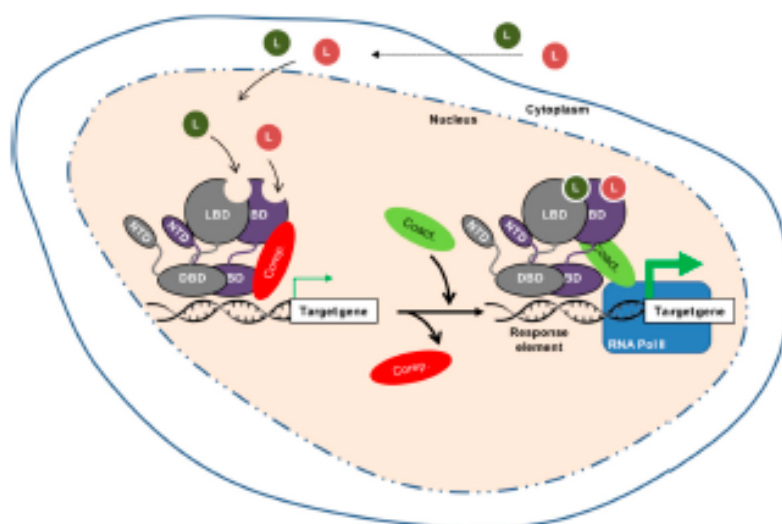


Figure 2 Schematic structure and functioning of nuclear receptors bound as heterodimers with retinoid X receptors (RXR). The non-steroid nuclear receptor (grey) is supposed to be bound with RXRs, a receptor for 9-*cis* retinoic acid (deep purple), to the DNA. In absence of ligand, the transcriptional activity is blocked (thin green arrow) by co-repressors (Corep.). As for the steroid receptors, the binding of co-activators (Coact.) makes possible the recruitment of the transcriptional machinery, along with the RNA polymerase II (RNA Pol II), the transcription of the target gene (thick green arrow), and the physiological effects.

Ligand binding triggers major conformational changes in the receptor's ligand-binding domain which leads to the dissociation of chaperones and/or corepressors, nuclear translocation (when necessary) and DNA-binding, and the recruitment of coactivators. Thus, it initiates gene transcription [7] (Figures 1 and 2). Hence, in the presence of an agonist in the ligand-binding pocket, corepressors dissociate and the recruitment of transcriptional coactivators is favored. Reciprocally, interactions with an antagonist represses association with coactivators and enables corepressor recruitment. The ligand-binding domain may also contribute to the modulation of the N-terminal AF-1 through inter-domain crosstalk, allowing activating domains to recruit coactivators individually or in a synergistic manner [7].

2 Nuclear Receptors Are Fundamental for Prostate Physiology

Androgen [8] and/or estrogen [9] deregulations have been associated with the development of PCa. Their respective NRs are targeted in the treatment of this tumor. Besides these classical steroid NRs, newly considered steroid receptors such as LXR α and LXR β [10] have emerged as interesting players in both prostate homeostasis and carcinogenesis [11–13]. This section will be focused on the androgen (AR/NR3C4), estrogen (ER α /NR3A1 and ER β /NR3A2), and oxysterol (LXRs) receptors, and their putative interactions in maintaining prostate physiology.

2.1 Role of AR in Prostate Physiology and in PCa

Since pioneering work from Higgins and Hodges was published in 1941 [8], it has been well established that androgen regulation signaling is one of the hallmarks of PCa. If testosterone is the principle circulating androgen, the most active androgen in the prostate remains 5 α -dihydrotestosterone (DHT), produced by conversion of testosterone by 5 α -reductase type 2 (SRD5A2), which binds their nuclear receptor with two to ten-fold higher affinity than testosterone [14]. DHT exerts its activity through AR-regulated transcription of genes involved in cell differentiation, development, survival, and function of the prostate in adulthood. Androgens may

also exert rapid, AR-dependent non-genomic effects. In this process, cytoplasmic AR can induce kinase-signaling pathways such as mitogen-activated protein kinases (MAPK) or phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT, which ultimately influence AR signaling through the phosphorylation of AR itself or AR co-regulators (for a review see [15]). Part of this mechanism could explain therapeutic failures when anti-androgens have no effect on androgen target genes despite AR remaining active.

2.1.1. Androgens Are Involved in Prostate Differentiation, Growth, and Functioning

Various knock-out models for AR have pointed out that the initiation of prostate development needs a functional AR [16], even though a correct organization of the future prostate also involves mesenchymal/epithelial interactions, in which AR is required at the stromal level. Cunha and colleagues [17] showed that AR signaling is needed in the mesenchymal compartment for initiation of prostate development, but not in the epithelial compartment. The stromal cells express AR and secrete peptide growth factors in response to androgen signaling [18,19], which contribute to the prostate differentiation. Binding of these growth factors to their respective receptors on basal cells promotes their proliferation and differentiation first into intermediate cells, then into fully differentiated luminal cells [20]. Conversely, basal cells do not have AR [21,22]. In adulthood, maintenance of the prostate gland depends on the balance of growth-survival/apoptosis driven by androgens, which promote the survival of luminal epithelial cells. In animal models, supra-physiological levels of androgens result in an increase in cellular proliferation in the prostate [23]. Conversely, castration induces apoptosis in about 70% of luminal epithelial cells in adult male rats but has little or no effect on basal and stromal cells [24].

2.1.2. Androgens Drive Proliferation of Luminal Epithelial Cells in PCa

The malignant switch from benign luminal cells to cancerous adenocarcinoma cells is poorly understood, but regardless, AR activity still drives proliferation. This applies both in tumors which are dependent on circulating androgens and in more advanced, castrate resistant disease [25–27]. This signaling pathway pathologically allows androgen/AR complexes to bind to and enhance expression of survival and proliferation genes that are normally not regulated by these complexes in either intermediate cells or luminal cells [25–27]. Using ChIP-on-Chip and ChIP-Seq experiments, research groups have reported thousands of AR direct binding events in PCa cell lines and tissues, furthermore showing different binding patterns depending on the stages of cancer [28–30].

2.2. Role of ER in Prostate Physiology and in PCa

The physiological functions of estrogens in the prostate, other than their activity as antiandrogens, have been unclear for many years. The development of genetic mouse models and their study have helped decipher the role of 17 β -estradiol and its receptors in the prostate. 17 β -estradiol activity is mainly mediated through its specific nuclear receptors, ER α (NR3A1) and ER β (NR3A2) (for a review see Yaşar et al. [31]). As with AR, ERs control transcription via binding to distinct DNA sequences at target genes or through their non-genomic activity. In non-malignant human adult prostate tissue, ER α is mainly expressed in the stromal compartment where it is involved in stromal cell proliferation and differentiation [32], and it can be found in less than 2% of epithelial cells where it drives estrogen-mediation epithelial cell proliferation [33,34]. Conversely ER β is detected in 90% of epithelial cells [35–37], where it promotes cell homeostasis and differentiation [38].

During PCa initiation and progression, stromal ER α expression remains but up to 80% of all epithelial cells show an expression of ER α that rises from 0–2 to 80% in PCa [37]. Inversely, epithelial cells lose ER β , as it drops from 90 to 15% of cells in PCa [35,39,40]. Finally, the TRAMP and PB-Cre4/*Pten*^{loxP} PCa mouse models have helped to understand the respective opposite roles of both ERs, along with the significance of this change that is seen in PCa. While epithelial ER α is thought to be responsible of estrogen-mediated PCa growth, epithelial ER β is believed to have protective roles [41].

Epidemiological data have shown controversial results regarding the role of circulating estrogens. Local steroid production by prostate tumors, rather than circulating steroids, may play a major role in

driving PCa growth in men following androgen deprivation therapy [42]. While current research on the role of intracrine steroids focuses on intratumoral androgens, it is important to note that aromatase (CYP19A1), which catalyzes estradiol production from testosterone, is also altered in PCa tissues [43] and CYP19A1 expression could be 30-fold higher than normal in PCa metastatic tissues [44].

2.3. LXRs as Emerging Factors Regulating Prostate Physiology

LXR α and LXR β , encoded by two distinct genes, are composed of 447 and 460 amino acids, respectively (for a review see [10,45]). They cannot be formally considered as true isoforms; however, they share 77% of their identity within their DNA- and ligand-binding domains. Initially described as orphan receptors, Mangelsdorf's group demonstrated more than 20 years ago that LXRs were actually the receptors for oxysterols, oxidized derivatives of cholesterol [46,47]. Because oxysterols were described as bona fide ligands, it was suspected that LXRs could be involved in the regulation of cholesterol metabolism. Indeed, this was further demonstrated by the phenotype analysis of LXR-deficient mice [48]. Hence, the activation of both LXRs by their cognate oxysterol ligands reduces the intracellular concentration of cholesterol. This occurs through several means: (1) the increase of the cholesterol efflux via the transcription of *ABCG1* and *ABCA1*, two membrane transporters and target of LXRs; (2) the inhibition of the cholesterol influx by increasing the ubiquitin ligase inducible degrader of the LDL receptor (IDOL), which targets the LDL receptor; (3) the increase of cholesterol metabolism into bile acids (induction of CYP7A1) or steroids (induction of StAR); and (4) the increase of cholesterol storage.

In the prostate, we and others have explored the physiologic role of LXRs. Both isoforms are expressed in the prostate, in epithelial as well as in stromal cells. However, so far, it has not been possible to dissociate the exact role of each LXR isoform as they both compensate each other [49]. Fukuchi et al. first pointed out that *ABCA1* was downregulated by AR in LNCaP cells [50]. Furthermore, the same group showed that the activation of LXRs by the synthetic agonist T0901317 slows down LNCaP proliferation [51], suggesting a role of LXRs in the progression of CaP, or at least showing that these receptors could be pharmacologically targeted. LXRs and some of their target genes were found to be less accumulated during the progression of the androgen-dependent into androgen-independent relapsed tumors in a xenograft model [52].

The role of LXRs in the control of the apoptosis of prostate cells was also shown using various natural or synthetic ligands [11]; this occurs through the modulation of the membrane cholesterol content associated with the lipid rafts, thus decreasing the PI3K and survival pathways. Using new cellular models derived from the dorsal prostate, we showed that LXRs control both protein kinase B (or AKT) and MAPK phosphorylation pathways in a normal prostate's cell cycle [12]. This point is of importance as the Ras/MAPK pathway is essential to maintaining cellular homeostasis because of its implication in cell proliferation and differentiation. Additionally, this pathway is the second major signaling pathway whose deregulation has been associated to prostate tumorigenesis: it has been found up-regulated in 43% of primary tumors and in the greatest majority of metastases [53]. Furthermore, the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), which is able to inhibit p42/p44 MAPK signaling [54] and the proliferation and migratory ability of cancer cells, is upregulated upon LXR activation [55,56]. Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) and Wingless/Integrated (Wnt) pathways could also be deregulated in PCa [53]. Interestingly, LXR activation represses the JAK/STAT signaling pathway in the liver and decreases β -catenin accumulation, a crucial mediator of the Wnt pathway [57].

In parallel, our group pointed out that LXR-deficient mice fed with a high cholesterol diet presented a neoplasia within the prostate epithelium, characterized by the downregulation of the tumor suppressor Homeobox protein NKX3.1 and beta-microseminoprotein MSMB and the upregulation of pro-oncogenic factors such as CyclinD1 and CyclinD2 [58]. This was definitively due to the accumulation of the oncogene and histone methyl transferase enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), whose overexpression has been described in patients with an aggressive PCa [59]. The question

regarding any expression change with cancer progression is unclear. Indeed, OncoPrint[®] analysis did not show any difference for LXR α , while a slight significant difference was observed for LXR β [58].

Altogether, ex vivo and in vivo studies suggest that LXRs could be implicated in the progression of PCa and, thus, could represent a pharmacological target for its treatment (Figure 3).

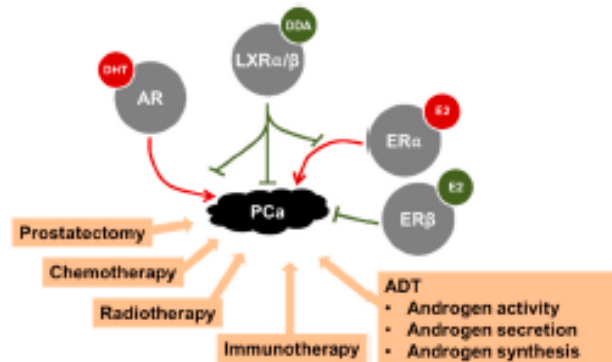


Figure 3. Summary of the various treatments proposed to treat PCa. A focus is made on some nuclear receptors. The androgen (AR) and estrogen receptor (ER) α have deleterious effects on prostate cancer (PCa) progression when activated by their respective ligands dihydrotestosterone (DHT) and 17 β -estradiol (E2). Conversely, nuclear oxysterol receptors (LXR α/β) and ER β block the progression of PCa in animal models when activated by their respective ligands. As indicated, AR and ER α activity in PCa could be modulated by LXRs, directly or indirectly. For more details see the text. DDA: dandrogenin A.

2.4. Androgens, Estrogens, and Oxysterols Interact in the Prostate

Despite their specific respective physiological roles on prostate physiology (see above sections), androgens, estrogens, and oxysterols cross interact through the transcriptional activation of their respective NRs.

2.4.1. LXRs Regulate the Availability of Active Steroids

As described above, prostate homeostasis is sensitive to steroids such as androgens and estrogens. All of these molecules derive from cholesterol. Regarding the binding to their respective receptors, the availability of androgens [60] and estrogens can be modulated by sulfotransferases, which inactivate the steroid activity [61]. Previous work has reported that sulfotransferase family 2A member 1 (SULT2A1) deactivating androgens is a LXR-target gene [62]. Indeed, ligand activated LXRs deprive cells from androgens through the increase of SULT2A1. Conversely, LXRs inhibit the expression of steroid sulfatase STS, an enzyme involved in the activation of androgens in prostate [63]. The level of active estrogens is also dependent of the levels of the estrogen sulfotransferase EST/SULT1E1. As for androgens, sulfated estrogens cannot bind to and activate ER activities [64].

2.4.2. AR, ER, and LXR Interaction within the Prostate

PC-3 AR-negative cells display a higher accumulation of LXR target genes [65], such as *ABCA1* and *ABCG1* [13,50,52]. A similar accumulation is also seen mouse models and in patients receiving androgen deprivation therapy [66]. Benign prostatic hyperplasia is a pathological situation due to an excessive activity of AR and the production of DHT [67]. Using transgenic animals, we [49] and others [68] described LXR α as a key modulator of the cross talk between the stromal and epithelial compartments, which is essential for the integration of androgen signaling in the prostate and its effect on the epithelium. We pointed out that LXR α -deficient mice have increased secretory activity in the epithelium resulting from a deregulation of the androgen signaling. No clear specific role

was identified for LXRs between the epithelial and the stromal compartments, suggesting a complex paracrine network regulated by these receptors [49]. Likewise, Tsui et al. [69] pointed out that LXR expression was higher in androgen-sensitive LNCaP cells than in other PCa cell lines, and activating LXRs by T0901317 in LNCaP cells decreases their AR accumulation and PSA production. Overall, AR and LXRs are definitively interconnected. Even it is not fully demonstrated for the prostate, it has also been shown that ERs down-regulate *LXR α* mRNA in mouse macrophages [70,71], through an estrogen response element in the *LXR α* promoter [70], suggesting a putative interaction between these two classes of receptors.

2.5. NR Activity Can Be Altered in Prostate Physiology by Environmental Disrupting Chemicals

Cholesterol-derived molecules are not the only ones that are able to modulate AR, ER, and LXR transcriptional activity (Figure 3). Indeed, environmental disrupting chemicals (EDCs) (reviewed in Delfosse et al. [72]) affect physiology in various ways by mimicking natural endogenous molecule activity, antagonizing their action, or modifying the synthesis, metabolism, and transport of these endogenous compounds. Due to their estrogen-like structure, the main harmful effects of EDCs have been attributed to their interference with hormone signaling mediated by NRs [72]. Hence, the physiologic roles controlled by the targeted NRs are altered. Historically, studies were focused on ER α and ER β , AR, and thyroid receptors TR α (NR1A1) and TR β (NR1A2). Then, because disorders of metabolic pathways have been associated to a higher risk of developing PCa, NRs controlling these processes have been the center of interest. Among them, peroxisome proliferator activated receptors (PPAR γ /NR1C3), retinoid receptors (RXRs/NR2B1-3), and LXR α and β /NR1H3 and 2 are abundantly studied due to their potential to be pharmacologically targeted (for a review on LXRs please refer to Maqdasy et al. [10]).

3. Lipid Metabolism, Angiogenesis and Immunity Are Altered in PCa

As for other cancers, prostate tumorigenesis is a multifactorial process that depends on cell modifications to allow for proliferation and growth. For that purpose, tumor cells usually (1) adapt their metabolism to produce enough cell components [73] and (2) induce molecular modifications to escape from cell cycle control.

3.1. Lipid and Cholesterol Metabolism in Cancer Cells

Among the numerous metabolic alterations that fuel cells and allow for the increased rate of growth and proliferation in cancer cells, the Warburg effect is a metabolic switch where cancer cells reprogram their glucose metabolism for "aerobic glycolysis", a process usually favored in anaerobic conditions [74]. Another example of an adaptation is citrate and fatty acid production. While citrate, necessary for secretion in prostatic fluid, is produced in large amount, it is used as a substrate for de novo fatty acid synthesis [75], which is found to be increased in PCa development [76].

A deregulation in cholesterol homeostasis has also long been associated to PCa [77,78]. Indeed, White described an "accumulation of crystals of lipid nature in tumors" suggesting that "cholesterol might be associated in some way with the regulation of cell proliferation" [78]. Interestingly this suspicion was later confirmed by Swyer who identified a two-fold increase of cholesterol content when prostates were affected by a hypertrophy [77]. More recently and using imaging data, prostate cancer aggressiveness has been associated with an aberrant accumulation of esterified cholesterol in lipid droplets [79]. However, no clear link has been made between cholesterolemia and Gleason score, positive nodal status, and/or positive surgical margins [80]. Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) is the key enzyme in endogenous de novo cholesterol synthesis and is inhibited by statins. Interestingly, the use of statin by patients suffering a hypercholesterolemia has been associated with improved PCa specific survival, particularly in men undergoing radiotherapy [81].

Additionally, and as presented above, LXRs increase the apoptosis of PCa cell lines by modifying the membrane distribution of cholesterol. Indeed, we pointed out that activated LXRs by various

natural or synthetic ligands could induce smaller and thinner lipid rafts and downregulate AKT phosphorylation in these lipid rafts [13]. LXRs also regulate the first step of prostate carcinogenesis since, as previously presented, LXR-deficient mice fed a high cholesterol diet have prostatic intra-epithelial neoplasia while wild-type mice do not. This indicates that LXRs could act as gatekeepers against PCa when cholesterol homeostasis tends to be destabilized.

Conversely, AR and androgens have been implicated in the increase of the intracellular concentration of cholesterol in PCa cells by inducing the accumulation of HMGCoA and transcription factor sterol response element binding protein (SREBP2), which increases cholesterol de novo synthesis, and by decreasing the amount of ABCA1 [82]. AR also decreases LXR activation in PCa by competing for their coactivators. For a review regarding the interaction between AR and LXRs refer to Cariello et al. [83].

Besides an increased endogenous synthesis of lipids, environmental factors such as food intake play a critical role in cancer development. Hence, it has been considered that food intake could represent the principal source of cholesterol [84]. It is thus not surprising that an enriched lipid diet could be described as a risk factor for developing PCa [85]. A similar positive association with a higher risk of developing PCa has been found for the consumption of products of animal origin [86].

3.2. Modification of Angiogenesis and Immunity

Immune system dysregulation is another feature of cancer development. Some studies show an interesting correlation between recurrent prostatitis and PCa, suggesting the importance of the immune system in prostate carcinogenesis [87]. Indeed, systemic and in situ inflammation could be observed in the tumor and stromal microenvironment. This inflammation is suspected to contribute to the tumor development by the supply of bioactive molecules, such as growth factors produced by the microenvironment immune cells. PCa has also been associated with the accumulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) [88]. Cyclooxygenase (COX) 2, a pro-inflammatory enzyme synthesizing iNOS is highly expressed in tumor-associated macrophages [89]. In the same way, IL6 is highly expressed in PCa and promotes tumor growth at least in part via PI3K/AKT signaling activation [90,91]. Noteworthy, LXRs downregulate inflammation by the parallel inhibition of iNOS, COX2, and IL6 expression [92,93]. Moreover, LXR activation is able to stimulate an antitumor immune response by promoting the secretion of IFN γ by macrophages and T-cells, a phenomenon that has been associated with an increase in survival of mice injected with lung carcinoma cells [94].

Tumor expansion depends on the availability of nutrients and oxygen and the ability to eliminate the waste produced by the high metabolism of the tumor cells. To avoid the microenvironment becoming hypoxic and poor in nutrients, cancer cells favor angiogenesis by increasing the production of vascular endothelial growth factor (VEGF). In PCa cells, VEGF is highly expressed. Moreover it has been shown that LXRs are able to decrease VEGF signaling by modifying the distribution of cholesterol at the membrane [95,96]. Logically, synthetic LXR agonist T0901317 blocks migration of endothelial cells and vessel tube formation [97].

Altogether, modulation of cholesterol homeostasis has a strong effect both on inflammation and angiogenesis within the prostate, two steps that are important for the progression of PCa to an advanced form of disease. Hence, the fact that identified metabolisms are altered during tumor development and metastasis process allows for the future possibility of using inhibitors of lipid synthesis, inflammation, and/or angiogenesis in patients with PCa.

4. Management of Prostate Cancer and Treatments

Even though this review is focused on the NRs in PCa, it is important to have a clear overview of the various management strategies as, according to what was described in the previous sections, anti-steroid therapy or novel molecules targeting LXRs could be applied depending on the stage of PC. Hence, medical care of the patients is based on whether the tumor is localized, if it is advanced, metastasized, or resistant to castration. Apart from classical treatments such as radio- or chemotherapy, specific strategies have been developed to target steroid production and have shown some efficacy.

Still, new strategies are to be developed to increase treatment efficacy. The treatments could also be combined in order to increase their efficacy.

4.1. Local PCa

Less than 5–10% of patients with low-grade, low-volume tumors will develop a PCa in the 10 years following diagnosis [98]. Based on the usually late age of diagnosis (usually above 70 years of age), deferred treatment and active surveillance are proposed to patients in order to prevent over-treatment that reduces mortality while decreasing the quality of life. About 80% of men with PCa have a localized disease [99]. For localized or locally advanced disease, the choice of treatment will be depending on the risk of progression of the tumor, life expectancy, and patient wishes. According to the European Association of Urology guidelines, radical prostatectomy is usually proposed to patients with low to high-risk PCa since they have a life expectancy >10 years. Radiation therapy is a suitable option for low-risk PCa and should be used in combination with androgen deprivation therapy (ADT) for intermediate/high-risk localized and locally advanced PCa.

4.2. Advanced and Metastatic PCa

Median survival for a patient newly diagnosed with metastatic PCa (about 5%) is at least 42 months. However, this is largely heterogeneous [100], and the first line standard approach for patient with advanced PCa is ADT [101]. Three main pharmacological treatments are proposed to block androgen effects. The first is treatment with LHRH ligands [102]. On one hand, agonists (mainly goserelin leuproline, and triptorelin) are able to downregulate the LHRH receptor, resulting in a huge decrease of LH/FSH secretions and testosterone production. On the other hand, LHRH antagonists (abarelix and degarelix) directly block the LHRL receptor and also result in the shut-down of testosterone production. The second treatment is the blockade of androgen synthesis. CYP17, the limiting enzyme for the production of androgens, is upregulated in CRPC [44] and can be inhibited by abiraterone treatment [103]. Ketoconazole has also been shown to block the adrenal steroidogenesis. This metabolic pathway is important as HSD3B1, which converts DHEA to androstenedione in prostate tissue as well as in the adrenal gland, is sometimes found highly expressed in PCa [104]. Likewise, AKR1C3, which converts weak adrenal androgens (e.g., DHEA and androstenedione) into T and DHT, is a good pharmacological target [105]. The third treatment is antiandrogens to antagonize AR and androgen action. These compounds could have either a steroid structure as cyproterone acetate or a non-steroid backbone, such as bicalutamide, flutamide, or nilutamide. Enzalutamide, also a non-steroidal antiandrogen, prevents AR nuclear translocation and has a higher affinity for AR than the widely used bicalutamide [106].

Together with ADT, chemotherapy may be performed. Recent clinical trials and meta-analyses show a 9% improved benefit on overall survival at four years of using docetaxel chemotherapy in combination with ADT for metastatic hormone-sensitive PCa [100].

4.3. Castration Resistant Prostate Cancer

Most patients experience tumor growth recovery despite being on ADT within a median of 18 to 24 months [107] and progress to a lethal stage called castration-resistant PCa (CRPC). The emergence of this aggressive form of PCa is diagnosed when blood PSA increases despite a low serum testosterone, followed by a progression of the disease with the appearance of new symptoms and bone or soft tissue lesions [108]. About 33% of men with a rise of PSA level will develop bone metastasis within two years [109], even though patients with CRPC are highly heterogeneous. Various genetic alterations have been associated to this CRPC, such as alterations in PI3K or in Wnt pathways and in the cell cycle or DNA repair processes [110].

However, AR pathway harbors the main alterations. Five general mechanisms are usually described to explain the emergence of CRPC. The first is the overexpression of the protein AR [111,112], even though AR expression is lost in a subset of metastatic CRPC (mCRPC) [113] and the mechanisms

associated to this complete androgen independence remain unclear. The second are the mutations of AR [114], which could induce a hypersensitivity to low levels of androgens, an antagonist-to-agonist switch for antiandrogens, or a receptor able to respond to non-canonical agonists like non-androgen steroids. The third is the upregulation of AR coactivators such as ARA70, which plays an important role in the antiandrogen antagonist-to-agonist switch in the DU145 PCa cell line [115], the forkhead box protein (FOXA1) [116], immunoglobulin transcription factor (ITF2), steroid receptor coactivator (SRC1) [117], lysine methyltransferase (EZH2) [118], and aldo-keto-reductase (AKR1C3) [119]. Conversely to breast cancer, no downregulation of co-repressors has been reported so far. The fourth is the activation of AR by tyrosine-kinase receptors linking the androgen regulated pathway with the growth factor signaling pathways. Hence, insulin like growth factor (IGF-1), keratin growth factor (KGF), and epidermal growth factor (EGF) can activate AR in vitro in the absence of a ligand [120]. Likewise, receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 (Her-2/neu) overexpression has been observed in 67% of CRPC tissue versus 20% of hormone-naive tissue [121,122] and participates in the activation of AR in absence of androgen through MAPK signaling [123]. Her-2/neu activation also increases AR stability [124]. The fifth is the intratumoral synthesis of active androgens. The primary source of androgens for the tumor cells are the testes, even though the adrenal glands [125] could, to a less extent, provide inactive androgens that are transformed into active hormones (5–10%). Additionally, as described above, some tumors synthesize their own active androgens by the abnormal production of cytochrome CYP17A1 and AKR1C3 or a higher activity of SRD5A1/3, which allows for the conversion of testosterone into DHT [126].

4.4. New Therapeutic Strategies for PCa Beside Steroids and NRs

For few years, therapeutic strategies have attempted to reduce overtreatment of metastatic CRPC (mCRPC) patients, which only offers little benefits to life expectancy while having a negative effect on quality of life. One strategy to prevent over-diagnosis of PCa has been to limit systematic PSA screening. However, metastatic PCa has been increasing in the USA. As PCa mortality is due to the progression of the disease, the new challenge for physicians and researchers is to propose new options to treat advanced and metastatic forms of PCa.

Chemotherapy with cabazitaxel, a novel taxane-derivate drug, is now a second-line option for docetaxel-resistant cancer. A TROPIC phase III clinical trial demonstrated an overall survival benefit of cabazitaxel (15.1 months) versus mitoxantrone (12.7 months) in docetaxel-resistant CRPC [127].

As PCa preferentially metastasizes in bone (90%) and primarily forms osteoblastic lesions [128], these metastases are incurable and contribute to tumor-specific morbidity and mortality [129]. Hence, radium 223, which is a radiopharmaceutical molecule, similar to calcium, improves overall survival by binding to newly formed bone and emitting radiation to induce apoptosis in the surrounding tumor cells [130]. Bisphosphonates slow down bone resorption and prevent loss of bone mass by binding hydroxyapatite and inhibiting osteoclast activity. Among them, zoledronic acid shows a delay in the emergence of skeletal-related events by 36% [131]. Targeting the bone microenvironment can also reduce skeletal-related events. Denosumab is a monoclonal antibody, which binds to receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) ligand, interfering with the activation of RANK at the surface of osteoclasts and thus inhibiting their proliferation, function, and survival while decreasing bone resorption. This molecule delays the time of apparition of first bone metastasis for about four months [132].

Cancer therapy is now facing the new era of immunotherapy. Recently, focus was made on immunotherapy of PCa since sipuleucel-T demonstrated significant, even limited, benefit on overall survival in a clinical trial on asymptomatic or little symptomatic mCRPC patients [133].

Even in CRPC, AR remains active and PCa cells are sensitive to a second-line of ADT. For CRPC patients, specific drugs have been developed such as abiraterone acetate and enzalutamide (see above).

Unfortunately, initial responders to second generation ADT inevitably become resistant to enzalutamide and abiraterone, and others develop acquired resistance [134]. So, for the last few

years, research has been focused on the comprehension of the molecular mechanisms inducing these resistances [134].

The discovery of new mechanisms of resistance will allow for the deciphering of new molecular pathways and encourage the development of future molecules, such as the currently under trial apalutamide (ARN-509, Janssen, Horsham, PA, USA), darolutamide (ODM-201, Orion, Espoo, Finland), proxalutamide (GT0918, Suzhou Kintor Pharmaceuticals, Suzhou, China), seviteronel (Viamet Pharmaceuticals, Research Triangle Park, NC/Innocrin Pharmaceuticals, Durham, NC, USA), ASN001 (Asana Biosciences, Lawrenceville, NJ, USA), and TRC253 (Janssen).

Recent results suggest that oxysterols and LXRs have a protective role against progression and dissemination of tumor cells. Indeed 27-hydroxycholesterol, a LXR ligand, reduces the invasive potential of LNCaP and PC3 PCa cells in *in vitro* cell invasion assays [135]. Pencheva and colleagues demonstrated in a melanoma model that treatment with an LXR agonist affected secretion of APOE by stromal cells resulted in a decrease in tumor growth, neoangiogenesis, and metastatic dissemination [136]. Likewise, Segala et al. pointed out that dendrogenin A, a newly discovered cholesterol metabolite and activator of LXRs, is able to specifically induce lethal autophagy of cancer cells *in vitro* and *in vivo* [137].

5. Conclusions

As already presented, cholesterol is an important molecule whose concentration needs to be controlled in prostate physiology. Since cholesterol is associated with the aggressiveness of prostate adenocarcinoma, targeting its metabolism appears to be an interesting theoretical therapy. Two pathways can be targeted: the mevalonate pathway, which is inhibited by the statins, and the LXR signaling pathway, which could be activated to tighten the control of cholesterol homeostasis. The modulation of both pathways will have a hypocholesterolemic effect.

Various epidemiological studies and meta-analyses have shown that the use of statins reduces the risk of PCa mortality [138] and, more importantly, decreases the risks associated with the development of advanced PCa [139] to present aggressive pathological features in histological analysis of prostatectomy specimens [140] or to develop distant metastasis in patients who were diagnosed with non-metastatic PCa [141]. A decrease in the time of response to ADT has also been reported in patients with hypercholesterolemia. Conversely, statins delay the emergence of CRPC in ADT treated patients [142]. However, it should be kept in mind that statins have numerous side effects.

Since the primary use of statins in PCa therapy is still controversial, the development of new selective liver X receptor modulators (SLiMs, [143]) is theoretically a good option to regulate the intra-prostatic levels of cholesterol. These tissue-specific LXR agonists would modulate intracellular levels of cholesterol in prostate tissue, be specific for each LXR isoform, and prevent any highly adverse side effect. Such a specific SLiM, GW6340, has already been developed. It promotes macrophage reverse cholesterol transport *in vivo* and thus exerts an anti-atherogenic effect without side effects linked to hepatic LXRs activation like elevated plasma triglycerides [144]. As LXR α seems to be the isoform responsible for the hepatic adverse effects observed upon pan-LXRs activation, the development of LXR β isoform-specific agonists actually mobilizes intense efforts from researchers. Currently, many molecules are under development [145]. Recently, BMS-852927, a novel partial LXR β -selective compound, was successfully tested in healthy human volunteers in a phase 1 ascending-dose study [146]. This study reported an increase in plasma and hepatic lipids and a decrease in circulating neutrophils in mice that was not observed in monkeys. These findings highlight the greatest difficulty in drug discovery to predict clinical responses in animal models. To date, RGX-104, a LXR β -selective agonist, is currently being tested in patients with advanced solid malignancies and lymphoma (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02922764). Expected effects of this molecule are a stimulation of antitumor immunity and an inhibitory action on angiogenesis. Likewise, Segala et al. showed that dendrogenin A is a natural specific activator of LXR usable in the treatment of cancers [137].

As the development of selective LXR agonists and *in vitro/in vivo* test is ongoing, the safe and effective use of SLiMs appears to will be promising notably for prostate cancer treatment, as well as other steroid-dependent tumors. Given the heterogeneity of the mechanisms of emergence of castration-resistance, the focus of interest should be combinatorial treatment in cancer therapeutic. SLiMs may be used in combination with current standard of care for the treatment of advanced PCa/mCRPC, like ADT, chemotherapy, or immunotherapy to potentiate their effects or to target multiple cancer-associated pathways and to reduce the risk of resistance development overall. Another benefit of combinatorial therapy is to diminish doses of administrated drugs and, likewise, to reduce deleterious side effect. In a xenograft mouse model of melanoma, combining LXR agonist treatment to frontline chemotherapy (dacarbazine) has shown a synergistic effect in reducing tumor growth [136]. This seems to be a direction for the future.

Funding: Funding was provided by the Région Auvergne-Rhône-Alpes, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques (ARTP), Fondation ARC, Ligue contre le Cancer, and AAP Plan Cancer Environnement 2016 for SB-JMAL lab. The funders had no role in data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments: We are deeply grateful to James Wilmouth (GRoD Lab) for his help in editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ABCA1/G1	ATP-binding cassette A1/G1
ADT	androgen deprivation therapy
AF1/2	activating function 1/2
AR	androgen receptor
COX2	cyclooxygenase 2
DHT	dihydrotestosterone
CRPC	castration-resistant prostate cancer
mCRPC	metastatic CRPC
ER	estrogen receptor
EST	estrogen sulfotransferase
EZH2	enhancer of Zeste homolog 2
Her-2/neu	receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
HMGCR	hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase
IDOL	inducible degrader of the LDL receptor
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
LDLR	LDL receptor
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MSMB	beta-microseminoprotein
NKX3.1	homeobox protein Nkx-3.1
NR	nuclear receptor
PCa	prostate cancer
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PSA	prostate specific antigen
RXR	retinoid X receptor
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
SR5A2	5 α -reductase type 2
SREBP	sterol response element binding protein
SLiMs	selective liver X receptor modulators
SULT2A1	sulfotransferase family 2A member 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wnt	Wingless/Integrated

References

- Bostwick, D.G.; Burke, H.B.; Djakiew, D.; Euling, S.; Ho, S.; Landolph, J.; Morrison, H.; Sonawane, B.; Shifflett, T.; Waters, D.J.; et al. Human prostate cancer risk factors. *Cancer* **2004**, *101*, 2371–2490. [CrossRef] [PubMed]
- Hsing, A.W.; Chu, L.W.; Stanczyk, F.Z. Androgen and prostate cancer: Is the hypothesis dead? *Cancer Epidemiol. Biomark.* **2008**, *17*, 2525–2530. [CrossRef] [PubMed]
- Härkönen, P.L.; Mäkelä, S.I. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 297–305. [CrossRef] [PubMed]
- Prins, G.S.; Korach, K.S. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* **2008**, *73*, 233–244. [CrossRef] [PubMed]
- Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157*, 255–266. [CrossRef] [PubMed]
- McKenna, N.J. Research Resources for Nuclear Receptor Signaling Pathways. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *90*, 153–159. [CrossRef] [PubMed]
- Helsen, C.; Claessens, F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *382*, 97–106. [CrossRef] [PubMed]
- Huggins, C.; Hodges, C.V. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res.* **1941**, *1*, 293–297. [CrossRef]
- Bonkhoff, H. Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression. *Prostate* **2018**, *78*, 2–10. [CrossRef] [PubMed]
- Maqdasy, S.; Trousson, A.; Tauveron, I.; Volle, D.H.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M.A. Once and for all, LXR α and LXR β are gatekeepers of the endocrine system. *Mol. Aspects Med.* **2016**, *49*, 31–46. [CrossRef] [PubMed]
- De Bousac, H.; Pommier, A.J.; Dufour, J.; Trousson, A.; Caira, F.; Volle, D.H.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M.A. LXR, prostate cancer and cholesterol: The Good, the Bad and the Ugly. *Am. J. Cancer Res.* **2013**, *3*, 58–69. [PubMed]
- Dufour, J.; Pommier, A.; Alves, G.; de Bousac, H.; Lours-Calet, C.; Volle, D.H.; Lobaccaro, J.-M.A.; Baron, S. Lack of Liver X Receptors Leads to Cell Proliferation in a Model of Mouse Dorsal Prostate Epithelial Cell. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58876. [CrossRef] [PubMed]
- Pommier, A.J.C.; 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. [CrossRef] [PubMed]
- Abdelgadir, S.E.; Connolly, P.B.; Resko, J.A. Androgen binding in peripheral tissues of fetal rhesus macaques: Effects of androgen metabolism in liver. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *37*, 545–551. [CrossRef]
- Heinlein, C.A.; Chang, C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 2181–2187. [CrossRef] [PubMed]
- Yeh, S.; Tsai, M.-Y.; Xu, Q.; Mu, X.-M.; Lardy, H.; Huang, K.-E.; Lin, H.; Yeh, S.-D.; Altuwajri, S.; Zhou, X.; et al. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13498–13503. [CrossRef] [PubMed]
- Cunha, G.R. The role of androgens in the epithelio-mesenchymal interactions involved in prostatic morphogenesis in embryonic mice. *Anat. Rec.* **1973**, *175*, 87–96. [CrossRef] [PubMed]
- Lu, W.; Luo, Y.; Kan, M.; McKeehan, W.L. Fibroblast Growth Factor-10 A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 12827–12834. [CrossRef] [PubMed]
- Planz, B.; Aretz, H.T.; Wang, Q.; Tabatabaei, S.; Kirley, S.D.; Lin, C.W.; McDougal, W.S. Immunolocalization of the keratinocyte growth factor in benign and neoplastic human prostate and its relation to androgen receptor. *Prostate* **1999**, *41*, 233–242. [CrossRef]
- Wikström, P.; Westin, P.; Stattin, P.; Damber, J.E.; Bergh, A. Early castration-induced upregulation of transforming growth factor beta1 and its receptors is associated with tumor cell apoptosis and a major decline in serum prostate-specific antigen in prostate cancer patients. *Prostate* **1999**, *38*, 268–277. [CrossRef]

21. Bonkhoff, H.; Remberger, K. Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Histopathol.* **1993**, *422*, 35–38. [[CrossRef](#)]
22. Mirosevich, J.; Bentel, J.M.; Zeps, N.; Redmond, S.L.; D'Antuono, M.F.; Dawkins, H.J. Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J. Endocrinol.* **1999**, *162*, 341–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Berry, S.J.; Isaacs, J.T. Comparative Aspects of Prostatic Growth and Androgen Metabolism with Aging in the Dog Versus the Rat. *Endocrinology* **1984**, *114*, 511–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. English, H.F.; Kyprianou, N.; Isaacs, J.T. Relationship between DNA fragmentation and apoptosis in the programmed cell death in the rat prostate following castration. *Prostate* **1989**, *15*, 233–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gao, J.; Isaacs, J.T. Development of an androgen receptor-null model for identifying the initiation site for androgen stimulation of proliferation and suppression of programmed (apoptotic) death of PC-82 human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3299–3306. [[PubMed](#)]
26. Gao, J.; Arnold, J.T.; Isaacs, J.T. Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5038–5044. [[PubMed](#)]
27. Memarzadeh, S.; Cai, H.; Janzen, D.M.; Xin, L.; Lukacs, R.; Riedinger, M.; Zong, Y.; DeGendt, K.; Verhoeven, G.; Huang, J.; et al. Role of autonomous androgen receptor signaling in prostate cancer initiation is dichotomous and depends on the oncogenic signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7962–7967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Massie, C.E.; Lynch, A.; Ramos-Montoya, A.; Boren, J.; Stark, R.; Fazli, L.; Warren, A.; Scott, H.; Madhu, B.; Sharma, N.; et al. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* **2011**, *30*, 2719–2733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Jin, H.-J.; Kim, J.; Yu, J. Androgen receptor genomic regulation. *Transl. Androl. Urol.* **2013**, *2*, 157–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sharma, N.L.; Massie, C.E.; Ramos-Montoya, A.; Zecchini, V.; Scott, H.E.; Lamb, A.D.; MacArthur, S.; Stark, R.; Warren, A.Y.; Mills, I.G.; et al. The androgen receptor induces a distinct transcriptional program in castration-resistant prostate cancer in man. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 35–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yaşar, P.; Ayaz, G.; User, S.D.; Güpür, G.; Muyan, M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod. Med. Biol.* **2017**, *16*, 4–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chen, M.; Hsu, L.; Wolfe, A.; Radovick, S.; Huang, K.; Yu, S.; Chang, C.; Messing, E.M.; Yeh, S. Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor- α null male mice. *Endocrinology* **2009**, *150*, 251–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chen, M.; Yeh, C.-R.; Chang, H.-C.; Vitkus, S.; Wen, X.-Q.; Bhowmick, N.A.; Wolfe, A.; Yeh, S. Loss of epithelial oestrogen receptor α inhibits oestrogen-stimulated prostate proliferation and squamous metaplasia via in vivo tissue selective knockout models. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 17–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vitkus, S.; Yeh, C.-R.; Lin, H.-H.; Hsu, L.; Yu, J.; Chen, M.; Yeh, S. Distinct function of estrogen receptor α in smooth muscle and fibroblast cells in prostate development. *Mol. Endocrinol.* **2013**, *27*, 38–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Leav, I.; Lau, K.M.; Adams, J.Y.; McNeal, J.E.; Taplin, M.E.; Wang, J.; Singh, H.; Ho, S.M. Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 79–92. [[CrossRef](#)]
36. Lau, K.M.; LaSpina, M.; Long, J.; Ho, S.M. Expression of estrogen receptor (ER)- α and ER- β in normal and malignant prostatic epithelial cells: Regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3175–3182. [[PubMed](#)]
37. Royuela, M.; de Miguel, M.P.; Bethencourt, F.R.; Sánchez-Chapado, M.; Fraile, B.; Arenas, M.I.; Paniagua, R. Estrogen receptors α and β in the normal, hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J. Endocrinol.* **2001**, *168*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Imamov, O.; Morani, A.; Shim, G.-J.; Omoto, Y.; Thulin-Andersson, C.; Warner, M.; Gustafsson, J.-A. Estrogen receptor β regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9375–9380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Latil, A.; Bièche, I.; Vidaud, D.; Lidereau, R.; Berthon, P.; Cussenot, O.; Vidaud, M. Evaluation of androgen, estrogen (ER α and ER β), and progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1919–1926. [PubMed]
40. Bonkhoff, H.; Fixemer, T.; Hunsicker, I.; Remberger, K. Estrogen Receptor Expression in Prostate Cancer and Premalignant Prostatic Lesions. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155*, 641–647. [CrossRef]
41. Slusarz, A.; Jackson, G.A.; Day, J.K.; Shenouda, N.S.; Bogener, J.L.; Browning, J.D.; Fritsche, K.L.; MacDonald, R.S.; Besch-Williford, C.L.; Lubahn, D.B. Aggressive prostate cancer is prevented in ER α KO mice and stimulated in ER β KO TRAMP mice. *Endocrinology* **2012**, *153*, 4160–4170. [CrossRef] [PubMed]
42. Mohler, J.L.; Gregory, C.W.; Ford, O.H.; Kim, D.; Weaver, C.M.; Petrusz, P.; Wilson, E.M.; French, F.S. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 440–448. [CrossRef] [PubMed]
43. Ellem, S.J.; Schmitt, J.F.; Pedersen, J.S.; Frydenberg, M.; Risbridger, G.P. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, *89*, 2434–2441. [CrossRef] [PubMed]
44. Montgomery, R.B.; Mostaghel, E.A.; Vessella, R.; Hess, D.L.; Kalhorn, T.F.; Higano, C.S.; True, L.D.; Nelson, P.S. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4447–4454. [CrossRef] [PubMed]
45. Wang, B.; Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2018**, *14*, 452–463. [CrossRef] [PubMed]
46. Janowski, B.A.; Willy, P.J.; Devi, T.R.; Falck, J.R.; Mangelsdorf, D.J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* **1996**, *383*, 728–731. [CrossRef] [PubMed]
47. Janowski, B.A.; Grogan, M.J.; Jones, S.A.; Wisely, G.B.; Kliewer, S.A.; Corey, E.J.; Mangelsdorf, D.J. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 266–271. [CrossRef] [PubMed]
48. Peet, D.J.; Turley, S.D.; Ma, W.; Janowski, B.A.; Lobaccaro, J.M.; Hammer, R.E.; Mangelsdorf, D.J. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell* **1998**, *93*, 693–704. [CrossRef]
49. Viennois, E.; Esposito, T.; Dufour, J.; Pommier, A.; Fabre, S.; Kemeny, J.-L.; Guy, L.; Morel, L.; Lobaccaro, J.-M.; Baron, S. LXR α Regulates the Androgen Response in Prostate Epithelium. *Endocrinology* **2012**, *153*, 3211–3223. [CrossRef] [PubMed]
50. Fukuchi, J.; Hiipakka, R.A.; Kokontis, J.M.; Hsu, S.; Ko, A.L.; Fitzgerald, M.L.; Liao, S. Androgenic suppression of ATP-binding cassette transporter A1 expression in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7682–7685. [CrossRef] [PubMed]
51. Fukuchi, J.; Kokontis, J.M.; Hiipakka, R.A.; Chuu, C.; Liao, S. Antiproliferative Effect of Liver X Receptor Agonists on LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7686–7689. [CrossRef] [PubMed]
52. Chuu, C.; Hiipakka, R.A.; Kokontis, J.M.; Fukuchi, J.; Chen, R.-Y.; 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. [CrossRef] [PubMed]
53. Taylor, B.S.; Schultz, N.; Hieronymus, H.; Gopalan, A.; Xiao, Y.; Carver, B.S.; Arora, V.K.; Kaushik, P.; Cerami, E.; Reva, B.; et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2010**, *18*, 11–22. [CrossRef] [PubMed]
54. Puhr, M.; Santer, F.R.; Neuwirt, H.; Marcias, G.; Hobisch, A.; Culig, Z. SOCS-3 antagonises the proliferative and migratory effects of fibroblast growth factor-2 in prostate cancer by inhibition of p44/p42 MAPK signalling. *Endocr. Relat. Cancer* **2010**, *17*, 525–538. [CrossRef] [PubMed]
55. Fu, W.; Yao, J.; Huang, Y.; Li, Q.; Li, W.; Chen, Z.; He, F.; Zhou, Z.; Yan, J. LXR Agonist Regulates the Carcinogenesis of PCa via the SOCS3 Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 195–204. [CrossRef] [PubMed]
56. Xiong, H.; Zhang, Y.; Chen, S.; Ni, Z.; He, J.; Li, X.; Li, B.; Zhao, K.; Yang, F.; Zeng, Y.; et al. Induction of SOCS3 by liver X receptor suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 64083–64094. [CrossRef] [PubMed]
57. Youlin, K.; Li, Z.; Weiyang, H.; Jian, K.; Siming, L.; Xin, G. Liver X receptor activation inhibits PC-3 prostate cancer cells via the beta-catenin pathway. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*, 267–270. [CrossRef] [PubMed]

58. Pommier, A.J.C.; Dufour, J.; Alves, G.; Viennois, E.; de Boussac, H.; Trousson, A.; Volle, D.H.; Caira, F.; Val, P.; Arnaud, P.; et al. Liver X receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003483. [CrossRef] [PubMed]
59. Varambally, S.; Dhanasekaran, S.M.; Zhou, M.; Barrette, T.R.; Kumar-Sinha, C.; Sanda, M.G.; Ghosh, D.; Pienta, K.J.; Sewalt, R.G.A.B.; Otte, A.P.; et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **2002**, *419*, 624–629. [CrossRef] [PubMed]
60. Tamae, D.; Mostaghel, E.; Montgomery, B.; Nelson, P.S.; Balk, S.P.; Kantoff, P.W.; Taplin, M.-E.; Penning, T.M. The DHEA-sulfate depot following P450c17 inhibition supports the case for AKR1C3 inhibition in high risk localized and advanced castration resistant prostate cancer. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *234*, 332–338. [CrossRef] [PubMed]
61. Pasqualini, J.R. Estrogen sulfotransferases in breast and endometrial cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1155*, 88–98. [CrossRef] [PubMed]
62. Lee, J.H.; Gong, H.; Khadem, S.; Lu, Y.; Gao, X.; Li, S.; Zhang, J.; Xie, W. Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* **2008**, *149*, 3778–3788. [CrossRef] [PubMed]
63. Gong, H.; Guo, P.; Zhai, Y.; Zhou, J.; Uppal, H.; Jarzynka, M.J.; Song, W.-C.; Cheng, S.-Y.; Xie, W. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 1781–1790. [CrossRef] [PubMed]
64. Song, W.C. Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *948*, 43–50. [CrossRef] [PubMed]
65. Dozmorov, M.G.; Hurst, R.E.; Culkin, D.J.; Kropp, B.P.; Frank, M.B.; Osban, J.; Penning, T.M.; Lin, H.-K. Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. *Prostate* **2009**, *69*, 1077–1090. [CrossRef] [PubMed]
66. Sekine, Y.; Demosky, S.J.; Stonik, J.A.; Furuya, Y.; Koike, H.; Suzuki, K.; Remaley, A.T. High-density lipoprotein induces proliferation and migration of human prostate androgen-independent cancer cells by an ABCA1-dependent mechanism. *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 1284–1294. [CrossRef] [PubMed]
67. Füllhase, C.; Schneider, M.P. 5- α -Reductase Inhibitors and Combination Therapy. *Urol. Clin.* **2016**, *43*, 325–336. [CrossRef] [PubMed]
68. Kim, H.-J.; Andersson, L.C.; Bouton, D.; Warner, M.; Gustafsson, J.-A. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 558–563. [CrossRef] [PubMed]
69. Tsui, K.-H.; Chung, L.-C.; Feng, T.-H.; Lee, T.-Y.; Chang, P.-L.; Chen, W.-T.; Juang, H.-H. Divergent effect of liver X receptor agonists on prostate-specific antigen expression is dependent on androgen receptor in prostate carcinoma cells. *Prostate* **2015**, *75*, 603–615. [CrossRef] [PubMed]
70. Lundholm, L.; Moverare, S.; Steffensen, K.R.; Nilsson, M.; Otsuki, M.; Ohlsson, C.; Gustafsson, J.A.; Dahlman-Wright, K. Gene expression profiling identifies liver X receptor α as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue. *J. Mol. Endocrinol.* **2004**, *32*, 879–892. [CrossRef] [PubMed]
71. Kramer, P.R.; Wray, S. 17- β -estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *81*, 203–216. [CrossRef]
72. Delfosse, V.; le Maire, A.; Balaguer, P.; Bourguet, W. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, *36*, 88–101. [CrossRef] [PubMed]
73. Schulze, A.; Harris, A.L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* **2012**, *491*, 364–373. [CrossRef] [PubMed]
74. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **1956**, *124*, 269–270. [PubMed]
75. Mycielska, M.E.; Patel, A.; Rizer, N.; Mazurek, M.P.; Keun, H.; Patel, A.; Ganapathy, V.; Djamgoz, M.B.A. Citrate transport and metabolism in mammalian cells. *BioEssays* **2009**, *31*, 10–20. [CrossRef] [PubMed]
76. Swinnen, J.V.; Roskams, T.; Joniau, S.; van Poppel, H.; Oyen, R.; Baert, L.; Heyns, W.; Verhoeven, G. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 19–22. [CrossRef] [PubMed]
77. Swyer, G.I.M. The Cholesterol Content of Normal and Enlarged Prostates. *Cancer Res.* **1942**, *2*, 372–375.
78. White, C.P. On the occurrence of crystals in tumours. *J. Pathol. Bacteriol.* **1909**, *13*, 3–10. [CrossRef]
79. Yue, S.; Li, J.; Lee, S.-Y.; Lee, H.J.; Shao, T.; Song, B.; Cheng, L.; Masterson, T.A.; Liu, X.; Rathliff, T.L.; et al. Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 393–406. [CrossRef] [PubMed]

80. Wettstein, M.S.; Saba, K.; Umbehr, M.H.; Murtola, T.J.; Fankhauser, C.D.; Adank, J.-P.; Hofmann, M.; Sulser, T.; Hermanns, T.; Moch, H.; et al. Prognostic Role of Preoperative Serum Lipid Levels in Patients Undergoing Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Prostate* **2017**, *77*, 549–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Alfaqih, M.A.; Allott, E.H.; Hamilton, R.J.; Freeman, M.R.; Freedland, S.J. The current evidence on statin use and prostate cancer prevention: Are we there yet? *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 107–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Krycer, J.R.; Brown, A.J. Cross-talk between the androgen receptor and the liver X receptor: Implications for cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20637–20647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Cariello, M.; Ducheix, S.; Maqdasy, S.; Baron, S.; Moschetta, A.; Lobaccaro, J. LXRs, SHP and FXR in prostate cancer: Enemies or Ménage-à-quatre with AR? *Nucl. Recept. Signal.* **2018**, in press.
84. Morris, M.D.; Chaikoff, I.L. The origin of cholesterol in liver, small intestine, adrenal gland, and testis of the rat: Dietary versus endogenous contributions. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1095–1097. [[PubMed](#)]
85. Schaffner, C.P. Prostatic cholesterol metabolism: Regulation and alteration. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1981**, *75A*, 279–324. [[PubMed](#)]
86. Michaud, D.S.; Augustsson, K.; Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Willet, W.C.; Giovannucci, E. A prospective study on intake of animal products and risk of prostate cancer. *Cancer Causes Control* **2001**, *12*, 557–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. De Marzo, A.M.; Platz, E.A.; Sutcliffe, S.; Xu, J.; Grönberg, H.; Drake, C.G.; Nakai, Y.; Isaacs, W.B.; Nelson, W.G. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 256–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Aaltoma, S.H.; Lipponen, P.K.; Kosma, V.M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 3101–3106. [[PubMed](#)]
89. Tsai, C.-S.; Chen, F.-H.; Wang, C.-C.; Huang, H.-L.; Jung, S.-M.; Wu, C.-J.; Lee, C.-C.; McBride, W.H.; Chiang, C.-S.; Hong, J.-H. Macrophages From Irradiated Tumors Express Higher Levels of iNOS, Arginase-I and COX-2, and Promote Tumor Growth. *Int. J. Radiat. Oncol.* **2007**, *68*, 499–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Twillie, D.A.; Eisenberger, M.A.; Carducci, M.A.; Hsieh, W.-S.; Kim, W.Y.; Simons, J.W. Interleukin-6: A candidate mediator of human prostate cancer morbidity. *Urology* **1995**, *45*, 542–549. [[CrossRef](#)]
91. Siegmund, M.J.; Yamazaki, H.; Pastan, I. Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *J. Urol.* **1994**, *151*, 1396–1399. [[CrossRef](#)]
92. Castrillo, A.; Joseph, S.B.; Vaidya, S.A.; Haberland, M.; Fogelman, A.M.; Cheng, G.; Tontonoz, P. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 805–816. [[CrossRef](#)]
93. Joseph, S.B.; Castrillo, A.; Laffitte, B.A.; Mangelsdorf, D.J.; Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 213–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Wang, Q.; Ma, X.; Chen, Y.; Zhang, L.; Jiang, M.; Li, X.; Xiang, R.; Miao, R.; Hajjar, D.P.; Duan, Y.; et al. Identification of interferon- γ as a new molecular target of liver X receptor. *Biochem. J.* **2014**, *459*, 345–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Labrecque, L.; Royal, L.; Surprenant, D.S.; Patterson, C.; Gingras, D.; Béliveau, R. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Activity by Caveolin-1 and Plasma Membrane Cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 334–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Noghero, A.; Perino, A.; Seano, G.; Saglio, E.; Lo Sasso, G.; Veglio, F.; Primo, L.; Hirsch, E.; Bussolino, F.; Morello, F. Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2280–2288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Lai, C.-J.; Cheng, H.-C.; Lin, C.-Y.; Huang, S.-H.; Chen, T.-H.; Chung, C.-J.; Chang, C.-H.; Wang, H.-D.; Chuu, C.-P. Activation of liver X receptor suppresses angiogenesis via induction of ApoD. *FASEB J.* **2017**, *31*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Albertsen, P.C. Observational studies and the natural history of screen-detected prostate cancer. *Curr. Opin. Urol.* **2015**, *25*, 232–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **2016**, *66*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. James, N.D.; Sydes, M.R.; Clarke, N.W.; Mason, M.D.; Dearnaley, D.P.; Spears, M.R.; Ritchie, A.W.S.; Parker, C.C.; Russell, J.M.; Attard, G.; et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **2016**, *387*, 1163–1177. [[CrossRef](#)]

101. Sweeney, C.J.; Chen, Y.-H.; Carducci, M.; Liu, G.; Jarrard, D.F.; Eisenberger, M.; Wong, Y.-N.; Hahn, N.; Kohli, M.; Cooney, M.M.; et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 737–746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Klotz, L.; Boccon-Gibod, L.; Shore, N.D.; Andreou, C.; Persson, B.-E.; Cantor, P.; Jensen, J.-K.; Olesen, T.K.; Schröder, F.H. The efficacy and safety of degarelix: A 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU Int.* **2008**, *102*, 1531–1538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Attard, G.; Reid, A.H.M.; A'Hern, R.; Parker, C.; Oommen, N.B.; Folkerd, E.; Messiou, C.; Molife, L.R.; Maier, G.; Thompson, E.; et al. Selective Inhibition of CYP17 With Abiraterone Acetate Is Highly Active in the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3742–3748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Chang, K.-H.; Li, R.; Kuri, B.; Lotan, Y.; Roehrborn, C.G.; Liu, J.; Vessella, R.; Nelson, P.S.; Kapur, P.; Guo, X.; et al. A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell* **2013**, *154*, 1074–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Hamid, A.R.A.H.; Pfeiffer, M.J.; Verhaegh, G.W.; Schaafsma, E.; Brandt, A.; Sweep, F.C.G.J.; Sedelaar, J.P.M.; Schalken, J.A. Aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3) is a biomarker and therapeutic target for castration-resistant prostate cancer. *Mol. Med. Camb. Mass* **2013**, *18*, 1449–1455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Tran, C.; Ouk, S.; Clegg, N.J.; Chen, Y.; Watson, P.A.; Arora, V.; Wongvipat, J.; Smith-Jones, P.M.; Yoo, D.; Kwon, A.; et al. Development of a Second-Generation Antiandrogen for Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Science* **2009**, *324*, 787–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Sharifi, N.; Dahut, W.L.; Steinberg, S.M.; Figg, W.D.; Tarassoff, C.; Arlen, P.; Gulley, J.L. A retrospective study of the time to clinical endpoints for advanced prostate cancer. *BJU Int.* **2005**, *96*, 985–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Cornford, P.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Briers, E.; de Santis, M.; Gross, T.; Henry, A.M.; Joniau, S.; Lam, T.B.; Mason, M.D.; et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2017**, *71*, 630–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Smith, M.R.; Kabbinavar, F.; Saad, F.; Hussain, A.; Gittelman, M.C.; Bihartz, D.L.; Wynne, C.; Murray, R.; Zinner, N.R.; Schulman, C.; et al. Natural history of rising serum prostate-specific antigen in men with castrate nonmetastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2918–2925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Robinson, D.; van Allen, E.M.; Wu, Y.-M.; Schultz, N.; Lonigro, R.J.; Mosquera, J.-M.; Montgomery, B.; Taplin, M.-E.; Pritchard, C.C.; Attard, G.; et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell* **2015**, *162*, 454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Visakorpi, T.; Hyytinen, E.; Koivisto, P.; Tanner, M.; Keinänen, R.; Palmberg, C.; Palotie, A.; Tammela, T.; Isola, J.; Kallioniemi, O.-P. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat. Genet.* **1995**, *9*, 401–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Chen, C.D.; Welsbie, D.S.; Tran, C.; Baek, S.H.; Chen, R.; Vessella, R.; Rosenfeld, M.G.; Sawyers, C.L. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 33–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Komiya, A.; Yasuda, K.; Watanabe, A.; Fujiuchi, Y.; Tsuzuki, T.; Fuse, H. The prognostic significance of loss of the androgen receptor and neuroendocrine differentiation in prostate biopsy specimens among castration-resistant prostate cancer patients. *Mod. Clin. Oncol.* **2013**, *1*, 257–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Waltering, K.K.; Urbanucci, A.; Visakorpi, T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *360*, 38–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Miyamoto, H.; Yeh, S.; Wilding, G.; Chang, C. Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 7379–7384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Gerhardt, J.; Montani, M.; Wild, P.; Beer, M.; Huber, F.; Hermanns, T.; Müntener, M.; Kristiansen, G. FOXA1 Promotes Tumor Progression in Prostate Cancer and Represents a Novel Hallmark of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Am. J. Pathol.* **2012**, *180*, 848–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Gregory, C.W.; He, B.; Johnson, R.T.; Ford, O.H.; Mohler, J.L.; French, F.S.; Wilson, E.M. A Mechanism for Androgen Receptor-mediated Prostate Cancer Recurrence after Androgen Deprivation Therapy. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4315–4319. [[PubMed](#)]

118. Xu, K.; Wu, Z.J.; Groner, A.C.; He, H.H.; Cai, C.; Lis, R.T.; Wu, X.; Stack, E.C.; Loda, M.; Liu, T.; et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* **2012**, *338*, 1465–1469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Yepuru, M.; Wu, Z.; Kulkarni, A.; Yin, F.; Barrett, C.M.; Kim, J.; Steiner, M.S.; Miller, D.D.; Dalton, J.T.; Narayanan, R. Steroidogenic enzyme AKR1C3 is a novel androgen receptor-selective coactivator that promotes prostate cancer growth. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5613–5625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Culig, Z.; Hobisch, A.; Cronauer, M.V.; Radmayr, C.; Trapman, J.; Hittmair, A.; Bartsch, G.; Klocker, H. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5474–5478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Signoretti, S.; Montironi, R.; Manola, J.; Altissimi, A.; Tam, C.; Bubley, G.; Balk, S.; Thomas, G.; Kaplan, L.; Hlatky, L.; et al. Her-2-neu Expression and Progression Toward Androgen Independence in Human Prostate Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1918–1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Osman, I.; Scher, H.I.; Drobnjak, M.; Verbel, D.; Morris, M.; Agus, D.; Ross, J.S.; Cordon-Cardo, C. HER-2/neu (p185neu) Protein Expression in the Natural or Treated History of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2643–2647. [[PubMed](#)]
123. Yeh, S.; Lin, H.-K.; Kang, H.-Y.; Thin, T.H.; Lin, M.-F.; Chang, C. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: A novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5458–5463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Mellingerhoff, I.K.; Vivanco, L.; Kwon, A.; Tran, C.; Wongvipat, J.; Sawyers, C.L. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 517–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Labrie, F. Adrenal androgens and intracrinology. *Semin. Reprod. Med.* **2004**, *22*, 299–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Mitsiades, N.; Sung, C.C.; Schultz, N.; Danila, D.C.; He, B.; Eedunuri, V.K.; Fleisher, M.; Sander, C.; Sawyers, C.L.; Scher, H.I. Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 6142–6152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. De Bono, J.S.; Oudard, S.; Ozguroglu, M.; Hansen, S.; Machiels, J.-P.; Kocak, I.; Gravis, G.; Bodrogi, L.; Mackerzie, M.J.; Shen, L.; et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: A randomised open-label trial. *Lancet* **2010**, *376*, 1147–1154. [[CrossRef](#)]
128. Bubendorf, L.; Schöpfer, A.; Wagner, U.; Sauter, G.; Moch, H.; Willi, N.; Gasser, T.C.; Mihatsch, M.J. Metastatic patterns of prostate cancer: An autopsy study of 1589 patients. *Hum. Pathol.* **2000**, *31*, 578–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Weinfurt, K.P.; Li, Y.; Castel, L.D.; Saad, F.; Timbie, J.W.; Glendenning, G.A.; Schulman, K.A. The significance of skeletal-related events for the health-related quality of life of patients with metastatic prostate cancer. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 579–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Parker, C.; Nilsson, S.; Heinrich, D.; Helle, S.I.; O'Sullivan, J.M.; Fosså, S.D.; Chodacki, A.; Wiechno, P.; Logue, J.; Seke, M.; et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 213–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Saad, F.; Gleason, D.M.; Murray, R.; Tchekmedyian, S.; Verner, P.; Lacombe, L.; Chin, J.L.; Vinholes, J.J.; Goas, J.A.; Zheng, M. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 879–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Smith, M.R.; Saad, F.; Coleman, R.; Shore, N.; Fizazi, K.; Tombal, B.; Miller, K.; Sieber, P.; Karsh, L.; Damião, R.; et al. Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: Results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* **2012**, *379*, 39–46. [[CrossRef](#)]
133. Kantoff, P.W.; Higano, C.S.; Shore, N.D.; Berger, E.R.; Small, E.J.; Penson, D.F.; Redfern, C.H.; Ferrari, A.C.; Dreicer, R.; Sims, R.B.; et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 411–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Antonarakis, E.S.; Lu, C.; Wang, H.; Luber, B.; Nakazawa, M.; Roeser, J.C.; Chen, Y.; Mohammad, T.A.; Chen, Y.; Fedor, H.L.; et al. AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1028–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

135. Raza, S.; Meyer, M.; Goodyear, C.; Hammer, K.D.P.; Guo, B.; Ghribi, O. The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol stimulates cell proliferation via ER β in prostate cancer cells. *Cancer Cell Int.* **2017**, *17*, 52. [CrossRef] [PubMed]
136. Pencheva, N.; Buss, C.G.; Posada, J.; Merghoub, T.; Tavazoie, S.F. Broad-Spectrum Therapeutic Suppression of Metastatic Melanoma through Nuclear Hormone Receptor Activation. *Cell* **2014**, *156*, 986–1001. [CrossRef] [PubMed]
137. Segala, G.; David, M.; de Medina, P.; Poirot, M.C.; Serhan, N.; Vergez, E.; Mougel, A.; Saland, E.; Carayon, K.; Leignadier, J.; et al. Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1903. [CrossRef] [PubMed]
138. Zhong, S.; Zhang, X.; Chen, L.; Ma, T.; Tang, J.; Zhao, J. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 554–567. [CrossRef] [PubMed]
139. Platz, E.A.; Leitzmann, M.F.; Visvanathan, K.; Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C.; Giovannucci, E. Statin drugs and risk of advanced prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 1819–1825. [CrossRef] [PubMed]
140. Loeb, S.; Kan, D.; Helfand, B.T.; Nadler, R.B.; Catalona, W.J. Is statin use associated with prostate cancer aggressiveness? *BJU Int.* **2010**, *105*, 1222–1225. [CrossRef] [PubMed]
141. Harshman, L.C.; Wang, X.; Nakabayashi, M.; Xie, W.; Valenca, L.; Werner, L.; Yu, Y.; Kantoff, A.M.; Sweeney, C.J.; Mucci, L.A.; et al. Statin Use at the Time of Initiation of Androgen Deprivation Therapy and Time to Progression in Patients With Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *JAMA Oncol.* **2015**, *1*, 495–504. [CrossRef] [PubMed]
142. Harshman, L.C.; Werner, L.; Tripathi, A.; Wang, X.; Maughan, B.L.; Antonarakis, E.S.; Nakabayashi, M.; McKay, R.; Pomerantz, M.; Mucci, L.A.; et al. The impact of statin use on the efficacy of abiraterone acetate in patients with castration-resistant prostate cancer. *Prostate* **2017**, *77*, 1303–1311. [CrossRef] [PubMed]
143. Viennois, E.; Pommier, A.J.C.; Mouzat, K.; Oumeddour, A.; El Hajjaji, F.-Z.; Dufour, J.; Caira, F.; Volle, D.H.; Baron, S.; Lobaccaro, J.-M.A. Targeting liver X receptors in human health: Deadlock or promising trail? *Expert. Opin. Ther. Targets* **2011**, *15*, 219–232. [CrossRef] [PubMed]
144. Yasuda, T.; Grillot, D.; Billheimer, J.T.; Briand, F.; Delerive, P.; Huet, S.; Rader, D.J. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage RCT in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 781–786. [CrossRef] [PubMed]
145. Stachel, S.J.; Zerbinatti, C.; Rudd, M.T.; Cosden, M.; Suon, S.; Nanda, K.K.; Wessner, K.; DiMuzio, J.; Maxwell, J.; Wu, Z.; et al. Identification and in Vivo Evaluation of Liver X Receptor β -Selective Agonists for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 3489–3498. [CrossRef] [PubMed]
146. Kirchgessner, T.G.; Slep, P.; Ostrowski, J.; Lupisella, J.; Ryan, C.S.; Liu, X.; Fernando, G.; Grimm, D.; Shipkova, P.; Zhang, R.; et al. Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 223–233. [CrossRef] [PubMed]



2. Annexe 2



Contents lists available at ScienceDirect

Chemistry and Physics of Lipids

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemphyslip



Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product



Nada Zabaïou^{a,b,c}, Allan Fouache^{a,b}, Amalia Trousson^{a,b}, Silvère Baron^{a,b}, Amar Zellagui^d, Mesbah Lahouel^{c,*}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{a,b,**}

^a Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, F63001, Clermont-Ferrand, France

^b Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France

^c Laboratory of Molecular Toxicology, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, Université Mohamed Seddik Ben Yahia, 18000 Jijel, Algeria

^d Laboratory of Biomolecules and Plant Breeding, Université Larbi Ben Mhidi, 04000 Oum El Bouaghi, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2017

Received in revised form 5 April 2017

Accepted 10 April 2017

Available online 12 April 2017

Keywords:

Propolis

Flavonoids

Prostate cancer

Ethanol extracts

Traditional therapy

ABSTRACT

Natural products are an interesting source of new therapeutics, especially for cancer therapy as 70% of them have botany origin. Propolis, a resinous mixture that honey bees collect and transform from tree buds, sap flows, or other botanical sources, has been used by ethnobotany and traditional practitioners as early in Egypt as 3000 BCE. Enriched in flavonoids, phenol acids and terpene derivatives, propolis has been widely used for its antibacterial, antifungal and anti-inflammatory properties. Even though it is a challenge to standardize propolis composition, chemical analyses have pointed out interesting molecules that also present anti-oxidant and anti-proliferative properties that are of interest in the field of anti-cancer therapy. This review describes the various geographical origins and compositions of propolis, and analyzes how the main compounds of propolis could modulate cell signaling. A focus is made on the putative use of propolis in prostate cancer.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	215
1.1. Propolis, an ancient product that has become fashionable	215
1.2. Composition of propolis	215
1.2.1. Gross composition of propolis	215
1.2.2. Geographical origin of propolis and composition	215
2. Biological properties of propolis	216
2.1. Modulation of immune system	217
2.2. Antibacterial and antifungal effects	217
2.3. Antioxidant effect	217
2.3.1. Effect of propolis on neurodegenerative and depressive diseases	218
2.4. Antiproliferative effect	218
2.4.1. Effect of propolis on prostate cancer	219

Abbreviation: DHT, 5 α -dihydrotestosterone; ABCA1, ATP-binding cassette A1; AR, androgen receptor; cIAP-2, baculoviral IAP repeat-containing protein3; Bax, Bcl-2-associated X protein; CAPE, caffeic acid phenethyl ester; ERK, extracellular signal-regulated kinases; IL1- β , interleukin 1- β ; IXR α , liver X receptors; MMP, matrix metalloproteinases; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TLR, toll-like receptor; p70S6K, ribosomal protein S6 kinase beta-1; cIAP-1, transporter associated with antigen processing 1; TNF α , tumor necrosis factor α ; TRAIL, tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand; u-PA, urokinase-type plasminogen activator; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein.

* Corresponding author at: Université Mohamed Seddik Ben Yahia, Laboratory of Molecular Toxicology, Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, University of Jijel, 98 Ouled Aissa, 18000 Jijel, Algeria.

** Corresponding author at: Université Clermont Auvergne, GReD, 10 Avenue Blaise Pascal, Campus Universitaire des Cézeaux, CS60026, F-63178 Aubiere, France.

E-mail addresses: lahouelmesbah@yahoo.fr (M. Lahouel), j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr (J.-M.A. Lobaccaro).

25. Use of propolis as adjuvant in cancer therapy	220
3. Conclusion	220
Funding	220
Conflict of interest	220
References	220

1. Introduction

1.1. Propolis, an ancient product that has become fashionable

Propolis, also called bee glue is a natural complex matrix that is synthesized by honeybees from products collected in tree buds, saps, resins, mucilages, lattices and other plant sources. The word propolis is derived from Greek, in which pro stands for “at the entrance to” and polis for “city”, indicating this natural product is used in hive defense. Due to its waxy nature and mechanical properties, propolis is used by honeybees as cement to keep moisture and temperature stable in the hive all year around, and to seal cracks or open spaces. At elevated temperatures, propolis is soft, pliable and very sticky; however, when cooled, and particularly when frozen or at near freezing, it becomes hard and brittle. It will remain brittle after such treatment even at higher temperatures (Sforcin, 2016).

Since antiquity, mankind has been using propolis in different fields, mainly traditional medicine (Havsteen, 1983; Burdock, 1998). In ancient Greece, propolis was used as a disinfectant and antiseptic for cutaneous and buccal infections. The Egyptians used it mainly to embalm their cadavers. The use of propolis has then been developed over the time. Nowadays, the development of researches on propolis is mainly related to the development of chemistry and analytical methods that allowed analyzing its chemical composition.

The composition of propolis depends on the source of the various trees used by honeybees: generally poplar trees in the temperate zones, *Betula* in the Northern, *Dalechampia* in the Equatorial regions, *Clusia* in Venezuela and *Xanthorrhoea* in Australia (Burdock, 1998). Chemical heterogeneity of propolis is thus easily understandable as it is a complex mixture of compounds derived from various plants and processed by salivary enzymes of bees. Hence, composition of propolis depends of the plants, the seasons resins are collected, and the bee species. This chemical diversity brings a crucial question of standardization, even though bees, by themselves, do not change its chemical composition (Bankova et al., 2000).

1.2. Composition of propolis

As presented above, various types of propolis have been reported according to the geographical areas of production, botanical sources and chemical compositions (Bankova, 2005a). The temperate zone propolis is generally referred as poplar propolis because mainly produced from the bud exudates of *Populus* trees (Popova et al., 2004). Birch propolis is found specifically in Russia and is different from poplar propolis (Christov et al., 2006). Pacific propolis is a type of propolis found in Taiwan, Japan and Solomon Island (Popova et al., 2009). Various forms of Brazilian propolis are available: green propolis is derived from *Baccharis dracunculifolia* (Righi et al., 2011) while brown propolis comes from *Copaifera* species (Sawaya et al., 2006) and red propolis is obtained from *Dalbergia ecastophyllum* (L) (Piccinelli et al., 2011).

1.2.1. Gross composition of propolis

Propolis sample analyses from various parts of the world have been collectively reported to contain over 300 different chemical

compounds (Huang et al., 2014). Raw propolis is typically composed of 50% plant resins, 30% waxes, 10% essential and aromatic oils, 5% pollens and 5% other organic substances (Bankova, 2005a). Through various high throughput techniques such as mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance, gas chromatography coupled with mass spectroscopy, it has been possible to identify several families of chemically active compounds (For a review (Bankova, 2005b)) but not to define a minimal common composition with clear concentrations of the various compounds. Nevertheless, the main chemical groups present in propolis resin comprise phenolic acids or their esters, flavonoids, terpenes, aromatic aldehydes and alcohols, fatty acids, stilbens and β -steroids (Watanabe et al., 2011).

Flavonoids are the main compounds of propolis as they are responsible for the main pharmacological (see below). Among them it could be found flavones (luteolin), flavonols (quercetin and derivatives), flavanones (pinocembrin, or 5,7-dihydroxyflavone, and derivatives, and naringenin), flavanones (garbanzol and alnustinol), chalcones and dihydrochalcones, isoflavones (calycosin), isodihydroflavones (daidzein), flavans, isoflavans (vestitol and derivatives) and neoflavonoids (homopterocarpin and medicarpin) (for an extended review (Bankova, 2005b)).

Terpenoids, even though presented in only 10%, are responsible for the odor, because they are volatile components of plants, and also contribute for the biological properties of propolis. Terpenoids include monoterpenes (terpineol, camphor), diterpenes (the main group, such as ferruginol, junicedric acid and derivatives, pimaric acid, totarolone), triterpenes (such as lupeol and derivatives, lanosterol, amyrone and derivatives) and sesquiterpenes (such γ -elemene, valencene, α -ylangene, α -bisabolol) (Table 1).

Phenolic compounds include various acids such as cinnamic, p-coumaric, chicoric, caffeic and fulvic acids (For a review (Bankova, 2005b)).

1.2.2. Geographical origin of propolis and composition

This overview of propolis composition obviously depends of the area of collection. For example propolis samples from Europe, North America and other temperate zones are mainly composed of flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, quercetin, chrysin and galangin), phenolic acids and their esters (Falcão et al., 2010), likewise poplar propolis (Falcão et al., 2010; Sun et al., 2012).

Mediterranean propolis is characteristic by the high concentration of terpenoids and is found in many regions like Greece (Popova et al., 2010; Celemlı et al., 2013), Switzerland (Bankova et al., 2002), Malta (Popova et al., 2011), Turkey (Duran et al., 2011; Silici et al., 2007) and Algeria (Piccinelli et al., 2013). Among these, Algerian one is derived from two principal species *Populus* spp and *Citrus* spp and is composed of pinocembrin, chicoric and caffeic acids and their esters, galangin (Boutabet et al., 2011), diterpenic acids, flavonols like chrysin, and aromatic acids (Piccinelli et al., 2013). In Greece, propolis is rich of flavonoids and diterpenic acids (Popova et al., 2010). *Populus* spp and *eucalyptus* are the main plant sources of Turkish propolis. Its composition is not different from that of Algeria and Greece with caffeic acid and its esters, pinobanksin, pinocembrin, diterpenic acids, aromatic acids and flavonols (Duran et al., 2011).

Many studies with African propolis from different regions like Kenya, Cameroon, Congo and Ethiopia, showed that triterpenoids

Table 1
Main characteristics of the described propolis.

Geographical origin	Major compounds	Biological properties	Reference
Temperate zones Poplar propolis	flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, quercetin, chrysin, galangin), phenolic acids and esters	–	Falcão et al. (2010), Sun et al. (2012)
Algeria	diterpenic acids, chrysin, aromatic acids pinocembrin, chloric, caffeic acids and esters, galangin	Antiproliferation Anti UV Antimetastasis	Piccinelli et al. (2013), Boutabet et al. (2011), Segueni et al. (2011), Benguedouar et al. (2016)
Brazil (red and green)	prenylated phenylpropanoids, caffeoyl quinic acids, phenolic acids, p-coumaric acids, diterpenic acids, kaempferide, isosakuranetin, formononetin, isoliquiritigenin, biochanin A, apigenin	Antibacteria Antifungus Antioxidant Antiinflammation Antiangiogenic effects Antitumoral Cholesterol homeostasis Depression Anxiety Alzheimer's disease	Bankova et al. (2000), Bankova, (2005), Frozza et al. (2013), Park et al. (2002), da Silva Frozza et al. (2016), Silva et al. (2008), Alencar et al. (2007), de Mendonça et al. (2015), Machado et al. (2016), Righi et al. (2011), Bazo et al. (2002), Li et al. (2007), Iio et al. (2012), Reis et al. (2014), daSilveira et al. (2016)
China	–	Alzheimer's disease	Chen et al. (2008)
Cuba (red)	–	Antioxidant	Claus et al. (2000)
Egypt	–	Antioxidant	Salim et al. (2015)
Greece	flavonoids, diterpenic acids	Antiproliferative	Popova et al. (2010), Celemli et al. (2013)
Iran	–	Cytotoxic effects on cancer cells Inhibition of cancer cell proliferation	Amini-Sarshnizi et al. (2015), Alizadeh et al. (2015),
Kenya, Cameroon, Congo, Ethiopia	triterpenoids	Antibacteria Antifungus	Papachroni et al. (2015), Petrova et al. (2010), Popova et al. (2013), Rushdi et al. (2014)
Korean	–	Depression	Lee et al. (2013)
Malta	terpenoids	–	Popova et al. (2011)
Poland	–	Inhibition of cancer cell proliferation	Kubina et al. (2015)
Portugal	–	Free radical scavenging Anti-lipid peroxidation	Miguel et al. (2010), Valente et al. (2011)
Switzerland	terpenoids	–	Bankova et al. (2002)
Thailand	–	Antiproliferation	Khacha-ananda et al. (2013)
Turkey	terpenoids	Cytotoxic effects on cancer cells Antioxidant	Duran et al. (2011), Silici et al. (2007), Turan et al. (2015), Barlak et al. (2011)

Refer to the main text to have more information.

are the major chemical components (Papachroni et al., 2015; Petrova et al., 2010; Popova et al., 2013; Rushdi et al., 2014).

Propolis from tropical areas like Brazil is composed essentially by prenylated phenylpropanoids and caffeoyl quinic acids (Bankova et al., 2000). In Brazil, Park et al. (Park et al., 2002) have identified and classified 13 different types of propolis based on their physicochemical characteristics. Green and red propolis are the most common types of Brazilian propolis extracted from *Baccharis spp.*, *Dalbergia ecastaphyllum*, *Betula verrucosa*, *Betula pendula* and *Betula pubescens*, and are composed of prenylated phenylpropanoids, phenolic acids, p-coumaric acids, diterpenic acids, kaempferide, isosakuranetin, formononetin, isoliquiritigenin, biochanin A and apigenin (Bankova, 2005a; Frozza et al., 2013; Park et al., 2002; Silva et al., 2008; da Silva Frozza et al., 2016).

2. Biological properties of propolis

As previously presented, it is difficult to speak of “one” propolis but it should rather be presented “thousands” of propolis, due to the various origins, seasons collect, surrounding trees and flowers, genetics of bees, treatments of the collected propolis, methods of extractions. Indeed, the use of different solvents for the molecule extraction changes activity of main biologically active constituents in propolis (Table 1). As indicated in the previous chapters, flavonoids, terpenoids and phenolic esters of propolis are responsible for its potential effects with specific reagents (Wagh, 2013). It should also be noted that expect few *in vivo* studies, some of them presented above, the majority was performed in cell culture using crude extracts, which raises the question of propolis

composition but facilitates the deciphering of the molecular mechanism. On the other hand, *in vivo* experiments with animals fed various propolis do not indicate what specific compounds is really active or whether a mix of compounds could have a synergistic activity, and more importantly which transformed or not derivatives really reach the target organ. Despite these important points, many properties have been associated to propolis at the cellular and molecular levels (Fig. 1).

2.1. Modulation of immune system

Aqueous extract of propolis modulates macrophage antitumoral activity in mice and increases the production of lymphocyte activation factors (Orsolić et al., 2004). Ethanolic extract of Brazilian propolis enhances natural killers (NK) cells activity against lymphoma in rats (Sforzin, 2007). Orsatti et al. (Orsatti et al., 2010) have shown that ethanolic extract of Brazilian green propolis up regulates the expression of toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 and the production of interleukins (IL)-1 β in BALB/C mice after 3 days of treatment. Brazilian propolis also modulates the effect of macrophages in killing the parasites of *Leishmania braziliensis*. This propolis also increased the production of tumor necrosis factor (TNF) α in pretreated mice (da Silva et al., 2013).

Water extract of propolis induces the *in vitro* production of IL-1 by peritoneal macrophages (Dimov et al., 1992). Sampietro et al. (Quiroga et al., 2006; Sampietro et al., 2016) demonstrated that partially purified propolis extracts stimulate neutrophil chemotactic activity at various concentrations suggesting its possible use for patients suffering of neutrophil dysfunction.

2.2. Antibacterial and antifungal effects

Using ethanolic extract of Kenian propolis, Muli and Maingi (2007) have shown significant differences in the antibacterial activities among three studied geographical areas, depending on the tested microorganisms (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*) after 24h of treatment.

Brazilian ethanolic extract of propolis produced by *Apis mellifera* and Brazilian stingless bees showed significant effects against *S. aureus*, *E. coli* and *Enterococcus sp.* Using the disc diffusion method, Rahman et al. (Rahman et al., 2010) evaluated the antibacterial activity of Canadian propolis against *S. aureus* and *E. coli*. Result showed that *S. aureus* is more susceptible to propolis than *E. coli*.

Propolis extract has also a potential antifungal effect. Flavonoids from Maringa (Brazil) induce cellular death of 3 yeast species at a concentration of 20 μ g/ml: *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* (Oliveira et al., 2006). Dota et al. (2011) also demonstrated that yeast isolates obtained from vaginal exudates of patients with vulvovaginal candidiasis were inhibited by ethanol extract and propolis microparticles of Brazilian propolis, with small variation independent of the species of yeast.

2.3. Antioxidant effect

The antioxidant activity of propolis is due to its enrichment of polyphenols such as phenolic acids and flavonoids.

In a model of alcohol-induced liver damage, Cuban red propolis seems to have protective effects by inhibiting macrophage

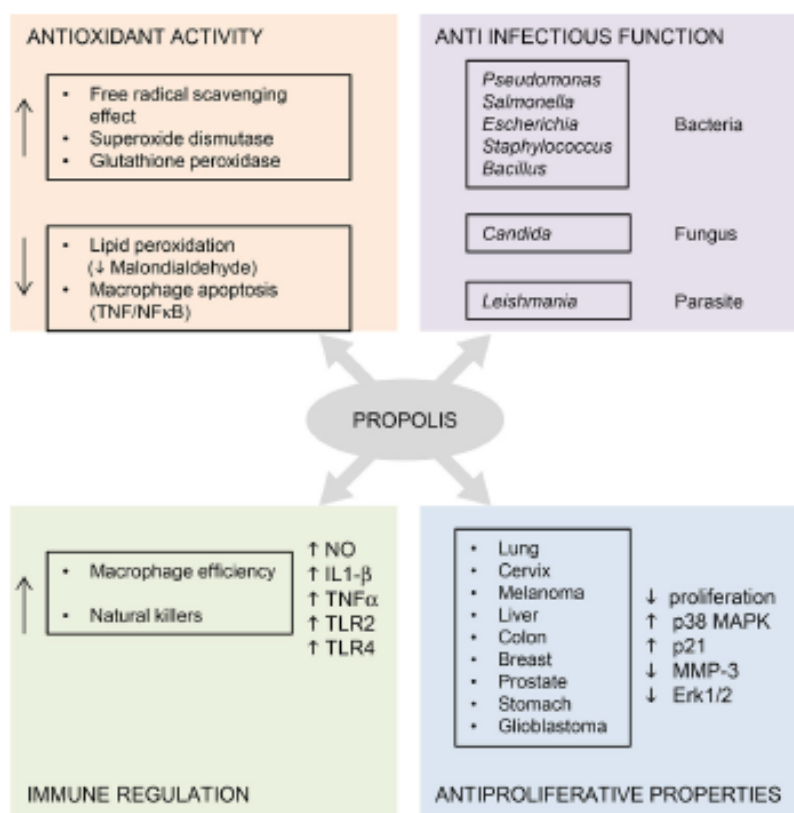


Fig. 1. Schematic representation of propolis activities. ERK, extracellular signal-regulated kinases; IL, interleukin; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; NF κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NO, nitric oxide; p21, CDK-interacting protein 1; TNF, tumor necrosis factor; TLR, toll-like receptor; MMP, matrix metalloproteinases.

apoptosis and modulating TNF/NFκB pathway (Claus et al., 2000). Portuguese propolis collected in thirteen different areas in the Algarve region during winter and spring are rich in phenols and have an important capacity of scavenging free radicals (Miguel et al., 2010). The antioxidant activity of propolis from Bornes (North East) and Fundão (Centre) regions of Portugal was also demonstrated. Its free radical scavenging effect and protection against lipid peroxidation were evaluated in human erythrocytes and demonstrated as well (Valente et al., 2011).

Antioxidant effect of ethanolic extract of red propolis has been studied on human tumor cell lines SF-295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovary) and HCT-116 (colon). Its enrichment in tanins, catechins, chalcones, aurones, flavonones, flavonols, xanthones, pentacyclic triterpenoids and guttiferones gives it a strong scavenging effect of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (Alencar et al., 2007; de Mendonça et al., 2015). The red propolis of the Northern region of Brazil showed the most potent antioxidant activity compared to green and brown propolis (Machado et al., 2016). However, no molecular mechanism has been described so far by the authors.

Methanolic extract of yellow propolis from Brazil also shows a high antioxidant activity determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and β-carotene/linoleic acid array methods (Righi et al., 2011). Interestingly, ethanolic extract of yellow propolis shows a decrease in the production of nitric oxide and malondialdehyde in 3 month old male Wistar rats, without affecting the levels of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase (da Silveira et al., 2016).

In C57BL/6 mice with acute lung inflammation caused by cigarette smoke, ethanolic extract of green propolis enhances the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, reduces malondialdehyde levels and decreases glutathione/oxidized glutathione ration (Lopes et al., 2013).

2.3.1. Effect of propolis on neurodegenerative and depressive diseases

Among the various pathologies linked to oxidation troubles, neurodegenerative diseases have a peculiar place as they are usually tardily diagnosed, without any significant curative treatment. In that line propolis has interesting antioxidant properties as already described that could be used as a prophylactic compound, and in some cases considered as potential therapeutic drug compound.

Hence Reis et al. described that oil extract of propolis exerts stimulant, anxiolytic and antidepressant effects on the central nervous system together with antioxidant activity in rats (Reis et al., 2014). Ethanolic extract of Korean propolis also have antidepressant effect by enhancing glucocorticoid receptor function (Lee et al., 2013). Essential oil of Brazilian green propolis, rich on terpenoids, possesses therapeutic effects against anxiety by modulating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Li et al., 2012).

Using human neuroblastoma SH-SY5Y cells, Ni et al. (2017) showed that pretreatment with an identical propolis significantly ameliorates the hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells, significantly reduces reactive oxygen species derived from mitochondria and 8-oxo-2'-deoxyguanosine and significantly reverses β-amyloid accumulation through the modulation of PI3K pathway. Altogether these data suggest that propolis could protect from neurodegenerative damage in neurons that occurs during Alzheimer's disease and aging (da Silveira et al., 2016). Chinese propolis has also significant activity in the central nervous system. Hence a water-soluble derivative could inhibit acetylcholine esterase activity in the hippocampus of mice treated by scopolamine, which induces learning and memory impairment, showing an interesting effect *in vivo* in amnesia as observed in Alzheimer's disease (Chen et al., 2008). Amyloid-β peptides accumulate in the brain and initiate a cascade of pathologic events in Alzheimer's disease. Interestingly pinocembrin, found enriched in propolis,

inhibits amyloid-β peptide accumulation *in vitro* (Wang et al., 2016) and *in vivo* (Liu et al., 2014).

Parkinson's disease is another widespread neurodegenerative disease associated with the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra and decreased striatal dopamine levels. Fontanilla et al (Fontanilla et al., 2011) reported that caffeic acid phenyl ester (CAPE) attenuated dopaminergic neurodegeneration and dopamine loss in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. The same compound also decreases the signs of amyotrophic lateral sclerosis and increases the survival progression by attenuating both neuroinflammation and motor neuron cell death (Fontanilla et al., 2012). Finally CAPE has also a protective effect against the dopaminergic neuronal loss pharmacologically induced in rats by protecting from cytochrome c release and caspase-3 activation (Barros Silva et al., 2013).

2.4. Antiproliferative effect

Cancer is now the leading cause of death in the world (Jemal et al., 2008). The pharmaceutical industry invests billions of dollars each year in the discovery and development of new molecules and therapeutic approaches. In fact, it is estimated that over 70% of anticancer drugs are natural compounds or related. Example is shown by taxol (paclitaxel) derived from the bark of Pacific yew (*Taxus brevifolia*) or American mandrake (*Podophyllum peltatum*) (Watanabe et al., 2011; de Weger et al., 2014).

Based on its the high concentration in flavonoids, terpenoids and phenolic compounds (for a review on their effects on cancers, see (Bayala et al., 2014)), propolis has been the subject of several studies to point out putative cytotoxic and antiproliferative effects on various *in vivo* and *in vitro* cancer animal models.

Propolis collected from Phayao province in Thailand has a significant antiproliferative effect evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test on an adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549) and a human epitheloid cervix carcinoma cells (HeLa) after 24, 48 and 72h of treatment in a dose dependent manner (Khacha-ananda et al., 2013).

Chemical analysis of Algerian propolis identified several anticancer phenolic compounds such as galangin (Boutabet et al., 2011) and (+)-chiroic acid, identified in propolis for the first time by Segueni et al. (Segueni et al., 2011). Independently, galangin was shown to induce melanoma cell apoptosis via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (Zhang et al., 2013b) and to inhibit *in vivo* tumor growth and metastasis in a mouse melanoma model (Zhang et al., 2013c). Galangin also reduces melanoma tumor progression/dissemination and induces autophagy and apoptosis (Benguedouar et al., 2016).

Chiroic acid, displayed potent *in vitro* matrix metalloproteinase (MMP)-3 inhibitory activity with IC50 at 6.3×10^{-7} M. In addition, both caffeic acid and (+)-chiroic acid methyl ester present in Algerian propolis significantly inhibit UVA-mediated MMP-3 upregulation by fibroblasts (Segueni et al., 2011).

In Turkey, five human cancer cell lines have been studied. Ethanolic extract of propolis have powerful cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma (HepG2), colon adenocarcinoma (WiDr), HeLa, mammary adenocarcinoma (MCF-7) and prostate adenocarcinoma (PC3) cells. It seems that the highest cytotoxic activity was demonstrated on PC-3 cells with the half maximal inhibitory concentration (IC50) at $20.7 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}$ (Turan et al., 2015). Likewise, ethanolic extract from Polish propolis inhibits proliferation of human malignant cells of melanoma (Me 45) and colorectal cancer (HCT 116) (Kubina et al., 2015).

Iranian propolis also has a strong cytotoxicity on AGS human gastric cancer cell lines. These extracts inhibited the proliferation of AGS cells with IC50 at 60, 30 and 15 $\mu\text{g/ml}$ after 24, 48 and 72 h

of treatment respectively (Amini-Sarteshnizi et al., 2015). In rats, gastric cancer initiated by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin could be inhibited by ethanolic extracts of Iranian propolis which decreases tumor proliferation and reduces the number of lesions compared to untreated controls (Alizadeh et al., 2015).

Ethanolic extract of Brazilian propolis play a protective action against 1,2 dimethylhydrazin induced colon cancer in rats (Bazo et al., 2002) by suppression of the development of neoplastic lesions. Tumor invasion and metastasis are considered as the main therapeutic challenges in oncology (Zhang et al., 2013a). It was reported that ethanolic extract of Brazilian propolis has an anti-angiogenic effect. This extract reduced the number of newly formed blood vessels and inhibits the proliferation of human umbilical vein endothelial cells through the induction of apoptosis and inactivation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 signaling pathway (Kunimasa et al., 2011).

2.4.1. Effect of propolis on prostate cancer

The risk for a man to have a diagnosed prostate cancer has drastically increased these last years to reach the second leading cause of death from cancer (Jemal et al., 2008). Prostate cancer is an androgen dependent tumor characterized by a very slow development. As for other types of cancer, propolis has also been studied for its activity to decrease proliferation.

In Brazil, Li et al. (2007) demonstrated that ethanolic extract of propolis has an antitumor activity against prostate cancer cell line. This cytotoxicity is due to the regulation of the expression of cyclin D1, B1 and protein p21.

Dimethylsulfoxid and water extracts of Turkish propolis have a very high antioxidant potential. According to Barlak et al. (2011), this property is responsible for the anti-proliferative activity in PC-3 cell line. Ethanolic extract of Egyptian propolis shows a great antioxidant and antiproliferative effect on the same cells by activation of apoptosis through the transcriptional induction of the cellular tumor antigen p53 and the Bcl-2-associated X protein (Bax) (Salim et al., 2015). This extract was more powerful than doxorubicin.

Szliszka et al. (2011a) have shown that one of the mechanisms involved in this cytotoxic effect is the activation of apoptosis through the activation of the tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in both LNCaP and DU-145 cells, which can present an excellent therapeutic target considering that more than 50 percent of the tumor cells are resistant to TRAIL at different levels of the signaling pathways (Zhang et al., 2013a).

Among the numerous compounds found in ethanolic extracts, the main molecules responsible of those effects are flavonoids and CAPE, and many studies have investigated their effects and the mechanisms by which they can intervene (Rosenberg Zand et al., 2002). The potential of CAPE in the treatment of advanced PCa was shown in blocking the migration of androgen-independent cancer cell lines PC-3 and DU-145; besides, CAPE induces receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) in non-canonical Wnt signaling pathway (Tseng et al., 2016).

Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavon) has an antimetastatic effect on human prostate DU-145 cell lines (Shen et al., 2010). Metastasis is related with the production of matrix proteins in a variety of cells or tissues they encounter (Nam et al., 2016). Acacetin was shown to inhibit the abilities of adhesion, invasion and migration. It could also block the phosphorylation of p38 MAPK, which is involved in the downregulation of MMP-2 and -9 and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) at protein and mRNA levels. Acacetin also reduces nuclear levels of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) and of proto-oncogenes c-Fos and c-Jun (Shen et al., 2010).

Chrysin (5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one) is a flavon known to be a potent inhibitor of aromatase, enzyme responsible for a key step in the biosynthesis of estrogens (Sanderson et al., 2004). Samarghandian et al. (Samarghandian et al., 2011) showed that chrysin decreases proliferation and induces apoptosis in PC-3 human cancer cell lines. Besides, chrysin increases apoptosis of androgen-independent DU145 and PC-3 cancer and blocks their proliferation through the decrease of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K). Moreover the same authors pointed out that chrysin also induces endoplasmic reticulum stress of the cells (Ryu et al., 2017).

Some of the flavonoids affect the cell cycle. For example, phytoestrogen genistein arrests cell cycle at G2/M phases by suppressing the expression of cyclin B and induction of p21 in a p53 independent manner (Kobayashi et al., 2002).

Flavonoid quercetin is also an important molecule. Used at concentrations of 25 and 50 μM quercetin significantly inhibits the growth of PC-3 and DU-145 cells (Nair et al., 2004). According to the authors, this is due to the inhibition of the expression of the oncogenes which control the phases G1, S and G2 of the cell cycle. Interestingly, quercetin does not affect colony formation by LNCaP, a poorly aggressive prostate cancer cell line, or by BG-9, a normal fibroblast cell line.

Pinoembrin exercises a cytotoxic effect and attenuates cell viability of LNCaP, DU-145 and PC-3 cell lines. It induces apoptosis of LNCaP cells and arrests cell cycle at both S and G2/M phases. It is also implicated in the dissipation of mitochondrial membrane potential before culminating in apoptosis in pinoembrin treated LNCaP cells (Chen et al., 2013). Besides, pinoembrin has also an interesting activity of 5α-reductase inhibitor (Komoda, 1989). Indeed, blocking 5α-reductase functioning would decrease the levels of 5α-dihydrotestosterone (DHT), a potent androgen for prostate epithelium growth.

As presented above, CAPE is one of the most powerful phenolic acids of propolis. By inhibition of ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K), an intermediary responsible for the protein synthesis in PI3K/AKT pathway and some AKT signaling networks, CAPE blocks the proliferation of LNCaP, DU-145 and PC-3 cells and reduces the tumor growth of LNCaP xenografts in nude mice (Chuu et al., 2012; Lin et al., 2012). CAPE can also act by inducing apoptosis. In a dose dependent manner, CAPE decreases the expression of the inhibitors of apoptosis: transporter associated with antigen processing 1 (cIAP-1), baculoviral IAP repeat-containing protein3 (cIAP-2) and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) (McEleny et al., 2004).

Hormonotherapy is one of the approaches used for the treatment of prostate cancer. This therapy consists of blocking the signaling of the androgen receptor (AR). Four flavonoids from propolis (myricetin, quercetin, fisetin and kaempferol) were studied for their chemopreventive effects against castration sensitive or castration resistant prostate cancers. Several mechanisms have been proposed to explain the effects: inhibition of 5α-reductase (see above), direct competition with the androgen in binding pocket of AR, disruption of AR interaction with coregulators, and modulation of the PI3K/AKT pathway (Boam, 2015).

Another nuclear receptor signaling pathway could also be modulated by propolis extract. Iio et al. (Iio et al., 2012) pointed out that ethanolic extracts of Brazilian red propolis could increase Abca1 expression, a membrane transporter involved in cholesterol efflux, by modulating the transcriptional activity of the liver X receptors (LXRs). Ligand activation of these nuclear receptors has been associated to the decrease of prostate tumor progression of in a xenograft model of LNCaP cells (Pommier et al., 2010) and *in vivo* (Pommier et al., 2013).

2.5. Use of propolis as adjuvant in cancer therapy

The aim of adjuvant treatment is to improve disease-specific symptoms and overall survival. Hence propolis has been shown to potentiate chemotherapeutics and to alleviate their adverse effects (Patel, 2016). For example when aldo-keto reductase AKR1B10, which metabolizes aldehydes and drugs containing carbonyl groups, is highly accumulated it induces inflammation and tumorigenesis by reducing the effects of the chemotherapy. CAPE has proved to be an effective inhibitor of AKR1B10 enzyme and should increase the efficacy of the treatment (Soda et al., 2012). Doxorubicin, which interacts with DNA by intercalation and inhibition of macromolecular biosynthesis, is commonly used to treat some leukemia and Hodgkin's lymphoma, as well as other cancers, e.g., bladder, breast, stomach, lung, ovaries. However side effects are numerous such as the induction of testicular toxicity and thus infertility. In rat model, propolis when co-administered with doxorubicin prevents the adverse effect on testis (Rizk et al., 2014). Likewise, Portuguese propolis has been shown to reinforce paclitaxel effect in estrogen-insensitive MDA-MB-231 cells and androgen-insensitive DU145 cells (Silva-Carvalho et al., 2014). TRAIL initiates in cancer cell death, however highly malignant tumors are often resistant to apoptosis induction by TRAIL, and some cancer cells that were originally sensitive to TRAIL-induced apoptosis can become resistant after repeated exposure (Trivedi and Mishra, 2015). Interestingly bioactive compounds of Brazilian green propolis help in prostate cancer chemoprevention through the enhancement of TRAIL-mediated apoptosis (Szliszka et al., 2011b). These few examples among numerous clearly point out that besides the potential of propolis used as therapeutic agent, its co-administration with already improved treatment is an interesting field of investigation as it will increase the efficacy of chemotherapy as well as will protect of deleterious side effects.

3. Conclusion

The therapeutic use of propolis is definitively an ancient empirical approach (at least 3000 BCE). The richness of chemical compounds of propolis especially the phenolic contents, conferred to it exceptional properties and justifies the numerous studies of various propolis extracts for the putative treatments of numerous pathologies. Based on ethnobotanist observations and traditional practitioners, many properties of this natural product have been explored. Among them cancer therapy is one the most exciting fields since many tumors undergo a therapeutic escape, demonstrating that new therapeutic ways need to be explored. Besides the identification of the compounds responsible for the effects and deciphering their molecular mechanisms, there will be a difficult and long process before using propolis as a routine drug. Indeed the most prominent challenge for a direct use of it will be i) to standardize propolis extracts; ii) to define the galenic formulation; iii) to identify the best route of administration; iv) to select which medical application(s) could be eligible for; and at last v) to choose whether an acute vs. long treatment should be preferred. Nonetheless, this challenge needs to be faced as it will give new insights in cancer biology and treatment as well as signaling pathways.

Funding

Part of this study is supported by specific grants from European Regional Development Fund (FEDER), Auvergne Region, Projet Hubert Curien Tassili 16-MDU-956.

Conflict of interest

We have read and understood the Chemistry and Physics of lipids policy on declaration of interests and declare that N. Zabaïou is recipient of a grant from Projet Hubert Curien (PHC) Tassili 16-MDU-956 and PROFAS-B from the French Embassy in Algeria, A. Fouache is recipient of a doctoral grant from Université Blaise Pascal, part of this work is financed by Auvergne Region, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), and PHC Tassili. The funders had no role in the redaction of this review, decision to publish, or preparation of the manuscript. Authors have no competing interest for the submitted review.

References

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, L.S.R., Costa-Neto, C.M., Curry, J.A., Rosalen, P.J., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Ethnopharmacol.* 113, 278–283.
- Alizadeh, A.M., Afrouzan, H., Dinparast-Djadid, N., Sawaya, A.C.H.F., Azizian, S., Hemmati, H.R., Mohagheghi, M.A., Erfani, S.I., 2015. Chemoprotection of MNNG-initiated gastric cancer in rats using Iranian propolis. *Arch. Iran. Med.* 18, 18–23.
- Amini-Sarteshnizi, N., Mobini-Dehkordi, M., Khosravi-Farsani, S., Teimori, H., 2015. Anticancer activity of ethanolic extract of propolis on AGS cell line. *J. HerbMed Pharmacol.* 29–34.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L., Maroucci Maria, C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 3–15.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.-G., 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 57, 530–533.
- Bankova, V.I., 2005a. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114–117.
- Bankova, V., 2005b. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2, 29–32.
- Barlak, Y., Değer, Ö., Colak, M., Karataylı, S.C., Bozdayı, A.M., Yücesan, F., 2011. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci.* 9, 74.
- Barros Silva, R., Santos, A., N.G., Martins, N.M., Ferreira, D.S., Barbosa, F., Oliveira Souza, V.C., Kinoshita, A., Baffa, O., Del-Bel, E., Santos, A.C., 2013. Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience* 233, 86–94.
- Bayala, B., Bassolet, J.H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Iobaccaro, J.-M.A., Simpoire, J., 2014. Anticancer activity of essential oils and their chemical components – a review. *Am. J. Cancer Res.* 4, 591–607.
- Bazo, A.P., Rodrigues, M.A.M., Sforzini, J.M., de Camargo, J.L.V., Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., 2002. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 22, 183–194.
- Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S.C., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., Antonicelli, F., 2016. Ethanolic extract of algerian propolis and galangin decreased murine melanoma T. *Anticancer Agents Med. Chem.* 16, 1172–1183.
- Boam, T., 2015. Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Eganermedicallscience* 9, 585.
- Boutabet, K., Kebba, W., Alyane, M., Lahouel, M., 2011. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J. Nephrol.* 21, 101–106.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 36, 347–363.
- Celemlı, Ö.G., Hatjina, F., Charistos, L., Schiesser, A., Ozkirim, A., 2013. More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 68, 429–438.
- Chen, J., Long, Y., Han, M., Wang, T., Chen, Q., Wang, R.J., 2008. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 441–446.
- Chen, Z., Rasu, A., Zhao, C., Millimouno, F.M., Tsuji, I., Yamamura, T., Iqbal, R., Malhi, M., Li, X., Li, J., 2013. Antiproliferative and apoptotic effects of pinocembrin in human prostate cancer cells. *Bangladesh J. Pharmacol.* 255–263.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Bertrand, M., 2006. Chemical composition of propolis from Canada: its antiradical activity and plant origin. *Nat. Prod. Res.* 20, 531–536.
- Chuu, C.-P., Lin, H.-P., Giacó, M.F., Kokontis, J.M., Haure, R.J., Hipakka, R.A., Liao, S., Jones, R.B., 2012. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 5, 788–797.
- Claus, R., Kinscherf, R., Gehrke, C., Bonaterra, G., Basnet, P., Metz, J., Deigner, H.P., 2000. Antiapoptotic effects of propolis extract and propolis on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung* 50, 373–379.
- da Silva Frozza, C.O., da Silva Brum, E., Alving, A., Moura, S., Henriques, J.A.P., Roesch-Ely, M., 2016. LC-MS analysis of Hep-2 and Hek-293 cell lines treated with Brazilian red propolis reveals differences in protein expression. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 1073–1084.

- da Silva, S.S., da S. Thomé G., Cataneo, A.H.D., Miranda, M.M., Felipe, L. de J. Andrade C.G.T., Watanabe, M.A.E., Piana, G.M., Sforcin, J.M., Pavanelli, W.R., et al., 2013. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 673058 (ECAM).
- da Silveira, C.C.S., de, M., Fernandes, L.M.P., Silva, M.I., Luz, D.A., Gomes, A.R.Q., Monteiro, M.C., Machado, C.S., Torres, Y.R., de Lira, T.O., Ferreira, A.G., et al., 2016. Neurobehavioral and antioxidant effects of ethanolic extract of yellow propolis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 2906953.
- de Mendonça, L.C.G., Porto, L.C.C., de, M., do Nascimento, T.G., de Souza, N.S., Oliveira, J.M., dos, S., Arruda, R.E., dos, S., Mousinho, K.C., dos Santos, A.F., Bastião-Júnior, I. D., Parolia, A., et al., 2015. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 352.
- de Weger, V.A., Beijnen, J.H., Schellens, J.H.M.J., 2014. Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel—a review. *Anticancer Drugs* 25, 488–494.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Popov, S., 1992. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. *Vaccine* 10, 817–823.
- Dota, K.F.D., Consolaro, M.E.J., Svidzinski, T.L.E., Bruschi, M.J., 2011. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 201953.
- Duran, N., Muz, M., Culha, G., Duran, G., Ozer, B., 2011. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol. Res.* 108, 95–105.
- Falcao, S.I., Vilas-Boas, M., Esteveinho, L.M., Barros, C., Domingues, M.R.M., Cardoso, S. M., 2010. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 887–897.
- Fontanilla, C.V., Ma, Z., Wei, X., Kloboche, J., Zhao, L., Wisniowski, P., Dodel, R.C., Farlow, M.R., Oertel, W.H., Du, Y., 2011. Caffeic acid phenethyl ester prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 188, 135–141.
- Fontanilla, C.V., Wei, X., Zhao, L., Johnstone, B., Pascuzzi, R.M., Farlow, M.R., Du, Y., 2012. Caffeic acid phenethyl ester extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* 205, 185–193.
- Frozza, C.D., Garcia, C.S., Gambato, G., de Souza, M.D., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.X., Collares, T., Borsuk, S., et al., 2013. Chemical characterization: antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 52, 137–142.
- Havsteen, B.I., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1141–1148.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.-L., 2014. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Mol. Basel Switz.* 19, 19610–19632.
- Ito, A., Ohguchi, K., Maruyama, H., Tazawa, S., Araki, Y., Ichihara, K., Nozawa, Y., Ito, M., 2012. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *Phytother. Int. J. Phytother. Phytother.* 19, 383–388.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J., 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* 58, 71–96.
- Khacha-ananda, S., Tragoolpua, K., Chantawannakul, P., Tragoolpua, Y., 2013. Antioxidant and anti-cancer cell proliferation activity of propolis extracts from two extraction methods. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 14, 6991–6995.
- Kobayashi, T., Nakata, T., Kuzumaki, T., 2002. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 176, 17–23.
- Komoda, Y., 1989. Isolation of flavonoids from *Populus nigra* as delta-4-3-ketosteroid (5 alpha) reductase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 37, 3128–3130.
- Kubina, R., Kabala-Dzik, A., Dziedzic, A., Bielec, B., Wojtyczka, R.D., Buldak, R.J., Wyszynska, M., Stawarska-Pięta, B., Szafarska-Stajko, E., 2015. The ethanol extract of Polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and m645 malignant melanoma cells in vitro conditions. *Adv. Clin. Exp. Med.* 24, 203–212.
- Kumazawa, K., Ahn, M.-R., Kobayashi, T., Eguchi, R., Kumazawa, S., Fujimori, Y., Nakano, T., Nakayama, T., Kaji, K., Ohta, T., 2011. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 870753.
- Lee, M.-S., Kim, Y.H., Park, W.-S., Ahn, W.G., Park, O.K., Kwon, S.-H., Morita, K., Shim, I., Her, S., 2013. Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 217853.
- Li, H., Kapur, A., Yang, J.X., Srivastava, S., McLeod, D.G., Paredes-Guzman, J.F., Dausch, A., Park, Y.K., Rhim, J.S., 2007. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int. J. Oncol.* 31, 601–606.
- Li, Y.-J., Xuan, H.-Z., Shou, Q.-Y., Zhan, Z.-G., Lu, X., Hu, F.-L., 2012. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 31, 157–165.
- Lin, H.-P., Jiang, S.S., Chou, C.-P., 2012. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction Akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. *PLoS One* 7, e31286.
- Liu, R., Li, J., Song, J., Zhou, D., Huang, C., Bai, X., Xie, T., Zhang, X., Li, Y., Wu, C., et al., 2014. Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiol. Aging* 35, 1275–1285.
- Lopes, A.A., Ferreira, T.S., Nesi, R.T., Lanzetti, M., Pires, K.M.P., Silva, A.M., Borges, R. M., Silva, A.J.R., Valença, S.S., Porto, L.C.I., 2013. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 7570–7577.
- Machado, B.A.S., Silva, R.P.D., de A. Barreto G., Costa, S.S., Silva, D.F., da Brandão, H.N., Rocha, J.L.C., da Dellagostin, O.A., Henriques, J.A.P., Umsza-Guez, M.A., et al., 2016. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One* 11, e0145954.
- McElroy, K., Coffey, R., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., Watson, R.W.G., 2004. Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int.* 94, 402–406.
- Miguel, M.G., Nunes, S., Danden, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D., 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alkoholic extracts of propolis from Algarve: south of Portugal. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 48, 3418–3423.
- Muli, E.M., Maingi, J.M., 2007. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 655–663.
- Nair, H.K., Rao, K.V.K., Aalinkhel, R., Mahajan, S., Chawda, R., Schwartz, S.A.I., 2004. Inhibition of prostate cancer cell colony formation by the flavonoid quercetin correlates with modulation of specific regulatory genes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 63–69.
- Nam, J.-S., Sharma, A.R., Nguyen, L.T., Chakraborty, C., Sharma, G., Lee, S.-S., 2016. Application of bioactive quercetin in oncology: from nutrition to nanomedicine. *Mol. Basel Switz.* 21, E108.
- Ni, J., Wu, Z., Meng, J., Zhu, A., Zhong, X., Wu, S., Nakanishi, H., 2012. The neuroprotective effects of Brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 7984327.
- Oliveira, A.C.P., Shinobu, C.S., Longhini, R., Franco, S.I., Svidzinski, T.L.E., 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 493–497.
- Orsatti, C.L., Missima, F., Pagliamone, A.C., Bachiega, T.F., Búfalo, M.C., Araújo, J.P., Sforcin, J.M., 2010. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother. Res. PTR* 24, 1141–1146.
- Orsolic, N., Knezevic, A.H., Svet, L., Terzic, S., Basic, I., 2004. Immunomodulatory and antitastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.* 94, 307–315.
- Papachroni, D., Graikou, K., Kosalec, I., Damianakos, H., Ingram, V., Chinou, I.I., 2015. Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples from Cameroon and Congo. *Nat. Prod. Commun.* 10, 67–70.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.I., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2502–2506.
- Patel, S., 2016. Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents. *J. Diet. Suppl.* 13, 245–268.
- Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, L., Naydenski, H., Muli, E., Bankova, V., 2010. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Bioterapia* 81, 509–514.
- Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rastrelli, L., 2011. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6484–6491.
- Piccinelli, A.L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R.P., Rastrelli, L., 2013. Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5080–5088.
- Pommier, A.J.C., 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.
- Pommier, A.J.C., Dufout, J., Alves, G., Viennois, E., De Bussac, H., Trousson, A., Volle, D.H., Caira, F., Val, P., Arnaud, P., et al., 2013. Liver x receptors protect from development of prostatic intra-epithelial neoplasia in mice. *PLoS Genet.* 9, e1003483.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marazzan, G.L., Bogdanov, S., 2004. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Anal. PCA* 15, 235–240.
- Popova, M.P., Chinou, I.B., Marekov, I.N., Bankova, V.S.I., 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70, 1262–1271.
- Popova, M.P., Graikou, K., Chinou, I., Bankova, V.S., 2010. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3167–3176.
- Popova, M.P., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., Tsvetkova, L., Najdenski, H., Bankova, V., 2011. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* 1431–1435.
- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H.T., Tsvetkova, I., Najdenski, H., Bankova, V., 2013. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chem. Cent. J.* 7, 158.
- Quiroga, E.N., Sampietro, D.A., Soberón, J.R., Sgariglia, M.A., Vattuone, M.A., 2006. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J. Appl. Microbiol.* 101, 103–110.
- Rahman, M.M., Richardson, A., Sofian-Azirun, M., 2010. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 872–878.

- Reis, J.S.S., Oliveira, G.B., Monteiro, M.C., Machado, C.S., Torres, Y.R., Prediger, R.D., Maia, C.S.F., 2014. Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytother. Phytopharm.* 21, 1466–1472.
- Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2363–2370.
- Rizk, S.M., Zaki, H.F., Mina, M.A.M., 2014. Propolis attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 67, 176–186.
- Rosenberg Zand, R.S., Jenkins, D.J.A., Diamandis, E.P., 2002. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 777, 219–232.
- Rushdi, A.I., Adgaba, N., Bayaqoob, N.J.M., Al-Khazim, A., Simoneit, B.U.T., El-Mubarak, A.H., Al-Mudraq, K.F., 2014. Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *SpringerPlus* 3, 253.
- Ryu, S., Lim, W., Bazer, F.W., Song, G., 2012. Chrysin induces death of prostate cancer cells by inducing ROS and ER stress. *J. Cell. Physiol.* doi:http://dx.doi.org/10.1002/jcp.25861 Feb 18. [Epub ahead of print].
- Salim, E.L., Abd El-Magid, A.D., Farara, K.M., Maria, D.S.M., 2015. Antitumoral and antioxidant potential of egyptian propolis against the PC3 prostate cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 16, 7641–7651.
- Samarghandian, S., Afshari, J.T., Davoodi, S., 2011. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3. *Clin. Sao Paulo Braz.* 66, 1073–1079.
- Sampietro, D.A., Sampietro Vattuone, M.M., Vattuone, M.A., 2016. Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina. *IWT – Food Sci. Technol.* 9–15.
- Sanderson, J.T., Hordijk, J., Denison, M.S., Springsted, M.F., Nantz, M.H., van den Berg, M., 2004. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 82, 70–79.
- Sawaya, A.C.H.F., Cunha, L.B., Marcucci, M., de Oliveira Rodrigues, R.F., Eberlin, M.N., 2006. Brazilian propolis (*fratraginis ca angustula* and *apis mellifera*). *Apidologie* 398–407.
- Segueni, N., Magid, A.A., Decarme, M., Rhouati, S., Lahouel, M., Antonicelli, F., Lavaud, C., Hornebeck, W., 2011. Inhibition of stromelysin-1 by caffeic acid derivatives from a propolis sample from Algeria. *Planta Med.* 77, 999–1004.
- Sforzin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1–14.
- Sforzin, J.M., 2016. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother. Res. PTR* 30, 894–905.
- Shen, K.-H., Hung, S.-H., Yin, L.-T., Huang, C.-S., Chao, C.-H., Liu, C.-L., Shih, Y.-W., 2010. Acacetin a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 333, 279–291.
- Silici, S., Onlu, M., Vardar-Onlu, G., 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1797–1803.
- Silva, B.B., Rosalen, P.J., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008. Chemical composition and botanical origin of red propolis: a new type of brazilian propolis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 5, 313–316.
- Silva-Carvalho, R., Miranda-Gonçalves, V., Ferreira, A.M., Cardoso, S.M., Sobral, A.J.F.N., Almeida-Aguiar, C., Baltazar, F., 2014. Antitumoral and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. *J. Funct. Foods* 160–171.
- Soda, M., Hu, D., Endo, S., Takemura, M., Li, J., Wada, R., Ifuku, S., Zhao, H.-T., El-Kabbani, O., Ohta, S., et al., 2012. Design: synthesis and evaluation of caffeic acid phenethyl ester-based inhibitors targeting a selectivity pocket in the active site of human aldo-keto reductase 1B10. *Eur. J. Med. Chem.* 48, 321–329.
- Sun, L.-P., Chen, A.-L., Hung, H.-C., Chien, Y.-H., Huang, J.-S., Huang, C.-Y., Chen, Y.-W., Chen, C.-N., 2012. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11748–11758.
- Szliszka, E., Czuba, Z.P., Bronikowska, J., Mertar, A., Paradysz, A., Krol, W., 2011a. Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 535172.
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G., Krol, W., 2011b. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int. J. Oncol.* 38, 941–953.
- Trivedi, R., Mishra, D.P., 2015. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells. *Front. Oncol.* 5.
- Tseng, J.-C., Lin, C.-Y., Su, L.-C., Fu, H.-H., Yang, S.-D., Chuu, C.-P., 2016. CAPE suppresses migration and invasion of prostate cancer cells via activation of non-canonical Wnt signaling. *Oncotarget* 7, 38010–38024.
- Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., Deger, O., 2015. Cytotoxic effect of turkish propolis on liver, colon, breast, cervix and prostate cancer cell lines. *Trop. J. Pharm. Res.* 777–782.
- Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M., 2011. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49, 86–92.
- Wagh, V.D., 2013. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013, 308249.
- Wang, Y., Miao, Y., Mir, A.Z., Cheng, L., Wang, L., Zhao, L., Cui, Q., Zhao, W., Wang, H., 2016. Inhibition of beta-amyloid-induced neurotoxicity by pinocembrin through Nrf2/HO-1 pathway in SH-SY5Y cells. *J. Neurol. Sci.* 368, 223–230.
- Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J., Sforzin, J.M., 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1378–1386.
- Zhang, E.-H., Wang, R.-F., Guo, S.-Z., Liu, B., 2013a. An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 875621.
- Zhang, W., Lan, Y., Huang, Q., Hua, Z., 2013b. Galangin induces B16F10 melanoma cell apoptosis via mitochondrial pathway and sustained activation of p38 MAPK. *Cytotechnology* 65, 447–455.
- Zhang, W., Tang, B., Huang, Q., Hua, Z., 2013c. Galangin inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma. *J. Cell. Biochem.* 114, 152–161.

3. Annexe 3

Role of the liver X receptors in skin physiology: putative pharmacological targets in human diseases.

**Zangbéwendé Guy OUEDRAOGO^{a,b}, Allan FOUACHE^{a,b}, Amalia TROUSSON^{a,b},
Silvère BARON^{a,b*}, Jean-Marc A. LOBACCARO^{a,b*}**

a Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR 6293, INSERM U1103, 28, place Henri Dunant, BP38, F63001, Clermont-Ferrand, France.

b Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France

* **Corresponding authors at:** Université Clermont Auvergne, GReD, 10 Avenue Blaise Pascal, Campus Universitaire des Cézeaux, CS60026, F-63178 Aubiere, France . Tel.:+33 473 40 74 16 (JMAL); fax:+33 473 40 70 42.

E-mail addresses: silvere.baron@univ-bpclermont.fr (S. Baron); j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr (J.-M.A. Lobaccaro).

Abstract

Liver X receptors (LXRs) are members of the nuclear receptor superfamily that have been shown to regulate various physiological functions such as lipid metabolism and cholesterol homeostasis. Concordant reports have elicited the possibility to target them to cure many human diseases including arteriosclerosis, cancer, arthritis, and diabetes. The high relevance of modulating LXR activities to treat numerous skin diseases, mainly those with exacerbated inflammation processes, contrasts with the lack of approved therapeutic use. This review makes an assessment to sum up the findings regarding the physiological roles of LXRs in skin and help progress towards the therapeutic and safe management of their activities. It focuses on the possible pharmacological targeting of LXRs to cure or prevent selected skin diseases.

Abbreviations used:

ABCA1: ATP-binding cassette 1; ABCA12: ATP-binding cassette 12; ABCG1: ATP Binding cassette subfamily G member 1; Apo: apolipoprotein; CAT: catalase; COX-2: cyclooxygenase-2; DR4: direct repeat 4; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; ERK, extracellular signal-related kinase; FLG: filaggrin; GBA: beta-glucocerebrosidase; HETE: Hydroxyeicosatetraenoic acid; HMGCoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A; IFNG: interferon gamma; IL1A: interleukin 1 alpha; IL1B: interleukin 1 Beta; IL6: Interleukin 6; IL8: interleukin 8; iNOS: inducible nitric oxide synthase; IVL: involucrin; LOR: loricrin; LPCAT3: lysophosphatidylcholine acyltransferase 3; LPS: lipopolysaccharide; LXR: liver X receptor; LXRE: LXR response element; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; MDC: macrophage-derived chemokine; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; MMP: matrix metalloproteinase; MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog; NADPH: reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺); PPARG: peroxisome proliferator activated receptor gamma; PTGES1: microsomal prostaglandin E synthase; RXR: retinoid X receptor; SLiMs: selective liver X receptor modulators; TGM1: transglutaminase 1; TNFA: tumor necrosis factor A; TRP, tyrosine-related protein; UV: ultraviolet; VDR: vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃) receptor; VEGFA: vascular endothelial growth factor A.

Keywords: LXRs; skin diseases; Selective liver X receptor modulators SLiMs; oxysterols; pharmacological targets

1. Introduction

1.1. Structure and functioning of the LXRs

Liver X receptors are members of the nuclear receptor superfamily (Willy et al., 1995; Maqdasy et al., 2016). They were early identified as a stage managers of lipid (including cholesterol) metabolism as well as homeostasis (Tobin et al., 2002). Two highly similar receptors have been described, LXR α (NR1H3) and LXR β (NR1H2), encoded by distinct genes located respectively on the human genomic regions 11p11.2 and 19q13.3. They harbor the common structure of the nuclear receptor superfamily, made of three organized domains: i) the amino-terminal domain is a regulatory domain of the transcriptional activity, which undergoes regulatory post-translational modifications; ii) the central DNA-binding domain allows both recognition and binding to the LXR response element (LXRE), a specific DNA sequences also called direct repeat 4 (DR4), that consists in direct repeats of 5'-AGGTCA-3' separated by four nucleotides (Willy et al., 1995); iii) the carboxy-terminal region contains a characteristic hydrophobic pocket for ligand binding and interaction with co-activators and co-repressors. While sharing a high rate amino-acid identity (77%) in their ligand- and DNA-binding domains, the two human LXR proteins differ in their amino-terminal domain and in the hinge domain located between the DNA- and the ligand-binding regions (see Viennois *et al.*, 2011 for an extensive description) (Viennois et al., 2011). LXR α or LXR β heterodimerizes with one of the 9-*cis* retinoic acid retinoid X receptors (RXRs or NR2B1-3) (Peet et al., 1998). Once bound to their respective ligands, oxysterol or 9-*cis* retinoic acid, allosteric changes in the heterodimer trigger the release of corepressors, the recruitment of coactivators and subsequent target gene transcription activation (El-Hajjaji et al., 2011; Lobaccaro et al., 2001; Peet et al., 1998).

LXRs were so called at their discovery in 1994 from rat liver (Apfel et al., 1994) because the endogenous ligands had not been identified yet. The later discovery of oxygenated cholesterol derivatives (oxysterols) (Janowski et al., 1996) as LXR endogenous ligands, ejected them from the group of “orphan” nuclear receptors to be classified as “adopted” nuclear receptors. After two decades of intensive research to understand their physiological roles, the study of

selective *Lxr* knockout mice as well as the testing of natural and synthetic ligands pointed out that LXRs may be “druggable” targets in many human diseases including metabolic disorders, immunological upset and/or reproductive disturbances (see Maqdasy *et al.*, 2016 for review). Hence, both LXRs are now considered as true endocrine receptors (Maqdasy *et al.*, 2016). However, the extent of their biological functions highlighted the possible side effects that may accompany the management of their activities to prevent or cure diseases. This also may provide an explanation to the adverse events observed with the highest doses of the first clinically tried LXR agonist (LXR-623)(Katz *et al.*, 2009). This awareness redirected research to the look for selective LXR modulators (SLiMs, (Viennois *et al.*, 2011)) to take full advantage of the therapeutic and protective effects of LXR agonists while avoiding foreseeable drawbacks.

Skin diseases, mainly those involving exacerbated inflammatory processes, are possible future indications of drug candidate LXR ligands (Viennois *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2016), provided that efficient and safe drug is identified. Furthermore, by the feasibility of easy topical use, skin offers several possibilities for the design of targeted therapy (dermal topical medication) with limited or no general adverse events (see below, chapter III).

1.2.Natural ligands of the LXRs

Oxysterols are the first and well documented LXR endogenous agonists. They include 20(*S*)-, 24(*S*)-, 22(*R*)-, 24(*R*)-, 27-hydroxycholesterols, and 24,25-epoxycholesterol, (Björkhem, 2002; Hessvik *et al.*, 2012; Huang, 2014; Janowski *et al.*, 1996; Schroepfer, 2000; Viennois *et al.*, 2012). In addition to oxysterols, some of their downstream metabolites, mainly cholestenic acids with a 3 β -hydroxy-5-ene structure, activate LXR α and LXR β in neuronal cells (Theofilopoulos *et al.*, 2014). The 6 α -hydroxylated bile acids have also been identified as LXR α selective activators (Song *et al.*, 2000). In addition, some other lipid metabolites such as 5 α ,6 α -epoxycholesterol, 7-ketocholesterol-3-sulfate, polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid, prostaglandin F2 α and ursodeoxycholic acid have been shown to antagonize LXR activation (Berrodin *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2014; Ou *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001; Yoshikawa *et al.*, 2002; Zhuang *et al.*, 2013). Besides those endogenous ligands, many agonists from fungi and many antagonists from plants and fungi have been described (see Huang *et al.*, 2014 for review). However this effect needs to be demonstrated *in vivo*.

It is currently accepted that human LXRs are ubiquitously expressed and both LXR α and β are present in skin (Russell *et al.*, 2007). Besides, oxysterols are also present in this tissue. 3 β -

hydroxy-5 α -cholest-8(14)-en-15-one has been described in rat skin and hair (Emmons et al., 1988); this compound inhibits cholesterol synthesis by regulating 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMGCoA) reductase activity (Swaminathan et al., 1992) and has been shown to be a partial agonist for both LXRs (Schmidt et al. 2006). Sulfate esters of cholesterol are abundantly found in keratinized tissues such as skin (Zellmer and Lasch, 1997). They are synthesized by sulfotransferases (Falany et al., 2006), mainly SUL2B1b. It has been suggested that cholesterol sulfates are important for skin integrity and adhesion of the various layers (Figure 1). They also act in keratinocyte differentiation by controlling accumulation of proteins involved in the skin barrier, and perturbations in their metabolism are associated ichthyoses (Elias et al., 1984; Epstein et al., 1984; Webster et al., 1978; Williams and Elias, 1981; Williams et al., 1987). Skin has also been described as a “true” steroidogenic organ (Slominky et al. 2014; Thiboutot et al. 2003). As it, potent LXR ligands which are intermediate in the conversion of cholesterol to pregnenolone by CYP11A1 such as 22(R)-, 25- and 27-hydroxycholesterols could be synthesized. 25-hydroxycholesterol could also be produced keratinocytes under by UV light during photoaging (Olivier et al. 2016). Interestingly, 6-ketocholestanol could also be found in skin. This sterol does not have any known activity on LXRs but could inhibit cholesterol epoxide hydrolase which has been involved in cancer progression (Silvente-Poirot and Poirot, 2012).

Altogether, LXRs are ligand-activated transcription factors; because plant-, fungi- and see animal-origin molecules could modulate LXR activities, identifying and developing medical, nutraceutical or cosmetic LXR modulators is a reasonable challenge.

2. Roles of LXRs in skin physiology

The skin is an organ that plays, as a selective barrier, a central role in body protection and exchange with environment. This role is achieved thanks to a strict specialization of skin cells that build a well-structured histological architecture, which prevents invasion by pathogens and also controls flows of chemical and physical agents. The skin is made up of three distinct cellular layers (Figure 1): the inner, hypodermis, the dermis over the hypodermis, and the outermost, epidermis overlaying the dermis. Under physiologic conditions, the epidermal barrier is continuously maintained by intra-organ trafficking of contents as well as cell proliferation, migration and differentiation, from the *stratum basale* that provides auto-renewal stem cells. LXR interferes with each of those processes as attested by *in vitro* and *in vivo* studies (see below).

2.1. LXRs inhibit proliferation and induce differentiation of skin cells

Keratinocytes are the predominating cells of the skin. From the *stratum basale*, they undergo the vertical differentiation program to successively give rise to the *stratum spinosum*, the *stratum granulosum*, and finally and outermost to the *stratum corneum* made of anuclear bodies full of proteins and called corneocytes. These cells are embedded in a lipid matrix to form the outer skin barrier. Differentiation of keratinocytes to form the *stratum corneum* is accompanied by production of particular proteins such as loricrin, involucrin and filaggrin. Oxysterols inhibit keratinocytes proliferation and simultaneously induce their differentiation by activating LXR β (Hanley et al., 2000; K m uves et al., 2002). They increase expression of loricrin, involucrin, filaggrin and transglutaminase-1, that are markers of keratinocyte differentiation (Hanley et al., 2000; K m uves et al., 2002). The result is the formation of a cornified envelop. *In utero* oxysterols stimulate development of the barrier permeability in fetal rat skin (Hanley et al., 1999) and improve barrier homeostasis in adult mice (K m uves et al., 2002). The molecular mechanisms involved are provided by i) epidermal cholesterol, fatty acid, and sphingolipid synthesis; ii) increase in formation, secretion, and post-secretory processing of lamellar bodies; iii) induction of activity of the lipid processing enzyme β -glucocerebrosidase; iv) expression of ABCA12, a membrane transporter of glucosylceramides into lamellar bodies (Jiang et al., 2008; Man et al., 2006). Surprisingly, despite such antiproliferative effect of LXR activation described *in vitro* and *in vivo*, it has been shown that topical application of activators of LXRs can slow down the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis, including decrease of both proliferation and differentiation in mice (Demerjian et al., 2009).

The neural crest derived pigment cells, the melanocytes, play crucial role in skin by protecting cells from UV radiation. They synthesize melanin polymer in melanosome organelles that are transferred to keratinocytes (Lin and Fisher, 2007). Recent studies have pointed out a possible role of LXR α in the pathogenesis of vitiligo, a skin pigmentation disorder with loss of melanocytes. An abnormal LXR α hyperactivity has been described in vitiligo perilesional melanocytes (Kumar et al., 2010). Interestingly, LXR α single nucleotide polymorphisms (rs11039155 and rs2279238) have been associated with susceptibility to develop vitiligo (Agarwal et al., 2016). Early explanation incriminates a decrease in cell proliferation, an induction of cell death and reduction of MMP1, MMP2 and MMP9 due to LXR α activation in melanocytes (Kumar et al., 2012). Further studies are needed to better define the role of LXR α as well as the level of the ligands in this disease.

Besides keratinocytes and melanocytes, other skin cells, including sebocytes, fibroblasts and adipocytes, undergo reduction of proliferation and increase in differentiation when LXR agonists are added (Russell et al., 2007). Vice-versa, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) impaired proliferation, adipose differentiation and lipid accumulation of 3T3-L1 mouse embryo fibroblasts while it down-regulated LXR α (Moon et al., 2007). Thus, activation of LXRs could inhibit proliferation and stimulate differentiation of various skin cell types (Figure 2).

2.2. Skin barrier maintenance

Integrity of the skin is required to perform physiologic functions and prevent infections and trans-epidermal loss of water. Lipid composition of the skin plays hence a critical role. The epidermis pool of lipids is mainly composed of cholesterol, fatty acids, and ceramides that account about 50% (van Smeden et al., 2014). Intrinsic and extrinsic (photo-) aging modifies corneocyte morphology. Likewise, a change in spatial distribution of sterol cholesterol sulfate, a membrane stabilizing lipid, and in the proportion of both lignoceric acid (C24:0) and hexacosanoic acid (C26:0) are observed during aging (Starr et al., 2016).

UV-induced skin aging results in elevation of matrix metalloproteinases that degrade skin collagen (Fisher et al., 1997) and in hyperactivation of the MAP kinase pathway, mainly ERK, JNK and p38 (Kim et al., 2006). Intrinsic aging and photoaging are associated to disrupted skin barrier with sagging, laxity and dryness. In addition, many skin diseases such as ichthyoses, atopic dermatitis and psoriasis disrupt skin barrier (Schmuth et al., 2015). In ichthyoses, there is a primary dysfunction of skin barrier caused by i) corneocyte defect due to mutations in transglutaminase 1 (TGM1) (Oji et al., 2010; Schmuth et al., 2013); ii) defect in extracellular lipid matrix including impaired ceramide synthesis (Eckl et al., 2013; Radner et al., 2013), reduced cholesterol (Elias et al., 2014); iii) abnormal cell-to-cell adhesion (Hachem et al., 2006).

In atopic dermatitis (Elias and Schmuth, 2009; Sandilands et al., 2007) and in psoriasis (Bergboer et al., 2012; de Cid et al., 2009), primary and secondary barrier dysfunctions (Schmuth et al., 2015) coexist. The secondary dysfunctions usually include inflammatory processes. Interestingly, activation of LXRs improves the repair of skin barrier in experimental models of aging and skin diseases (Chang et al., 2008; Kim et al., 2006; Man et al., 2006; Schmuth et al., 2004). Cholesterol is essential for cell membrane synthesis. Because LXRs regulate lipid synthesis and trafficking (Jiang et al., 2006, 2010), they strengthen the

relevance of their agonist ligands as drug candidates in injuries with disrupted skin barrier. Demonstration is provided by the study of mouse models. In acute barrier disruption, the need of cholesterol increases keratinocyte expression of ABCG1, a plasma membrane transporter involved in cholesterol efflux for the maintenance of lamellar body density, content, and secretion (Jiang et al., 2010). Furthermore, topical treatment of murine skin with LXR activators increases ABCG1 expression in murine epidermis, suggesting that it may help restoring skin barrier (Jiang et al., 2010).

2.3.LXRs modulate skin inflammation and wound healing

Inflammation is a multistep biological response of body tissues to harmful stimulations. It involves immune cells, blood vessels, as well as molecular mediators and aims to rule out the cause, also to mop up damaged tissues and useless metabolites. It further induces tissue repair. Inflammation is a physiological process that is part of the innate immune system; it becomes pathological when it is exacerbated or long lasting (chronic) (Grivennikov et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011; Karin et al., 2006). Acute inflammation chronologically follows three steps: i) an initiation or vascular phase; ii) an amplification or cellular phase; iii) a repair or resolving phase. The vascular phase involves vessel reaction to platelet- and resident cell secreted factors as well as plasma-derived factors. The amplification phase implicates attracted immune cells, mainly granulocytes responsible for phagocytosis and those involved in enzymatic granules release. Chronic inflammation involves, in its cellular phase, an implication of monocytes and lymphocytes. In each phase, inflamed tissues (resident cells and attracted cells) release mediators that modulate the process, such as proteins (chemokines such as TNF and interleukins), or lipids (eicosanoids such as prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes and lipoxins, or resolvins).

2.4.LXR and prostaglandin synthesis

Human cells synthesize lipids, depending on cell types and challenging stimuli. LXR agonists induce lipid accumulation in HaCaT keratinocytes by stimulating lipogenesis (Hong et al., 2010). In human macrophages, LXR activation induces lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3) that increases the pool of arachidonic acid to be mobilized from phospholipids for the production of eicosanoids (Ishibashi et al., 2013). It is thus not surprising that LXR activation may result in an exacerbation or conversely in a decrease of the inflammation process, depending on the produced eicosanoids. For instance, the release of prostaglandin E₂, a pro-inflammatory mediator, is enhanced when macrophages are

preconditioned by LXR agonist (Ishibashi et al., 2013). Inversely, LXR agonists inhibit in cultured macrophages (Joseph et al., 2003) and in keratinocytes (Hong et al., 2010) the expression of COX-2, the major inducible enzyme involved in the synthesis of the prostaglandin intermediary product. LXR agonists furthermore downregulate inflammation *in vivo* (Joseph et al., 2003). Normal epidermal differentiation however needs subsequent synthesis of prostaglandins (sometimes proinflammatory) that are basally synthesized by COX-1 (Tiano et al., 2002). The putative relevance of using LXR agonists to offset COX-2 expression and decrease pro-inflammatory prostaglandin release should be assessed by taking into account their effect on COX-1 as for non-steroidal anti-inflammatory drugs.

However, inhibition of COX-2 does not mean an anti-inflammatory effect as a matter of course. Actually, it has been shown that COX-2 has a pro-inflammatory effect by producing PGE₂ in the early phase of inflammation in the rat carrageenan-induced pleurisy model of acute inflammation. However, COX-2 induces an anti-inflammatory profile of released prostaglandins with predominance of prostaglandin D₂ and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (Gilroy et al., 1999) at a later phase; this process is nowadays called “eicosanoid class switching”. Furthermore, evidence has been provided that the phospholipase A₂/Cox-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E₂ axis activates this switching that results in the biosynthesis of lipoxins (Chandrasekharan and Sharma-Walia, 2015) and resolvins (Moro et al., 2016) that promote the resolution of the inflammatory process through various molecular and cellular processes (Mancini and Battista, 2011).

In Alzheimer disease, prostaglandin F₂ α has been reported to selectively antagonize LXR/RXR and RXR/RXR dimers to accelerate the inflammatory response to β -amyloid (Zhuang et al., 2013). However, such finding has not been reported so far in skin.

2.5. LXRs and leukotriene synthesis

Early studies showed that 5-, 12- and 15-lipoxygenases are active in normal human skin and hyperactivated in psoriatic skin (Duell et al., 1988). Inhibition of the leukotriene B₄ (LTB₄) and 5-lipoxygenase enzyme involved in its synthesis, is a therapeutic basis of drugs designed against asthma (Chauhan and Ducharme, 2012) as well as other diseases with exacerbated inflammation (Rao et al., 2010). In human atherosclerotic plaque, IL-4 induces expression of active 15-lipoxygenase that inhibits LXR α expression and activation, surprisingly resulting in an anti-inflammatory alternative macrophage M₂ phenotype (Chinetti-Gbaguidi et al., 2011). How LXR α is inhibited by 15-lipoxygenase remains unclear. More explanation is provided by

the report that overexpression of arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP or FLAP) in mouse adipose tissue leads to lipoxin A4 production and protects against diet-induced obesity, insulin resistance and inflammation (Elias et al., 2016). Analysis of lipoxin role in non-skin models reveals the anti-inflammatory properties of lipoxins that are lipid metabolites from arachidonic acid through lipoxygenases (Chandrasekharan and Sharma-Walia, 2015).

2.6. LXRs and production of reactive oxygen species

Treatment of lipopolysaccharides (LPS)-activated cells with endogenous or exogenous LXR activating ligands suppresses inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) both at mRNA and protein levels, and thus subsequent NO production (Crisafulli et al., 2010; Hong et al., 2010; Joseph et al., 2003; Yasuda et al., 2005). This strengthened the early studies showing that LXR inhibition by 7-ketocholesterol resulted in an increased generation of reactive oxygen species by enhancing the expression of NADPH oxidase subunits in primary human macrophages (Pedruzzi et al., 2004) and in human U937 promonocytic leukemia (Lemaire-Ewing et al., 2005).

2.7. LXRs inhibits pro-inflammatory cytokines production and release

In skin diseases with exacerbated inflammation such as psoriasis, a low level of LXR α is found together with a high accumulation of pro-inflammatory IL-6, IL-8 and IFN- γ chemokines (Gupta et al., 2009). LXRs regulate pro-inflammatory cytokine synthesis and release depending from the presence/absence of an inflammatory stimulation. Treatment of unstimulated human peripheral blood monocytes or the differentiated macrophage cell line THP-1 with LXR and/or RXR agonists results in the specific induction of the potent pro-inflammatory cytokine TNF α (Landis et al., 2002). When the same cells are stimulated by LPS, they released IL-6 and IL-1 β simultaneously with TNF α . However the release of cytokines when the cells are simultaneously treated with LPS and LXR/RXR ligands were not described by the authors. Besides, LXR ligands dampen the release of pro-inflammatory cytokines under inflammatory conditions. For instance, IL-1 α and TNF α are downregulated in the oxysterol-treated sites from both irritant and allergic contact models of dermatitis compared to untreated sites (Fowler et al., 2003). Activation of LXRs also decreases TNF α -activated expression of pro-inflammatory IL-8, IL-6, and IL-1 β and UV-induced IL-8 and TNF α (Chang et al., 2008).

Moreover, LXR activation by the agonist T0901317 has antifibrotic effects in bleomycin-induced skin fibrosis by interfering with infiltration of macrophages and their release of the pro-fibrotic IL-6 (Beyer et al., 2015).

In formaldehyde-induced pain mouse model, deletion of *Lxr β* in mouse enhances the formalin-induced inflammation, with more activated microglia and astrocytes in the spinal cord and results in hyper reactivity to pain (Bao et al., 2016). The lack of *Lxr β* was accompanied by elevated levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α as well as NF κ B in the formalin-injected paw. Altogether this suggests that LXR β could also be a target for the development of analgesics.

2.8. LXRs decreases production and release of matrix metalloproteinases

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of Zn²⁺-containing endopeptidases which degrades extracellular matrix components. MMPs are involved in remodeling of tissues in physiological as well as pathological contexts, including metastasis and tissue infiltration by cancer cells, inflammation, organ development, angiogenesis, and wound healing (Brinckerhoff and Matrisian, 2002). Basal expression of MMP2 and MMP9 in LXR β -knockout mice is higher than littermate controls, suggesting that LXR β may repress MMPs (Chang et al., 2008). Furthermore, exposure to UV triggers overexpression of MMP2 and MMP9 in hairless mouse skin (Chang et al., 2008) and in human skin (Fisher et al., 1996), making a link between UV-induced skin inflammation (or aging) with MMPs. In addition, cultured fibroblasts displayed high levels of MMP3 and MMP13 (mouse orthologous of human MMP1). Moreover LXR activation by ligands significantly impaired the expression of these MMPs in wild type but not LXR β knock out fibroblasts, thus confirming that LXR ligands mediated the negative regulation of MMP expression through LXR β . Similar conclusions have been drawn from studies in other models (Castrillo et al., 2003; Laragione and Gulko, 2012). However, a study reported that MMP9 is not regulated in human monocyte-derived dendritic cells by LXR activation by T0901317 (Bruckner et al., 2012).

2.9. LXRs and angiogenesis

LXR β subsequently modulates signaling by ALK-1, the transforming growth factor beta (TGF- β) receptor family member (Mo et al., 2002) involved in hereditary hemorrhagic telangiectasia -Rendu-Osler-Weber syndrome- by mutation of its encoding gene *ACVRL1* (Dupuis-Girod et al., 2010; Shovlin et al., 2000). LXR α and LXR β transactivate the *VEGFA* promoter in macrophages by binding to an LXRE (Walczak et al., 2004). Furthermore, LXR

agonists have been shown to reverse high glucose-impaired endothelial progenitor cell-mediated angiogenesis *in vitro* (Li et al., 2012), to promote angiogenesis in the ischemic brain and to improve mouse functional recovery after stroke (Chen et al., 2009; Cui et al., 2013). This is strengthened by the recent report that LXR α knockout mice display reduced angiogenesis, increased mortality and aggravation of heart failure after myocardial infarction (Liu et al., 2016). Some however reported that LXR activation inhibited endothelial sprouting and *in vivo* neo-angiogenesis probably due to disturbed VEGFR2 signaling, lipid raft localization, and cholesterol homeostasis (Noghero et al., 2012). This anti-angiogenic function of LXR may be beneficial to antitumor therapy (Pencheva et al., 2014) but requires further studies to decipher the exact mechanism, even though an early explanation has been provided through the transcriptional induction of tumor and stromal apolipoprotein-E (ApoE) (See above).

3. Therapeutic relevance of LXRs in selected skin diseases

The discovery and development of SLiMs is a long and tedious process that needs several successive approaches based on molecular modeling, cell-based screening and toxicity studies on animal models. It is only after safety studies in healthy volunteers, registered in the ClinicalTrials.gov database, that the compounds could enter clinical trials (for a review on drug discovery of LXRs, see Hong and Tontonoz (Hong and Tontonoz, 2014). In *Nature Reviews Drug Discovery* 13,409 (2014), several patent applications were published related to LXRs by Anayaderm, Bristol-Myers Squibb, Exelixis, Vitae Pharmaceuticals, and Wyeth (Pfizer). A schematic representation of potential skin disorders that could be treated by specific LXR ligands is shown in Figure 3.

3.1.Psoriasis

A significant decrease of LXR α expression has been described in psoriatic lesions compared to healthy skins (Mehta et al., 2013). Microarray analyses have shown that inflammatory chemokines, mainly monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage-derived chemokine (MDC), were elevated in patients compared to controls. Inflammatory chemokines were also highly expressed in affected vs. unaffected skin of patients with psoriasis (Mehta et al., 2013). In addition, MCP-1 and MDC were also higher in patient serum than in healthy subjects, while apolipoprotein-A1 (Apo-A1) was decreased in psoriatic patient serum in comparison to healthy subjects. For unknown reasons, despite such studies suggesting that

LXR activation may benefit psoriatic patients (Gupta et al., 2009), no clinical trial of LXR based therapy has been made available for this disease so far.

Moreover, an altered systemic metabolism of 12(*S*)-HETE has been reported in patients, resulting in increased urinary excretion of tetranor-12(*S*)-HETE with low level of its 12(*S*)-HETE precursor in urine (Setkowicz et al., 2015). This suggests that systemic levels of 12(*S*)-HETE are altered due to accelerated inactivation of this eicosanoid in beta-oxidation. Because 12-lipoxygenase is involved in the synthesis of those metabolites and the pro-resolving lipoxin A4 and lipoxin B4 (Chandrasekharan and Sharma-Walia, 2015), it could be speculated that a perturbation of this metabolic pathway may be the substratum of the exacerbated inflammation in psoriasis. Thus, normalizing the 12-lipoxygenase activity might be relevant for therapeutic strategy.

3.2. Atopic dermatitis

Primary and secondary skin barrier dysfunctions coexist in atopic dermatitis (Schmuth et al., 2015), indicating that skin barrier restoration may be helpful in the therapeutic management of such diseases. In mouse model of dermatitis, transepidermal water loss was impaired by topical treatment with LXR or PPAR γ agonists (Kim et al., 2012). Furthermore, murine atopic dermatitis has been reported to respond to topical LXR and PPAR α and β/δ activators, resulting in normalized or improved epidermal hyperplasia and reduced histologic evidence of inflammation (Hatano et al., 2010). Normal lamellar membrane structures are subsequently restored by those treatments.

Orally active LXR activators have been designed for the treatment of atopic dermatitis (Zheng et al., 2016). One of these, VTP 38543 developed by Vitae Pharmaceuticals as a topical treatment for eczema or atopic dermatitis, is expected to improve barrier function, to decrease inflammation in damaged skin tissue and to repair the damaged outer layer of skin by forming new cells and cementing the new cells together with secreted lipids. VTP-38543 is currently in a Phase 2a proof-of-concept clinical trial (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02655679) to assess the safety, tolerability and efficacy in healthy adult male and female patients with mild to moderate atopic dermatitis.

3.3. Post-surgery and post-radiotherapy wound healing

Based on cellular and animal models, LXR activators may be efficient in improving post-surgery and post-radiotherapy wound healing, by normalizing skin homeostasis. Because of

their capacity to slow-down cell proliferation and induce cell differentiation, they should prevent hypertrophic scar or keloid, if that they are used at the late resolving phase. They should be avoided when cell proliferation is needed for re-epitheliation. Furthermore, their antifibrotic action (Beyer et al., 2015) may be a rational for their use during resolution phase.

3.4. *Ichthyosis*

Existence of a primary skin barrier dysfunction strengthens the putative use of LXR agonists to repair and maintain skin barrier homeostasis (Schmuth et al., 2015). LXR agonists have been proven to be efficient in treating animal models of those diseases (Man et al., 2006). However because of genetic heterogeneity in ichthyoses involving genes such as *TGMI* (Hennies et al., 1998), *ABCA12*, *FLG* and many others (for implicated genes and classification, see Oji et al, 2010 (Oji et al., 2010)), it is possible that only some patients might respond to LXR activation. Other fundamental and preclinical studies on the role of LXRs in lipoxigenase pathways and in ichthyoses are required to better define the possible indications of LXR ligands in ichthyoses.

3.5. *Photo-aging and sunburn*

Chang *et al.* have provided evidence that skin photo-aging, chronological aging and sunburn display molecular alterations and physical damages which are reproducible, for their major part, by LXR β knockout in mice (Chang et al., 2008). They showed that LXR agonists may block COX-2 induction, pro-inflammatory chemokines and release of MMPs, and subsequently repair skin homeostasis and further inhibit skin thickening and wrinkle formation. The finding that aging dermal, but not epidermal, cells express more *PTGES1* and *COX-2* resulting in higher levels of prostaglandin E2 in elderly vs. young skin (Li et al., 2015) reinforces the relevance of using LXR agonists to slow down age- and UV-induced skin damages.

3.6. *Skin cancer*

Melanoma is a cancer that schematically develops from the melanocytes, the pigment-containing cells. The primary cause of UV light exposure in people with low levels of skin pigments. It is mainly the most common type of malignancy in the Caucasian population and its incidence is dramatically increasing (Apalla et al. 2017). Interestingly, Lee et al. (Lee et al. 2013) demonstrated that natural (22*R*)-hydroxycholesterol and synthetic ligands of LXRs inhibit melanogenesis. This process goes through the decrease expression of tyrosine,

tyrosine-related protein 1 (TRP-1) and TRP-2, acceleration of degradation of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), an important regulator melanogenesis, and the activation of extracellular signal-related kinase (ERK) and its downstream target ras, a small GTPase protein. More importantly LXRs activated by synthetic ligands could also block the proliferation of melanoma in cell culture (B16F10 and A-376) and in xenografts (Zhang et al. 2014). This occurs through the induction of apoptosis (caspase-3 cleavage). However, Pencheva et al. (Pencheva et al. 2014) also pointed out the reduction of ApoE, known to have suppressive effects on metastasis. These effects were mediated by LXR β and not LXR α . Conversely to Zhang et al. (2014), the authors did not show any modification of proliferation or survival of melanoma cells. At last Pencheva's work opens a new field of investigations for LXR ligands useful for melanoma as they have a clear significant effect of tumor growth of melanoma tumors resistant to dacarbazine (a clinically approved chemotherapeutic agent) and vemurafenib (a serine/threonine kinase B-Raf inhibitor).

4. Conclusion and perspectives for LXR-based therapy in skin diseases

LXRs are promising pharmacological targets for several skin diseases as they transcriptional activity may be modulated by lipophilic molecules that could easily cross the skin structure. However some concerns should be addressed in the light of recent knowledges on the role of lipoxins and resolvins. Hence, it is important to know how LXRs influence the metabolism of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases.

Furthermore, the design of clinical trials with LXR modulators should take into account the right selection of the targeted pathological process and also the moment of using LXR modulators in the evolution of the disease. Because LXRs play critical roles in several organs and physiological processes (Maqdasy et al., 2016), a cautious management of LXR modulators is undoubtedly necessary for adverse event prevention. Since LXRs are nuclear transcription factors presented as two proteins with specific cell expression, modulators should be adequately vectored (Katz et al., 2009). However, topical use in skin may help decreasing systemic side effects and also allow sufficient dose delivery to the targets. The next generation of SLiMs to be clinically tested should thus include the possibility of an external (topical) administration. They should also be able to access to their targets despite skin barrier permeability disruption that usually exists in the potential indicated diseases. The divergence in some research findings may be due to the complexity of the LXR regulated

pathways. Therefore, *in vitro* studies are useful to make a first screening for active drugs, and *in vivo* testing, for efficiency demonstration.

Conflict of interest: We have read and understood the Chemistry and Physics of lipids policy on declaration of interests and declare that Z. G. Ouedraogo is associate researcher funded by La Régie Municipale des Grands Thermes (La Bourboule, France) and Auvergne Region. The funders had no role in the redaction of this review, decision to publish, or preparation of the manuscript. Authors have no competing interest for the submitted review.

Funding: Part of this study is supported by specific grants from European Regional Development Fund (FEDER), Auvergne Region, La Régie Municipale des Grands Thermes (La Bourboule, France), GREENTECH SA (Saint-Beauzire, France).

References

- Agarwal, S., Kaur, G., Randhawa, R., Mahajan, V., Bansal, R., and Changotra, H. (2016). Liver X Receptor- α polymorphisms (rs11039155 and rs2279238) are associated with susceptibility to vitiligo. *Meta Gene* 8, 33–36.
- Apalla, Z., Nashan, D., Weller, R.B., Castellsagué, X. (2017). Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol. Ther. (Heidelb)*. Jan;7(Suppl 1):5-19. doi: 10.1007/s13555-016-0165-y
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M.A., Salbert, G., and Pfahl, M. (1994). A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7025–7035.
- Bao, X., Cai, Y., Wang, Y., Zhao, J., He, X., Yu, D., Huang, J., Jing, S., Du, Z., Yang, T., et al. (2016). Liver X Receptor β Is Involved in Formalin-Induced Spontaneous Pain. *Mol. Neurobiol.* 1–15.
- Bergboer, J.G.M., Zeeuwen, P.L.J.M., and Schalkwijk, J. (2012). Genetics of psoriasis: evidence for epistatic interaction between skin barrier abnormalities and immune deviation. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2320–2331.
- Berrodin, T.J., Shen, Q., Quinet, E.M., Yudt, M.R., Freedman, L.P., and Nagpal, S. (2010). Identification of 5 α , 6 α -epoxycholesterol as a novel modulator of liver X receptor activity. *Mol. Pharmacol.* 78, 1046–1058.

- Beyer, C., Huang, J., Beer, J., Zhang, Y., Palumbo-Zerr, K., Zerr, P., Distler, A., Dees, C., Maier, C., Munoz, L., et al. (2015). Activation of liver X receptors inhibits experimental fibrosis by interfering with interleukin-6 release from macrophages. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 1317–1324.
- Björkhem, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest.* *110*, 725–730.
- Brinckerhoff, C.E., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 207–214.
- Bruckner, M., Dickel, D., Singer, E., and Legler, D.F. (2012). Converse regulation of CCR7-driven human dendritic cell migration by prostaglandin E2 and liver X receptor activation. *Eur. J. Immunol.* *42*, 2949–2958.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Marathe, C., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003). Liver X Receptor-dependent Repression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Macrophages. *J. Biol. Chem.* *278*, 10443–10449.
- Chandrasekharan, J.A., and Sharma-Walia, N. (2015). Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *J. Inflamm. Res.* *8*, 181–192.
- Chang, K.C.N., Shen, Q., Oh, I.G., Jelinsky, S.A., Jenkins, S.F., Wang, W., Wang, Y., LaCava, M., Yudit, M.R., Thompson, C.C., et al. (2008). Liver X receptor is a therapeutic target for photoaging and chronological skin aging. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 2407–2419.
- Chauhan, B.F., and Ducharme, F.M. (2012). Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002314.
- Chen, J., Cui, X., Zacharek, A., Roberts, C., and Chopp, M. (2009). eNOS mediates TO90317 treatment-induced angiogenesis and functional outcome after stroke in mice. *Stroke J. Cereb. Circ.* *40*, 2532–2538.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Baron, M., Bouhlel, M.A., Vanhoutte, J., Copin, C., Sebti, Y., Derudas, B., Mayi, T., Bories, G., Tailleux, A., et al. (2011). Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR γ and LXR α Pathways Novelty and Significance. *Circ. Res.* *108*, 985–995.
- de Cid, R., Riveira-Munoz, E., Zeeuwen, P.L.J.M., Robarge, J., Liao, W., Dannhauser, E.N., Giardina, E., Stuart, P.E., Nair, R., Helms, C., et al. (2009). Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat. Genet.* *41*, 211–215.
- Crisafulli, C., Mazzon, E., Paterniti, I., Galuppo, M., Bramanti, P., and Cuzzocrea, S. (2010). Effects of Liver x receptor agonist treatment on signal transduction pathways in acute lung inflammation. *Respir. Res.* *11*, 19.
- Cui, X., Chopp, M., Zacharek, A., Cui, Y., Roberts, C., and Chen, J. (2013). The neurorestorative benefit of GW3965 treatment of stroke in mice. *Stroke J. Cereb. Circ.* *44*, 153–161.
- Demerjian, M., Choi, E.-H., Man, M.-Q., Chang, S., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (2009). Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis. *Exp. Dermatol.* *18*, 643–649.

Duell, E.A., Ellis, C.N., and Voorhees, J.J. (1988). Determination of 5,12, and 15-Lipoxygenase Products in Keratomed Biopsies of Normal and Psoriatic Skin. *J. Invest. Dermatol.* *91*, 446–450.

Dupuis-Girod, S., Bailly, S., and Plauchu, H. (2010). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: from molecular biology to patient care. *J. Thromb. Haemost.* *8*, 1447–1456.

Eckl, K.-M., Tidhar, R., Thiele, H., Oji, V., Hausser, I., Brodesser, S., Preil, M.-L., Önal-Akan, A., Stock, F., Müller, D., et al. (2013). Impaired Epidermal Ceramide Synthesis Causes Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis and Reveals the Importance of Ceramide Acyl Chain Length. *J. Invest. Dermatol.* *133*, 2202–2211.

El-Hajjaji, F.-Z., Oumeddour, A., Pommier, A.J.C., Ouvrier, A., Viennois, E., Dufour, J., Caira, F., Drevet, J.R., Volle, D.H., Baron, S., et al. (2011). Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1812*, 974–981.

Elias, P.M., and Schmuth, M. (2009). Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* *9*, 437–446.

Elias, I., Ferré, T., Vilà, L., Muñoz, S., Casellas, A., Garcia, M., Molas, M., Agudo, J., Roca, C., Ruberte, J., et al. (2016). ALOX5AP Overexpression in Adipose Tissue Leads to LXA4 Production and Protection Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* *65*, 2139–2150.

Elias, P.M., Williams, M.L., Maloney, M.E., Bonifas, J.A., Brown, B.E., Grayson, S., Epstein, E.H., and Jr (1984). Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* *74*, 1414.

Elias, P.M., Williams, M.L., Choi, E.-H., and Feingold, K.R. (2014). Role of cholesterol sulfate in epidermal structure and function: Lessons from X-linked ichthyosis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 353–361.

Emmons, G.T., Pyrek, J.S., Dam, R., Martin, M., Kudo, K., and Schroepfer, G.J. (1988). 5 alpha-cholest-8(14)-en-3 beta-ol-15-one, a potent regulator of cholesterol metabolism: occurrence in rat skin. *J. Lipid Res.* *29*, 1039–1054.

Epstein, E.H., Bonifas, J.M., Barber, T.C., and Haynes, M. (1984). Cholesterol Sulfotransferase of Newborn Mouse Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *83*, 332–335.

Falany, C.N., He, D., Dumas, N., Frost, A.R., and Falany, J.L. (2006). Human cytosolic sulfotransferase 2B1: Isoform expression, tissue specificity and subcellular localization. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *102*, 214–221.

Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.-Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* *379*, 335–339.

Fisher, G.J., Wang, Z., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1997). Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. *N. Engl. J. Med.* *337*, 1419–1429.

Fowler, A.J., Sheu, M.Y., Schmuth, M., Kao, J., Fluhr, J.W., Rhein, L., Collins, J.L., Willson, T.M., Mangelsdorf, D.J., Elias, P.M., et al. (2003). Liver X Receptor Activators Display Anti-Inflammatory Activity in Irritant and Allergic Contact Dermatitis Models: Liver-X-Receptor-Specific Inhibition of Inflammation and Primary Cytokine Production. *J. Invest. Dermatol.* *120*, 246–255.

- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* *5*, 698–701.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* *140*, 883.
- Gupta, D.S., Kaul, D., Kanwar, A.J., and Parsad, D. (2009). Psoriasis: crucial role of LXR- α . *Genes Immun.* *11*, 37–44.
- Hachem, J.-P., Wagberg, F., Schmith, M., Crumrine, D., Lissens, W., Jayakumar, A., Houben, E., Mauro, T.M., Leonardsson, G., Brattsand, M., et al. (2006). Serine Protease Activity and Residual LEKTI Expression Determine Phenotype in Netherton Syndrome. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1609–1621.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hanley, K., Kömüves, L.G., Bass, N.M., He, S., Jiang, Y., Crumrine, D., Appel, R., Friedman, M., Bettencourt, J., Min, K., et al. (1999). Fetal Epidermal Differentiation and Barrier Development In Vivo is Accelerated by Nuclear Hormone Receptor Activators1. *J. Invest. Dermatol.* *113*, 788–795.
- Hanley, K., Ng, D.C., He, S., Lau, P., Min, K., Elias, P.M., Bikle, D.D., Mangelsdorf, D.J., Williams, M.L., and Feingold, K.R. (2000). Oxysterols Induce Differentiation in Human Keratinocytes and Increase Ap-1-Dependent Involucrin Transcription. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 545–553.
- Hatano, Y., Man, M.-Q., Uchida, Y., Crumrine, D., Mauro, T.M., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Holleran, W.M. (2010). Murine atopic dermatitis responds to peroxisome proliferator-activated receptors α and β/δ (but not γ) and liver X receptor activators. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, 160–169.e5.
- Hennies, H.C., Küster, W., Wiebe, V., Krebsová, A., and Reis, A. (1998). Genotype/phenotype correlation in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 1052.
- Hessvik, N.P., Bakke, S.S., Smith, R., Ravna, A.W., Sylte, I., Rustan, A.C., Thoresen, G.H., and Kase, E.T. (2012). The liver X receptor modulator 22(S)-hydroxycholesterol exerts cell-type specific effects on lipid and glucose metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *128*, 154–164.
- Hong, C., and Tontonoz, P. (2014). Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 433–444.
- Hong, I., Rho, H.S., Kim, D.-H., and Lee, M.-O. (2010). Activation of LXR α induces lipogenesis in HaCaT cells. *Arch. Pharm. Res.* *33*, 1443–1449.
- Huang, C. (2014). Natural modulators of liver X receptors. *J. Integr. Med.* *12*, 76–85.
- Ishibashi, M., Varin, A., Filomenko, R., Lopez, T., Athias, A., Gambert, P., Blache, D., Thomas, C., Gautier, T., Lagrost, L., et al. (2013). Liver X Receptor Regulates Arachidonic Acid Distribution and Eicosanoid Release in Human Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1171–1179.
- 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 α . *Nature* *383*, 728–731.

- Jiang, Y.J., Lu, B., Kim, P., Elias, P.M., and 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., Kim, P., Paragh, G., Schmitz, G., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (2008). PPAR and LXR Activators Regulate ABCA12 Expression in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 128, 104–109.
- Jiang, Y.J., Lu, B., Tarling, E.J., Kim, P., Man, M.-Q., Crumrine, D., Edwards, P.A., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (2010). Regulation of ABCG1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J. Lipid Res.* 51, 3185–3195.
- 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.
- Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006). Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer. *Cell* 124, 823–835.
- 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.
- Kim, B., Kim, J.E., Kim, H., Lee, J.D., Choi, K.-Y., and Lee, S.H. (2012). Co-treatment with retinyl retinoate and a PPAR α agonist reduces retinoid dermatitis. *Int. J. Dermatol.* 51, 733–741.
- Kim, H.H., Cho, S., Lee, S., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2006). Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J. Lipid Res.* 47, 921–930.
- Kömüves, L.G., Schmuth, M., Fowler, A.J., Elias, P.M., Hanley, K., Man, M.-Q., Moser, A.H., Lobaccaro, J.-M.A., Williams, M.L., Mangelsdorf, D.J., et al. (2002). Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 118, 25–34.
- Kumar, R., Parsad, D., Kaul, D., and Kanwar, A. (2010). Liver X receptor expression in human melanocytes, does it have a role in the pathogenesis of vitiligo? *Exp. Dermatol.* 19, 62–64.
- Kumar, R., Parsad, D., Kanwar, A., and Kaul, D. (2012). Altered levels of LXR- α : crucial implications in the pathogenesis of vitiligo. *Exp. Dermatol.* 21, 853–858.
- Landis, M.S., Patel, H.V., and Capone, J.P. (2002). Oxysterol Activators of Liver X Receptor and 9-cis-Retinoic Acid Promote Sequential Steps in the Synthesis and Secretion of Tumor Necrosis Factor- α from Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 4713–4721.
- Laragione, T., and Gulko, P.S. (2012). Liver X receptor regulates rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte invasiveness, matrix metalloproteinase 2 activation, interleukin-6 and CXCL10. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 1009–1017.
- Lee, C.S., Park, M., Han, J., Lee, J.H., Bae, I.H., Choi, H., Son, E.D., Park, Y.H., Lim, K.M. (2013). Liver X receptor activation inhibits melanogenesis through the acceleration of ERK-mediated MITF degradation. *J Invest Dermatol.* 133, 1063-1071.
- Lee, J.-M., Gang, G.-T., Kim, D.-K., Kim, Y.D., Koo, S.-H., Lee, C.-H., and Choi, H.-S. (2014). Ursodeoxycholic acid inhibits liver X receptor α -mediated hepatic lipogenesis via induction of the nuclear corepressor SMILE. *J. Biol. Chem.* 289, 1079–1091.

Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Berthier, A., Bessède, G., Corcos, L., Gambert, P., Néel, D., and Lizard, G. (2005). Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol. Toxicol.* *21*, 97–114.

Li, X., Song, Y., Han, Y., Wang, D., and Zhu, Y. (2012). Liver X Receptor Agonist Alleviated High Glucose-Induced Endothelial Progenitor Cell Dysfunction via Inhibition of Reactive Oxygen Species and Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Microcirculation* *19*, 547–553.

Li, Y., Lei, D., Swindell, W.R., Xia, W., Weng, S., Fu, J., Worthen, C.A., Okubo, T., Johnston, A., Gudjonsson, J.E., et al. (2015). Age-Associated Increase in Skin Fibroblast-Derived Prostaglandin E2 Contributes to Reduced Collagen Levels in Elderly Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 2181–2188.

Lin, J.Y., and Fisher, D.E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* *445*, 843–850.

Liu, X., Gao, J., Xia, Q., Lu, T., and Wang, F. (2016). Increased mortality and aggravation of heart failure in liver X receptor- α knockout mice after myocardial infarction. *Heart Vessels* *31*, 1370–1379.

Lobaccaro, J.M., Repa, J.J., Lu, T.T., Caira, F., Henry-Berger, J., Volle, D.H., and Mangelsdorf, D.J. (2001). [Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]. *Ann. Endocrinol.* *62*, 239–247.

Man, M.-Q., Choi, E.-H., Schmutz, M., Crumrine, D., Uchida, Y., Elias, P.M., Holleran, W.M., and Feingold, K.R. (2006). Basis for improved permeability barrier homeostasis induced by PPAR and LXR activators: liposensors stimulate lipid synthesis, lamellar body secretion, and post-secretory lipid processing. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 386–392.

Mancini, A.D., and Battista, J.A.D. (2011). The cardinal role of the phospholipase A2/cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase/prostaglandin E2 (PCPP) axis in inflammation. *Inflamm. Res.* *60*, 1083–1092.

Maqdasy, S., Trousson, A., Tauveron, I., Volle, D.H., Baron, S., and Lobaccaro, J.-M.A. (2016). Once and for all, LXR α and LXR β are gatekeepers of the endocrine system. *Mol. Aspects Med.* *49*, 31–46.

Mehta, N.N., Li, K., Szapary, P., Krueger, J., and Brodmerkel, C. (2013). Modulation of cardiometabolic pathways in skin and serum from patients with psoriasis. *J. Transl. Med.* *11*, 194.

Mo, J., Fang, S.J., Chen, W., and Blobe, G.C. (2002). Regulation of ALK-1 Signaling by the Nuclear Receptor LXR β . *J. Biol. Chem.* *277*, 50788–50794.

Moon, H.-S., Chung, C.-S., Lee, H.-G., Kim, T.-G., Choi, Y.-J., and Cho, C.-S. (2007). Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Cells. *Obesity* *15*, 2571–2582.

Moro, K., Nagahashi, M., Ramanathan, R., Takabe, K., and Wakai, T. (2016). Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. *World J. Clin. Cases* *4*, 155–164.

Noghero, A., Perino, A., Seano, G., Saglio, E., Sasso, G.L., Veglio, F., Primo, L., Hirsch, E., Bussolino, F., and Morello, F. (2012). Liver X Receptor Activation Reduces Angiogenesis by Impairing Lipid Raft Localization and Signaling of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 2280–2288.

Oji, V., Tadini, G., Akiyama, M., Blanchet Bardon, C., Bodemer, C., Bourrat, E., Coudiere, P., DiGiovanna, J.J., Elias, P., Fischer, J., et al. (2010). Revised nomenclature and classification of

inherited ichthyoses: results of the First Ichthyosis Consensus Conference in Sorèze 2009. *J. Am. Acad. Dermatol.* **63**, 607–641.

Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Laprèvote, O., Rat, P. (2016). Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* May 18. pii: S0960-0760(16)30145-5. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.015. [Epub ahead of print]

Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6027–6032.

Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J.-C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., et al. (2004). NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10703–10717.

Peet, D.J., Janowski, B.A., and Mangelsdorf, D.J. (1998). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 571–575.

Pencheva, N., Buss, C.G., Posada, J., Merghoub, T., and Tavazoie, S.F. (2014). Broad-Spectrum Therapeutic Suppression of Metastatic Melanoma through Nuclear Hormone Receptor Activation. *Cell* **156**, 986–1001.

Radner, F.P.W., Marrakchi, S., Kirchmeier, P., Kim, G.-J., Ribierre, F., Kamoun, B., Abid, L., Leipoldt, M., Turki, H., Schempp, W., et al. (2013). Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans. *PLoS Genet.* **9**, e1003536.

Rao, P.P.N., Kabir, S.N., and Mohamed, T. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development. *Pharm. Basel Switz.* **3**, 1530–1549.

Russell, L.E., Harrison, W.J., Bahta, A.W., Zouboulis, C.C., Burrin, J.M., and Philpott, M.P. (2007). Characterization of liver X receptor expression and function in human skin and the pilosebaceous unit. *Exp. Dermatol.* **16**, 844–852.

Sandilands, A., Terron-Kwiatkowski, A., Hull, P.R., O'Regan, G.M., Clayton, T.H., Watson, R.M., Carrick, T., Evans, A.T., Liao, H., Zhao, Y., et al. (2007). Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat. Genet.* **39**, 650–654.

Schmidt, R.J., Ficorilli, J.V., Zhang, Y., Bramlett, K.S., Beyer, T.P., Borchert, K., Dowless, M.S., Houck, K.A., Buris, T.P., Eacho, P.I., Liang, G., Guo, L.-W., Wilson, W.K., Michael, L.F., Cao, G. (2006). A 15-ketosterol is a liver X receptor ligand that suppresses sterol-responsive element binding protein-2 activity. *J. Lipid. Res.* **47**, 1037-1044.

Schmuth, M., Elias, P.M., Hanley, K., Lau, P., Moser, A., Willson, T.M., Bikle, D.D., and Feingold, K.R. (2004). The effect of LXR activators on AP-1 proteins in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 41–48.

Schmuth, M., Martinz, V., Janecke, A.R., Fauth, C., Schossig, A., Zschocke, J., and Gruber, R. (2013). Inherited ichthyoses/generalized Mendelian disorders of cornification. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **21**, 123–133.

Schmuth, M., Blunder, S., Dubrac, S., Gruber, R., and Moosbrugger-Martinz, V. (2015). Epidermal barrier in hereditary ichthyoses, atopic dermatitis, and psoriasis. *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.* *13*, 1119–1123.

Schroepfer, G.J. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* *80*, 361–554.

Setkowicz, M., Mastalerz, L., Gielicz, A., Wojas-Pelc, A., and Sanak, M. (2015). Lack of association of ALOX12 and ALOX15B polymorphisms with psoriasis despite altered urinary excretion of 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Br. J. Dermatol.* *172*, 337–344.

Shovlin, C.L., Guttmacher, A.E., Buscarini, E., Faughnan, M.E., Hyland, R.H., Westermann, C.J., Kjeldsen, A.D., and Plauchu, H. (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am. J. Med. Genet.* *91*, 66–67.

Silvente-Poirot, S., Poirot, M. (2012). Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* *12*, 696–703.

Slominski, A.T., Manna, P.R., Tuckey, R.C. (2014). Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol.* *23*, 369–674.

van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S., and Bouwstra, J.A. (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1841*, 295–313.

Song, C., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (2000). Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids* *65*, 423–427.

Song, C., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (2001). Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* *66*, 473–479.

Starr, N.J., Johnson, D.J., Wibawa, J., Marlow, I., Bell, M., Barrett, D.A., and Scurr, D.J. (2016). Age-Related Changes to Human Stratum Corneum Lipids Detected Using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Following in Vivo Sampling. *Anal. Chem.* *88*, 4400–4408.

Swaminathan, S., Pinkerton, F.D., Numazawa, S., Wilson, W.K., and Schroepfer, G.J. (1992). Inhibitors of sterol synthesis. Chemical synthesis and spectral properties of 3 beta-hydroxy-5 alpha-cholest-8(14),24-dien-15-one, 3 beta,25-dihydroxy-5 alpha-cholest-8(14)-en-15-one, and 3 beta,24-dihydroxy-5 alpha-cholest-8(14)-en-15-one and their effects on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in CHO-K1 cells. *J. Lipid Res.* *33*, 1503–1515.

Theofilopoulos, S., Griffiths, W.J., Crick, P.J., Yang, S., Meljon, A., Ogundare, M., Kitambi, S.S., Lockhart, A., Tuschl, K., Clayton, P.T., et al. (2014). Cholestenic acids regulate motor neuron survival via liver X receptors. *J. Clin. Invest.* *124*, 4829–4842.

Thiboutot, D., Jabara, S., McAllister, J.M., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z., Clawson, G. (2003). Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol.* *120*, 905–914.

Tiano, H.F., Loftin, C.D., Akunda, J., Lee, C.A., Spalding, J., Sessoms, A., Dunson, D.B., Rogan, E.G., Morham, S.G., Smart, R.C., et al. (2002). Deficiency of Either Cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 Alters Epidermal Differentiation and Reduces Mouse Skin Tumorigenesis. *Cancer Res.* 62, 3395–3401.

Tobin, K.A.R., Ulven, S.M., Schuster, G.U., Steineger, H.H., Andresen, S.M., Gustafsson, J.-Å., and Nebb, H.I. (2002). Liver X Receptors as Insulin-mediating Factors in Fatty Acid and Cholesterol Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 10691–10697.

Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K., Oumeddour, A., Hajjaji, F.-Z.E., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., and Lobaccaro, J.-M.A. (2011). Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 219–232.

Viennois, E., Mouzat, K., Dufour, J., Morel, L., Lobaccaro, J.-M., and Baron, S. (2012). Selective liver X receptor modulators (SLiMs): what use in human health? *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 129–141.

Walczak, R., Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Castrillo, A., Pei, L., and Tontonoz, P. (2004). Transcription of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene in Macrophages Is Regulated by Liver X Receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 9905–9911.

Webster, D., France, J.T., Shapiro, L.J., and Weiss, R. (1978). X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. *Lancet Lond. Engl.* 1, 70–72.

Williams, M.L., and Elias, P.M. (1981). Stratum corneum lipids in disorders of cornification: increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive x-linked ichthyosis. *J. Clin. Invest.* 68, 1404.

Williams, M.L., Feingold, K.R., Grubauer, G., and Elias, P.M. (1987). Ichthyosis induced by cholesterol-lowering drugs. Implications for epidermal cholesterol homeostasis. *Arch. Dermatol.* 123, 1535–1538.

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.

Yasuda, T., Kanno, M., Kawamoto, M., Yuge, O., and Ninomiya, Y. (2005). Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 22(R)-hydroxycholesterol requires de novo protein synthesis in activated macrophages. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 376–383.

Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., et al. (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.

Zellmer, S., and Lasch, J. (1997). Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 691, 321–329.

Zhang, W., Jiang, H., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, A., Zhao, Y., Zhu, X., Lin, Z., Yuan, X. (2014). Liver X receptor activation induces apoptosis of melanoma cell through caspase pathway. *Cancer Cell Int.* 14, 16. doi: 10.1186/1475-2867-14-16.

Zheng, Y., Zhuang, L., Fan, K.Y., Tice, C.M., Zhao, W., Dong, C., Lotesta, S.D., Leftheris, K., Lindblom, P.R., Liu, Z., et al. (2016). Discovery of a Novel, Orally Efficacious Liver X Receptor (LXR) β Agonist. *J. Med. Chem.* 59, 3264–3271.

Zhuang, J., Zhang, H., Zhou, R., Chen, L., Chen, J., and Shen, X. (2013). Regulation of prostaglandin F₂ α against β amyloid clearance and its inflammation induction through LXR/RXR heterodimer antagonism in microglia. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 106, 45–52.

(2014). Recent patents related to liver X receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 409–409.

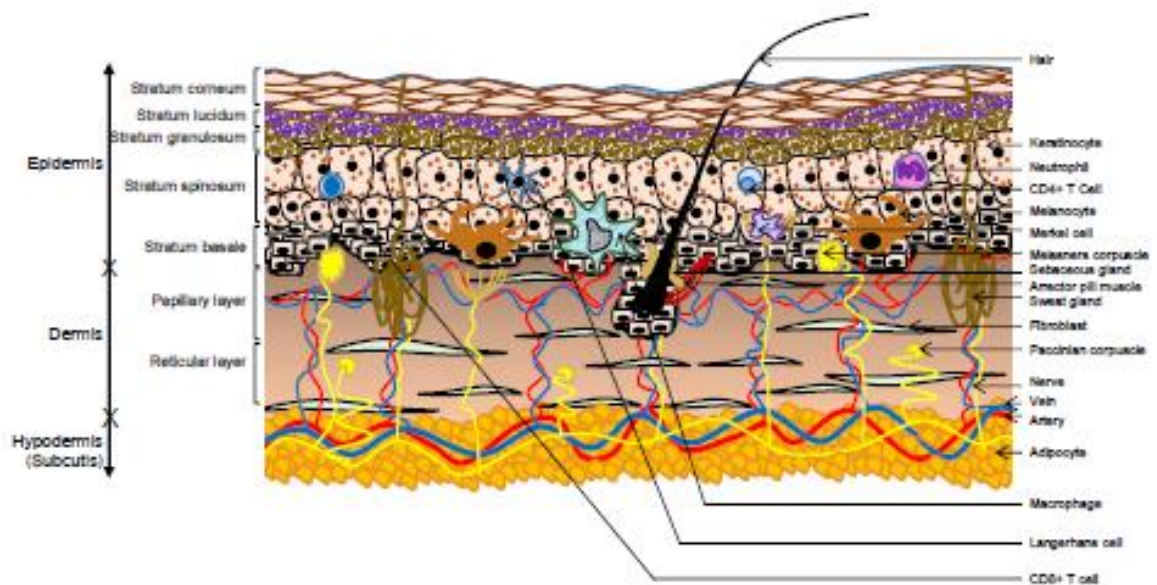


Fig. 1. Schematic representation of human skin architecture. Skin is made of 3 layers that are from inner to outer, the hypodermis, the dermis and the epidermis. Epidermis is structured in 6 layers arising from proliferation and differentiation of keratinocytes from the *stratum basale*. Keratinocytes, fibroblasts, melanocytes and sebocytes the major skin resident cells while cells such as macrophages, dendritic cells, lymphocytes (CD4+ or CD8+ T cells) and neutrophils are secondary attracted to the skin by released chemokines.

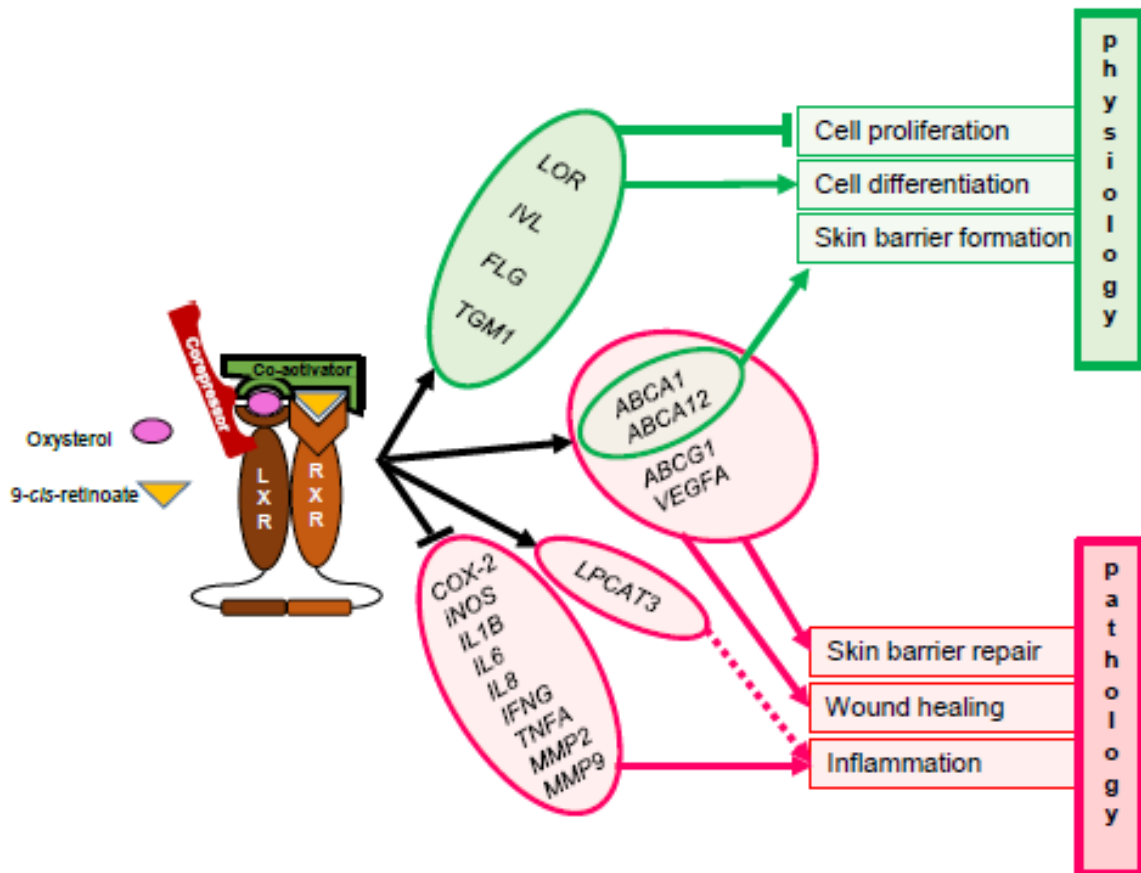


Fig. 2. Role of LXR in physiological and pathological processes. Through direct (transcriptional) or indirect (AP-1) regulation, LXR-RXR heterodimer modulates several targets involved in physiological or pathological conditions. LXR: liver X receptor, RXR: retinoid X receptor, DR4: direct repeat 4, LOR: loricrin, IVL: involucrin, FLG: filaggrin, TGM1: transglutaminase 1, ABCA1: ATP-binding cassette 1, ABCA12: ATP-binding cassette 12, ABCG1: ATP Binding cassette subfamily G member 1, VEGFA: vascular endothelial growth factor A, LPCAT3: lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, COX-2: cyclo-oxygenase-2, iNOS: inducible nitric oxide synthase, IL1B: interleukin 1 Beta, IL6: Interleukin 6, IL8: interleukin 8, IFNG: interferon gamma, TNFA: tumor necrosis factor A, MMP2: matrix metalloproteinase 2, MMP9: matrix metalloproteinase 9.

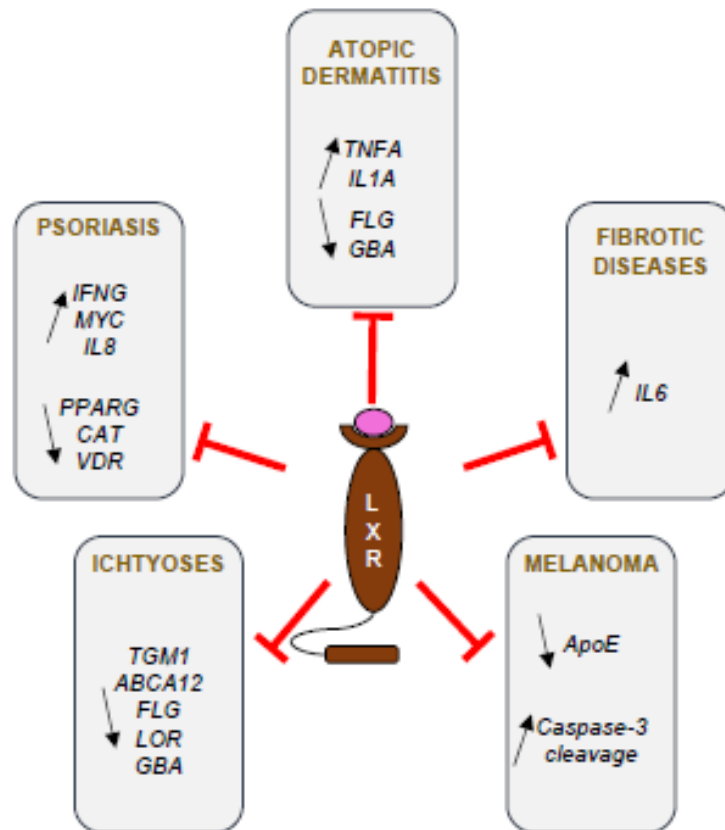


Fig 3. Putative therapeutic targets of LXR activators in selected skin diseases. In each of these skin diseases, perturbed (hyperactivated or repressed) pathways involving some LXR target genes have been associated to the pathogenesis or to the progression of the diseases. Those perturbations constitute rationale for therapeutic development and use of SLiMs. LXR: liver X receptor, IFNG: interferon gamma, MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, IL8: interleukin 8, PPARG: peroxisome proliferator activated receptor gamma, CAT: catalase, VDR: vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor, TNFA: tumor necrosis factor A, IL1A: interleukin 1 alpha, FLG: filaggrin, GBA: beta-glucocerebrosidase, IL6: interleukin 6, TGM1: transglutaminase 1, ABCA12: ATP-binding cassette 12, LOR: loricrin; Apo E, apolipoprotein E.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Agarwal, Jasmin R., Qiuju Wang, Toshihiko Tanno, Zeshaan Rasheed, Akil Merchant, Nilanjan Ghosh, Ivan Borrello, Carol Ann Huff, Farhad Parhami, et William Matsui. 2014. « Activation of Liver X Receptors Inhibits Hedgehog Signaling, Clonogenic Growth, and Self-Renewal in Multiple Myeloma ». *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (7): 1873-81. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0997>.

Albers, Michael, Beatrix Blume, Thomas Schlueter, Matthew B. Wright, Ingo Kober, Claus Kremoser, Ulrich Deuschle, et Manfred Koegl. 2006. « A Novel Principle for Partial Agonism of Liver X Receptor Ligands COMPETITIVE RECRUITMENT OF ACTIVATORS AND REPRESSORS ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (8): 4920-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510101200>.

Al-Hariri, Mohamed T. 2011. « Propolis and its direct and indirect hypoglycemic effect ». *Journal of Family and Community Medicine* 18 (3): 152-54. <https://doi.org/10.4103/2230-8229.90015>.

Amaral, Danilo T., Rogilene A. Prado, et Vadim R. Viviani. 2012. « Luciferase from Fulgeochlizus Bruchi (Coleoptera:Elateridae), a Brazilian Click-Beetle with a Single Abdominal Lantern: Molecular Evolution, Biological Function and Comparison with Other Click-Beetle Luciferases ». *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 11 (7): 1259-67. <https://doi.org/10.1039/c2pp25037c>.

Andersson, Sandra, Nina Gustafsson, Margaret Warner, et Jan-Ake Gustafsson. 2005. « Inactivation of Liver X Receptor Beta Leads to Adult-Onset Motor Neuron Degeneration in Male Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (10): 3857-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500634102>.

Anthonisen, Elin Holter, Lise Berven, Sverre Holm, Maria Nygård, Hilde I. Nebb, et Line M. Grønning-Wang. 2010. « Nuclear Receptor Liver X Receptor Is O-GlcNAc-Modified in Response to Glucose ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 1607-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082685>.

Asquith, Darren Lee, Lucy E. Ballantine, Jagtar Singh Nijjar, Manhal Khuder Makdasy, Sabina Patel, Pamela B. Wright, James H. Reilly, et al. 2013. « The Liver X Receptor Pathway Is Highly Upregulated in Rheumatoid Arthritis Synovial Macrophages and Potentiates TLR-Driven Cytokine Release ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 72 (12): 2024-31. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202872>.

Bai, Ting, You-li Yao, Xue-jun Jin, Li-hua Lian, Qian Li, Ning Yang, Quan Jin, Yan-ling Wu, et Ji-xing Nan. 2014. « Acanthoic Acid, a Diterpene in *Acanthopanax Koreanum*, Ameliorates the Development of Liver Fibrosis via LXRs Signals ». *Chemico-Biological Interactions* 218 (juillet): 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.04.016>.

Baker, Amelia H., James Watt, Cassie K. Huang, Louis C. Gerstenfeld, et Jennifer J. Schlezinger. 2015. « Tributyltin Engages Multiple Nuclear Receptor Pathways and Suppresses Osteogenesis in Bone Marrow Multipotent Stromal Cells ». *Chemical Research in Toxicology* 28 (6): 1156-66. <https://doi.org/10.1021/tx500433r>.

Balaguer, P., A. M. Boussioux, E. Demirpençe, et J. C. Nicolas. 2001. « Reporter Cell Lines Are Useful Tools for Monitoring Biological Activity of Nuclear Receptor Ligands ». *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence* 16 (2): 153-58. <https://doi.org/10.1002/bio.630>.

Ballard, Clive, Serge Gauthier, Anne Corbett, Carol Brayne, Dag Aarsland, et Emma Jones. 2011. « Alzheimer's Disease ». *Lancet (London, England)* 377 (9770): 1019-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).

Benguedouar, L., M. Lahouel, S. Gangloff, A. Durlach, F. Grange, P. Bernard, et F. Antonicelli. 2015. « Algerian ethanolic extract of Propolis and galangin decreased melanoma tumour progression

in C57BL6 mice ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 33e Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), 142 (6, Supplement 1): S294. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2015.04.053>.

Bensinger, Steven J., Michelle N. Bradley, Sean B. Joseph, Noam Zelcer, Edith M. Janssen, Mary Ann Hausner, Roger Shih, et al. 2008. « LXR Signaling Couples Sterol Metabolism to Proliferation in the Acquired Immune Response ». *Cell* 134 (1): 97-111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.052>.

Berman, Helen M., John Westbrook, Zukang Feng, Gary Gilliland, T. N. Bhat, Helge Weissig, Ilya N. Shindyalov, et Philip E. Bourne. 2000. « The Protein Data Bank ». *Nucleic Acids Research* 28 (1): 235-42. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.

Bernards, A., et I. K. Hariharan. 2001. « Of Flies and Men--Studying Human Disease in *Drosophila* ». *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (3): 274-78.

Berrodin, Thomas J., Qi Shen, Elaine M. Quinet, Matthew R. Yudt, Leonard P. Freedman, et Sunil Nagpal. 2010. « Identification of 5 α , 6 α -Epoxycholesterol as a Novel Modulator of Liver X Receptor Activity ». *Molecular Pharmacology* 78 (6): 1046-58. <https://doi.org/10.1124/mol.110.065193>.

Bier, Ethan. 2005. « *Drosophila*, the Golden Bug, Emerges as a Tool for Human Genetics ». *Nature Reviews. Genetics* 6 (1): 9-23. <https://doi.org/10.1038/nrg1503>.

Birrell, Mark A., Matthew C. Catley, Elizabeth Hardaker, Sissie Wong, Timothy M. Willson, Kerry McCluskie, Thomas Leonard, et al. 2007. « Novel Role for the Liver X Nuclear Receptor in the Suppression of Lung Inflammatory Responses ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (44): 31882-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703278200>.

Björkhem, I. 2006. « Crossing the Barrier: Oxysterols as Cholesterol Transporters and Metabolic Modulators in the Brain ». *Journal of Internal Medicine* 260 (6): 493-508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x>.

Björkhem, Ingemar. 2007. « Rediscovery of Cerebrosterol ». *Lipids* 42 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1003-2>.

Bodzioch, M., E. Orsó, J. Klucken, T. Langmann, A. Böttcher, W. Diederich, W. Drobnik, et al. 1999. « The Gene Encoding ATP-Binding Cassette Transporter 1 Is Mutated in Tangier Disease ». *Nature Genetics* 22 (4): 347-51. <https://doi.org/10.1038/11914>.

Boergesen, Michael, Thomas Åskov Pedersen, Barbara Gross, Simon J. van Heeringen, Dik Hagenbeek, Christian Bindsbøll, Sandrine Caron, et al. 2012. « Genome-Wide Profiling of Liver X Receptor, Retinoid X Receptor, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Mouse Liver Reveals Extensive Sharing of Binding Sites ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (4): 852-67. <https://doi.org/10.1128/MCB.06175-11>.

Bonney, Stephanie, et Julie A. Siegenthaler. 2017. « Differential Effects of Retinoic Acid Concentrations in Regulating Blood-Brain Barrier Properties ». *eNeuro* 4 (3). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0378-16.2017>.

Bourguet, W., P. Germain, et H. Gronemeyer. 2000. « Nuclear Receptor Ligand-Binding Domains: Three-Dimensional Structures, Molecular Interactions and Pharmacological Implications ». *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (10): 381-88.

Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, et D. Moras. 1995. « Crystal Structure of the Ligand-Binding Domain of the Human Nuclear Receptor RXR-Alpha ». *Nature* 375 (6530): 377-82. <https://doi.org/10.1038/375377a0>.

Bousset, Laura, Amandine Rambur, Allan Fouache, Julio Bunay, Laurent Morel, Jean-Marc Lobaccaro, Silvère Baron, et al. 2018. « New Insights in Prostate Cancer Development and Tumor Therapy: Modulation of Nuclear Receptors and the Specific Role of Liver X Receptors ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9): 2545. <https://doi.org/10.3390/ijms19092545>.

Bramlett, Kelli S., Keith A. Houck, Kristen M. Borchert, Michele S. Dowless, Palaniappan Kulanthaivel, Youyan Zhang, Thomas P. Beyer, et al. 2003. « A Natural Product Ligand of the Oxysterol Receptor, Liver X Receptor ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307 (1): 291-96. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.052852>.

Brown, M. S., et J. L. Goldstein. 1986. « A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis ». *Science (New York, N.Y.)* 232 (4746): 34-47.

Burke, T. J., K. R. Loniello, J. A. Beebe, et K. M. Ervin. 2003. « Development and Application of Fluorescence Polarization Assays in Drug Discovery ». *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 6 (3): 183-94.

Cali, James J., Andrew Niles, Michael P. Valley, Martha A. O'Brien, Terry L. Riss, et John Shultz. 2008. « Bioluminescent Assays for ADMET ». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4 (1): 103-20. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.1.103>.

Candelaria, Nicholes R., Sridevi Addanki, Jine Zheng, Trang Nguyen-Vu, Husna Karaboga, Prasenjit Dey, Chiara Gabbi, et al. 2014. « Antiproliferative Effects and Mechanisms of Liver X Receptor Ligands in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells ». *PLoS One* 9 (9): e106289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106289>.

Cannon, Megan V., Hongjuan Yu, Wellington M. Candido, Martin M. Dokter, Eva-Lotte Lindstedt, Herman H. W. Silljé, Wiek H. van Gilst, et Rudolf A. de Boer. 2015. « The Liver X Receptor Agonist AZ876 Protects against Pathological Cardiac Hypertrophy and Fibrosis without Lipogenic Side Effects ». *European Journal of Heart Failure* 17 (3): 273-82. <https://doi.org/10.1002/ejhf.243>.

Cao, Guoqing, Yu Liang, Carol L. Broderick, Brian A. Oldham, Thomas P. Beyer, Robert J. Schmidt, Youyan Zhang, et al. 2003. « Antidiabetic Action of a Liver x Receptor Agonist Mediated by Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2): 1131-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210208200>.

Caysa, Henrike, Roland Jacob, Nadine Müther, Bruce Branchini, Martin Messerle, et Ariane Söling. 2009. « A Redshifted Codon-Optimized Firefly Luciferase Is a Sensitive Reporter for Bioluminescence Imaging ». *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 8 (1): 52-56. <https://doi.org/10.1039/b814566k>.

Cecchi, C, F Rosati, A Pensalfini, L Formigli, D Nosi, G Liguri, F Dichiaro, et al. 2008. « Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against A β toxicity by increasing membrane cholesterol content ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (5b): 1990-2002. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00216.x>.

Celniker, Susan E., et Gerald M. Rubin. 2003. « The Drosophila Melanogaster Genome ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 4: 89-117. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110323>.

Chambon, Pierre. 2005. « The Nuclear Receptor Superfamily: A Personal Retrospect on the First Two Decades ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (6): 1418-28. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0125>.

Chandra, Vikas, Pengxiang Huang, Yoshitomo Hamuro, Srilatha Raghuram, Yongjun Wang, Thomas P. Burris, et Fraydoon Rastinejad. 2008. « Structure of the Intact PPAR-Gamma-RXR- Nuclear Receptor Complex on DNA ». *Nature* 456 (7220): 350-56. <https://doi.org/10.1038/nature07413>.

Chandra, Vikas, Pengxiang Huang, Nalini Potluri, Dalei Wu, Youngchang Kim, et Fraydoon Rastinejad. 2013. « Multidomain Integration in the Structure of the HNF-4 α Nuclear Receptor Complex ». *Nature* 495 (7441): 394-98. <https://doi.org/10.1038/nature11966>.

Chao, Esther Y., Justin A. Caravella, Mike A. Watson, Nino Campobasso, Serena Ghisletti, Andrew N. Billin, Cristin Galardi, et al. 2008. « Structure-Guided Design of N-Phenyl Tertiary Amines as Transrepression-Selective Liver X Receptor Modulators with Anti-Inflammatory Activity ». *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (18): 5758-65. <https://doi.org/10.1021/jm800612u>.

Chen, Deliang, Numan Oezguen, Petri Urvil, Colin Ferguson, Sara M. Dann, et Tor C. Savidge. 2016. « Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing ». *Science Advances* 2 (3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501240>.

Chen, Guoxun, Guosheng Liang, Jiafu Ou, Joseph L. Goldstein, et Michael S. Brown. 2004. « Central Role for Liver X Receptor in Insulin-Mediated Activation of Srebp-1c Transcription and Stimulation of Fatty Acid Synthesis in Liver ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11245-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404297101>.

Chen, Mingyi, Michelle N. Bradley, Simon W. Beaven, et Peter Tontonoz. 2006. « Phosphorylation of the Liver X Receptors ». *FEBS Letters* 580 (20): 4835-41. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.074>.

Chen, Taosheng, Wen Xie, Michele Agler, et Martyn Banks. 2003. « Coactivators in Assay Design for Nuclear Hormone Receptor Drug Discovery ». *Assay and Drug Development Technologies* 1 (6): 835-42. <https://doi.org/10.1089/154065803772613462>.

Chen, Wenling, Guoxen Chen, Daphne L. Head, David J. Mangelsdorf, et David W. Russell. 2007. « Enzymatic Reduction of Oxysterols Impairs LXR Signaling in Cultured Cells and the Livers of Mice ». *Cell Metabolism* 5 (1): 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.012>.

Chirumbolo, Salvatore. 2015. « Anti-inflammatory property of propolis ». *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 56 (2): 163-64. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.14-110>.

Choe, Sung Sik, A. Hyun Choi, Joo-Won Lee, Kang Ho Kim, Jun-Jae Chung, Jiyoung Park, Kyeong-Min Lee, Keun-Gyu Park, In-Kyu Lee, et Jae Bum Kim. 2007. « Chronic Activation of Liver X Receptor Induces β -Cell Apoptosis Through Hyperactivation of Lipogenesis: Liver X Receptor–Mediated Lipotoxicity in Pancreatic β -Cells ». *Diabetes* 56 (6): 1534-43. <https://doi.org/10.2337/db06-1059>.

Christenson, L. K., et J. F. Strauss. 2000. « Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) and the Intramitochondrial Translocation of Cholesterol ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1529 (1-3): 175-87.

Chu, Kiki, Makoto Miyazaki, Weng Chi Man, et James M. Ntambi. 2006. « Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Deficiency Protects against Hypertriglyceridemia and Increases Plasma High-Density Lipoprotein Cholesterol Induced by Liver X Receptor Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (18): 6786-98. <https://doi.org/10.1128/MCB.00077-06>.

Commerford, S. Renee, Leo Vargas, Suzanne E. Dorfman, Nico Mitro, Erik C. Rocheford, Puiying A. Mak, Xue Li, Patrick Kennedy, Tara L. Mullarkey, et Enrique Saez. 2007. « Dissection of the Insulin-Sensitizing Effect of Liver X Receptor Ligands ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (12): 3002-12. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0156>.

Cui, Guoliang, Xia Qin, Lili Wu, Yuebo Zhang, Xiaoyan Sheng, Qiwen Yu, Hongguang Sheng, Beili Xi, Jingwu Z. Zhang, et Ying Qin Zang. 2011. « Liver X Receptor (LXR) Mediates Negative Regulation of Mouse and Human Th17 Differentiation ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (2): 658-70. <https://doi.org/10.1172/JCI42974>.

Cummins, Carolyn L., David H. Volle, Yuan Zhang, Jeffrey G. McDonald, Benoît Sion, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Françoise Caira, Georges Veyssi re, David J. Mangelsdorf, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2006. « Liver X Receptors Regulate Adrenal Cholesterol Balance ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1902-12. <https://doi.org/10.1172/JCI28400>.

Cutler, Roy G., Ward A. Pedersen, Simonetta Camandola, Jeffrey D. Rothstein, et Mark P. Mattson. 2002. « Evidence That Accumulation of Ceramides and Cholesterol Esters Mediates Oxidative Stress-Induced Death of Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis ». *Annals of Neurology* 52 (4): 448-57. <https://doi.org/10.1002/ana.10312>.

Dai, Xiao-Yan, Xiang Ou, Xin-Rui Hao, Dong-Li Cao, Ya-Ling Tang, Yan-Wei Hu, Xiao-Xu Li, et Chao-Ke Tang. 2008. « The Effect of T0901317 on ATP-Binding Cassette Transporter A1 and Niemann-Pick Type C1 in ApoE^{-/-} Mice ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 51 (5): 467-75. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31816a5be3>.

Dai, Yu-bing, Xin-jie Tan, Wan-fu Wu, Margaret Warner, et Jan-Åke Gustafsson. 2012. « Liver X Receptor β Protects Dopaminergic Neurons in a Mouse Model of Parkinson Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (32): 13112-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210833109>.

Dalen, Knut Tomas, Stine Marie Ulven, Krister Bamberg, Jan-Ake Gustafsson, et Hilde I. Nebb. 2003. « Expression of the Insulin-Responsive Glucose Transporter GLUT4 in Adipocytes Is Dependent on Liver X Receptor Alpha ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 48283-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302287200>.

Dauer, William, et Serge Przedborski. 2003. « Parkinson's Disease: Mechanisms and Models ». *Neuron* 39 (6): 889-909.

Davis, Melissa B., Inigo SanGil, Grace Berry, Rashidat Olayokun, et Lori H. Neves. 2011. « Identification of common and cell type specific LXXLL motif EcR cofactors using a bioinformatics refined candidate RNAi screen in Drosophila melanogaster cell lines ». *BMC Developmental Biology* 11 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-66>.

Defour, Aurélie, Kevin Dessalle, Andréa Castro Perez, Thomas Poyot, Josiane Castells, Yann Simon Gallot, Christine Durand, et al. 2012. « Sirtuin 1 Regulates SREBP-1c Expression in a LXR-Dependent Manner in Skeletal Muscle ». *PloS One* 7 (9): e43490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043490>.

Dooley, K., et L. I. Zon. 2000. « Zebrafish: A Model System for the Study of Human Disease ». *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (3): 252-56.

Drouineaud, Véronique, Paul Sagot, Carmen Garrido, Emmanuelle Logette, Valérie Deckert, Philippe Gambert, Clément Jimenez, Bart Staels, Laurent Lagrost, et David Masson. 2007. « Inhibition of Progesterone Production in Human Luteinized Granulosa Cells Treated with LXR Agonists ». *Molecular Human Reproduction* 13 (6): 373-79. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam019>.

Drysdale, Rachel, et FlyBase Consortium. 2008. « FlyBase : A Database for the Drosophila Research Community ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 420: 45-59. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_3.

El Roz, Ali, Jean-Marie Bard, Jean-Michel Huvelin, et Hassan Nazih. 2012. « LXR Agonists and ABCG1-Dependent Cholesterol Efflux in MCF-7 Breast Cancer Cells: Relation to Proliferation and Apoptosis ». *Anticancer Research* 32 (7): 3007-13.

El Roz, Ali, Jean-Marie Bard, Sabine Valin, Jean-Michel Huvelin, et Hassan Nazih. 2013. « Macrophage Apolipoprotein E and Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells: Role of LXR ». *Anticancer Research* 33 (9): 3783-89.

Engel, Thomas, Aloys Lueken, Günther Bode, Uwe Hobohm, Stefan Lorkowski, Bernhard Schlueter, Stephan Rust, et al. 2004. « ADP-Ribosylation Factor (ARF)-like 7 (ARL7) Is Induced by Cholesterol Loading and Participates in Apolipoprotein AI-Dependent Cholesterol Export ». *FEBS Letters* 566 (1-3): 241-46. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.048>.

Evans, Ronald M. 2005. « The Nuclear Receptor Superfamily: A Rosetta Stone for Physiology ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (6): 1429-38. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0046>.

Färnegårdh, Mathias, Tomas Bonn, Sherry Sun, Jan Ljunggren, Harri Ahola, Anna Wilhelmsson, Jan-Ake Gustafsson, et Mats Carlquist. 2003. « The Three-Dimensional Structure of the Liver X Receptor Beta Reveals a Flexible Ligand-Binding Pocket That Can Accommodate Fundamentally Different Ligands ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (40): 38821-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304842200>.

Farooqui, Tahira, et Akhlaq A. Farooqui. 2012. « Beneficial Effects of Propolis on Human Health and Neurological Diseases ». *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4 (janvier): 779-93.

Fishman, M. C. 2001. « Genomics. Zebrafish--the Canonical Vertebrate ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5545): 1290-91. <https://doi.org/10.1126/science.1066652>.

Fontaine, Coralie, Elena Rigamonti, Atsushi Nohara, Philippe Gervois, Elisabeth Teissier, Jean-Charles Fruchart, Bart Staels, et Giulia Chinetti-Gbaguidi. 2007. « Liver X Receptor Activation Potentiates the Lipopolysaccharide Response in Human Macrophages ». *Circulation Research* 101 (1): 40-49. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.135814>.

Fowler, Ashley J., Mary Y. Sheu, Matthias Schmuth, Jack Kao, Joachim W. Fluhr, Linda Rhein, Jon L. Collins, et al. 2003. « Liver X Receptor Activators Display Anti-Inflammatory Activity in Irritant and Allergic Contact Dermatitis Models: Liver-X-Receptor-Specific Inhibition of Inflammation and Primary Cytokine Production ». *The Journal of Investigative Dermatology* 120 (2): 246-55. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12033.x>.

Fradera, Xavier, et Jordi Mestres. 2004. « Guided Docking Approaches to Structure-Based Design and Screening ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4 (7): 687-700.

Fradera, Xavier, Diep Vu, Olaf Nimz, Robert Skene, David Hosfield, Robert Wynands, Andrew J. Cooke, et al. 2010. « X-Ray Structures of the LXRA α LBD in Its Homodimeric Form and Implications for Heterodimer Signaling ». *Journal of Molecular Biology* 399 (1): 120-32. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.005>.

Francisco, Vera, Artur Figueirinha, Gustavo Costa, Joana Liberal, Isabel Ferreira, Maria C. Lopes, Carmen García-Rodríguez, Maria T. Cruz, et Maria T. Batista. 2016. « The Flavone Luteolin Inhibits Liver X Receptor Activation ». *Journal of Natural Products* 79 (5): 1423-28. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00146>.

Frenoux, J.-M., P. Vernet, D. H. Volle, A. Britan, F. Saez, A. Kocer, J. Henry-Berger, D. J. Mangelsdorf, J.-M. A. Lobaccaro, et J. R. Drevet. 2004. « Nuclear Oxysterol Receptors, LXRs, Are Involved in the Maintenance of Mouse Caput Epididymidis Structure and Functions ». *Journal of Molecular Endocrinology* 33 (2): 361-75. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01515>.

Fu, Weihua, Jiwei Yao, Yan Huang, Qianwei Li, Weibing Li, Zhiwen Chen, Fengtian He, Zhansong Zhou, et Junan Yan. 2014. « LXR Agonist Regulates the Carcinogenesis of PCa via the SOCS3 Pathway ». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 33 (1): 195-204. <https://doi.org/10.1159/000356662>.

Fu, X., J. G. Menke, Y. Chen, G. Zhou, K. L. MacNaul, S. D. Wright, C. P. Sparrow, et E. G. Lund. 2001. « 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Ligand for Liver X Receptor in Cholesterol-Loaded Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (42): 38378-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105805200>.

Fukuchi, Junichi, Richard A. Hiipakka, John M. Kokontis, Stephen Hsu, Andrew L. Ko, Michael L. Fitzgerald, et Shutsung Liao. 2004. « Androgenic Suppression of ATP-Binding Cassette Transporter A1

Expression in LNCaP Human Prostate Cancer Cells ». *Cancer Research* 64 (21): 7682-85. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2647>.

Fukuchi, Junichi, John M. Kokontis, Richard A. Hiipakka, Chih-Pin Chuu, et Shutsung Liao. 2004. « Antiproliferative Effect of Liver X Receptor Agonists on LNCaP Human Prostate Cancer Cells ». *Cancer Research* 64 (21): 7686-89. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2332>.

Futter, M., H. Diekmann, E. Schoenmakers, O. Sadiq, K. Chatterjee, et D. C. Rubinsztein. 2009. « Wild-Type but Not Mutant Huntingtin Modulates the Transcriptional Activity of Liver X Receptors ». *Journal of Medical Genetics* 46 (7): 438-46. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066399>.

Gabbi, Chiara, Hyun-Jin Kim, Rodrigo Barros, Marion Korach-André, Margaret Warner, et Jan-Ake Gustafsson. 2010. « Estrogen-Dependent Gallbladder Carcinogenesis in LXRbeta^{-/-} Female Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (33): 14763-68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009483107>.

Geyeregger, René, Medhat Shehata, Maximilian Zeyda, Florian W. Kiefer, Karl M. Stuhlmeier, Edit Porpaczy, Gerhard J. Zlabinger, Ulrich J ger, et Thomas M. Stulnig. 2009. « Liver X Receptors Interfere with Cytokine-Induced Proliferation and Cell Survival in Normal and Leukemic Lymphocytes ». *Journal of Leukocyte Biology* 86 (5): 1039-48. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008663>.

Geyeregger, René, Maximilian Zeyda, Wolfgang Bauer, Ernst Kriehuber, Marcus D. S emann, Gerhard J. Zlabinger, Dieter Maurer, et Thomas M. Stulnig. 2007. « Liver X Receptors Regulate Dendritic Cell Phenotype and Function through Blocked Induction of the Actin-Bundling Protein Fascin ». *Blood* 109 (10): 4288-95. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043422>.

Ghisalberti, E. L. 1979. « Propolis: A Review ». *Bee World* 60 (2): 59-84. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>.

Ghisletti, Serena, Wendy Huang, Sumito Ogawa, Gabriel Pascual, Mu-En Lin, Timothy M. Willson, Michael G. Rosenfeld, et Christopher K. Glass. 2007. « Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPARgamma ». *Molecular Cell* 25 (1): 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.022>.

Giguère, V., S. M. Hollenberg, M. G. Rosenfeld, et R. M. Evans. 1986. « Functional Domains of the Human Glucocorticoid Receptor ». *Cell* 46 (5): 645-52.

Glass, Christopher K., et Michael G. Rosenfeld. 2000. « The Coregulator Exchange in Transcriptional Functions of Nuclear Receptors ». *Genes & Development* 14 (2): 121-41. <https://doi.org/10.1101/gad.14.2.121>.

Glickman, J. Fraser, Andres Schmid, et Sandrine Ferrand. 2008. « Scintillation Proximity Assays in High-Throughput Screening ». *Assay and Drug Development Technologies* 6 (3): 433-55. <https://doi.org/10.1089/adt.2008.135>.

Goldwasser, Jonathan, Pazit Y. Cohen, Eric Yang, Patrick Balaguer, Martin L. Yarmush, et Yaakov Nahmias. 2010. « Transcriptional Regulation of Human and Rat Hepatic Lipid Metabolism by the Grapefruit Flavonoid Naringenin: Role of PPARalpha, PPARgamma and LXRalpha ». *PLoS One* 5 (8): e12399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012399>.

Gong, Haibiao, Ping Guo, Yonggong Zhai, Jie Zhou, Hirdesh Uppal, Michael J. Jarzynka, Wen-Chao Song, Shi-Yuan Cheng, et Wen Xie. 2007. « Estrogen Deprivation and Inhibition of Breast Cancer Growth in Vivo through Activation of the Orphan Nuclear Receptor Liver X Receptor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (8): 1781-90. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0187>.

González-Granillo, M., K. R. Steffensen, O. Granados, N. Torres, M. Korach-André, V. Ort z, C. Aguilar-Salinas, et al. 2012. « Soy Protein Isoflavones Differentially Regulate Liver X Receptor Isoforms

to Modulate Lipid Metabolism and Cholesterol Transport in the Liver and Intestine in Mice ». *Diabetologia* 55 (9): 2469-78. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2599-9>.

Green, S., V. Kumar, I. Theulaz, W. Wahli, et P. Chambon. 1988. « The N-Terminal DNA-Binding “zinc Finger” of the Oestrogen and Glucocorticoid Receptors Determines Target Gene Specificity ». *The EMBO Journal* 7 (10): 3037-44.

Greene, G. L., P. Gilna, M. Waterfield, A. Baker, Y. Hort, et J. Shine. 1986. « Sequence and Expression of Human Estrogen Receptor Complementary DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 231 (4742): 1150-54.

Grefhorst, Aldo, Theo H. van Dijk, Anke Hammer, Fjodor H. van der Sluijs, Rick Havinga, Louis M. Havekes, Johannes A. Romijn, Pieter H. Groot, Dirk-Jan Reijngoud, et Folkert Kuipers. 2005. « Differential Effects of Pharmacological Liver X Receptor Activation on Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Lean and Ob/Ob Mice ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289 (5): E829-838. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00165.2005>.

Gronemeyer, Hinrich, Jan-Ake Gustafsson, et Vincent Laudet. 2004. « Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 3 (11): 950-64. <https://doi.org/10.1038/nrd1551>.

Gu, Ming, Yu Zhang, Chuhe Liu, Dongshan Wang, Li Feng, Shengjie Fan, Baican Yang, Qingchun Tong, Guang Ji, et Cheng Huang. 2017. « Morin, a Novel Liver X Receptor α/β Dual Antagonist, Has Potent Therapeutic Efficacy for Nonalcoholic Fatty Liver Diseases ». *British Journal of Pharmacology* 174 (18): 3032-44. <https://doi.org/10.1111/bph.13933>.

Güler-Gane, Gülin, Sara Kidd, Sudharsan Sridharan, Tristan J. Vaughan, Trevor C. I. Wilkinson, et Natalie J. Tigue. 2016. « Overcoming the Refractory Expression of Secreted Recombinant Proteins in Mammalian Cells through Modification of the Signal Peptide and Adjacent Amino Acids ». *PLoS ONE* 11 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155340>.

Gupta, D. S., D. Kaul, A. J. Kanwar, et D. Parsad. 2010. « Psoriasis: Crucial Role of LXR-Alpha RNomics ». *Genes and Immunity* 11 (1): 37-44. <https://doi.org/10.1038/gene.2009.63>.

Han, D. D., D. Stein, et L. M. Stevens. 2000. « Investigating the Function of Follicular Subpopulations during Drosophila Oogenesis through Hormone-Dependent Enhancer-Targeted Cell Ablation ». *Development (Cambridge, England)* 127 (3): 573-83.

Hanley, Timothy M., Wendy Blay Puryear, Suryaram Gummuluru, et Gregory A. Viglianti. 2010. « PPARgamma and LXR Signaling Inhibit Dendritic Cell-Mediated HIV-1 Capture and Trans-Infection ». *PLoS Pathogens* 6 (juillet): e1000981. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000981>.

Hannah, V. C., J. Ou, A. Luong, J. L. Goldstein, et M. S. Brown. 2001. « Unsaturated Fatty Acids Down-Regulate Srebp Isoforms 1a and 1c by Two Mechanisms in HEK-293 Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (6): 4365-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007273200>.

Hardy, R., et M. S. Cooper. 2009. « Bone Loss in Inflammatory Disorders ». *The Journal of Endocrinology* 201 (3): 309-20. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0568>.

Hatano, Yutaka, Mao-Qiang Man, Yoshikazu Uchida, Debra Crumrine, Theodora M. Mauro, Kenneth R. Feingold, Peter M. Elias, et Walter M. Holleran. 2010. « Murine Atopic Dermatitis Responds to Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha and Beta/Delta (but Not Gamma) and Liver X Receptor Activators ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (1): 160-169.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.06.049>.

He, Qing, Jun Pu, Ancai Yuan, Wayne Bond Lau, Erhe Gao, Walter J. Koch, Xin-Liang Ma, et Ben He. 2014. « Activation of Liver-X-Receptor α but Not Liver-X-Receptor β Protects against Myocardial

Ischemia/Reperfusion Injury ». *Circulation. Heart Failure* 7 (6): 1032-41. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001260>.

Heinz, Sven, Christopher Benner, Nathanael Spann, Eric Bertolino, Yin C. Lin, Peter Laslo, Jason X. Cheng, Cornelis Murre, Harinder Singh, et Christopher K. Glass. 2010. « Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime Cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities ». *Molecular Cell* 38 (4): 576-89. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>.

Helleboid-Chapman, Audrey, Stéphane Helleboid, Heidelinde Jakel, Catherine Timmerman, Christian Sergheraert, François Pattou, Jamila Fruchart-Najib, et Jean-Charles Fruchart. 2006. « Glucose Regulates LX α Subcellular Localization and Function in Rat Pancreatic Beta-Cells ». *Cell Research* 16 (7): 661-70. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310069>.

Henry-Berger, Joëlle, Kevin Mouzat, Silvère Baron, Carmelo Bernabeu, Geoffroy Marceau, Jean-Paul Saru, Vincent Sapin, Jean-Marc A. Lobaccaro, et Françoise Caira. 2008. « Endoglin (CD105) Expression Is Regulated by the Liver X Receptor Alpha (NR1H3) in Human Trophoblast Cell Line JAR ». *Biology of Reproduction* 78 (6): 968-75. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066498>.

Herath, Kithsiri, Hiranthi Jayasuriya, John G. Ondeyka, Ziqiang Guan, Robert P. Borris, Eirik Stijfhoorn, Dennis Stevenson, et al. 2005. « Guttiferone I, a New Prenylated Benzophenone from *Garcinia Humilis* as a Liver X Receptor Ligand ». *Journal of Natural Products* 68 (4): 617-19. <https://doi.org/10.1021/np050045j>.

Herzog, Birger, Magnus Hallberg, Asha Seth, Angela Woods, Roger White, et Malcolm G. Parker. 2007. « The Nuclear Receptor Cofactor, Receptor-Interacting Protein 140, Is Required for the Regulation of Hepatic Lipid and Glucose Metabolism by Liver X Receptor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (11): 2687-97. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0213>.

Heudorf, Ursel, Volker Mersch-Sundermann, et Jürgen Angerer. 2007. « Phthalates: Toxicology and Exposure ». *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 210 (5): 623-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>.

Higham, Andrew, Simon Lea, Jonathan Plumb, Barbara Maschera, Karen Simpson, David Ray, et Dave Singh. 2013. « The Role of the Liver X Receptor in Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Respiratory Research* 14 (octobre): 106. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-106>.

Hindinger, Claudia, David R. Hinton, Stefanie J. Kirwin, Roscoe D. Atkinson, Margaret E. Burnett, Cornelia C. Bergmann, et Stephen A. Stohlman. 2006. « Liver X Receptor Activation Decreases the Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Neuroscience Research* 84 (6): 1225-34. <https://doi.org/10.1002/jnr.21038>.

Hoang, Minh-Hien, Yaoyao Jia, Hee-jin Jun, Ji Hae Lee, Kwang-Yeon Hwang, Dal-Woong Choi, Soo-Jong Um, Boo-Yong Lee, Sang-Guan You, et Sung-Joon Lee. 2012. « Taurine Is a Liver X Receptor- α Ligand and Activates Transcription of Key Genes in the Reverse Cholesterol Transport without Inducing Hepatic Lipogenesis ». *Molecular Nutrition & Food Research* 56 (6): 900-911. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100611>.

Hoang, Minh-Hien, Yaoyao Jia, Hee-jin Jun, Ji Hae Lee, Boo Yong Lee, et Sung-Joon Lee. 2012. « Fucosterol Is a Selective Liver X Receptor Modulator That Regulates the Expression of Key Genes in Cholesterol Homeostasis in Macrophages, Hepatocytes, and Intestinal Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (46): 11567-75. <https://doi.org/10.1021/jf3019084>.

Hoang, Minh-Hien, Yaoyao Jia, Hee-jin Jun, Ji-Hae Lee, Dong-Ho Lee, Bang-Yeon Hwang, Woo-Jin Kim, Hak-Ju Lee, et Sung-Joon Lee. 2012. « Ethyl 2,4,6-Trihydroxybenzoate Is an Agonistic Ligand for Liver X Receptor That Induces Cholesterol Efflux from Macrophages without Affecting Lipid

Accumulation in HepG2 Cells ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22 (12): 4094-99. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.071>.

Hoerer, Stefan, Angela Schmid, Armin Heckel, Ralph M. Budzinski, et Herbert Nar. 2003. « Crystal Structure of the Human Liver X Receptor Beta Ligand-Binding Domain in Complex with a Synthetic Agonist ». *Journal of Molecular Biology* 334 (5): 853-61.

Hollenberg, S. M., C. Weinberger, E. S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. B. Thompson, M. G. Rosenfeld, et R. M. Evans. 1985. « Primary Structure and Expression of a Functional Human Glucocorticoid Receptor CDNA ». *Nature* 318 (6047): 635-41.

Hong, Cynthia, Sarah Duit, Pilvi Jalonen, Ruud Out, Lilith Scheer, Vincenzo Sorrentino, Rima Boyadjian, et al. 2010. « The E3 Ubiquitin Ligase IDOL Induces the Degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor Family Members VLDLR and ApoER2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (26): 19720-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123729>.

Hong, Cynthia, Robert Walczak, Helena Dhamko, Michelle N. Bradley, Chaitra Marathe, Rima Boyadjian, Jon V. Salazar, et Peter Tontonoz. 2011. « Constitutive Activation of LXR in Macrophages Regulates Metabolic and Inflammatory Gene Expression: Identification of ARL7 as a Direct Target ». *Journal of Lipid Research* 52 (3): 531-39. <https://doi.org/10.1194/jlr.M010686>.

Hu, Xiao, Suzhen Li, Jun Wu, Chunsheng Xia, et Deepak S. Lala. 2003. « Liver X Receptors Interact with Corepressors to Regulate Gene Expression ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 17 (6): 1019-26. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0399>.

Hu, Yun, Yaqi Yang, Yanjun Yu, Gesi Wen, Nana Shang, Wei Zhuang, Dihan Lu, et al. 2013. « Synthesis and Identification of New Flavonoids Targeting Liver X Receptor β Involved Pathway as Potential Facilitators of A β Clearance with Reduced Lipid Accumulation ». *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (15): 6033-53. <https://doi.org/10.1021/jm301913k>.

Hua, X, C Yokoyama, J Wu, M R Briggs, M S Brown, J L Goldstein, et X Wang. 1993. « SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (24): 11603-7.

Huang, Cheng. 2014. « Natural Modulators of Liver X Receptors ». *Journal of Integrative Medicine* 12 (2): 76-85. [https://doi.org/10.1016/S2095-4964\(14\)60013-3](https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60013-3).

Huang, Tom Hsun-Wei, Valentina Razmovski-Naumovski, Noeris K. Salam, Rujee K. Duke, Van Hoan Tran, Colin C. Duke, et Basil D. Roufogalis. 2005. « A Novel LXR-Alpha Activator Identified from the Natural Product Gynostemma Pentaphyllum ». *Biochemical Pharmacology* 70 (9): 1298-1308. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.07.033>.

Huang, Wendy, Serena Ghisletti, Kaoru Saijo, Meghal Gandhi, Myriam Aouadi, Greg Tesz, Dawn Zhang, et al. 2011. « Coronin2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes ». *Nature* 470 (7334): 414-18. <https://doi.org/10.1038/nature09703>.

Hwahng, Seong Hwan, Sung Hwan Ki, Eun Ju Bae, Hyun Eun Kim, et Sang Geon Kim. 2009. « Role of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase-P70 Ribosomal S6 Kinase-1 Pathway in Repression of Liver X Receptor-Alpha-Dependent Lipogenic Gene Induction and Hepatic Steatosis by a Novel Class of Dithiolethiones ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (6): 1913-25. <https://doi.org/10.1002/hep.22887>.

Iio, Akio, Kenji Ohguchi, Munekazu Iinuma, Yoshinori Nozawa, et Masafumi Ito. 2012. « Hesperetin Upregulates ABCA1 Expression and Promotes Cholesterol Efflux from THP-1 Macrophages ». *Journal of Natural Products* 75 (4): 563-66. <https://doi.org/10.1021/np200696r>.

Ishibashi, Minako, Alexis Varin, Rodolphe Filomenko, Tatiana Lopez, Anne Athias, Philippe Gambert, Denis Blache, et al. 2013. « Liver X Receptor Regulates Arachidonic Acid Distribution and Eicosanoid Release in Human Macrophages Significance: A Key Role for Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (6): 1171-79. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300812>.

Ishibashi, S, M S Brown, J L Goldstein, R D Gerard, R E Hammer, et J Herz. 1993. « Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. » *Journal of Clinical Investigation* 92 (2): 883-93.

Ishibashi, S., J. L. Goldstein, M. S. Brown, J. Herz, et D. K. Burns. 1994. « Massive Xanthomatosis and Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Low Density Lipoprotein Receptor-Negative Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 93 (5): 1885-93. <https://doi.org/10.1172/JCI117179>.

Jakobsson, Tomas, Nicolas Venteclaf, Gudrun Toresson, Anastasios E. Damdimopoulos, Anna Ehrlund, Xiaohua Lou, Sabyasachi Sanyal, Knut R. Steffensen, Jan-Ake Gustafsson, et Eckardt Treuter. 2009. « GPS2 Is Required for Cholesterol Efflux by Triggering Histone Demethylation, LXR Recruitment, and Coregulator Assembly at the ABCG1 Locus ». *Molecular Cell* 34 (4): 510-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.006>.

Janowski, B. A., P. J. Willy, T. R. Devi, J. R. Falck, et D. J. Mangelsdorf. 1996. « An Oxysterol Signalling Pathway Mediated by the Nuclear Receptor LXR Alpha ». *Nature* 383 (6602): 728-31. <https://doi.org/10.1038/383728a0>.

Jaye, Michael C., John A. Krawiec, Nino Campobasso, Angela Smallwood, Chunyan Qiu, Quinn Lu, John J. Kerrigan, et al. 2005. « Discovery of Substituted Maleimides as Liver X Receptor Agonists and Determination of a Ligand-Bound Crystal Structure ». *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (17): 5419-22. <https://doi.org/10.1021/jm050532w>.

Jefcoate, Colin R. 2006. « Liver X Receptor Opens a New Gateway to StAR and to Steroid Hormones ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1832-35. <https://doi.org/10.1172/JCI29160>.

Jensen, E. V. 1962. « On the Mechanism of Estrogen Action ». *Perspectives in Biology and Medicine* 6: 47-59.

Jia, Yaoyao, Minh Hien Hoang, Hee-Jin Jun, Ji Hae Lee, et Sung-Joon Lee. 2013. « Cyanidin, a Natural Flavonoid, Is an Agonistic Ligand for Liver X Receptor Alpha and Beta and Reduces Cellular Lipid Accumulation in Macrophages and Hepatocytes ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (14): 4185-90. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.030>.

Jin, Lihua, et Yong Li. 2010. « Structural and functional insights into nuclear receptor signaling ». *Advanced drug delivery reviews* 62 (13): 1218-26. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.007>.

Johnson, Mark A., et Gerald M. Maggiora. 1990. *Concepts and Applications of Molecular Similarity*. Wiley. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300674768>.

Joseph, Sean B., Antonio Castrillo, Bryan A. Laffitte, David J. Mangelsdorf, et Peter Tontonoz. 2003. « Reciprocal Regulation of Inflammation and Lipid Metabolism by Liver X Receptors ». *Nature Medicine* 9 (2): 213-19. <https://doi.org/10.1038/nm820>.

Joseph, Sean B., Bryan A. Laffitte, Parthive H. Patel, Michael A. Watson, Karen E. Matsukuma, Robert Walczak, Jon L. Collins, Timothy F. Osborne, et Peter Tontonoz. 2002. « Direct and Indirect Mechanisms for Regulation of Fatty Acid Synthase Gene Expression by Liver X Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 11019-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111041200>.

Joseph, Sean B., Elaine McKilligin, Liming Pei, Michael A. Watson, Alan R. Collins, Bryan A. Laffitte, Mingyi Chen, et al. 2002. « Synthetic LXR Ligand Inhibits the Development of Atherosclerosis

in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (11): 7604-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.112059299>.

Jun, Hee-jin, Minh-Hien Hoang, Jin Woo Lee, Jia Yaoyao, Ji-Hae Lee, Dong-Ho Lee, Hak-Ju Lee, Woo-Duck Seo, Bang Yeon Hwang, et Sung-Joon Lee. 2012. « Iristectorigenin B Isolated from *Belamcanda chinensis* Is a Liver X Receptor Modulator That Increases ABCA1 and ABCG1 Expression in Macrophage RAW 264.7 Cells ». *Biotechnology Letters* 34 (12): 2213-21. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1036-y>.

Jun, Hee-jin, Minh-Hien Hoang, Siok-Koon Yeo, Yaoyao Jia, et Sung-Joon Lee. 2013. « Induction of ABCA1 and ABCG1 Expression by the Liver X Receptor Modulator Cineole in Macrophages ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23 (2): 579-83. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.11.012>.

Kakidani, H., et M. Ptashne. 1988. « GAL4 Activates Gene Expression in Mammalian Cells ». *Cell* 52 (2): 161-67.

Kakuma, Tetsuya, Young Lee, Moritake Higa, Zhuo-wei Wang, Wentong Pan, Ichihiro Shimomura, et Roger H. Unger. 2000. « Leptin, Troglitazone, and the Expression of Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Liver and Pancreatic Islets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (15): 8536-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8536>.

Kalaany, Nada Y., Karine C. Gauthier, Ann Marie Zavacki, Pradeep P. A. Mammen, Tatsuya Kitazume, Julian A. Peterson, Jay D. Horton, Daniel J. Garry, Antonio C. Bianco, et David J. Mangelsdorf. 2005. « LXRs Regulate the Balance between Fat Storage and Oxidation ». *Cell Metabolism* 1 (4): 231-44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.03.001>.

Kaneko, Emi, Morihiro Matsuda, Yukio Yamada, Yoji Tachibana, Ichihiro Shimomura, et Makoto Makishima. 2003. « Induction of Intestinal ATP-Binding Cassette Transporters by a Phytosterol-Derived Liver X Receptor Agonist ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36091-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304153200>.

Kavlock, Robert, Kim Boekelheide, Robert Chapin, Michael Cunningham, Elaine Faustman, Paul Foster, Mari Golub, et al. 2002. « NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: Phthalates Expert Panel Report on the Reproductive and Developmental Toxicity of Di-n-Butyl Phthalate ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 16 (5): 489-527.

Kempnaers, Bart, Anne Peters, et Katharina Foerster. 2008. « Sources of Individual Variation in Plasma Testosterone Levels ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 363 (1497): 1711-23. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.0001>.

Kennedy, Matthew A., Gabriel C. Barrera, Kotoka Nakamura, Angel Baldán, Paul Tarr, Michael C. Fishbein, Joy Frank, Omar L. Francone, et Peter A. Edwards. 2005. « ABCG1 Has a Critical Role in Mediating Cholesterol Efflux to HDL and Preventing Cellular Lipid Accumulation ». *Cell Metabolism* 1 (2): 121-31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.002>.

Khorasanizadeh, S., et F. Rastinejad. 2001. « Nuclear-Receptor Interactions on DNA-Response Elements ». *Trends in Biochemical Sciences* 26 (6): 384-90.

Kim, Bora, Jin E. Kim, Hyuk Kim, Joo D. Lee, Kang-Yell Choi, et Seung H. Lee. 2012. « Co-Treatment with Retinyl Retinoate and a PPAR α Agonist Reduces Retinoid Dermatitis ». *International Journal of Dermatology* 51 (6): 733-41. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05332.x>.

Kim, Kang Ho, Gha Young Lee, Jong In Kim, Mira Ham, Joo Won Lee, et Jae Bum Kim. 2010. « Inhibitory Effect of LXR Activation on Cell Proliferation and Cell Cycle Progression through Lipogenic Activity ». *Journal of Lipid Research* 51 (12): 3425-33. <https://doi.org/10.1194/jlr.M007989>.

King-Jones, Kirst, et Carl S. Thummel. 2005. « Nuclear Receptors--a Perspective from *Drosophila* ». *Nature Reviews. Genetics* 6 (4): 311-23. <https://doi.org/10.1038/nrg1581>.

Klebe, Gerhard. 2006. « Virtual Ligand Screening: Strategies, Perspectives and Limitations ». *Drug Discovery Today* 11 (13-14): 580-94. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.05.012>.

Kleyer, Arnd, Carina Scholtysek, Edith Bottesch, Ulrike Hillienhof, Christian Beyer, Jörg Hw Distler, Jan P. Tuckermann, Georg Schett, et Gerhard Krönke. 2012. « Liver X Receptors Orchestrate Osteoblast/Osteoclast Crosstalk and Counteract Pathologic Bone Loss ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (12): 2442-51. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1702>.

Kömüves, László G., Matthias Schmuth, Ashley J. Fowler, Peter M. Elias, Karen Hanley, Mao-Qiang Man, Arthur H. Moser, et al. 2002. « Oxysterol Stimulation of Epidermal Differentiation Is Mediated by Liver X Receptor-Beta in Murine Epidermis ». *The Journal of Investigative Dermatology* 118 (1): 25-34. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01628.x>.

Korach-André, Marion, Amena Archer, Rodrigo P. Barros, Paolo Parini, et Jan-Åke Gustafsson. 2011. « Both Liver-X Receptor (LXR) Isoforms Control Energy Expenditure by Regulating Brown Adipose Tissue Activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 403-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017884108>.

Kratzer, Adelheid, Marlene Buchebner, Thomas Pfeifer, Tatjana M. Becker, Georg Uray, Makoto Miyazaki, Shinobu Miyazaki-Anzai, et al. 2009. « Synthetic LXR Agonist Attenuates Plaque Formation in ApoE^{-/-} Mice without Inducing Liver Steatosis and Hypertriglyceridemia ». *Journal of Lipid Research* 50 (2): 312-26. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800376-JLR200>.

Krust, A., S. Green, P. Argos, V. Kumar, P. Walter, J. M. Bornert, et P. Chambon. 1986. « The Chicken Oestrogen Receptor Sequence: Homology with v-ErbA and the Human Oestrogen and Glucocorticoid Receptors ». *The EMBO Journal* 5 (5): 891-97.

Kuipers, Irma, Pim van der Harst, Folkert Kuipers, Linda van Genne, Maaïke Goris, Jukka Y. Lehtonen, Dirk J. van Veldhuisen, Wiek H. van Gilst, et Rudolf A. de Boer. 2010. « Activation of Liver X Receptor-Alpha Reduces Activation of the Renal and Cardiac Renin-Angiotensin-Aldosterone System ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 90 (4): 630-36. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.7>.

Kuipers, Irma, Jiang Li, Inge Vreeswijk-Baudoin, Johan Koster, Pim van der Harst, Herman H. W. Silljé, Folkert Kuipers, Dirk J. van Veldhuisen, Wiek H. van Gilst, et Rudolf A. de Boer. 2010. « Activation of Liver X Receptors with T0901317 Attenuates Cardiac Hypertrophy in Vivo ». *European Journal of Heart Failure* 12 (10): 1042-50. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfq109>.

Kujumgiev, A, I Tsvetkova, Yu Serkedjieva, V Bankova, R Christov, et S Popov. 1999. « Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin ». *Journal of Ethnopharmacology* 64 (3): 235-40. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7).

Kumar, Ravinder, Davinder Parsad, Amrinderjit J. Kanwar, Amrinderjit Kanwar, et Deepak Kaul. 2012. « Altered Levels of LXR- α : Crucial Implications in the Pathogenesis of Vitiligo ». *Experimental Dermatology* 21 (11): 853-58. <https://doi.org/10.1111/exd.12017>.

Kumar, V., S. Green, A. Staub, et P. Chambon. 1986. « Localisation of the Oestradiol-Binding and Putative DNA-Binding Domains of the Human Oestrogen Receptor ». *The EMBO Journal* 5 (9): 2231-36.

Laffitte, Bryan A., Lily C. Chao, Jing Li, Robert Walczak, Sarah Hummasti, Sean B. Joseph, Antonio Castrillo, et al. 2003. « Activation of Liver X Receptor Improves Glucose Tolerance through Coordinate Regulation of Glucose Metabolism in Liver and Adipose Tissue ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5419-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.0830671100>.

- Laffitte, Bryan A., Sean B. Joseph, Mingyi Chen, Antonio Castrillo, Joyce Repa, Damien Wilpitz, David Mangelsdorf, et Peter Tontonoz. 2003. « The Phospholipid Transfer Protein Gene Is a Liver X Receptor Target Expressed by Macrophages in Atherosclerotic Lesions ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (6): 2182-91. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.6.2182-2191.2003>.
- Landis, Mark S., Hansa V. Patel, et John P. Capone. 2002. « Oxysterol Activators of Liver X Receptor and 9-Cis-Retinoic Acid Promote Sequential Steps in the Synthesis and Secretion of Tumor Necrosis Factor-Alpha from Human Monocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4713-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108807200>.
- Lazar, Mitchell A. 2003. « Nuclear receptor corepressors ». *Nuclear Receptor Signaling* 1 (juin). <https://doi.org/10.1621/nrs.01001>.
- Lee, Chang Seok, Miyoung Park, Jiwon Han, Ji-Hae Lee, Il-Hong Bae, Hyunjung Choi, Eui Dong Son, Young-Ho Park, et Kyung-Min Lim. 2013. « Liver X Receptor Activation Inhibits Melanogenesis through the Acceleration of ERK-Mediated MITF Degradation ». *The Journal of Investigative Dermatology* 133 (4): 1063-71. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.409>.
- Lee, Ji-Min, Gil-Tae Gang, Don-Kyu Kim, Yong Deuk Kim, Seung-Hoi Koo, Chul-Ho Lee, et Hueng-Sik Choi. 2014. « Ursodeoxycholic Acid Inhibits Liver X Receptor α -Mediated Hepatic Lipogenesis via Induction of the Nuclear Corepressor SMILE ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (2): 1079-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491522>.
- Lee, Jung Hoon, Haibiao Gong, Shaheen Khadem, Yi Lu, Xiang Gao, Song Li, Jian Zhang, et Wen Xie. 2008. « Androgen Deprivation by Activating the Liver X Receptor ». *Endocrinology* 149 (8): 3778-88. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1605>.
- Lee, Seunghee, Jeongkyung Lee, Soo-Kyung Lee, et Jae W. Lee. 2008. « Activating Signal Cointegrator-2 Is an Essential Adaptor to Recruit Histone H3 Lysine 4 Methyltransferases MLL3 and MLL4 to the Liver X Receptors ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22 (6): 1312-19. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0012>.
- Lehmann, J. M., S. A. Kliewer, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, B. B. Oliver, J. L. Su, S. S. Sundseth, et al. 1997. « Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3137-40.
- Lei, Peng, Anton Baysa, Hilde Irene Nebb, Guro Valen, Tor Skomedal, Jan Bjørn Osnes, Zaiqing Yang, et Fred Haugen. 2013. « Activation of Liver X Receptors in the Heart Leads to Accumulation of Intracellular Lipids and Attenuation of Ischemia-Reperfusion Injury ». *Basic Research in Cardiology* 108 (1): 323. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0323-z>.
- Levin, Nancy, Eric D. Bischoff, Chris L. Daige, Diane Thomas, Calvin T. Vu, Richard A. Heyman, Rajendra K. Tangirala, et Ira G. Schulman. 2005. « Macrophage Liver X Receptor Is Required for Antiatherogenic Activity of LXR Agonists ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (1): 135-42. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000150044.84012.68>.
- Li, Ning, Moisés A. Rivéra-Bermúdez, Mei Zhang, Julio Tejada, Sonya S. Glasson, Lisa A. Collins-Racie, Edward R. Lavallie, et al. 2010. « LXR Modulation Blocks Prostaglandin E2 Production and Matrix Degradation in Cartilage and Alleviates Pain in a Rat Osteoarthritis Model ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (8): 3734-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911377107>.
- Li, Xiaoling, Songwen Zhang, Gil Blander, Jeanette G. Tse, Monty Krieger, et Leonard Guarente. 2007. « SIRT1 Deacetylates and Positively Regulates the Nuclear Receptor LXR ». *Molecular Cell* 28 (1): 91-106. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.032>.

- Lin, Hsiang-Ru. 2013. « Paeoniflorin Acts as a Liver X Receptor Agonist ». *Journal of Asian Natural Products Research* 15 (1): 35-45. <https://doi.org/10.1080/10286020.2012.742510>.
- Lindegaard, Marie L., Christopher A. Wassif, Boris Vaisman, Marcelo Amar, Elizabeth V. Wasmuth, Robert Shamburek, Lars B. Nielsen, Alan T. Remaley, et Forbes D. Porter. 2008. « Characterization of Placental Cholesterol Transport: ABCA1 Is a Potential Target for in Utero Therapy of Smith-Lemli-Opitz Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 17 (23): 3806-13. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn278>.
- Liu, Ziqing, Olivia Chen, J. Blake Joseph Wall, Michael Zheng, Yang Zhou, Li Wang, Haley Ruth Vaseghi, Li Qian, et Jiandong Liu. 2017. « Systematic Comparison of 2A Peptides for Cloning Multi-Genes in a Polycistronic Vector ». *Scientific Reports* 7 (1): 2193. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>.
- Lo Sasso, Giuseppe, Fabiola Bovenga, Stefania Murzilli, Lorena Salvatore, Giuseppe Di Tullio, Nicola Martelli, Andria D'Orazio, et al. 2013. « Liver X Receptors Inhibit Proliferation of Human Colorectal Cancer Cells and Growth of Intestinal Tumors in Mice ». *Gastroenterology* 144 (7): 1497-1507, 1507.e1-13. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.005>.
- Loffler, Michael, Martin Bilban, Mark Reimers, Werner Waldhäusl, et Thomas M. Stulnig. 2006. « Blood Glucose-Lowering Nuclear Receptor Agonists Only Partially Normalize Hepatic Gene Expression in Db/Db Mice ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316 (2): 797-804. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.093831>.
- Lou, Xiaohua, Gudrun Toresson, Cindy Benod, Ji Ho Suh, Kevin J. Philips, Paul Webb, et Jan-Ake Gustafsson. 2014. « Structure of the Retinoid X Receptor α -Liver X Receptor β (RXR α -LXR β) Heterodimer on DNA ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (3): 277-81. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2778>.
- Luo, Y., et A. R. Tall. 2000. « Sterol Upregulation of Human CETP Expression in Vitro and in Transgenic Mice by an LXR Element ». *The Journal of Clinical Investigation* 105 (4): 513-20. <https://doi.org/10.1172/JCI8573>.
- Machuca, I., G. Esslemont, L. Fairclough, et J. R. Tata. 1995. « Analysis of Structure and Expression of the Xenopus Thyroid Hormone Receptor-Beta Gene to Explain Its Autoinduction ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 9 (1): 96-107. <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7760854>.
- Mak, Puiying A., Heidi R. Kast-Woelbern, Andrew M. Anisfeld, et Peter A. Edwards. 2002. « Identification of PLTP as an LXR Target Gene and ApoE as an FXR Target Gene Reveals Overlapping Targets for the Two Nuclear Receptors ». *Journal of Lipid Research* 43 (12): 2037-41.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, et al. 1995. « The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade ». *Cell* 83 (6): 835-39.
- Maqdasy, Salwan, Amalia Trousson, Igor Tauveron, David H. Volle, Silvère Baron, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2016. « Once and for All, LXR α and LXR β Are Gatekeepers of the Endocrine System ». *Molecular Aspects of Medicine* 49: 31-46. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.001>.
- Marceau, Geoffroy, David H. Volle, Denis Gallot, David J. Mangelsdorf, Vincent Sapin, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2005. « Placental Expression of the Nuclear Receptors for Oxysterols LXR α and LXR β during Mouse and Human Development ». *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 283 (1): 175-81. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20157>.
- Mata De Urquiza, A., L. Solomin, et T. Perlmann. 1999. « Feedback-Inducible Nuclear-Receptor-Driven Reporter Gene Expression in Transgenic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13270-75.

Matsumoto, Shunichi, Koshi Hashimoto, Masanobu Yamada, Teturo Satoh, Junko Hirato, et Masatomo Mori. 2009. « Liver X Receptor-Alpha Regulates Proopiomelanocortin (POMC) Gene Transcription in the Pituitary ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 23 (1): 47-60. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0533>.

Matsushima, Yuichi, Cristina Adán, Rafael Garesse, et Laurie S. Kaguni. 2007. « Functional Analysis by Inducible RNA Interference in *Drosophila Melanogaster* ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 372: 207-17. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-365-3_15.

Matthews, Kathleen A., Thomas C. Kaufman, et William M. Gelbart. 2005. « Research Resources for *Drosophila*: The Expanding Universe ». *Nature Reviews. Genetics* 6 (3): 179-93. <https://doi.org/10.1038/nrg1554>.

Mehta, Nehal N., Katherine Li, Philippe Szapary, James Krueger, et Carrie Brodmerkel. 2013. « Modulation of Cardiometabolic Pathways in Skin and Serum from Patients with Psoriasis ». *Journal of Translational Medicine* 11 (août): 194. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-194>.

Mekenyan, Ovanes. 2002. « Dynamic QSAR Techniques: Applications in Drug Design and Toxicology ». *Current Pharmaceutical Design* 8 (17): 1605-21.

Mesbah, L., et A. Samia. 2011. « Bioavailability and Pharmacokinetic of the Algerian Propolis Constituent Naringenin in Rats after Oral Administration ». *Planta Medica* 77 (12): PA11. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1282207>.

Miksicek, Richard J. 1995. « Estrogenic Flavonoids: Structural Requirements for Biological Activity ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208 (1): 44-50. <https://doi.org/10.3181/00379727-208-43830>.

Mitro, Nico, Puiying A. Mak, Leo Vargas, Cristina Godio, Eric Hampton, Valentina Molteni, Andreas Kreuzsch, et Enrique Saez. 2007. « The Nuclear Receptor LXR Is a Glucose Sensor ». *Nature* 445 (7124): 219-23. <https://doi.org/10.1038/nature05449>.

Morales, Jesús R., Iván Ballesteros, José Manuel Deniz, Olivia Hurtado, José Vivancos, Florentino Nombela, Ignacio Lizasoain, Antonio Castrillo, et María A. Moro. 2008. « Activation of Liver X Receptors Promotes Neuroprotection and Reduces Brain Inflammation in Experimental Stroke ». *Circulation* 118 (14): 1450-59. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.782300>.

Morello, Fulvio, Rudolf A. de Boer, Knut R. Steffensen, Massimiliano Gnecci, Jeffrey W. Chisholm, Frans Boomsma, Leonard M. Anderson, et al. 2005. « Liver X Receptors Alpha and Beta Regulate Renin Expression in Vivo ». *The Journal of Clinical Investigation* 115 (7): 1913-22. <https://doi.org/10.1172/JCI24594>.

Mouzat, Kevin, Nicolas Molinari, Jovana Kantar, Anne Polge, Philippe Corcia, Philippe Couratier, Pierre Clavelou, et al. 2018. « Liver X Receptor Genes Variants Modulate ALS Phenotype ». *Molecular Neurobiology* 55 (3): 1959-65. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0453-2>.

Mouzat, Kevin, Magali Prod'homme, David H. Volle, Benoit Sion, Pierre Déchelotte, Karine Gauthier, Jean-Marc Vanacker, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2007. « Oxysterol Nuclear Receptor LXRbeta Regulates Cholesterol Homeostasis and Contractile Function in Mouse Uterus ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (7): 4693-4701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606718200>.

Mouzat, Kevin, Fanny Volat, Silvère Baron, Georges Alves, Aurélien J. C. Pommier, David H. Volle, Geoffroy Marceau, et al. 2009. « Absence of Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptor Induces Ovarian Hyperstimulation Syndrome in Mice ». *Endocrinology* 150 (7): 3369-75. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1519>.

Mozzicafreddo, Matteo, Massimiliano Cuccioloni, Laura Bonfili, Valentina Cecarini, Francesco Alessandro Palermo, Paolo Cocci, Gilberto Mosconi, et al. 2015. « Environmental Pollutants Directly

Affect the Liver X Receptor Alpha Activity: Kinetic and Thermodynamic Characterization of Binding ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 152 (août): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.011>.

Muczynski, Vincent, Charlotte Lecureuil, Sébastien Messiaen, Marie-Justine Guerquin, Thierry N'tumba-Byn, Delphine Moison, Wassim Hodroj, et al. 2012. « Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving LXR α in Human Fetal Testis and Ovary ». *PloS One* 7 (10): e48266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048266>.

Mujica, Verónica, Roxana Orrego, Jorge Pérez, Paula Romero, Paz Ovalle, Jessica Zúñiga-Hernández, Miguel Arredondo, et Elba Leiva. 2017. « The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial ». *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4272940>.

Murakami, H., N. Tamasawa, J. Matsui, M. Yasujima, et T. Suda. 2000. « Plasma Oxysterols and Tocopherol in Patients with Diabetes Mellitus and Hyperlipidemia ». *Lipids* 35 (3): 333-38.

Myhre, Anders E., Joanna Agren, Maria K. Dahle, Margareth V. Tamburstuen, Ståle P. Lyngstadaas, A. Jon L. Collins, Simon J. Foster, Christoph Thiemermann, Ansgar O. Aasen, et Jacob E. Wang. 2008. « Liver X Receptor Is a Key Regulator of Cytokine Release in Human Monocytes ». *Shock (Augusta, Ga.)* 29 (4): 468-74. <https://doi.org/10.1097/shk.0b013e31815073cb>.

Nagel, S. C., J. L. Hagelbarger, et D. P. McDonnell. 2001. « Development of an ER Action Indicator Mouse for the Study of Estrogens, Selective ER Modulators (SERMs), and Xenobiotics ». *Endocrinology* 142 (11): 4721-28. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8471>.

Nguyen-Vu, Trang, Lise-Lotte Vedin, Ka Liu, Philip Jonsson, Jean Z. Lin, Nicholes R. Candelaria, Lindsay P. Candelaria, et al. 2013. « Liver \times Receptor Ligands Disrupt Breast Cancer Cell Proliferation through an E2F-Mediated Mechanism ». *Breast Cancer Research: BCR* 15 (3): R51. <https://doi.org/10.1186/bcr3443>.

Nieva Moreno, M. I., M. I. Isla, N. G. Cudmani, M. A. Vattuone, et A. R. Sampietro. 1999. « Screening of Antibacterial Activity of Amaicha Del Valle (Tucumán, Argentina) Propolis ». *Journal of Ethnopharmacology* 68 (1-3): 97-102.

Nilsson, Maria, Thomas M. Stulnig, Chin-Yo Lin, Ai Li Yeo, Peter Nowotny, Edison T. Liu, et Knut R. Steffensen. 2007. « Liver X Receptors Regulate Adrenal Steroidogenesis and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Feedback ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (1): 126-37. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0187>.

Nilsson, Stefan, et Jan-Ake Gustafsson. 2002. « Biological Role of Estrogen and Estrogen Receptors ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37 (1): 1-28. <https://doi.org/10.1080/10409230290771438>.

Noghero, Alessio, Alessia Perino, Giorgio Seano, Elisa Saglio, Giuseppe Lo Sasso, Franco Veglio, Luca Primo, Emilio Hirsch, Federico Bussolino, et Fulvio Morello. 2012. « Liver X Receptor Activation Reduces Angiogenesis by Impairing Lipid Raft Localization and Signaling of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (9): 2280-88. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.250621>.

Ollikainen, Noah, Charlie Chandsawangbhuwana, et Michael E. Baker. 2006. « Evolution of the Thyroid Hormone, Retinoic Acid, Ecdysone and Liver X Receptors ». *Integrative and Comparative Biology* 46 (6): 815-26. <https://doi.org/10.1093/icb/icl035>.

Ou, J., H. Tu, B. Shan, A. Luk, R. A. DeBose-Boyd, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein, et M. S. Brown. 2001. « Unsaturated Fatty Acids Inhibit Transcription of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c (SREBP-1c) Gene by Antagonizing Ligand-Dependent Activation of the LXR ». *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 98 (11): 6027-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.111138698>.

Oumeddour, Abdelkader, Emilie Viennois, Françoise Caira, Clélia Decourbey, Salwan Maqdasy, Abdelkrim Tahraoui, Silvère Baron, David H. Volle, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2014. « Liver X Receptors Interfere with the Deleterious Effect of Diethylstilbestrol on Testicular Physiology ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (3): 656-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.005>.

Ouvrier, Aurélia, Rémi Cadet, Patrick Vernet, Brigitte Laillet, Jean-Michel Chardigny, Jean-Marc A. Lobaccaro, Joël R. Drevet, et Fabrice Saez. 2009. « LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner ». *Journal of Lipid Research* 50 (9): 1766-75. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800657-JLR200>.

Paguio, Aileen, Pete Stecha, Keith V Wood, et Frank Fan. 2010. « Improved Dual-Luciferase Reporter Assays for Nuclear Receptors ». *Current Chemical Genomics* 4 (mai): 43-49. <https://doi.org/10.2174/1875397301004010043>.

Park, Min-Chan, Yong-Jin Kwon, Soo-Jin Chung, Yong-Beom Park, et Soo-Kon Lee. 2010. « Liver X Receptor Agonist Prevents the Evolution of Collagen-Induced Arthritis in Mice ». *Rheumatology (Oxford, England)* 49 (5): 882-90. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq007>.

Pascual-García, Mónica, Laura Rué, Theresa León, Josep Julve, José María Carbó, Jonathan Matalonga, Herbert Auer, et al. 2013. « Reciprocal Negative Cross-Talk between Liver X Receptors (LXRs) and STAT1: Effects on IFN- γ -Induced Inflammatory Responses and LXR-Dependent Gene Expression ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (12): 6520-32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201393>.

Pasqualini, Jorge Raul. 2009. « Estrogen Sulfotransferases in Breast and Endometrial Cancers ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1155 (février): 88-98. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04113.x>.

Patil, Rohan, Suranjana Das, Ashley Stanley, Lumbani Yadav, Akulapalli Sudhakar, et Ashok K. Varma. 2010. « Optimized Hydrophobic Interactions and Hydrogen Bonding at the Target-Ligand Interface Leads the Pathways of Drug-Designing ». *PLoS ONE* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>.

Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer, et D. J. Mangelsdorf. 1998. « Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXR Alpha ». *Cell* 93 (5): 693-704.

Pehkonen, Petri, Lynn Welter-Stahl, Janine Diwo, Jussi Ryyänen, Anke Wienecke-Baldacchino, Sami Heikkinen, Eckardt Treuter, Knut R. Steffensen, et Carsten Carlberg. 2012. « Genome-Wide Landscape of Liver X Receptor Chromatin Binding and Gene Regulation in Human Macrophages ». *BMC Genomics* 13 (janvier): 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-50>.

Pencheva, Nora, Colin G. Buss, Jessica Posada, Taha Merghoub, et Sohail F. Tavazoie. 2014. « Broad-Spectrum Therapeutic Suppression of Metastatic Melanoma through Nuclear Hormone Receptor Activation ». *Cell* 156 (5): 986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.038>.

Pencheva, Nora, Hien Tran, Colin Buss, Doowon Huh, Marija Drobnjak, Klaus Busam, et Sohail F. Tavazoie. 2012. « Convergent Multi-MiRNA Targeting of ApoE Drives LRP1/LRP8-Dependent Melanoma Metastasis and Angiogenesis ». *Cell* 151 (5): 1068-82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.028>.

Peng, Dacheng, Richard A. Hiipakka, Qing Dai, Jian Guo, Catherine A. Reardon, Godfrey S. Getz, et Shutsung Liao. 2008. « Antiatherosclerotic Effects of a Novel Synthetic Tissue-Selective Steroidal Liver X Receptor Agonist in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice ». *The Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics 327 (2): 332-42.
<https://doi.org/10.1124/jpet.108.142687>.

Peng, Dacheng, Richard A. Hiipakka, Catherine A. Reardon, Godfrey S. Getz, et Shutsung Liao. 2009. « Differential Anti-Atherosclerotic Effects in the Innominate Artery and Aortic Sinus by the Liver X Receptor Agonist T0901317 ». *Atherosclerosis* 203 (1): 59-66.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.058>.

Pfeiffer, Barret D., James W. Truman, et Gerald M. Rubin. 2012. « Using translational enhancers to increase transgene expression in Drosophila ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17): 6626-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204520109>.

Pikuleva, Irina A. 2006. « Cholesterol-Metabolizing Cytochromes P450 ». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34 (4): 513-20. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.008789>.

Plat, Jogchum, et Ronald P. Mensink. 2002. « Increased Intestinal ABCA1 Expression Contributes to the Decrease in Cholesterol Absorption after Plant Stanol Consumption ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (10): 1248-53. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0718hyp>.

Plat, Jogchum, Jason A. Nichols, et Ronald P. Mensink. 2005. « Plant Sterols and Stanols: Effects on Mixed Micellar Composition and LXR (Target Gene) Activation ». *Journal of Lipid Research* 46 (11): 2468-76. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500272-JLR200>.

Pommier, A. J. C., G. Alves, E. Viennois, S. Bernard, Y. Communal, B. Sion, G. Marceau, et al. 2010. « Liver X Receptor Activation Downregulates AKT Survival Signaling in Lipid Rafts and Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells ». *Oncogene* 29 (18): 2712-23. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.30>.

Pommier, Arnaud, Alexandra Audemard, Aurélie Durand, Renée Lengagne, Arnaud Delpoux, Bruno Martin, Laetitia Douguet, et al. 2013. « Inflammatory Monocytes Are Potent Antitumor Effectors Controlled by Regulatory CD4+ T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (32): 13085-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300314110>.

Porte, C., G. Janer, L. C. Lorusso, M. Ortiz-Zarragoitia, M. P. Cajaraville, M. C. Fossi, et L. Canesi. 2006. « Endocrine Disruptors in Marine Organisms: Approaches and Perspectives ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 143 (3): 303-15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.03.004>.

Potter, Christopher J., Bosiljka Tasic, Emilie V. Russler, Liang Liang, et Liqun Luo. 2010. « The Q System: A Repressible Binary System for Transgene Expression, Lineage Tracing, and Mosaic Analysis ». *Cell* 141 (3): 536-48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.025>.

Prawitt, Janne, F. Timo Beil, Robert P. Marshall, Alexander Bartelt, Wolfgang Ruether, Joerg Heeren, Michael Amling, Bart Staels, et Andreas Niemeier. 2011. « Short-Term Activation of Liver X Receptors Inhibits Osteoblasts but Long-Term Activation Does Not Have an Impact on Murine Bone in Vivo ». *Bone* 48 (2): 339-46. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.018>.

Qian, Hongwu, Xin Zhao, Pingping Cao, Jianlin Lei, Nieng Yan, et Xin Gong. 2017. « Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1 ». *Cell* 169 (7): 1228-1239.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.020>.

Quinet, Elaine M., Michael D. Basso, Anita R. Halpern, David W. Yates, Robert J. Steffan, Valerie Clerin, Christine Resmini, et al. 2009. « LXR Ligand Lowers LDL Cholesterol in Primates, Is Lipid Neutral in Hamster, and Reduces Atherosclerosis in Mouse ». *Journal of Lipid Research* 50 (12): 2358-70. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900037-JLR200>.

Rébé, Cédric, Magalie Raveneau, Angélique Chevriaux, Daniela Lakomy, Anne-Laure Sberna, Annie Costa, Ginette Bessède, et al. 2009. « Induction of Transglutaminase 2 by a Liver X Receptor/Retinoic Acid Receptor Alpha Pathway Increases the Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages ». *Circulation Research* 105 (4): 393-401. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201855>.

Rebeck, G. William. 2004. « Cholesterol Efflux as a Critical Component of Alzheimer's Disease Pathogenesis ». *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 23 (3): 219-24. <https://doi.org/10.1385/JMN:23:3:219>.

Renaud, J. P., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, et D. Moras. 1995. « Crystal Structure of the RAR-Gamma Ligand-Binding Domain Bound to All-Trans Retinoic Acid ». *Nature* 378 (6558): 681-89. <https://doi.org/10.1038/378681a0>.

Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein, et D. J. Mangelsdorf. 2000. « Regulation of Mouse Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c Gene (SREBP-1c) by Oxysterol Receptors, LXRA and LXRbeta ». *Genes & Development* 14 (22): 2819-30.

Repa, Joyce J., Hao Li, Tamy C. Frank-Cannon, Mark A. Valasek, Stephen D. Turley, Malú G. Tansey, et John M. Dietschy. 2007. « Liver X Receptor Activation Enhances Cholesterol Loss from the Brain, Decreases Neuroinflammation, and Increases Survival of the NPC1 Mouse ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (52): 14470-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4823-07.2007>.

Riabinina, Olena, et Christopher J. Potter. 2016. « The Q-System: A Versatile Expression System for Drosophila ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1478: 53-78. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6371-3_3.

Riggs, B. Lawrence, et Lynn C. Hartmann. 2003. « Selective Estrogen-Receptor Modulators -- Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice ». *The New England Journal of Medicine* 348 (7): 618-29. <https://doi.org/10.1056/NEJMra022219>.

Robertson, Kirsten M., Gertrud U. Schuster, Knut R. Steffensen, Outi Hovatta, Steve Meaney, Kjell Hultenby, Lisen C. Johansson, Konstantin Svechnikov, Olle Söder, et Jan-Ake Gustafsson. 2005. « The Liver X Receptor- β Is Essential for Maintaining Cholesterol Homeostasis in the Testis ». *Endocrinology* 146 (6): 2519-30. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1413>.

Robertson Remen, Kirsten M., Ulf H. Lerner, Jan-Åke Gustafsson, et Göran Andersson. 2013. « Activation of the Liver X Receptor- β Potently Inhibits Osteoclastogenesis from Lipopolysaccharide-Exposed Bone Marrow-Derived Macrophages ». *Journal of Leukocyte Biology* 93 (1): 71-82. <https://doi.org/10.1189/jlb.0712339>.

Rock, Kylie D., Brian Horman, Allison L. Phillips, Susan L. McRitchie, Scott Watson, Jocelin Deese-Spruill, Dereje Jima, Susan Sumner, Heather M. Stapleton, et Heather B. Patisaul. 2018. « EDC IMPACT: Molecular Effects of Developmental FM 550 Exposure in Wistar Rat Placenta and Fetal Forebrain ». *Endocrine Connections* 7 (2): 305-24. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0373>.

Roeder, R. G. 1996. « The Role of General Initiation Factors in Transcription by RNA Polymerase II ». *Trends in Biochemical Sciences* 21 (9): 327-35.

Rondanino, Christine, Lemlih Ouchchane, Candice Chauffour, Geoffroy Marceau, Pierre Déchelotte, Benoît Sion, Hanae Pons-Rejraji, et al. 2014. « Levels of Liver X Receptors in Testicular Biopsies of Patients with Azoospermia ». *Fertility and Sterility* 102 (2): 361-371.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.033>.

Russell, D. W., W. J. Schneider, T. Yamamoto, K. L. Luskey, M. S. Brown, et J. L. Goldstein. 1984. « Domain Map of the LDL Receptor: Sequence Homology with the Epidermal Growth Factor Precursor ». *Cell* 37 (2): 577-85.

Rust, S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J. C. Piette, J. F. Deleuze, et al. 1999. « Tangier Disease Is Caused by Mutations in the Gene Encoding ATP-Binding Cassette Transporter 1 ». *Nature Genetics* 22 (4): 352-55. <https://doi.org/10.1038/11921>.

Saez, Fabrice, Eléonore Chabory, Rémi Cadet, Patrick Vernet, Silvère Baron, Jean-Marc A. Lobaccaro, et Joël R. Drevet. 2007. « Liver X Receptors and Epididymal Epithelium Physiology ». *Asian Journal of Andrology* 9 (4): 574-82. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00301.x>.

Savic, Daniel, Ryne C. Ramaker, Brian S. Roberts, Emma C. Dean, Todd C. Burwell, Sarah K. Meadows, Sara J. Cooper, Michael J. Garabedian, Jason Gertz, et Richard M. Myers. 2016. « Distinct gene regulatory programs define the inhibitory effects of liver X receptors and PPAR γ on cancer cell proliferation ». *Genome Medicine* 8 (1): 74. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0328-6>.

Schmuth, Matthias, Stefan Blunder, Sandrine Dubrac, Robert Gruber, et Verena Moosbrugger-Martinz. 2015. « Epidermal Barrier in Hereditary Ichthyoses, Atopic Dermatitis, and Psoriasis ». *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG* 13 (11): 1119-23. <https://doi.org/10.1111/ddg.12827>.

Schmuth, Matthias, Peter M. Elias, Karen Hanley, Peggy Lau, A. Moser, Timothy M. Willson, Daniel D. Bikle, et Kenneth R. Feingold. 2004. « The Effect of LXR Activators on AP-1 Proteins in Keratinocytes ». *The Journal of Investigative Dermatology* 123 (1): 41-48. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22707.x>.

Schultz, J. R., H. Tu, A. Luk, J. J. Repa, J. C. Medina, L. Li, S. Schwendner, et al. 2000. « Role of LXRs in Control of Lipogenesis ». *Genes & Development* 14 (22): 2831-38.

Schwedes, Christoph C., et Ginger E. Carney. 2012. « Ecdysone Signaling in Adult *Drosophila Melanogaster* ». *Journal of Insect Physiology* 58 (3): 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.01.013>.

Scotti, Elena, Martino Calamai, Chris N. Goulbourne, Li Zhang, Cynthia Hong, Ron R. Lin, Jinkuk Choi, et al. 2013. « IDOL Stimulates Clathrin-Independent Endocytosis and Multivesicular Body-Mediated Lysosomal Degradation of the Low-Density Lipoprotein Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (8): 1503-14. <https://doi.org/10.1128/MCB.01716-12>.

Segala, Gregory, Marion David, Philippe de Medina, Mathias C. Poirot, Nizar Serhan, François Vergez, Aurelie Mougél, et al. 2017. « Dendrogenin A Drives LXR to Trigger Lethal Autophagy in Cancers ». *Nature Communications* 8 (1): 1903. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01948-9>.

Segueni, Narimane, Amar Zellagui, Fairouz Moussaoui, Mesbah Lahouel, et Salah Rhouati. 2016. « Flavonoids from Algerian propolis ». *Arabian Journal of Chemistry* 9 (septembre): S425-28. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2011.05.013>.

Selkoe, D. J. 1991. « The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 6 (4): 487-98.

Sharma, Kiran Lata, Sanjeev Misra, Ashok Kumar, et Balraj Mittal. 2013. « Association of Liver X Receptors (LXRs) Genetic Variants to Gallbladder Cancer Susceptibility ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (6): 3959-66. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0984-8>.

Sheng, Xiaoyan, Min Wang, Meng Lu, Beili Xi, Hongguang Sheng, et Ying Qin Zang. 2011. « Rhein Ameliorates Fatty Liver Disease through Negative Energy Balance, Hepatic Lipogenic Regulation, and Immunomodulation in Diet-Induced Obese Mice ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 300 (5): E886-893. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00332.2010>.

Shoichet, Brian K. 2004. « Virtual Screening of Chemical Libraries ». *Nature* 432 (7019): 862-65. <https://doi.org/10.1038/nature03197>.

Singh, Sheo B., John G. Ondeyka, Weiguo Liu, Steve Chen, Tom S. Chen, Xiaohua Li, Aileen Bouffard, et al. 2005. « Discovery and Development of Dimeric Podocarpic Acid Leads as Potent Agonists of Liver X Receptor with HDL Cholesterol Raising Activity in Mice and Hamsters ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15 (11): 2824-28. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.03.100>.

Sironi, Luigi, Nico Mitro, Mauro Cimino, Paolo Gelosa, Uliano Guerrini, Elena Tremoli, et Enrique Saez. 2008. « Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage ». *FEBS letters* 582 (23-24): 3396-3400. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.035>.

Solomin, L., C. B. Johansson, R. H. Zetterström, R. P. Bissonnette, R. A. Heyman, L. Olson, U. Lendahl, J. Frisé, et T. Perlmann. 1998. « Retinoid-X Receptor Signalling in the Developing Spinal Cord ». *Nature* 395 (6700): 398-402. <https://doi.org/10.1038/26515>.

Song, C., et S. Liao. 2000. « Cholestenoic Acid Is a Naturally Occurring Ligand for Liver X Receptor Alpha ». *Endocrinology* 141 (11): 4180-84. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7772>.

———. 2001. « Hypolipidemic Effects of Selective Liver X Receptor Alpha Agonists ». *Steroids* 66 (9): 673-81.

Song, W. C. 2001. « Biochemistry and Reproductive Endocrinology of Estrogen Sulfotransferase ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 948 (décembre): 43-50.

Song, Yang, Vipul Madahar, et Jiayu Liao. 2011. « Development of FRET Assay into Quantitative and High-Throughput Screening Technology Platforms for Protein-Protein Interactions ». *Annals of Biomedical Engineering* 39 (4): 1224-34. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-0225-x>.

Speen, Adam M., Hye-Young H. Kim, Rebecca N. Bauer, Megan Meyer, Kymberly M. Gowdy, Michael B. Fessler, Kelly E. Duncan, Wei Liu, Ned A. Porter, et Ilona Jaspers. 2016. « Ozone-Derived Oxysterols Affect Liver X Receptor (LXR) Signaling A POTENTIAL ROLE FOR LIPID-PROTEIN ADDUCTS ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (48): 25192-206. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732362>.

Spencer, T. A., D. Li, J. S. Russel, J. L. Collins, R. K. Bledsoe, T. G. Consler, L. B. Moore, et al. 2001. « Pharmacophore Analysis of the Nuclear Oxysterol Receptor LXRalpha ». *Journal of Medicinal Chemistry* 44 (6): 886-97.

Stanley, Lesley A., Brian C. Horsburgh, Jillian Ross, Nico Scheer, et C. Roland Wolf. 2006. « PXR and CAR: Nuclear Receptors Which Play a Pivotal Role in Drug Disposition and Chemical Toxicity ». *Drug Metabolism Reviews* 38 (3): 515-97. <https://doi.org/10.1080/03602530600786232>.

Steffensen, Knut R., Kirsten Robertson, Jan-Ake Gustafsson, et Claus Yding Andersen. 2006. « Reduced Fertility and Inability of Oocytes to Resume Meiosis in Mice Deficient of the Lxr Genes ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 256 (1-2): 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.044>.

Stern, Beate, Lene C. Olsen, Christiane Trösse, Hanne Ravneberg, et Ian F. Pryme. 2007. « Improving mammalian cell factories : The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells ». In .

Sticozzi, Claudia, Alessandra Pecorelli, Giuseppe Belmonte, et Giuseppe Valacchi. 2010. « Cigarette Smoke Affects ABCA1 Expression via Liver X Receptor Nuclear Translocation in Human Keratinocytes ». *International Journal of Molecular Sciences* 11 (9): 3375-86. <https://doi.org/10.3390/ijms11093375>.

Stulnig, Thomas M., Knut R. Steffensen, Hui Gao, Mark Reimers, Karin Dahlman-Wright, Gertrud U. Schuster, et Jan-Ake Gustafsson. 2002. « Novel Roles of Liver X Receptors Exposed by Gene Expression Profiling in Liver and Adipose Tissue ». *Molecular Pharmacology* 62 (6): 1299-1305.

Svensson, Stefan, Tove Ostberg, Micael Jacobsson, Carina Norström, Karin Stefansson, Dan Hallén, Isabel Climent Johansson, Kristina Zachrisson, Derek Ogg, et Lena Jendeberg. 2003. « Crystal Structure of the Heterodimeric Complex of LXRA α and RXR β Ligand-Binding Domains in a Fully Agonistic Conformation ». *The EMBO Journal* 22 (18): 4625-33. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg456>.

Tamehiro, Norimasa, Yoji Sato, Takuo Suzuki, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa, Shinji Yokoyama, Tohru Kawanishi, et al. 2005. « Riccardin C: A Natural Product That Functions as a Liver X Receptor (LXR) α Agonist and an LXR β Antagonist ». *FEBS Letters* 579 (24): 5299-5304. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.054>.

Tamura, Kouichi, Yuqing E. Chen, Yutaka Tanaka, Masashi Sakai, Yuko Tsurumi, Yuichi Koide, Minoru Kihara, et al. 2004. « Nuclear Receptor LXRA α Is Involved in CAMP-Mediated Human Renin Gene Expression ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 224 (1-2): 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.07.005>.

Tangirala, Rajendra K., Eric D. Bischoff, Sean B. Joseph, Brandee L. Wagner, Robert Walczak, Bryan A. Laffitte, Chris L. Daige, et al. 2002. « Identification of Macrophage Liver X Receptors as Inhibitors of Atherosclerosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11896-901. <https://doi.org/10.1073/pnas.182199799>.

Tarling, Elizabeth J., et Peter A. Edwards. 2011. « ATP Binding Cassette Transporter G1 (ABCG1) Is an Intracellular Sterol Transporter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49): 19719-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113021108>.

Terasaka, Naoki, Ayano Hiroshima, Tadashi Koieyama, Naoko Ubukata, Yuka Morikawa, Daisuke Nakai, et Toshimori Inaba. 2003. « T-0901317, a Synthetic Liver X Receptor Ligand, Inhibits Development of Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice ». *FEBS Letters* 536 (1-3): 6-11.

The Nuclear Receptor FactsBook. 2002. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-437735-6.X5000-0>.

Tian, Jing, Joseph L. Goldstein, et Michael S. Brown. 2016. « Insulin Induction of SREBP-1c in Rodent Liver Requires LXRA α -C/EBP β Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (29): 8182-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608987113>.

Tiefenbach, Jens, Pamela R. Moll, Meryl R. Nelson, Chun Hu, Lilia Baev, Thomas Kislinger, et Henry M. Krause. 2010. « A Live Zebrafish-Based Screening System for Human Nuclear Receptor Ligand and Cofactor Discovery ». *PLoS ONE* 5 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009797>.

Torra, Inés Pineda, Naima Ismaili, Jonathan E. Feig, Chong-Feng Xu, Claudio Cavasotto, Raluca Pancratov, Inez Rogatsky, Thomas A. Neubert, Edward A. Fisher, et Michael J. Garabedian. 2008. « Phosphorylation of Liver X Receptor α Selectively Regulates Target Gene Expression in Macrophages ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (8): 2626-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.01575-07>.

Traves, Paqui G., Sonsoles Hortelano, Miriam Zeini, Ta-Hsiang Chao, Thanh Lam, Saskia T. Neuteboom, Emmanuel A. Theodorakis, Michael A. Palladino, Antonio Castrillo, et Lisardo Bosca. 2007. « Selective Activation of Liver X Receptors by Acanthoic Acid-Related Diterpenes ». *Molecular Pharmacology* 71 (6): 1545-53. <https://doi.org/10.1124/mol.106.031906>.

Troiani, T., E. Martinelli, A. Capasso, F. Morgillo, Michele Orditura, F. De Vita, et F. Ciardiello. 2012. « Targeting EGFR in Pancreatic Cancer Treatment ». *Current Drug Targets* 13 (6): 802-10.

Trott, Oleg, et Arthur J. Olson. 2010. « AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading ». *Journal of computational chemistry* 31 (2): 455-61. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

Trowell, Stephen C., Helen Dacres, Mira M. Dumancic, Virginia Leitch, et Rodney W. Rickards. 2016. « Molecular basis for the blue bioluminescence of the Australian glow-worm *Arachnocampa richardsae* (Diptera: Keroplatidae) ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (2): 533-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.081>.

Ulisse, S., G. Esslemont, B. S. Baker, V. Krishna, K. Chatterjee, et J. R. Tata. 1996. « Dominant-Negative Mutant Thyroid Hormone Receptors Prevent Transcription from *Xenopus* Thyroid Hormone Receptor Beta Gene Promoter in Response to Thyroid Hormone in *Xenopus* Tadpoles in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (3): 1205-9.

Uno, Shigeyuki, Kaori Endo, Yangsik Jeong, Katsuyoshi Kawana, Hiroyuki Miyachi, Yuichi Hashimoto, et Makoto Makishima. 2009. « Suppression of Beta-Catenin Signaling by Liver X Receptor Ligands ». *Biochemical Pharmacology* 77 (2): 186-95. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.10.007>.

Uppal, Hirdesh, Simrat P. S. Saini, Antonio Moschetta, Ying Mu, Jie Zhou, Haibiao Gong, Yonggong Zhai, et al. 2007. « Activation of LXRs Prevents Bile Acid Toxicity and Cholestasis in Female Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45 (2): 422-32. <https://doi.org/10.1002/hep.21494>.

Valenza, Marta, Dorotea Rigamonti, Donato Goffredo, Chiara Zuccato, Simone Fenu, Laure Jamot, Andrew Strand, et al. 2005. « Dysfunction of the Cholesterol Biosynthetic Pathway in Huntington's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (43): 9932-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3355-05.2005>.

Vedin, Lise-Lotte, Jan-Åke Gustafsson, et Knut R. Steffensen. 2013. « The Oxysterol Receptors LXR α and LXR β Suppress Proliferation in the Colon ». *Molecular Carcinogenesis* 52 (11): 835-44. <https://doi.org/10.1002/mc.21924>.

Vedin, Lise-Lotte, Sebastian A. Lewandowski, Paolo Parini, Jan-Ake Gustafsson, et Knut R. Steffensen. 2009. « The Oxysterol Receptor LXR Inhibits Proliferation of Human Breast Cancer Cells ». *Carcinogenesis* 30 (4): 575-79. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp029>.

Venkateswaran, Asha, Bryan A. Laffitte, Sean B. Joseph, Puiying A. Mak, Damien C. Wilpitz, Peter A. Edwards, et Peter Tontonoz. 2000. « Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (22): 12097-102.

Venken, Koen J. T., et Hugo J. Bellen. 2005. « Emerging Technologies for Gene Manipulation in *Drosophila Melanogaster* ». *Nature Reviews. Genetics* 6 (3): 167-78. <https://doi.org/10.1038/nrg1553>.

Venteclef, Nicolas, Tomas Jakobsson, Anna Ehlund, Anastasios Damdimopoulos, Laura Mikkonen, Ewa Ellis, Lisa-Mari Nilsson, et al. 2010. « GPS2-Dependent Corepressor/SUMO Pathways Govern Anti-Inflammatory Actions of LRH-1 and LXRbeta in the Hepatic Acute Phase Response ». *Genes & Development* 24 (4): 381-95. <https://doi.org/10.1101/gad.545110>.

Venteclef, Nicolas, Tomas Jakobsson, Knut R. Steffensen, et Eckardt Treuter. 2011. « Metabolic Nuclear Receptor Signaling and the Inflammatory Acute Phase Response ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 22 (8): 333-43. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.04.004>.

Viennois, Emilie, Kevin Mouzat, Julie Dufour, Laurent Morel, Jean-Marc Lobaccaro, et Silvère Baron. 2012. « Selective Liver X Receptor Modulators (SLiMs): What Use in Human Health? ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (2): 129-41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.036>.

Vigers, Guy P. A., et James P. Rizzi. 2004. « Multiple Active Site Corrections for Docking and Virtual Screening ». *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (1): 80-89. <https://doi.org/10.1021/jm030161o>.

Villablanca, Eduardo J., Laura Raccosta, Dan Zhou, Raffaella Fontana, Daniela Maggioni, Aurora Negro, Francesca Sanvito, et al. 2010. « Tumor-Mediated Liver X Receptor-Alpha Activation Inhibits CC

Chemokine Receptor-7 Expression on Dendritic Cells and Dampens Antitumor Responses ». *Nature Medicine* 16 (1): 98-105. <https://doi.org/10.1038/nm.2074>.

Volle, David H., Kevin Mouzat, Rajesha Duggavathi, Bénazir Siddeek, Pierre Déchelotte, Benoît Sion, Georges Veyssière, Mohamed Benahmed, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2007. « Multiple Roles of the Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptor to Maintain Male Fertility ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (5): 1014-27. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0277>.

Wang, Ling, Gertrud U. Schuster, Kjell Hultenby, Qinghong Zhang, Sandra Andersson, et Jan-Ake Gustafsson. 2002. « Liver X Receptors in the Central Nervous System: From Lipid Homeostasis to Neuronal Degeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21): 13878-83. <https://doi.org/10.1073/pnas.172510899>.

Wang, Yabin, Chunhong Li, Kang Cheng, Ran Zhang, Kazim Narsinh, Shuang Li, Xiujuan Li, et al. 2014. « Activation of Liver X Receptor Improves Viability of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Attenuate Myocardial Ischemia Injury through TLR4/NF-KB and Keap-1/Nrf-2 Signaling Pathways ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (18): 2543-57. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5683>.

Wang, Yongjun, Pamela M. Rogers, Keith R. Stayrook, Chen Su, Gabor Varga, Qi Shen, Sunil Nagpal, et Thomas P. Burris. 2008. « The Selective Alzheimer's Disease Indicator-1 Gene (Seladin-1/DHCR24) Is a Liver X Receptor Target Gene ». *Molecular Pharmacology* 74 (6): 1716-21. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048538>.

Wang, Yuancheng, Feng Wang, Riyuan Wang, Ping Zhao, et Qingyou Xia. 2015. « 2A Self-Cleaving Peptide-Based Multi-Gene Expression System in the Silkworm *Bombyx Mori* ». *Scientific Reports* 5 (novembre): 16273. <https://doi.org/10.1038/srep16273>.

Wang, Z., A. D. Sadovnick, A. L. Trabouise, J. P. Ross, C. Q. Bernales, M. Encarnacion, I. M. Yee, et al. 2016. « Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis., Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis ». *Neuron, Neuron* 90, 90 (5, 5): 948, 948-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.039>, [10.1016/j.neuron.2016.04.039](https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.039).

Webster, N., J. R. Jin, S. Green, M. Hollis, et P. Chambon. 1988. « The Yeast UASG Is a Transcriptional Enhancer in Human HeLa Cells in the Presence of the GAL4 Trans-Activator ». *Cell* 52 (2): 169-78.

Whitney, Karl D., Michael A. Watson, Jon L. Collins, William G. Benson, Tammy M. Stone, Mary Jo Numerick, Timothy K. Tippin, Joan G. Wilson, Deborah A. Winegar, et Steven A. Kliewer. 2002. « Regulation of Cholesterol Homeostasis by the Liver X Receptors in the Central Nervous System ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (6): 1378-85. <https://doi.org/10.1210/mend.16.6.0835>.

Wided, Kebsa, Rouibah Hassiba, et Lahouel Mesbah. 2014. « Polyphenolic Fraction of Algerian Propolis Reverses Doxorubicin Induced Oxidative Stress in Liver Cells and Mitochondria ». *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 27 (6): 1891-97.

Willett, P. 2003. « Similarity-Based Approaches to Virtual Screening ». *Biochemical Society Transactions* 31 (Pt 3): 603-6. <https://doi.org/10.1042/>.

Willy, P. J., K. Umesonu, E. S. Ong, R. M. Evans, R. A. Heyman, et D. J. Mangelsdorf. 1995. « LXR, a Nuclear Receptor That Defines a Distinct Retinoid Response Pathway ». *Genes & Development* 9 (9): 1033-45.

Wong, Jenny, Carmel M. Quinn, Ingrid C. Gelissen, et Andrew J. Brown. 2008. « Endogenous 24(S),25-Epoxycholesterol Fine-Tunes Acute Control of Cellular Cholesterol Homeostasis ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2): 700-707. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706416200>.

Wong, Jenny, Carmel M. Quinn, et Andrew J. Brown. 2006. « SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR ». *Biochemical Journal* 400 (Pt 3): 485-91. <https://doi.org/10.1042/BJ20060914>.

Wu, Chaowei, Maryem A. Hussein, Elina Shrestha, Sarah Leone, Mohammed S. Aiyegbo, W. Marcus Lambert, Benoit Pourcet, et al. 2015. « Modulation of Macrophage Gene Expression via Liver X Receptor α Serine 198 Phosphorylation ». *Molecular and Cellular Biology* 35 (11): 2024-34. <https://doi.org/10.1128/MCB.00985-14>.

Wu, Sijie, Ran Yin, Rick Ernest, Yuquan Li, Olga Zhelyabovska, Jinwen Luo, Yifeng Yang, et Qinglin Yang. 2009. « Liver X receptors are negative regulators of cardiac hypertrophy via suppressing NF- κ B signalling ». *Cardiovascular Research* 84 (1): 119-26. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp180>.

Xu, Jihong, Gail Wagoner, James C. Douglas, et Paul D. Drew. 2009. « Liver X Receptor Agonist Regulation of Th17 Lymphocyte Function in Autoimmunity ». *Journal of Leukocyte Biology* 86 (2): 401-9. <https://doi.org/10.1189/jlb.1008600>.

Yager, James D., et Nancy E. Davidson. 2006. « Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer ». *The New England Journal of Medicine* 354 (3): 270-82. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050776>.

Yahagi, N., H. Shimano, A. H. Hastay, M. Amemiya-Kudo, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, et al. 1999. « A Crucial Role of Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 in the Regulation of Lipogenic Gene Expression by Polyunsaturated Fatty Acids ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (50): 35840-44.

Yang, Chendong, Jeffrey G. McDonald, Amit Patel, Yuan Zhang, Michihisa Umetani, Fang Xu, Emily J. Westover, et al. 2006. « Sterol Intermediates from Cholesterol Biosynthetic Pathway as Liver X Receptor Ligands ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (38): 27816-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603781200>.

Yoshikawa, Tomohiro, Hitoshi Shimano, Naoya Yahagi, Tomohiro Ide, Michiyo Amemiya-Kudo, Takashi Matsuzaka, Masanori Nakakuki, et al. 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 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1705-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105711200>.

Yu, Liqing, Jennifer York, Klaus von Bergmann, Dieter Lutjohann, Jonathan C. Cohen, et Helen H. Hobbs. 2003. « Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (18): 15565-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301311200>.

Zabaiou, Nada, Allan Fouache, Amalia Trousson, Silvère Baron, Amar Zellagui, Mesbah Lahouel, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2017. « Biological Properties of Propolis Extracts: Something New from an Ancient Product ». *Chemistry and Physics of Lipids* 207 (Pt B): 214-22. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.005>.

Zand, Rachel S. Rosenberg, David J.A. Jenkins, et Eleftherios P. Diamandis. 2000. « Steroid Hormone Activity of Flavonoids and Related Compounds ». *Breast Cancer Research and Treatment* 62 (1): 35-49. <https://doi.org/10.1023/A:1006422302173>.

Zelcer, Noam, Cynthia Hong, Rima Boyadjian, et Peter Tontonoz. 2009. « LXR Regulates Cholesterol Uptake through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5936): 100-104. <https://doi.org/10.1126/science.1168974>.

Zelcer, Noam, Negar Khanlou, Ryan Clare, Qingguang Jiang, Erin G. Reed-Geaghan, Gary E. Landreth, Harry V. Vinters, et Peter Tontonoz. 2007. « Attenuation of Neuroinflammation and

Alzheimer's Disease Pathology by Liver x Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (25): 10601-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701096104>.

Zhang, Li, Prashant Rajbhandari, Christina Priest, Jaspreet Sandhu, Xiaohui Wu, Ryan Temel, Antonio Castrillo, Thomas Q. de Aguiar Vallim, Tamer Sallam, et Peter Tontonoz. 2017. « Inhibition of Cholesterol Biosynthesis through RNF145-Dependent Ubiquitination of SCAP ». *ELife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.28766>.

Zhang, Y., J. J. Repa, K. Gauthier, et D. J. Mangelsdorf. 2001. « Regulation of Lipoprotein Lipase by the Oxysterol Receptors, LXRalpha and LXRbeta ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 43018-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107823200>.

Zhang, Yuan, Sarah R. Breevoort, Jerry Angdisen, Mingui Fu, Daniel R. Schmidt, Sam R. Holmstrom, Steven A. Kliewer, David J. Mangelsdorf, et Ira G. Schulman. 2012. « Liver LXR α Expression Is Crucial for Whole Body Cholesterol Homeostasis and Reverse Cholesterol Transport in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (5): 1688-99. <https://doi.org/10.1172/JCI59817>.

Zheng, Yajun, Linghang Zhuang, Kristi Yi Fan, Colin M. Tice, Wei Zhao, Chengguo Dong, Stephen D. Lotesta, et al. 2016. « Discovery of a Novel, Orally Efficacious Liver X Receptor (LXR) β Agonist ». *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (7): 3264-71. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b02029>.

Zhuang, Jingjing, Haikun Zhang, Rong Zhou, Lili Chen, Jing Chen, et Xu Shen. 2013. « Regulation of Prostaglandin F 2α against β Amyloid Clearance and Its Inflammation Induction through LXR/RXR Heterodimer Antagonism in Microglia ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 106 (octobre): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.09.002>.

Zilliacus, J., J. Carlstedt-Duke, J. A. Gustafsson, et A. P. Wright. 1994. « Evolution of Distinct DNA-Binding Specificities within the Nuclear Receptor Family of Transcription Factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (10): 4175-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4175>.

Zuercher, William J., Richard G. Buckholz, Nino Campobasso, Jon L. Collins, Cristin M. Galardi, Robert T. Gampe, Stephen M. Hyatt, et al. 2010. « Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists ». *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (8): 3412-16. <https://doi.org/10.1021/jm901797p>.

