



HAL
open science

Caractérisation du récepteur nucléaire FXR α dans les cancers germinaux du testicule et étude fonctionnelle d'un nouveau variant

Manon Garcia

► **To cite this version:**

Manon Garcia. Caractérisation du récepteur nucléaire FXR α dans les cancers germinaux du testicule et étude fonctionnelle d'un nouveau variant. Physiologie [q-bio.TO]. Université Clermont Auvergne, 2021. Français. NNT : 2021UCFAC039 . tel-03712016

HAL Id: tel-03712016

<https://theses.hal.science/tel-03712016>

Submitted on 2 Jul 2022

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

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

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

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

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

Présentée et soutenue publiquement
Par

Manon GARCIA

le 06 juillet 2021

Caractérisation du récepteur nucléaire FXR α dans les cancers germinaux du testicule et étude fonctionnelle d'un nouveau variant

Président : Pr. Florence CALDEFIE-CHEZET INRAe UMR1019-UNH/UCA, Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Dr. Laurent DUBUQUOY, INSERM U1286, Lille
Pr. Joelle DUPONT, INRAe Centre Val de Loire, Nouzilly
Dr. Muriel LE ROMANCER, CNRS UMR5286-CRCL/U1052 INSERM/UCLB, Lyon

Examineurs : Dr. Gérard BENOIT, CNRS UMR5239-LBMC/U1210 INSERM/ENS Lyon/HCL, Lyon

Directeur de thèse : Pr. Claude BEAUDOIN, GReD/INSERM U1103/CNRS UMR 6293, Clermont-Ferrand

Remerciements

Je remercie sincèrement les membres de mon jury, Laurent DUBUQUOY, Joelle DUPONT, Muriel LE ROMANCER et Gérard BENOIT d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs et examinateur. Je remercie également Florence CALDEFIE-CHEZET de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Merci pour le temps précieux que chacun de vous a pu accorder à la lecture attentive de ce manuscrit.

Je tiens tout d'abord à remercier Claude BEAUDOIN pour m'avoir encadré pendant mon Master 2 et ma thèse. Merci « Papa Claude » de m'avoir supporté pendant ces quatre années et de toujours avoir été à l'écoute. Tu m'as donné la chance de découvrir la recherche en acceptant de me prendre sous ton aile.

Je remercie chaleureusement David VOLLE pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci David pour ta bienveillance, ta présence et toutes les réponses que tu as pu m'apporter au cours de ma thèse. Merci de m'avoir témoigné ta passion de la recherche.

A toute mon équipe, avec qui j'ai tant partagé pendant ces quatre années :

Avant tout, merci à Hélène, celle à qui je dois tout, professionnellement et personnellement. Tu as toujours été là et je n'aurai jamais réussi à surmonter tous ces obstacles sans toi. Tu m'as tellement appris ! et tellement botté les fesses... Merci pour m'avoir épaulé. Tu m'as permise d'avancer. Avec tout ce que tu as supporté pendant ces quatre ans, cette thèse est un peu la tienne. Et ne t'inquiètes pas, tu restes toujours mon mentor numéro 1 !

Aux VOLLINETTES, Laura, Mélusine (et Manue depuis peu), qu'est-ce qu'on a pu râler dans ce bureau ! (Enfin, surtout moi...). Mais qu'est-ce qu'on a rigolé. On a traversé tous ces moments ensemble, en partageant nos espoirs et nos déboires. Plutôt nos déboires d'ailleurs. On a grandi ensemble. Merci de m'avoir fait oublier que j'étais une « vieille thésarde », avec vous j'ai toujours 25 ans !

A mes Tic et Tac, ma fine équipe, ma petite famille. Toujours là quand on a besoin (ou pas d'ailleurs), et Dieu sait que c'est souvent ! une solution pour tout et la bonne humeur en plus. Vous avez égayé mon quotidien pendant toutes ces années et c'est à vous que je dois mes meilleurs souvenirs. L'idée de partir me fait regretter de ne plus vous avoir avec moi. Vous allez vraiment me manquer.

Merci à tous ceux qui m'ont tendu la main, à tata Coco, toujours une solution à mes problèmes. Une gentillesse et une efficacité redoutables !

A Adrien, ta bonne humeur inébranlable a toujours réussi à me donner la patate !

A mes collègues du 3^{ème} étage, toujours sympathiques, qui ont rendu ces quatre années tellement enrichissantes. Merci à tous les Gredins avec qui j'ai partagé et qui ont été présents à un moment ou à un autre.

Pour finir, merci à mes proches.

A ma famille surtout, qui a toujours été là. Je n'aurai rien réussi sans vous, tout ce que je réussi à accomplir c'est grâce à vous.

A mes meilleurs amis, Sandra, Max, Ericka, qui ont aussi eu à supporter les mauvais moments de ma thèse. Merci pour votre présence et votre soutien depuis toutes ces années.

Liste des publications

Article en préparation

Functional analysis of a novel naturally occurring DBD-binding domain FXR α splice variant with different capacity for transcriptional activation.

Garcia M, Holota H, Chebaro Y, Thirouard L, Monrose M, Billas I, Caira F, Benoit G, Volle DH, Beaudoin C.

En préparation

Articles publiés (voir Annexes)

Farnesoid X receptor alpha (FXR α) is a critical actor of the development and disorders of the male reproductive system. (Revue)

Garcia M*, Thirouard L*, Monrose M, Holota H, De Haze A, Caira F, Beaudoin C, Volle DH (2019). *Mol Aspects Med*.

Nuclear receptor metabolism of bile acids and xenobiotics: A coordinated detoxification system with impact in health and diseases. (Revue)

Garcia M, Thirouard L, Sedès L, Monrose M, Holota H, Caira F, Volle DH, Beaudoin C (2018). *Int J Mol Sci*.

FXR α modulates Leydig cell endocrine function in mouse.

Holota H, Thirouard L, Monrose M, Garcia M, De Haze A, Saru JP, Caira F, Beaudoin C, Volle DH (2020). *Mol Cell Endocrinol*.

New perspectives on PPAR, VDR and FXR α as new actors in testicular physiology. (Revue)

Monrose M, Thirouard L, Garcia M, Holota H, De Haze A, Caira F, Beaudoin C, Volle DH (2021). *Cell Mol Life Sci*

Fxr α gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis.

Holota H, Thirouard L, Garcia M, Monroe M, De Haze A, Saru J-P, Caira F, Beaudoin C, Volle DH (2019). *J Steroid Biochem Mol Biol*.

Cholesterol: a gatekeeper of male fertility? (Revue)

Sèdes L, Thirouard L, Maqdasy S, Garcia M, Caira F, Lobaccaro JMA, Beaudoin C, Volle DH (2018). *Front Endocrinol* (Lausanne)

Résumé

Le récepteur FXR α , décrit sous 4 formes chez l'homme, agit comme un facteur de transcription inductible capable de se lier à l'ADN sous la forme d'un hétérodimère avec le récepteur RXR α (Retinoid X Receptor α) pour réguler l'expression de gènes cibles. En contrôlant la transcription génique, le récepteur FXR α participe non seulement à la régulation du métabolisme des lipides et des glucides, mais aussi à la synthèse, au transport ainsi qu'à la détoxification des acides biliaires et de leurs métabolites. Il s'agit d'une fonction essentielle puisque la perte d'activité et/ou d'expression de ce récepteur, tout comme la hausse inappropriée des concentrations en acides biliaires, sont associées à des troubles de la prolifération et de l'apoptose décrits pour favoriser la transformation néoplasique notamment dans le foie et le colon.

Récemment, les travaux de l'équipe et ceux d'autres laboratoires ont montré que le récepteur FXR α est exprimé dans le testicule humain dès le premier trimestre de la grossesse ainsi que dans les testicules fœtaux de souris, puis que son activité contrôle l'équilibre des cellules souches germinales dans ce tissu. La forte réduction de l'abondance de FXR α dans les échantillons de tumeurs germino-testiculaires (TGT) mise en évidence par l'équipe ainsi que l'identification d'une nouvelle isoforme de FXR α présente dans le foie et d'autres tissus comme le testicule, interrogent sur la participation de ce facteur à l'étiologie moléculaire de la maladie.

Ces éléments fondent le projet scientifique qui vise à : i) étudier la fonction d'un nouveau variant de FXR α produit par l'épissage alternatif d'une partie de son domaine de liaison à l'ADN, et ii) de déterminer si les altérations d'expression et/ou de fonction des protéines FXR α affectent la biologie des cellules souches germinales (CSG) et participent à l'étiologie moléculaire des TGT.

Les résultats du travail de thèse montrent que le variant FXR α 1 excisé de son exon 5 (Δ Ex5) est exprimé dans plusieurs tissus et lignées cellulaires humaines ainsi que chez la souris selon un profil superposable à celui des autres protéines FXR α . Par l'absence d'une partie de son domaine de liaison à l'ADN, ce variant n'est plus en mesure de se lier à sa séquence cible au niveau de l'ADN ni d'activer les réseaux transcriptionnels dépendants de FXR α . De plus, ce variant de FXR α semble exercer un léger effet dominant négatif sur l'activité transcriptionnelle de FXR α 1 tout en présentant des capacités d'interaction différentes pour son partenaire RXR α pour mener à la perte de permissivité de ce dimère à transduire un signal via un mécanisme structurel encore inconnu.

Collectivement, les résultats présentés dans ce mémoire ont mis en évidence un nouveau variant de FXR α qui reste encore à renseigner pour sa capacité à affiner la réponse adaptative et/ou métabolique induit par les acides biliaires. Toutefois, ces données contribueront à approfondir nos connaissances sur la façon dont les variants d'épissage peuvent adapter la

fonction de FXR α dans les tissus, puis éclairer la participation de ce récepteur au contrôle de la biologie des CSG en lien avec les troubles de la fertilité et le développement des TGT.

Abstract

The FXR α receptor, described in 4 forms in humans, acts as an inducible transcription factor capable of binding to DNA as a heterodimer with the RXR α (Retinoid X Receptor α) to regulate the expression of target genes. By controlling gene transcription, the FXR α receptor is involved not only in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism, but also in the synthesis, transport as well as detoxification of bile acids and their metabolites. This is an essential function since the loss of activity and/or expression of this receptor, as well as inappropriate increase in bile acid concentrations, are associated with proliferation and apoptosis disorders described to promote neoplastic transformation especially in the liver and colon.

Recently, the work of our team and others has shown that the FXR α receptor is expressed in the human testis from the first trimester of pregnancy as well as in the mouse fetal testis, and that its activity controls the balance of germline stem cells in this tissue. The strong reduction of FXR α abundance in testicular germ cell tumors (TGCT) samples highlighted by the team as well as the identification of a new FXR α isoform present in the liver and other tissues such as the testis, raise questions about the participation of this factor in the molecular etiology of the disease.

These elements are the basis of the scientific project which aims to: i) study the function of a new FXR α variant produced by the alternative splicing of a part of its DNA binding domain, and ii) determine if the alterations in expression and/or function of FXR α proteins affect the biology of germline stem cells (GSC) and participate to the molecular etiology of TGT.

The results of the thesis work show that the FXR α 1 variant spliced for its exon 5 (Δ Ex5) is expressed in several human tissues and cell lines as well as in mice in similar a pattern than those described of FXR proteins. By the absence of part of its DNA-binding domain, this variant is no longer able to bind to its target sequence at the DNA level or to activate FXR α -dependent transcriptional networks. Furthermore, this FXR α variant appears to exert a slightly dominant negative effect on the transcriptional activity of FXR α 1 while exhibiting different interaction capabilities for its partner RXR α to lead to the loss of permissiveness of this dimer to transduce a signal via a yet unknown structural mechanism.

Collectively, the results presented in this thesis have highlighted a novel FXR α variant that has yet to be informed for its ability to fine-tune the adaptive and/or metabolic response induced by bile acids. However, these data will contribute to further improve our knowledge of how splice variants can fit FXR α functions in tissues and then shed light on the contribution of this receptor in the control of GSC biology with an impact on fertility disorders and TGT development.

Abréviations

6-ECDCA, <i>6alpha-ethyl-chenodeoxycholic acid</i>	ChIP-seq, <i>Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing</i>
AB, <i>Acides Biliaires</i>	ChREBP, <i>Carbohydrate Response Element Binding Protein</i>
ABC, <i>ATP-binding cassette</i>	CIS, <i>Carcinome In Situ</i>
ACC, <i>Acetyl-coa synthase</i>	COUP-TF, <i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter</i>
ADN, <i>Acide Désoxyribonucléique</i>	CREB, <i>CREB Binding protein</i>
ADNc, <i>ADN complémentaire</i>	CRISPR/Cas9, <i>CRISPR associated protein 9</i>
ADP, <i>Adénosine Diphosphate</i>	CtBP, <i>C-Terminal Binding Protein</i>
AF, <i>Activating Function</i>	CTE, <i>C-Terminal Extension region</i>
AG, <i>Acides gras</i>	CXCL12, <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 12</i>
AKR1B7, <i>Aldo-Keto Reductase Family 1 Member 7</i>	CXCR4, <i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
AKT, <i>Serine/Threonine Kinase</i>	CYP, <i>Cytochrome P450</i>
AMH, <i>Anti Mullerian Hormone</i>	DAX-1, <i>Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1</i>
AMPc, <i>Adénosine MonoPhosphate cyclique</i>	DBD, <i>DNA Binding Domain</i>
AMPK, <i>AMP-activated Protein Kinase</i>	DCA, <i>DeoxyCholic Acid</i>
ANGPTL3, <i>Angiopoietin Like 3</i>	DHEA, <i>Déhydroépiandrostérone</i>
AP1, <i>Activator protein 1</i>	Dhh, <i>Desert Hedgehog</i>
Apo, <i>Apolipoprotéine</i>	DHT, <i>Dihydrotestostérone</i>
AR, <i>Androgen Receptor</i>	DMSO, <i>Dimethylsulfoxyde</i>
ARN, <i>Acide Ribonucléique</i>	DR(n), <i>Direct Repeat</i>
ASBT, <i>Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter</i>	EC50, <i>Half maximal effective concentration</i>
ASCOM, <i>Activating Signal Cointegrator 2</i>	EMSA, <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ATP, <i>Adénosine TriPhosphate</i>	ER, <i>Estrogen Receptor</i>
BAAT, <i>Bile Acid N-Acetyltransferase</i>	ERK1/2, <i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2</i>
BACS, <i>Bile Acid-Coenzyme A Synthase</i>	ER(n), <i>Everted Repeat</i>
BAR, <i>Bile Acid Receptor</i>	ERR, <i>Estrogen Related Receptor</i>
BHT, <i>Barrière Héмато Testiculaire</i>	ESI, <i>Exonic Splice Enhancer</i>
BPA, <i>Bisphénol A</i>	ESS, <i>Exonic Splice Silencer</i>
BRAF, <i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	FAS, <i>Fatty Acid Synthase</i>
BRG-1, <i>BRM/SWI2-Related Gene 1</i>	FBP1, <i>Fructose 1,6-BiPhosphatase</i>
BSEP, <i>Bile Salt Export Protein</i>	FGF, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
CA, <i>Cholic Acid</i>	FGFR, <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
CAR, <i>Constitutive Androstane Receptor</i>	FSH, <i>Follicle Stimulating Hormone</i>
CARM1, <i>Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1</i>	FT, <i>Facteur de Transcription</i>
CBP, <i>CREB-Binding Protein</i>	FXR, <i>Farnesoid X Receptor</i>
CDCA, <i>ChenoDeoxyCholic Acid</i>	FXRE, <i>FXRE: FXR Response Element</i>
CDX2, <i>Caudal related Homeobox 2</i>	G6Pase, <i>Glucose-6-Phosphatase</i>
CETP, <i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>	GCNF, <i>Germ Cell Nuclear Factor</i>
CGS, <i>Cellules Germinales Souches</i>	GK, <i>Glucokinase</i>
CHC, <i>Carcinome Hépatocellulaire</i>	

GLUT, *Glucose Transporter*
GNIS, *Germ cell Neoplasia In Situ*
GnRH, *Gonadotropin Releasing Hormone*
GO, *Gene Ontology*
GR, *Glucocorticoid Receptor*
GRE, *GR Response Element*
GTF, *General Transcription Factor*
HAT, *Histone Acetyl-Transférase*
hnRNP, *Ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires*
HDAC, *Histone Désacétylase*
HDL, *High Density Lipoprotein*
HFD, *High Fat Diet*
HNF, *Hepatocyte Nuclear Factor*
HRE, *Hormonal Response Element*
HSC, *Hepatic Stellate Cells*
IBABP, *Intestinal Bile-Acid Binding Protein*
ICP, *Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*
IDL, *Intermediate Density Lipoprotein*
INSL3, *Insulin Like 3*
IR (n), *Inverted Repeat*
ISE, *Intronic Splice Enhancer*
ISS, *Intronic Splice Silencer*
JMJD3, *Jumonji domain-containing protein D3*
JNK1/2, *Jun N-terminal Kinase*
KIT, *KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*
KITLG, *KIT Ligand*
KRAS, *Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene*
LBD, *Ligand Binding Domain*
LBP, *Ligand Binding Pocket*
LCA, *Lithocholic Acid*
LCAT, *Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*
LDL, *Low-Density Lipoprotein*
LDL-R, *LDL Receptor*
LH, *Luteinizing Hormone*
LHCGR, *Luteinizing hormone / Choriogonadotropin Receptor*
L-PK, *Liver Pyruvate Kinase*
LPL, *Lipoprotein Lipase*
LPS, *Lipopolysaccharides*
LRH-1, *Liver Receptor Homolog 1*
LXR, *Liver X Receptor*
MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCA, *Muricholic Acid*
MDCA, *Murideoxycholic Acid*
MDR, *MultiDrug Resistance protein*
ME, *Molécules Environnementales*

MMTV, *Mammary Mouse Tumor Virus*
MR, *Mineralcorticoid Receptor*
MRP, *Multidrug-Resistance associated Protein*
NAFLD, *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*
NASH, *Non-Alcoholic Steatohepatitis*
NCoR, *Nuclear Receptor Co-Repressor*
NF-1, *Nuclear Factor 1*
NF- κ B, *Nuclear Factor Kappa-lightchain-enhancer of Activated B cells*
NGF-1, *Nerve Growth Factor*
nHRE, *negative Hormonal Response Element*
NOR-1, *Neuron-derived Orphan Receptor 1*
NRAS, *Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*
NTCP, *Na⁺ Taurocholic acid Cotransporting Polypeptide*
NTD, *N-Terminal Domain*
NURR, *Nuclear Receptor Related*
OATP, *Organic Anion Transporting Polypeptide*
OCA, *Obeticholic Acid*
OCT, *Octamer-Binding Protein*
OMS, *Organisation Mondiale de la Santé*
OST, *Organic Solute Transporter*
p300, *Histone acetyltransferase p300*
PARP, *Poly(ADP-Ribose) Polymerase*
PBC, *Primary Biliary Cirrhosis*
PCA, *Principal Component Analysis*
PCAF, *CBP/p300-Associated Factor*
PCSK9, *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9*
PEPCK, *Phosphoenolpyruvate carboxylase*
PFIC, *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*
PGC, *Primordial Germ Cell*
PGC1 α , *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha*
PI3K, *Phosphatidylinositol 3 Kinase*
PKA, *Protein Kinase A*
PKB, *Protein Kinase B*
PKC, *Protein Kinase C*
PLAP, *Placental Alkaline Phosphatase*
PLTP, *Phospholipid Transfer Protein*
PLZF, *Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger protein*
PNR, *Photoreceptor cell-specific Nuclear Receptor*
PPAR, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
PR, *Progesterone Receptor*
PRMT1, *Protein arginine Methyltransferase 1*

PSC, *Primary Sclerosing Cholangitis*
PTCH1, *Patched 1*
PTEN, *Phosphatase and Tensin homolog*
PXR, *Pregnane X Receptor*
RAC3, *Rac Family Small GTPase 3*
RAR, *Retinoic Acid Receptor*
RIP14/15, *RXR Interacting Protein 14*
RN, *Récepteur Nucléaire*
RNAi, *RNA interference*
ROR, *RAR-related Orphan Receptor*
RSEM, *RNA-Seq by Expectation-Maximization*
RT-(q)PCR, *RT-qPCR: Reverse Transcription – (quantitative) Polymerase Chain Reaction*
RXR, *Retinoid X Receptor*
SBARM, *Selective Bile Acid Receptor Modulators*
SCD, *Stearoyl-CoA desaturase*
SCF, *Stem Cell Factor*
SET7/9, *SET domain containing lysine methyltransferase 7/9*
SF-1, *Steroidogenic Factor 1*
SHP, *Small Heterodimer Partner*
SIRT1, *Sirtuin 1/SLC21A Solute Carrier Family*
SMRT, *Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor*
SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*
snRNP, *small nuclear Ribonucleoprotein*
SOX, *SRY-Box transcription factor*
SR-B1 (ou SCARB1), *Scavenger Receptor Class B Member 1*

SRC-1, *Steroid Receptor Coactivator 1 et 2*
SREBP1C, *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1 isoform C*
SRY, *Sex Determining Region Y*
SSC, *Spermatogonial Stem Cell*
StAR, *Steroidogenic Acute Regulatory protein*
SULT, *Sulfotransférase*
SUMO, *Small Ubiquitin-related Modifier*
TBP, *TATA-Box Binding Protein*
TCGA, *The Cancer Genome Atlas*
TG, *Triglycéride*
TGR5, *Takeda G-protein Receptor 5*
TGT, *Testicular Germ cell Tumor*
TIF2, *Transcriptional Intermediary Factor 2*
TLX, *Tailless nuclear receptor*
TP53, *Tumor Protein P53*
THR, *Thyroid hormone Receptor*
TR2/4, *Testicular Nuclear Receptor*
TSS, *Transcription Start Site*
TUNEL, *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*
U2AF2, *U2 small nuclear RNA Auxiliary Factor 2*
UDCA, *Ursodeoxycholic Acid*
UGT, *UDP GlucuronosylTransferase*
VDR, *Vitamin D Receptor*
VLDL, *Very Low Density Lipoprotein*
WB, *Western-Blot*
WT, *Wild Type*

Sommaire

<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	6
<u>Partie 1 : Les récepteurs nucléaires.....</u>	7
1 Contexte.....	8
2 Présentation de la superfamille des Récepteurs Nucléaires	8
2.1 Classification	8
2.2 Structure modulaire des Récepteurs Nucléaires	10
2.2.1 Domaine N-terminal.....	10
2.2.2 Domaine de liaison à l'ADN (DBD)	11
2.2.3 Domaine charnière.....	12
2.2.4 Domaine de liaison aux ligands (LBD)	12
2.3 Monomères, Homodimères et Hétérodimères	13
3 Mécanismes d'action des RN	14
3.1 Effets génomiques des RN	15
3.1.1 Ligands des RN	15
3.1.2 Eléments de réponse aux hormones.....	17
3.1.3 Cofacteurs des RN	18
3.1.4 Modulation de la structure chromatinienne et RN.....	19
3.1.5 Activation transcriptionnelle	20
3.1.6 Répression transcriptionnelle.....	21
3.1.7 Modulation de l'activité des RN par les modifications post-traductionnelles...23	
3.1.8 Interactions avec les facteurs de transcription généraux	24
3.1.9 Interactions avec les facteurs de transcription séquence-spécifiques : les modules transcriptionnels	25

3.2	Effets non génomiques des RN	26
Partie 2 : Farnesoid X Receptor.....		27
1	Généralités	28
2	Isoformes et variants polymorphiques de FXR α	29
2.1	Structure et expression tissulaire des isoformes de FXR α	29
2.2	Polymorphismes et mutations de FXR α	30
3	Le récepteur FXR α , un régulateur de la transcription	31
3.1	Ligands	31
3.1.1	Agonistes.....	31
3.1.2	Antagonistes de FXR α	32
3.2	Eléments de réponse à l'ADN (FXRE)	33
3.3	Activités transactivatrices et transrépressives de FXR α	34
3.3.1	Cofacteurs, régulateurs de l'activité transcriptionnelle de FXR α	34
3.3.2	Transactivation.....	35
3.3.3	Transrépression.....	36
3.4	Modulation de l'activité de FXR α	37
3.4.1	Régulation de l'expression de FXR α	37
3.4.2	Modifications post-traductionnelles (TPM) de FXR α	39
4	Rôles physiologiques médiés par FXR α	41
4.1	FXR α acteur de la régulation des acides biliaires et du cycle entérohépatique.....	41
4.1.1	Synthèse des acides biliaires.....	41
4.1.2	Réabsorption des acides biliaires : Cycle entéro-hépatique	43
4.1.3	Biotransformations et élimination des acides biliaires	46
4.2	FXR α et homéostasie du glucose	47
4.2.1	Métabolisme du glucose	47
4.2.2	FXR α et métabolisme glucidique	47

4.3	FXR α et métabolisme des lipides.....	49
4.3.1	Métabolisme des lipides.....	49
4.3.2	Rôle de FXR α dans le métabolisme des lipides	51
5	Rôle de FXR α en pathologie et ciblages thérapeutiques.....	53
5.1	FXR α et pathologies métaboliques	53
5.2	FXR α dans les pathologies hépatiques.....	54
5.3	FXR α dans les cancers.....	56
5.4	Altérations métaboliques et troubles de la fertilité masculine.....	58
<u>Partie 3 : FXRα dans le développement normal et pathologique du testicule.....</u>		60
1	Physiologie testiculaire : du fœtus à l'âge adulte	61
1.1	Développement fœtal du testicule	61
1.1.1	Cellules de Sertoli.....	61
1.1.2	Cellules de Leydig.....	63
1.1.3	Cellules germinales.....	64
1.2	Puberté : Essor des fonctions endocrine et exocrine du testicule	65
1.2.1	Fonction endocrine : rôle des cellules de Leydig.....	65
1.2.2	Fonction exocrine : production des gamètes mâles	67
1.3	Régulation des fonctions testiculaires par FXR α	70
1.3.1	FXR α et fonction endocrinienne	70
1.3.2	FXR α dans les cellules germinales masculines.....	73
1.3.3	FXR α , spermatogenèse et environnement	75
2	Problématique du travail de thèse et étude de la fonction du récepteur FXR α dans l'étiologie des cancers germinaux du testicule.....	77
2.1	Des troubles de la gamétogenèse comme lésions précurseurs des tumeurs germinotesticulaires	77
2.2	Principaux facteurs de risques et altérations décrites dans les TGT	79

2.3	Présentation de la problématique et résumé du projet de recherche	80
<u>METHODOLOGIE ET RESULTATS.....</u>		82
<u>Méthodologie.....</u>		83
1	Culture cellulaire et analyses de biologie cellulaire	84
1.1	Culture cellulaire	84
1.2	Transfection transitoire	84
1.3	Numérations cellulaires.....	85
1.4	Analyse de l'activité mitochondriale	85
2	Extraits protéiques et analyses par western blot.....	85
2.1	Extraits protéiques	85
2.2	Western-blot.....	86
3	Extraction des ARN et analyse de l'expression des gènes	87
3.1	Extraction des ARN	87
3.2	RT-PCR et RT-qPCR	87
4	Gel-shift assay Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)	88
5	Analyses in silico	89
5.1	Données sur les TGT	89
5.2	Procédure expérimentale	89
6	Analyses statistiques.....	90
<u>Résultats.....</u>		91
1	Analyse de l'expression de FXR α <i>in vitro</i> dans des lignées modèles de TGT.....	92
1.1	Sous-types histologiques de TGT	92
1.2	Lignées modèles de TGT	92
1.3	Expression et abondance de FXR α	93
1.4	Les NCCIT expriment-elles une protéine FXR α ?.....	94
1.5	L'activité des cellules de TGT est modifiée par les agonistes de FXR α	96

1.6	Les agonistes de FXR α modifient le profil de gènes cibles dans les cellules de TGT.	97
2	Analyse <i>in silico</i> de l'expression de FXR α dans les TGT	98
2.1	Sous-types tumoraux exprimant FXR α	98
2.1.1	FXR α et différenciation	99
2.1.2	FXR α et profils de méthylation.....	100
2.1.3	Ontologies et voies de signalisation des gènes corrélés à FXR α dans les TGT.	101
<u>DISCUSSION.....</u>		103
1	Expression de FXR α dans les tumeurs germino-testiculaires	104
1.1	Expression de FXR α dans le testicule	104
1.2	Signalisation FXR α	107
2	FXR α et étiologie des TGT	108
2.1	FXR α et pluripotence	108
2.2	FXR α et différenciation.....	111
2.3	FXR α et altérations du microenvironnement	112
3	Pertinence de FXR α comme nouveau marqueur biologique ?	114
3.1	FXR α et marqueurs diagnostiques	114
3.2	Résistance à la chimiothérapie dans les TGT.....	114
4	L'épissage alternatif comme source de variants du récepteur FXR α	116
5	Expression tissulaire et cellulaire du variant FXR α 1 Δ Ex5	118
6	Capacité de liaison et régulation de l'expression génique par le variant FXR α 1 Δ Ex5. ...	120
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>		126
<u>ANNEXES.....</u>		167

Introduction bibliographique

Partie 1 :
Les récepteurs nucléaires

1 CONTEXTE

Les récepteurs nucléaires (RN) sont des facteurs de transcription activés par des ligands qui contrôlent l'expression de gènes cibles impliqués dans des processus biologiques divers tels que la reproduction, le développement ou le métabolisme. Ces protéines ont d'abord été reconnues comme médiateurs de la signalisation hormonale par les stéroïdes et ont établi un lien important entre la régulation transcriptionnelle et la physiologie. En 1985, Hollenberg *et coll.* clonèrent le premier RN, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et al. 1985). Cette découverte fut suivie de celle du récepteur aux œstrogènes (ER) en 1986 par l'équipe de Green *et coll.* (Green et al. 1986). Depuis, le clonage d'autres gènes codant pour des RN a mené à la découverte inattendue d'une multitude de récepteurs nucléaires présentant une forte similitude dans leur séquence. La comparaison des séquences a révélé un modèle évolutif conservé chez plusieurs espèces et a également mis en évidence des caractéristiques structurelles et fonctionnelles qui préfiguraient l'émergence d'une superfamille de récepteurs nucléaires (Zhao et al. 2015). Aujourd'hui, le génome humain contiendrait 48 membres de cette famille de facteurs de transcription (Chawla et al. 2001). Cette superfamille comprend non seulement les récepteurs endocriniens classiques qui régulent les actions des hormones stéroïdes, des hormones thyroïdiennes, des lipides ou des vitamines liposolubles A et D, mais aussi d'autres récepteurs nucléaires dits orphelins, dont les ligands sont actuellement inconnus. Les RN agissent la plupart du temps sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères obligatoires avec le récepteur aux rétinoïdes RXR (Retinoid X Receptor) bien qu'ils puissent parfois agir seuls en liant des séquences cibles de la chromatine sous la forme de monomère.

2 PRESENTATION DE LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES

2.1 CLASSIFICATION

A ce jour, il est proposé que les RN dérivent de l'évolution d'un ancêtre commun. L'analyse de l'évolution phylogénétique des RN a mené à l'élaboration d'une classification officielle fondée sur la nomenclature du *Nuclear Receptors Nomenclature Committee* (« A Unified

	Gène	Symbole	Ligand endogène
Sous-famille 1	NR1A1	TR α	Thyroxine
	NR1A2	TR β	Thyroxine
	NR1B1	RAR α	Acide rétinoïque
	NR1B2	RAR β	Acide rétinoïque
	NR1B3	RAR γ	Acide rétinoïque
	NR1C1	PPAR α	Acides gras
	NR1C2	PPAR δ	Acides gras
	NR1C3	PPAR γ	Acides gras
	NR1D1	REV-ERB α	Hème
	NR1D2	REV-ERB β	Hème
	NR1F1	ROR α	Oxystérols
	NR1F2	ROR β	Oxystérols
	NR1F3	ROR γ	Oxystérols
	NR1H2	LXR β	Oxystérols
	NR1H3	LXR α	Oxystérols
	NR1H4	FXR	Acides biliaires
	NR1I1	VDR	Vitamine D
	NR1I2	PXR	Xénobiotiques
NR1I3	CAR	Xenobiotiques	
Sous-famille 2	NR2A1	HNF4 α	
	NR2A2	HNF4 γ	
	NR2B1	RXR α	Acide rétinoïque 9-cis
	NR2B2	RXR β	Acide rétinoïque 9-cis
	NR2B3	RXR γ	
	NR2C1	TR2	
	NR2C2	TR4	
	NR2E1	TLX	
	NR2E3	COUPTF1	
	NR2F1	COUPTF2	
	NR2F6	EAR2	
Sous-famille 3	NR3A1	ER α	Œstradiol
	NR3A2	ER β	Œstradiol
	NR3B1	ERR α	
	NR3B2	ERR β	
	NR3B3	ERR γ	
	NR3C1	GR	Glucocorticoïdes
	NR3C2	MR	Minéralocorticoïdes
	NR3C3	PR	Progestatifs
NR3C4	AR	Androgènes	
Sous-famille 4	NR4A1	NGFIB	
	NR4A2	NURR1	
	NR4A3	NOR1	
Sous-famille 5	NR5A1	SF-1	
	NR5A2	LRH-1	
Sous-famille 6	NR6A1	GCNF	
Sous-famille 7	NR0B1	DAX1	
	NR0B2	SHP	

Table 1: Famille des récepteurs nucléaires.
Issu de Burris et coll. 2013 Pharmacol rev

Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily » 1999). Elle repose sur la subdivision de la superfamille des RN en sept sous-familles numérotées de 0 à 6 (**Table 1**) :

- Sous-groupe 0 : Ce groupe comprend les RN atypiques *Dosage Sensitive Sex reversal-Adrenal hypoplasia Critical Region On The X Chromosome Protein 1*, DAX-1 (NR0B1) et *Small Heterodimer Partner*, SHP (NR0B2). Ils sont caractérisés par une absence de domaine de liaison à l'ADN (DBD) dans leur structure et par une activité répressive constitutive (Wongi Seol, Choi, et Moore 1996).
- Sous-groupe 1 : Cette grande famille est composée notamment des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (*Thyroid Hormone Receptor* α et β , THRA et THRB ; NR1A1, NR1A2), des récepteurs à l'acide rétinoïque (*Retinoic Acid Receptor* α , β et γ , RARs : NR1B1, NR1B2 et NR1B3), des récepteurs à la vitamine D (*Vitamin D Receptor* , VDR ; NR1I1), des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor* α , Δ et γ , PPARs ; NR1C1, NR1C2 et NR1C3) ainsi que de différents récepteurs orphelins récemment adoptés depuis l'identification de leurs ligands. L'activité de ces récepteurs est régulée par des molécules de signalisation lipophiles comprenant les hormones thyroïdiennes, des acides gras, des acides biliaires et des stérols.
- Sous-groupe 2 : Cette troisième sous-famille contient des récepteurs tels que les récepteurs à l'acide 9-cis rétinoïque (*Retinoid X Receptor* RXR α , β et γ ; NR2B1, NR2B2 et NR2B3), les récepteurs *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter 1 et 2* (COUP - TF1 et 2 ; NR2F1 et NR2F2), le facteur nucléaire hépatocytaire 4 (HNF4 ; NR2A1), les récepteurs testiculaires (*Testicular Nuclear Receptor 2 et 4*, TR2/4 ; NR2C1 et NR2C2) ainsi que des récepteurs impliqués dans le développement (*T Cell Leukemia Homeobox*, TLX (NR2E1) et *Photoreceptor-Specific Nuclear Receptor*, PNR (NR2E3)). Le récepteur RXR joue un rôle très important dans la famille des RN car il est le partenaire privilégié dans la formation de complexes hétérodimériques avec d'autres membres de cette superfamille (Schröder et al. 1993).
- Sous-groupe 3 : Ce groupe comprend les récepteurs stéroïdiens ainsi que les récepteurs orphelins apparentés aux œstrogènes (*Estrogen Related Receptor* α , β et γ ERR ; NR3B1, NR3B2 et NR3B3). La famille inclut le récepteur aux androgènes (*Androgen Receptor*, AR ; NR3C4), le récepteur à la progestérone (*Progesterone*

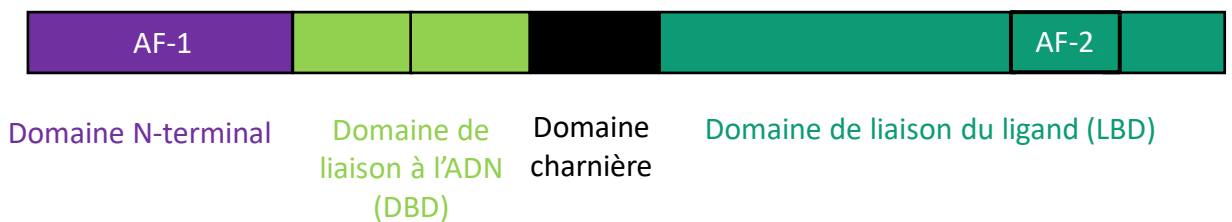
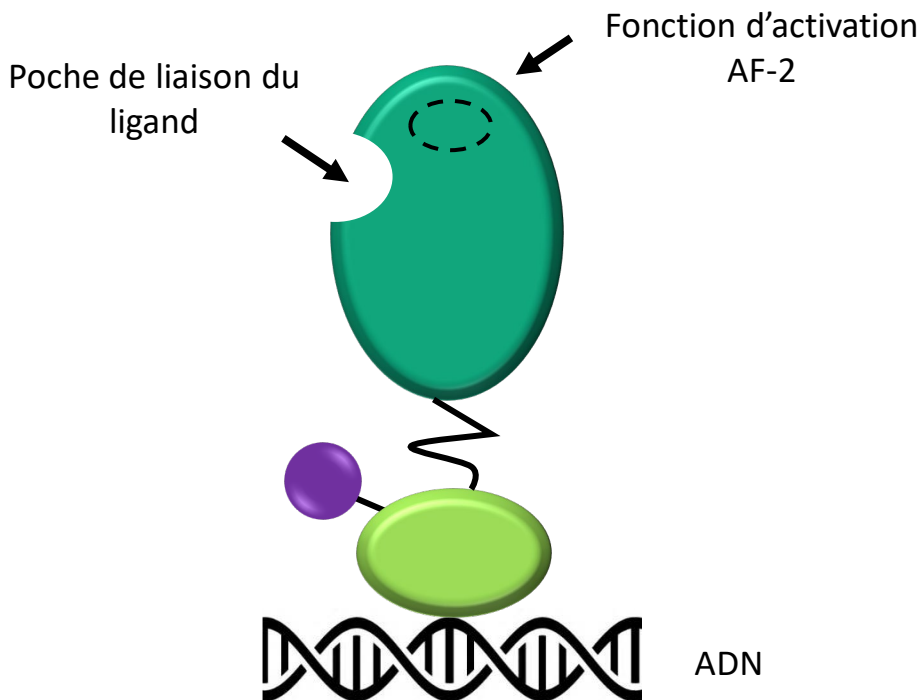


Figure 1 : Structure des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires sont divisés en quatre domaines principaux : une région amino-terminale dotée d'une fonction activatrice AF-1, un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine charnière suivi d'un domaine de liaison du ligand (LBD), contenant la fonction activatrice AF-2, situé à l'extrémité carboxy-terminale. ADN : Acide Désoxyribonucléique ; AF : Activating Function ; DBD : DNA Binding Domain ; LBD : Ligand Binding Domain.

Receptor, PR ; NR3C3), le récepteur aux œstrogènes (*Estrogen Receptor* α et β , ER ; NR3A1 et NR3A2), le récepteur aux glucocorticoïdes (*Glucocorticoid Receptor*, GR ; NR3C1) et le récepteur aux minéralocorticoïdes (*Mineralocorticoid Receptor*, MR ; NR3C2).

- Sous-groupe 4 : Il contient les récepteurs nucléaires orphelins *Nerve Growth Factor* IB NGF1-B (NR4A1), *Nurr Related Protein-1* NURR1 (NR4A2) et *Neuron-Derived Orphan Receptor 1* NOR-1 (NR4A3) qui jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, dans les pathologies inflammatoires et le cancer (Safe et al. 2016).
- Sous-groupe 5 : Cette sous famille contient le facteur stéroïdogène 1 (*Steroidogenic Factor 1*, SF-1 ; NR5A1) et le récepteur hépatique Homolog-1 (*Liver Receptor Homolog-1*, LRH-1 ; NR5A2), deux récepteurs impliqués dans le développement et le métabolisme (Fayard, Auwerx, et Schoonjans 2004; Bashamboo et McElreavey 2010).
- Sous-groupe 6 : Il ne contient qu'un seul récepteur, le facteur nucléaire des cellules germinales *Germ Cell Nuclear Factor* (GCNF ; NR6A1), un récepteur orphelin qui joue un rôle essentiel dans le développement (Lei et al. 1997). Il ne possède pas de fonction activatrice (AF) et est connu pour son action répressive (Greschik et Schüle 1998).

2.2 STRUCTURE MODULAIRE DES RN

La structure des récepteurs nucléaires peut être présentée en domaines fonctionnels dont chacun joue un rôle spécifique dans la fonction des récepteurs. Un RN typique est formé d'une région amino-terminale variable qui correspond au domaine de transactivation A/B, suivie d'un domaine fortement conservé de liaison à l'ADN (DBD), d'un domaine charnière qui apporte de la flexibilité au domaine de liaison du ligand (LBD) situé à l'extrémité carboxy-terminale (P. Huang, Chandra, et Rastinejad 2010) (**Figure 1**).

2.2.1 Domaine N-terminal

Au sein des membres de la famille des RN, le domaine situé à l'extrémité N-terminale est très peu conservé et présente la plus grande disparité de taille et de séquence. Il contient une région dotée d'une fonction activatrice AF-1 (Activating Function) constitutive qui coopère avec une seconde région AF-2 inductible du domaine carboxyterminal pour réguler la

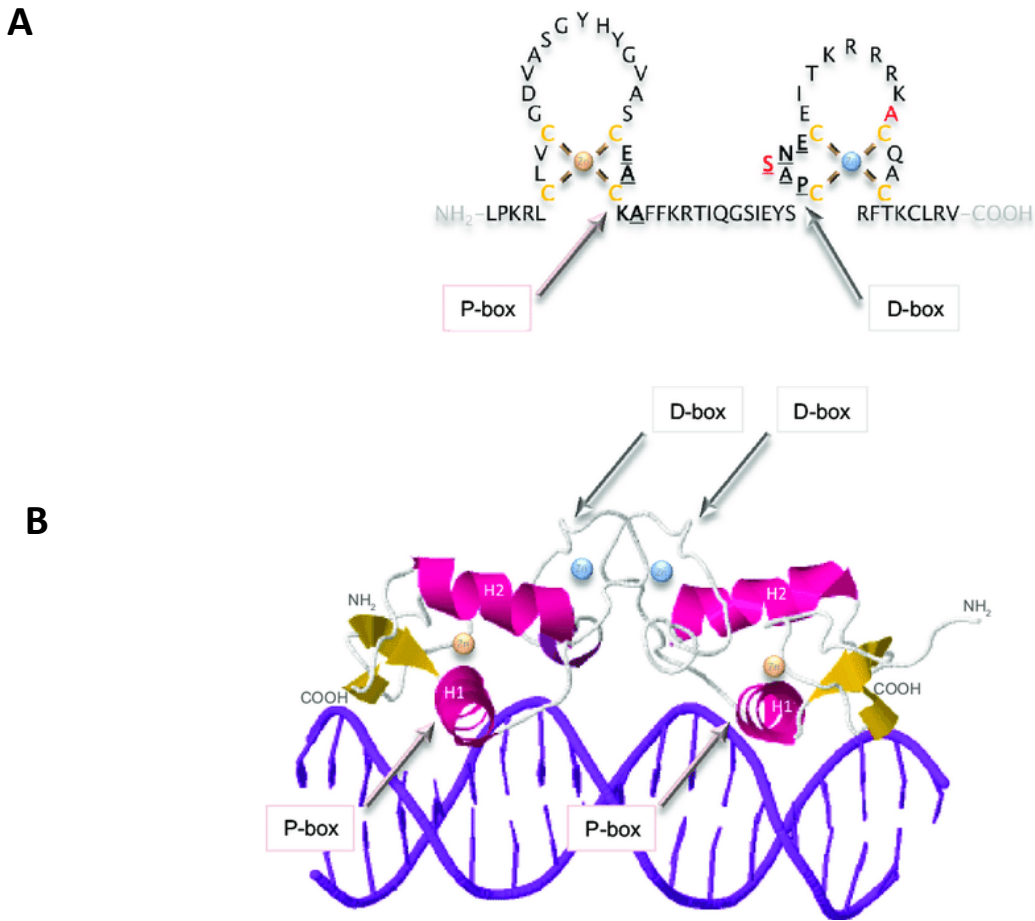


Figure 2 : Structure du domaine de liaison à l'ADN du récepteur aux œstrogènes ER

Le domaine de liaison à l'ADN est formé de deux hélices α et contient deux motifs en doigts de zinc. **A)** Les motifs en doigts de zinc sont formés d'un atome de zinc entouré par quatre résidus cystéines (ocre). Les résidus présents dans la boîte proximale (boîte P) du premier doigt de zinc, reconnaissent et fixent spécifiquement l'élément de réponse à l'ADN. Les résidus de la boîte distale (boîte D) interviennent dans la dimérisation et l'espacement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse. Les deux résidus uniques au récepteur ER α sont colorés en rouge. Le premier ion zinc est représenté par une petite sphère dorée tandis que le second est représenté en bleu. **B)** Les régions des structures secondaires sont schématisées : les coudes (gris), hélice α (cylindre rose) et feuilletts β (flèche jaune), reposent sur la double hélice d'ADN (Bleu). Issu de May EB, 2014 *Cancer Manag Res*.

transcription *via* le recrutement de modulateurs transcriptionnels (Bevan et al. 1999). L'hétérogénéité du domaine N-terminal explique en partie les modes d'actions spécifiques propres à chacun des récepteurs par la variabilité des cofacteurs qu'il peut fixer ainsi que diverses modifications post-traductionnelles dont il peut faire l'objet. En outre, ce domaine effectue de nombreuses interactions avec les protéines associées à la machinerie transcriptionnelle de base, notamment l'ARN polymérase 2 et les facteurs généraux de la transcription (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH).

2.2.2 Domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le plus conservé des domaines des RN, confère la capacité de reconnaître et de lier des séquences cibles spécifiques de l'ADN, les éléments de réponses aux hormones (HRE), afin d'adapter le niveau d'expression des gènes. Les HRE situés dans les promoteurs de gènes cibles sont généralement constitués de deux demi-sites composés de 6 nucléotides (ou paires de bases). L'HRE pour un récepteur donné est déterminé par l'orientation et la composition de la séquence nucléotidique des demi-sites ainsi que par l'espacement entre ces derniers (Evans et Mangelsdorf 2014; Cotnoir-White, Laperrière, et Mader 2011). Pour les récepteurs nucléaires, les demi-sites sont reconnus par des séquences d'acides aminés très conservées du DBD qui constituent deux sous-domaines contenant chacun quatre résidus de cystéine associés à un ion de zinc pour créer un motif en « doigt de zinc » (**Figure 2**). Les deux doigts de zinc portent chacun une séquence de 5 acides aminés, dénommées les boîtes P et D. La boîte P est la partie fortement conservée du premier doigt de zinc et détermine la spécificité de liaison entre l'HRE et le récepteur. Étonnamment, un seul changement d'acide aminé dans la boîte P peut entraver la sélectivité pour les éléments de réponse (Zilliaccus et al. 1995). Le second doigt de zinc quant à lui porte la boîte D qui régit les interactions nécessaires à la dimérisation du récepteur ainsi que l'espacement entre les deux demi-sites. L'hélice à la fin du deuxième doigt de zinc, appelée extension carboxy-terminale (CTE), est responsable d'interactions supplémentaires moins spécifiques avec l'ADN. En effet selon le type de récepteur, le CTE joue un rôle dans la reconnaissance de séquences et/ou la dimérisation (Helsen et al. 2012).

Les études menées *in vitro* avec des versions tronquées des récepteurs ont indiqué que les deux doigts de zinc sont insuffisants pour la liaison de forte affinité et la spécificité d'interaction avec l'ADN. En effet, il a été démontré que le CTE situé en aval du second doigt de zinc joue un rôle crucial bien que moins conservé (Schoenmakers et al. 1999). Pour les récepteurs stéroïdiens, le CTE semble étendre l'interface protéine-ADN en liant le sillon mineur 5' de l'élément de réponse (Roemer et al. 2006). Pour les récepteurs se dimérisant avec le récepteur RXR, les hélices du CTE peuvent former des interfaces de dimérisation supplémentaires, responsables de l'espacement entre les partenaires (Rastinejad et al. 1995; M. S. Lee et al. 1994) ou contribuer à l'interaction avec l'ADN (Chandra et al. 2008). Enfin, pour les récepteurs qui peuvent lier l'ADN en tant que monomères, des hélices supplémentaires dans le CTE prolongent également la surface d'interaction avec l'ADN, expliquant ainsi pourquoi ces récepteurs reconnaissent des éléments de réponse plus grands que le demi-site de AGGTCA (Gearhart et al. 2003).

2.2.3 Domaine charnière

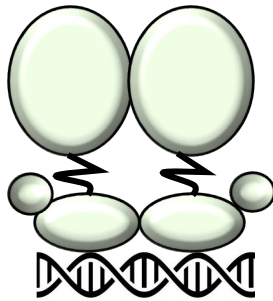
La séquence et la taille de cette région sont les moins bien conservées au sein de la superfamille des RN. Cette région offre une liberté de rotation entre le DBD et le site de liaison du ligand, permettant au récepteur d'adopter différentes conformations et de modifier ses capacités d'interactions moléculaires. Cette zone charnière intervient également dans le trafic nucléo-cytoplasmique de certains récepteurs par la présence d'un signal de localisation nucléaire (Daniel et al. 2010; Haelens et al. 2007).

Outre son rôle dans la conformation spatiale des récepteurs, des études montrent aujourd'hui que son intégrité est indispensable à leur fonctionnement et que des modifications post-traductionnelles peuvent en moduler l'activité (C. Wang et al. 2001; Delmotte et al. 1999; Pourcet et al. 2010; Yanqiao Zhang, Kast-Woelbern, et Edwards 2003).

2.2.4 Domaine de liaison aux ligands (LBD)

Les études de cristallographie du domaine de liaison du ligand (LBD) réalisées pour plusieurs RN ont démontré que la structure globale de ce domaine présentait de nombreuses similarités suggérant une structure canonique pour les différents membres de la superfamille (Moras et Gronemeyer 1998). Le LBD, moins conservé que le DBD, est fonctionnellement complexe car

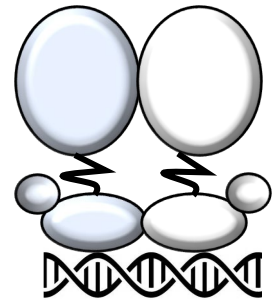
Récepteurs aux hormones stéroïdes



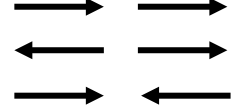
Répétition inversée
IR3



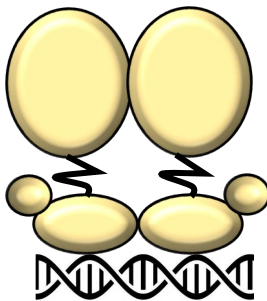
Hétérodimères RXR



Répétition directe (DR)
Répétition en miroir (ER)
Répétition inverse (IR)



Homodimères



Répétition directe
(DR)



Monomères

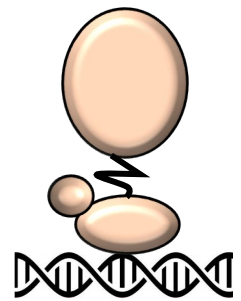


Figure 3 : Les récepteurs nucléaires lient l'ADN en homodimères, hétérodimères ou monomères

Les récepteurs stéroïdes lient au niveau de l'ADN des éléments de réponse hormonaux (HRE) de type IR-3 sous la forme d'homodimères. Les autres récepteurs nucléaires peuvent lier l'ADN en tant qu'hétérodimère avec RXR sur des HRE de type DR, ER ou IR, en homodimères sur des DR ou en monomères sur un seul demi-site.

il dirige la dimérisation du récepteur, ses interactions avec les protéines de choc thermique (HSP, *heat shock protein*), la liaison du ligand ainsi que sa fonction activatrice (AF-2) inductible.

Le LBD contient trois régions fonctionnellement liées :

- une surface de dimérisation, qui autorise l'interaction avec les LBD des autres récepteurs partenaires,
- une région d'activation AF-2, qui contrôle l'activité trans-régulatrice ligand-dépendante du récepteur *via* le recrutement de coactivateurs et de corépresseurs (Moras et Gronemeyer 1998).
- une cavité constituant la poche de liaison du ligand (*Ligand Binding Pocket*, *LBP*), dont la taille varie selon les RN permettant le recrutement de ligands de taille plus moins importantes (Uppenberg et al. 1998).

2.3 MONOMERES, HOMODIMERES ET HETERODIMERES

Les récepteurs nucléaires peuvent se lier à l'ADN sous une forme monomérique, homodimérique ou encore hétérodimérique avec le récepteur RXR (**Figure 3**). Les homodimères sont majoritairement représentés par les récepteurs stéroïdes. La première étude caractérisant un hétérodimère a été menée sur RAR α -RXR α (Bourguet et al. 2000). Elle a révélé que l'interface d'hétérodimérisation est topologiquement identique à l'interface d'homodimérisation observée pour les récepteurs RXR, ER et pour les LBD de PPAR γ . Cependant, la surface de contact interne entre les LBD des deux partenaires est inférieure à celle observée chez les homodimères comme ER. Une interaction plus faible au sein des hétérodimères RXR peut permettre à ce dernier de se lier à différents partenaires (Rastinejad et al. 1995; Chandra et al. 2008). Une autre propriété intéressante de l'hétérodimère RXR est que, hormis les récepteurs orphelins NGFI-B, les partenaires sont tous ligand-dépendants. Pour les récepteurs orphelins où de tels ligands n'ont pas été identifiés, les preuves structurelles, biochimiques et physiologiques indiquent que la poche de liaison du ligand n'a pas été identifiée ou est occupée continuellement par un lipide (Wisely et al. 2002), phospholipide (Krylova et al. 2005) ou molécule hydrophobe comme l'hème (Raghuram et al. 2007).

Une autre caractéristique de l'hétérodimère correspond à son potentiel d'être activé par le ligand de RXR et/ou celui du récepteur partenaire. On peut de ce fait diviser ces situations en deux catégories : les hétérodimères permissifs et non permissifs (Kurokawa et al. 1993). Les hétérodimères permissifs ont la propriété d'être activés aussi bien par des ligands de RXR que ceux de son partenaire, tandis que les hétérodimères non permissifs peuvent être activés uniquement par le ligand du partenaire. Une caractéristique importante des partenaires récepteurs permissifs (ex : *Liver X Receptor* (LXR ; NR1H3), *Farnesoid X Receptor* (FXR ; NR1H4), *Pregnane X Receptor* (PXR ; NR1I2)) est que la présence simultanée des ligands de RXR et de son partenaire donne lieu à une réponse additive voire synergique (Leblanc et Stunnenberg 1995). A l'inverse, en réduisant au silence l'activité liée à l'activation de RXR et en ne répondant qu'à leurs propres ligands, les partenaires non permissifs (ex : THR, VDR, RAR) permettent une régulation transcriptionnelle plus fine, uniquement proportionnelle à la concentration de leur ligand (Shulman et Mangelsdorf 2005).

3 MECANISMES D'ACTION DES RN

Les RN sont des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression génique *via* divers mécanismes d'activation et de répression au niveau des promoteurs des gènes cibles. L'activité des RN dépend de leurs interactions avec un réseau dynamique de différentes protéines impliquées dans le contrôle de la transcription basale, de la corégulation (corépresseurs et coactivateurs), et des modifications de la chromatine dont les régulateurs peuvent également modifier de façon post-traductionnelle les RN. L'implication de ces nombreux facteurs rend la signalisation des RN remarquablement complexe d'autant que ces nombreuses protéines corégulatrices dictent des réponses transcriptionnelles spécifiques aux cellules pour un récepteur donné. La modulation de la transcription génique peut également dépendre d'interrelations entre les différents membres de la famille des récepteurs parfois impliqués dans les mêmes voies de signalisation et pouvant réguler leur propre expression par des mécanismes de rétrocontrôles (pour revue (De Bosscher et al. 2020)).

En complément, certaines hormones exercent des actions rapides au niveau cellulaire *via* les RN indépendamment de leur rôle de facteur de transcription. Ces signalisations impliquant les RN par des mécanismes d'action dits « non génomiques » modulent notamment l'activité de

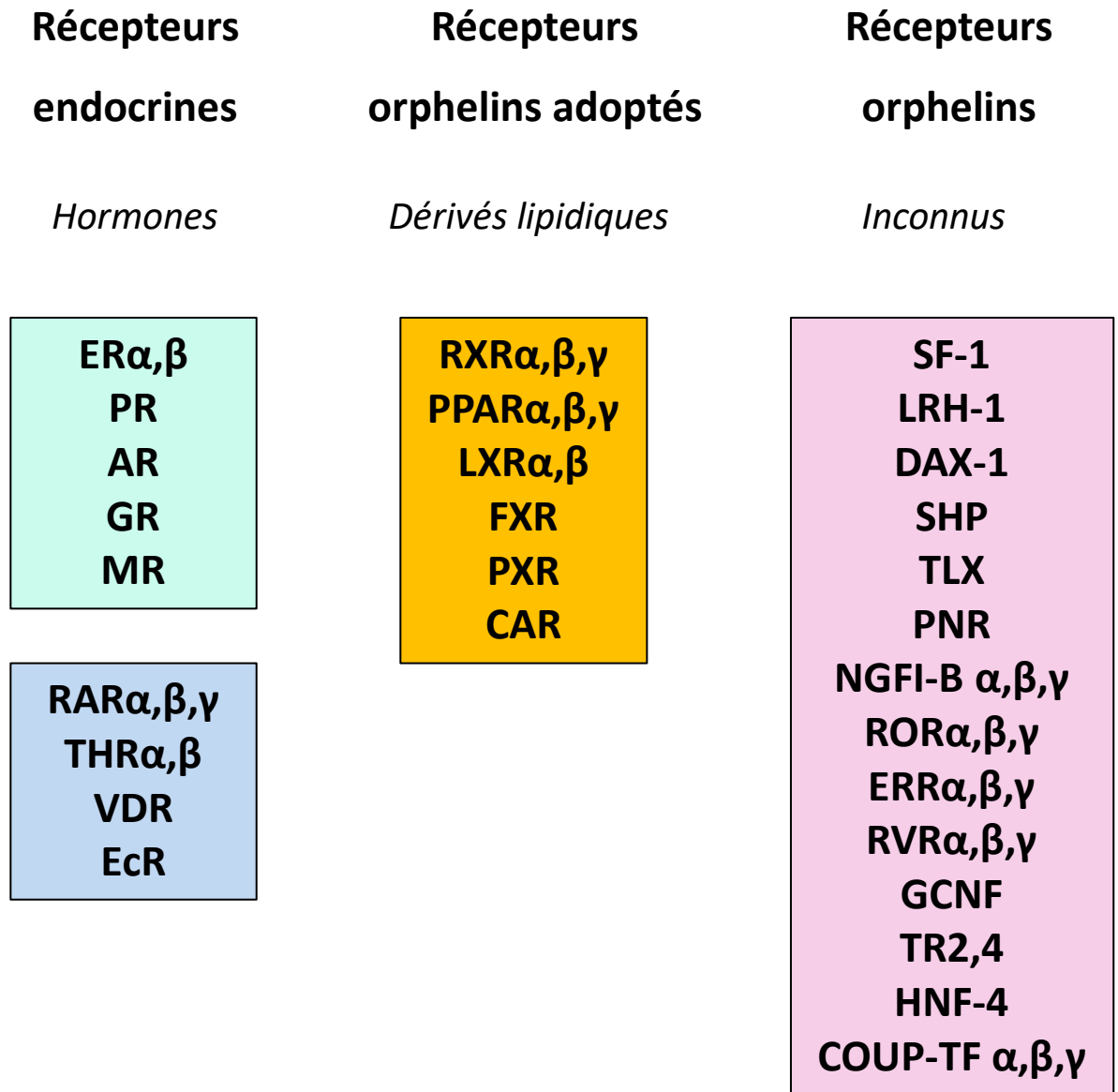


Figure 4 : Classification des récepteurs nucléaires selon le type de ligand

Les récepteurs nucléaires interagissent avec une diversité de ligands. Les récepteurs endocrines sont activés par des hormones stéroïdes, les récepteurs orphelins adoptés, répondent à divers ligands d'origine lipidique et les récepteurs orphelins dont les ligands sont actuellement inconnus.

AR : Androgen Receptor ; CAR : Constitutive Androstane Receptor ; COUP-TF : Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor ; DAX-1 : Dosage-sensitive sex reversal-Adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1 ; ER : Estrogen Receptor ; ERR : Estrogen-Related Receptor ; FXR : Farnesoid X Receptor ; GCNF : Germ Cell Nuclear factor ; GR : Glucocorticoid Receptor ; HNF-4 : Hepatocyte nuclear factor-4 ; LRH-1 : Liver Receptor Homolog-1 ; LXR : Liver X Receptor ; MR : Mineralocorticoid Receptor ; NGFI-B : Nerve Growth Factor IB-like receptor ; PNR : Photoreceptor-specific Nuclear Receptor ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; PR : Progesterone Receptor ; PXR : Pregnane X Receptor ; RAR : Retinoic Acid Receptor ; ROR : RAR-related Orphan Receptor ; RXR : Retinoid X Receptor ; SF-1 : Steroidogenic Factor-1 ; SHP : Small Heterodimer Partner ; TLX : Tailless homolog ; THR : Thyroid Hormone Receptor ; TR2,4 : Testicular orphan Receptor 2,4 ; VDR : Vitamin D Receptor. Adapté de Chawla et coll. 2001 Science

canaux ioniques, de kinases, phosphatases et autres enzymes dans différents types cellulaires (pour revue (Lösel et Wehling 2003)). Par conséquent, les RN fournissent un modèle intéressant pour comprendre comment l'intégration des signaux peut être coordonnée pour obtenir des profils spécifiques d'expression génique.

3.1 EFFETS GENOMIQUES DES RN

3.1.1 Ligands des RN

3.1.1.1 Ligands endogènes et exogènes

Les ligands jouent un rôle prédominant bien que leur disponibilité représente un paramètre limitant dans l'activité des RN (**Figure 4**). Les ligands des RN, qui sont de nature lipophile, diffusent librement au travers des membranes biologiques pour interagir avec des récepteurs intracellulaires. Les RN stéroïdes par exemple régulent l'expression des gènes sous une forme homodimérique après liaison d'hormones endocrines circulantes qui sont synthétisées par les tissus stéroïdogènes dont les activités sont contrôlées par l'axe hypothalamo-hypophysaire. En revanche, les récepteurs PPAR et LXR sont des RN hétérodimériques qui sont principalement, ou exclusivement régulés par des ligands paracrines. D'autres ligands sont synthétisés *de novo* dans la cellule cible et exercent leur rôle uniquement au niveau intracellulaire, on parle alors d'un mode d'action intracrine. Ce mode d'action constitue probablement une raison majeure pour laquelle les ligands endogènes de plusieurs récepteurs orphelins n'ont pu être identifiés.

Bien que les RN soient modulés par divers ligands physiologiques endogènes, ils peuvent également l'être par des molécules étrangères à l'organisme. Il peut s'agir de ligands synthétiques développés pour l'étude des RN, de molécules médicamenteuses ou de perturbateurs endocriniens (Gronemeyer, Gustafsson, et Laudet 2004; Fernandez 2018; Casals-Casas et Desvergne 2011).

3.1.1.2 Activités agonistes et antagonistes des ligands

Le postulat de base concernant l'action des ligands stipule qu'un agoniste mime l'action d'un ligand naturel en accédant à la poche de liaison du ligand ce qui cause un changement conformationnel du récepteur lui permettant d'activer la transcription de gènes cibles en

recrutant ses protéines coactivatrices. Un antagoniste quant à lui empêche l'action de l'agoniste en liant la poche de liaison du ligand (l'antagoniste se lie donc au récepteur mais ne provoque pas de réponse). Selon sa capacité à bloquer l'action d'un agoniste, on distinguera les antagonistes compétitifs et non compétitifs. Pour l'antagoniste compétitif, l'augmentation de la concentration d'agoniste activera de nouveau le RN. En revanche, l'antagoniste non compétitif liera le RN avec une très forte affinité (ou liaison covalente) ce qui ne permettra plus à l'agoniste d'activer le RN malgré des quantités croissantes. Un agoniste inverse est un agent qui interagit avec le récepteur mais produit l'effet pharmacologique opposé à l'agoniste. En favorisant une conformation permettant le recrutement de protéines corépressives par le RN, l'agoniste inverse exerce un effet inhibiteur en s'opposant à l'effet basal constitutionnellement actif du RN. Il existe des agonistes inverses complets, qui inhibent toute l'activité constitutive et des agonistes inverses partiels, qui n'inhibent qu'une partie de cette activité en bloquant la liaison de l'agoniste au LBD et ainsi en empêchant l'agoniste d'activer son récepteur. Inversement, de nombreux antagonistes peuvent afficher une activité agoniste inverse, où la liaison du ligand augmente le recrutement de cofacteurs corépresseurs conduisant à la répression active de la transcription.

Les ligands des RN peuvent présenter des mécanismes d'action complexes. En effet, certaines molécules montrent des activités agonistes ou antagonistes selon le tissu. Ces différences s'observent par exemple pour le tamoxifène, un antiœstrogène prescrit dans le cancer du sein. Cette molécule a la propriété d'agir comme antagoniste des récepteurs aux œstrogènes dans les cellules mammaires tandis qu'elle agit comme agoniste dans l'endomètre et le tissu osseux (Hol et al. 1997). La spécificité d'action tissulaire peut dépendre de divers facteurs comme la présence d'isoformes du RN aux propriétés spécifiques ou de différentes protéines régulatrices disponibles au sein de la cellule (Y. Shang et al. 2000; Kojetin et al. 2008). D'autres mécanismes propres à la cellule peuvent intervenir comme la présence de certaines protéines corégulatrices qui contrôlent les modifications post-traductionnelles de certains résidus pour moduler l'activité, la localisation et/ou la stabilité des récepteurs en réponse aux ligands (cf Modulation de l'activité des RN par les modifications post-traductionnelles p16) (Choi et al. 2010).

3.1.2 Éléments de réponse aux hormones

Les régions d'ADN 5' régulatrices en amont du gène contenant des séquences promotrices appelées promoteurs contiennent des séquences d'ADN spécifiques (boîte TATA) de liaison pour l'ARN polymérase II et des éléments de réponse (HRE) pour le RN qui permet d'initier la transcription. Les séquences *enhancers* et *silencers* situées en amont ou en aval du promoteur ont la faculté de stimuler ou diminuer son activité. Elles participent à la régulation de la transcription en liant aussi les RN et les protéines corégulatrices incluant les protéines de modification de la chromatine. Les récepteurs nucléaires se lient aux HRE dans les promoteurs de gènes cibles pour activer la transcription en présence de l'ARN polymérase et des facteurs de transcription généraux du complexe pré-initiateur. Bien que ces éléments de réponse soient trouvés majoritairement dans les régions promotrices, des HRE sont retrouvés dans les régions régulatrices d'amplification (*enhancers*) ce qui permet en plus aux RN de réguler le taux de la transcription au sein de complexe associant des protéines corégulatrices et des protéines de modification de la chromatine attestant d'un autre mode de régulation de la transcription médiée par les RN (Honkakoski et al. 1998; Kan, Georgopoulos, et Zannis 2000).

Les deux demi-sites de 6 paires de bases composant les HRE sont orientés en répétitions directes (*Direct Repeat, DR*), inversées (*Inverted Repeat, IR*) ou en miroir (*Everted Repeat, ER*). Deux motifs consensus ont été identifiés : AGAACA, préférentiellement reconnu par le groupe des RN stéroïdes (à l'exception du récepteur ER qui lie la séquence AGGTCA) alors que AGGTCA est un motif lié par les autres RN de la superfamille (Beato, Herrlich, et Schütz 1995). Pour les récepteurs monomériques, comme LRH-1 et SF-1, un seul demi-site AGG/TTCA est précédé d'une région 5' riche en bases A/T (Gearhart et al. 2003; Giguère, McBroom, et Flock 1995; Eriksson et Nilsson 1999). L'HRE pour un récepteur donné est par conséquent déterminé par l'orientation et la séquence nucléotidique des demi-sites ainsi que par l'espacement entre les deux (Evans et Mangelsdorf 2014; Cotnoir-White, Laperrière, et Mader 2011).

Les propriétés de liaison des RN à leurs éléments de réponse a permis de les ordonner en 4 groupes (**Figure 3**) :

- Les récepteurs d'hormones stéroïdes (AR, ER, GR, MR et PR) : ils fonctionnent en homodimères et lient les éléments de réponse de type IR-3 (répétitions inversées séparées par 3 nucléotides).

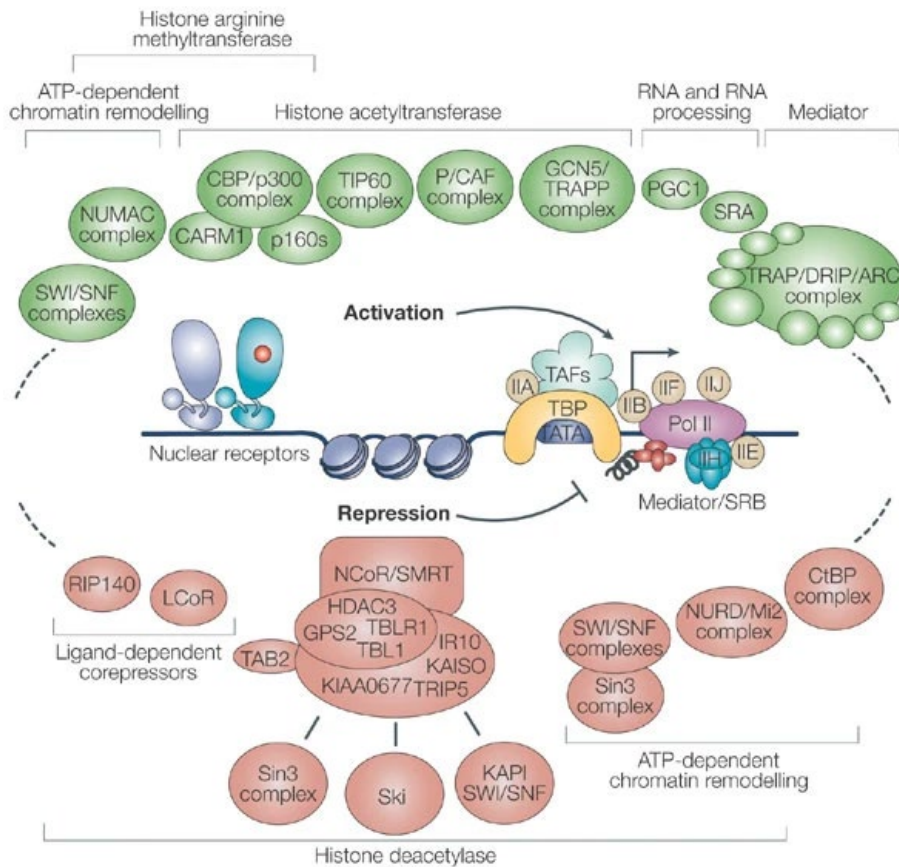


Figure 5 : Principaux complexes coactivateurs et corépresseurs associés aux récepteurs nucléaires pour réguler la transcription.

Les cofacteurs coactivateurs (vert) incluent des facteurs de remodelage de la chromatine, des histones méthyltransférases, histones acétyltransférases, des facteurs impliqués dans la maturation des ARN et les médiateurs des interactions avec la machinerie transcriptionnelle.

Les cofacteurs corépresseurs (rouge) regroupent des facteurs de remodelage de la chromatine, des corépresseurs généraux qui recrutent des enzymes à activité désacétylase et des corépresseurs spécifiques qui mobilisent d'autres complexes répresseurs en réponse au ligand.

Issu de Perissi et coll. 2005, Nat Rev Mol Cell Biol.

- Les récepteurs nucléaires qui agissent en hétérodimères avec RXR : il s'agit notamment des récepteurs LXR, FXR, RAR, PXR, *Constitutive Androstane Receptor* (CAR ; NR1I3), VDR et THR. Ils se lient généralement à des éléments de réponse de type DR (répétitions directes séparées par un nombre variable de nucléotides), mais d'autres types d'éléments de réponse sont également décrits.
- Les récepteurs nucléaires hormonaux non stéroïdes qui fonctionnent également comme homodimères tels que RXR, HNF4 ou COUP-TF et lient généralement des motifs de type DR.
- Les récepteurs nucléaires qui fonctionnent en monomères et lient un seul motif. Cette classe comprend les récepteurs NGF1-B, NURR1, SF-1 et LRH-1.

Quand un RN est lié à un HRE, il peut activer ou réprimer la transcription selon notamment la nature du ligand, l'organisation du promoteur, le contexte cellulaire ou le type d'élément de réponse. Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) par exemple a la capacité d'activer ou réprimer la transcription selon le type de HRE auquel il se lie. Ces éléments de réponse GRE, dits « positifs » (+GRE) ou « négatifs » (nGRE) seront décrits dans la section Répression transcriptionnelle page 21.

Un autre exemple d'activation dépendante du contexte a été démontré pour le RN *Liver-X-Receptor* (LXR). LXR active la transcription lorsqu'il est lié en hétérodimère avec RXR à une répétition directe contenant la séquence AGTTCA espacée par 4 paires de base (élément LXR). Toutefois, le complexe LXR/RXR est incapable d'activer la transcription lorsqu'il est lié à un élément DR4 contenant le motif nucléotidique AGGTCA même si l'hétérodimère LXR/RXR peut se lier aux 2 séquences avec des affinités similaires (Willy et al. 1995; Willy et Mangelsdorf 1997). Ainsi, les HRE peuvent affecter considérablement la fonction du récepteur en imposant des contraintes spécifiques pour sa liaison au niveau de la chromatine, puis pour le recrutement de ses protéines corégulatrices activatrices ou répressives.

3.1.3 Cofacteurs des RN

Après leur liaison à l'ADN, les RN offrent de nombreuses surfaces d'interaction leur permettant de recruter une variété de protéines connues sous le nom de corégulateurs. À ce jour, il existe plus de 200 protéines corégulatrices différentes, classées en deux catégories

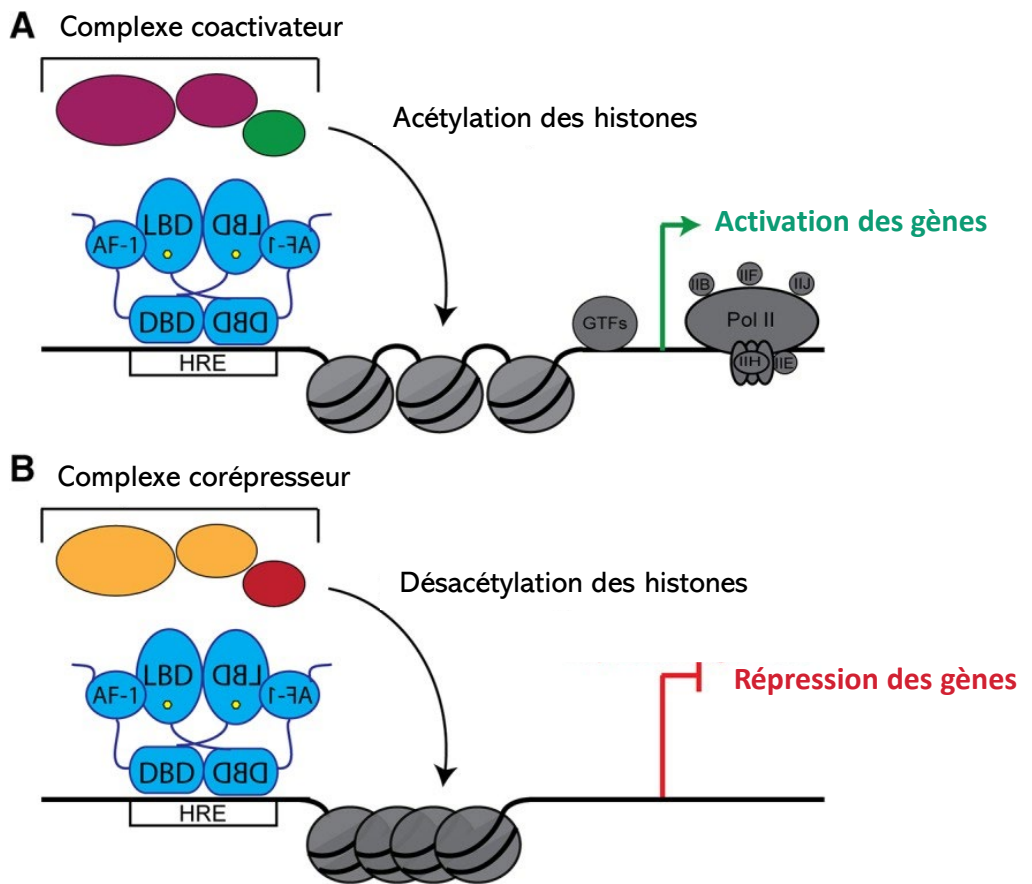


Figure 6 : Mécanismes généraux d'activation et de répression de la transcription par les récepteurs nucléaires

A) Lors d'une activation de la transcription, les récepteurs nucléaires liés à leurs éléments de réponse à l'ADN, recrutent des complexes protéiques coactivateurs qui en retour mobilisent des enzymes de modification des histones. Ces enzymes sont des histones acétyltransférases qui attachent des groupements acétyles au niveau des lysines de la partie amino-terminale des histones (queues d'histones), structurant la chromatine sous sa forme active. L'ouverture de la chromatine permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle générale initiant la transcription des gènes. **B)** Pour réprimer la transcription, les récepteurs nucléaires recrutent des complexes protéiques corépresseurs qui mobilisent des histones désacétylases. Ces enzymes vont retirer les marques acétyles d'histone entraînant la compaction de la chromatine. La conformation inactive de la chromatine empêche l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle générale réprimant ainsi l'expression des gènes.

Adapté de Weikum et coll. 2018 Protein Sci

principales : les coactivateurs et les corépresseurs (**Figure 5**). Ils interagissent avec les RN pour une grande majorité au niveau des régions AF-1 et AF-2. Plusieurs protéines coactivatrices se lient à la surface AF-2 du domaine LBD des RN par l'intermédiaire d'un motif court d'acides aminés, LXXLL où 3 résidus leucines (L) sont associés à 2 autres acides aminés (X)- (Heery et al. 1997). Les corépresseurs quant à eux contiennent un motif conservé appelé boîte *Corepressor Nuclear Receptor* (Co-RNR) organisé autour de la séquence L/IXXI/VI ou LXXXI/LXXXI/L où X- correspond à des acides aminés autres que la leucine (L), l'isoleucine (I) et la valine (V) (X. Hu et Lazar 1999).

Des études sur les mécanismes de *silencing* ont conduit à l'identification de différentes familles de corégulateurs qui se lient aux récepteurs en absence et présence d'hormones. Les protéines *Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors* (SMRT) et *Nuclear receptor Co-Repressor* (N-CoR) par exemple sont des protéines homologues qui régissent l'effet répressif des RN non liés à leur ligand grâce au recrutement des complexes d'histones déacétylases (Nagy et al. 1997; Heinzel et al. 1997). En revanche, le complexe *Creb Binding Protein* (CBP)/p300, le *CBP/p300-Associated Factor* (PCAF) et les membres de la famille p160 possèdent une activité intrinsèque d'histone acétyltransférase (HAT) potentialisant l'activité transcriptionnelle des récepteurs liés au ligand (Blanco et al. 1998; H. Chen et al. 1997). Ces données réunies mettent en évidence que l'activité des corégulateurs est liée au mécanisme d'action des RN en régulant leur activité transactivatrice ou transrépressive, en présence ou non de leur ligand.

3.1.4 Modulation de la structure chromatinienne et RN

L'organisation de l'ADN en chromatine des génomes eucaryotes induit des contraintes dans la régulation de l'expression génique (Khorasanizadeh 2004) (**Figure 6**). En effet, la structure de la chromatine influe sur la transcription en limitant l'accès des séquences promotrices à la machinerie transcriptionnelle et en organisant l'information génomique pour établir une régulation coordonnée de l'expression du génome (Perkins, Hallett, et Glass 2004). Par exemple, les régions de l'euchromatine des génomes eucaryotes présentent une hyperacétylation des histones, contrairement aux régions d'hétérochromatine transcriptionnellement inactives qui sont hypoacétylées (A. Vaquero, Loyola, et Reinberg 2003). Bon nombre de changements dans la structure de la chromatine par les facteurs de transcription impliquent des modèles complexes de modifications d'histones par des enzymes

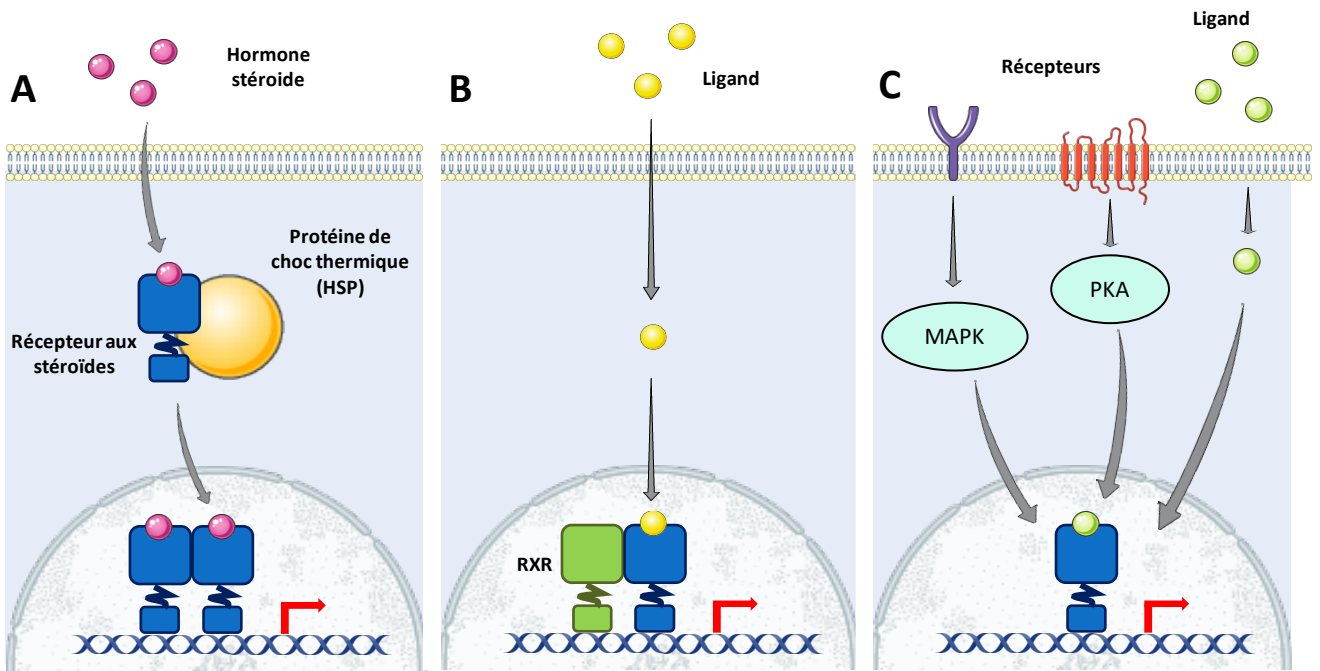


Figure 7 : Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires présentent 3 classes de mécanismes distincts. **A)** Les récepteurs stéroïdes sont associés aux protéines de choc thermique (HSP) dans le cytosol ou le noyau. La fixation de l'hormone stéroïde déclenche la dissociation des récepteurs et des HSP puis la translocation du récepteur à son élément de réponse à l'ADN situé dans le promoteur de ses gènes cibles (HRE). **B)** Les récepteurs formant des hétérodimères avec RXR sont constitutivement liés à leur élément de réponse à l'ADN. La liaison du ligand du partenaire ou de RXR déclenche la transcription des hétérodimères permissifs, tandis que les deux ligands sont nécessaires à l'activation des hétérodimères non permissifs. **C)** Les récepteurs nucléaires monomériques agissent seuls en réponse à des signaux variés. Il s'agit souvent de récepteurs orphelins. *GPCR : G-protein-coupled receptor; HSP : Heat Shock Protein; MAPK : mitogen-activated protein kinase; PKA : cAMP-dependent protein kinase; RXR : Retinoid X Receptor.*

Adapté de Glass CK et coll. 2006 Nat Rev Immunol

telles que les acétyltransférases d'histone (HAT), les méthyltransférases d'histone et les kinases. Toutes ces modifications de la chromatine ont conduit à la mise en place d'un code histone suggérant que des combinaisons spécifiques de modifications covalentes d'histones déterminent les réponses transcriptionnelles spécifiques et, par conséquent, des fonctions cellulaires (Strahl et Allis 2000). Ainsi, les histones sont des cibles cruciales pour les activités enzymatiques de cofacteurs recrutés par les RN.

En recrutant les histones désacétylases (HDAC), les complexes corépresseurs induisent quant à eux la compaction de la chromatine, puis la transrépression des gènes en favorisant le retrait des groupes acétyles au niveau des résidus lysines de l'extrémité amino-terminale des histones. La liaison du ligand au niveau de la poche du domaine LBD engendre le relargage du complexe corépresseur et le recrutement de protéines coactivatrices capables d'interagir par leur motif LXXLL avec la région du domaine AF-2 du RN. Plusieurs protéines du complexe coactivateur possèdent une activité HAT qui permet de relâcher la structure de la chromatine et de la rendre dans un état compatible à l'activation de la transcription génique. En plus de l'acétylation, d'autres modifications post-transcriptionnelles comme la phosphorylation, la méthylation et l'ADP ribosylation ciblent l'extrémité N-terminale de la queue des histones ce qui affecte leur charge, leur fonction ainsi que la structure de la chromatine pour contrôler l'expression des gènes (Bannister et Kouzarides 2011).

Si ces modifications induites de la structure chromatinienne par les complexes corégulateurs participent au contrôle de la transcription par les RN ces derniers sont également capables d'induire des modifications locales de la chromatine pour faciliter l'activation de la transcription par d'autres facteurs. C'est le cas du récepteur GR qui est décrit pour perturber l'organisation des nucléosomes selon la présence ou l'absence de son ligand (Reik, Schütz, et Stewart 1991). D'autres modèles de régulation de la transcription indiquent que la liaison des RN crée des changements subtils qui mènent à une plus grande accessibilité des autres facteurs de transcription à leurs séquences cibles.

3.1.5 Activation transcriptionnelle

Les modalités de l'activation transcriptionnelle peuvent varier selon le groupe de RN (**Figure 7 et 8**) :

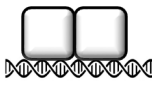
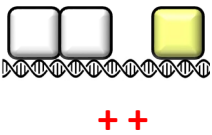


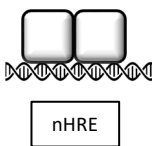

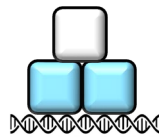
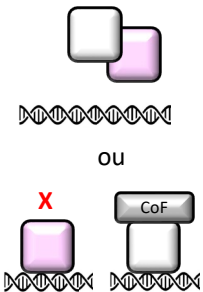
	Simple	Composée	Monomérique	d'Attache (Tethering)	Compétitive (Squelching)
Transactivation					-
Transrépression		-			

Figure 8 : Mécanismes généraux d'activation et de répression des gènes par les des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression des gènes par des mécanismes de transactivation ou de transrépression. Les mécanismes de transactivation comprennent la transactivation simple, composée, monomérique ou d'attache. La transactivation simple s'effectue sous forme dimérique, la transactivation composée en coopération avec d'autres facteurs de transcription situés à proximité, la transactivation monomérique sans l'aide d'un partenaire et la transactivation d'attache, en liant d'autres récepteurs sans se lier directement à l'ADN. Les mécanismes de transrépression comprennent la transrépression simple, monomérique, d'attache ou compétitive. La transrépression simple et monomérique s'effectue en liant des HRE de type négatifs, la transrépression d'attache en fixant d'autres facteurs de transcription pour empêcher leur activation et la transrépression compétitive en titrant les cofacteurs disponibles ou en inhibant leur accès à leur élément de réponse.

- Les récepteurs aux hormones stéroïdes sont maintenus sous une forme inactive dans des complexes contenant des protéines de choc thermique (HSP) dans le cytoplasme et/ou le noyau. La liaison des ligands hormonaux au niveau du LBD provoque un changement de conformation du récepteur qui peut se dissocier de son complexe HSP et migrer dans le noyau où leur liaison sous la forme d'homodimère aux HRE permet d'ajuster la transcription des gènes au sein de complexes transrégulateurs.
- Les récepteurs nucléaires hétérodimériques quant à eux sont liés constitutivement à l'ADN avec leur partenaire RXR. Bien que certains récepteurs hétérodimériques, comme le récepteur aux hormones thyroïdiennes, soient régulés par des systèmes endocriniens, la plupart des membres de ce groupe activés par un ligand sont régulés par des molécules produites de manière autocrine, intracrine ou paracrine. La liaison du ligand fait passer les facteurs de transcription d'un état inactif à l'état actif en induisant un changement conformationnel dans le LBD du récepteur (Bourguet, Germain, et Gronemeyer 2000). Cette conformation spécifique permet le relargage des complexes corépresseurs et le recrutement des coactivateurs dont des enzymes modificatrices de la chromatine nécessaires à la régulation de la transcription (Y. Shang et al. 2000). L'ouverture de la chromatine permet ainsi d'amplifier le recrutement et/ou la fonction de la machinerie transcriptionnelle incluant l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de la transcription (Roeder, 1996).
- Les récepteurs nucléaires homodimériques non stéroïdiens : ils sont fixés de façon constitutive à leurs HRE avec un mécanisme d'action similaire aux RN hétérodimériques, mais forme principalement des homodimères.
- Les RN se liant principalement à l'ADN en monomères sont désignés dans la plupart des cas comme « orphelins ». Ils lient un seul demi-site du HRE.

3.1.6 Répression transcriptionnelle

Les modes d'activation de la transcription en réponse au ligand ont été les premiers mécanismes étudiés. Cependant, les RN sont également capables de réguler l'expression des gènes par différents mécanismes de répression (**Figure 8**).

Plusieurs RN comme les RAR ou les LXR, répriment la transcription des gènes cibles en l'absence de ligand (Sap et al. 1989). Cette répression est liée au recrutement de complexes de corépresseurs contenant les protéines NCoR et SMRT par l'hétérodimère avec RXR. Bien que ces cofacteurs n'abritent pas d'activité enzymatique intrinsèque, chacun réside ou recrute des complexes transcriptionnels qui contiennent des désacétylases spécifiques d'histones (HDAC).

De nombreux RN peuvent également réguler négativement l'expression des gènes d'une manière dépendante des ligands. Les mécanismes responsables de cette répression restent mal compris, mais une classe générale de régulation négative, appelée transrépression dépendante du ligand, semble résulter de l'inhibition de l'activité d'autres facteurs de transcription, tels que les membres des familles des facteurs *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B) et du complexe protéique *Activator protein 1* (AP-1) (Helmberg et al. 1995; Ray et Prefontaine 1994; Schüle et al. 1991).

Enfin, certains membres de la superfamille des RN peuvent également jouer un rôle de médiateur dans la répression transcriptionnelle par le biais d'un mécanisme alternatif. Avec DAX-1, SHP appartient à un groupe hétérogène de protéines qui sont sensiblement distinctes des RN conventionnels dans leur structure et leur fonction. Les membres de cette famille ne possèdent pas de domaine DBD et agissent comme un répresseur. En effet, SHP agit comme un partenaire inhibiteur pour une variété de RN. Il se lie à leur domaine d'activation AF-2 et recrute des HDAC et des *Euchromatic Histone-lysine N-Methyltransferase* (EHMT) (Båvner et al. 2005; Ying Zhang et Dufau 2004).

Les RN peuvent aussi interagir avec des « éléments négatifs de réponse à l'ADN » comme cela a été montré chez le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Hudson, Youn, et Ortlund 2013). La transactivation dépendante du récepteur GR repose sur la présence d'éléments de réponse GRE dits positifs (+GRE) qui orchestrent une conformation spatiale du récepteur favorisant le recrutement de ses protéines coactivatrices de la transcription. Ces éléments contiennent deux répétitions inversées AGAACA séparées par trois nucléotides, essentiels pour la liaison du récepteur GR. L'espacement à trois nucléotides entre les demi-sites est quant à lui strictement nécessaire pour préserver le potentiel de dimérisation du GR sur l'élément. En revanche, la séquence consensus des GRE négatives (nGRE), CTCC(n0-2)GGAGA, diffère considérablement des séquences activatrices. La liaison à ces éléments modifie la

conformation spatiale des RN et favorise le recrutement de corépresseurs pour bloquer la transcription (Hua, Ganti, et Chambon 2016).

3.1.7 Modulation de l'activité des RN par les modifications post-traductionnelles

L'activité transcriptionnelle peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles ciblant tous les domaines fonctionnels des RN ou leurs protéines corégulatrices. La phosphorylation ainsi que d'autres modifications comme l'acétylation, la SUMOylation, l'ubiquitinylation et la méthylation, ont été décrites pour moduler la localisation, la stabilité et/ou la capacité de liaison à l'ADN des RN ce qui constitue potentiellement un mécanisme important d'intégration cellulaire (Kouzarides 2000; C. Wang et al. 2001; Fu et al. 2002; Perissi et Rosenfeld 2005). Les RN sont des phosphoprotéines, par conséquent de multiples fonctions peuvent être affectées par la phosphorylation en réponse à divers types d'effecteurs. La majorité des sites de phosphorylation des RN se trouve dans la région amino-terminale A/B, même si des sites de phosphorylation sont également présents dans les domaines DBD et LBD (Rochette-Egly et al. 1995; Delmotte et al. 1999). Ainsi, les protéines kinases, comme la *RAC-Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase* (AKT), Protéine Kinase A (PKA) ou C (PKC), coopèrent avec les ligands des RN pour potentialiser l'activation de la transcription. Inversement, la phosphorylation peut également contribuer à freiner la réponse induite par le ligand en favorisant d'autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitinylation afin d'activer la dégradation du récepteur, ou l'acétylation pour modifier son interaction avec un élément de réponse cible et/ou son affinité pour un ligand. À l'origine, les récepteurs aux hormones stéroïdes étaient considérés quasi exclusivement comme des facteurs de transcription inductibles par les hormones. Cependant des signaux extra- et intracellulaires, comme des facteurs de croissance, ont été décrits depuis pour leur capacité à activer l'activité transcriptionnelle des récepteurs stéroïdiens comme AR, ER et PR en l'absence de leurs ligands (Weigel et Zhang 1998). En exemple, Ignar-Trowbridge et coll. ont montré que le récepteur aux œstrogènes ER pouvait être activé par un traitement à l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) dans des cultures cellulaires et *in vivo* (Ignar-Trowbridge et al. 1992; 1993). Une autre étude menée par Culig et coll. a mis en évidence que le facteur de croissance *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) pouvait induire la sécrétion de *Prostatic Specific Antigen* (PSA) dans les cellules tumorales de prostate LNCaP exprimant un récepteur AR endogène muté dans son LBD (Culig et al. 1994).

En plus des modifications des récepteurs eux-mêmes, de telles modifications ont été signalées pour leurs coactivateurs et corépresseurs. En effet, les cofacteurs *Steroid Receptor Coactivator-1* (SRC-1), *Transcriptional Intermediary Factor 2* (TIF2), *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 3* (RAC3), *PPAR γ Coactivator 1 alpha* (PGC-1), p300, CBP, NCoR et SMRT sont des phosphoprotéines qui constituent des cibles pour certaines kinases (Font de Mora et Brown 2000; Rowan, Weigel, et O'Malley 2000; Yuan et Gambée 2000; Knutti, Kressler, et Kralli 2001; Lopez et al. 2001). Si la phosphorylation semble améliorer l'interaction des coactivateurs avec les RN et leur efficacité à recruter des complexes à activité HAT, il a été démontré en revanche que la phosphorylation des corépresseurs comme NCoR et SMRT par les *Mitogen-Activated Protein kinases* (MAP-kinases), *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK1/2), la protéine kinase AKT/Protéine Kinase B (PKB) et la caséine kinase-2 mène à leur relocalisation du noyau vers le cytoplasme pour lever leur inhibition sur l'activité des RN (Hong et Privalsky 2000; Y. Zhou et al. 2001; Baek et al. 2002; Hermanson, Glass, et Rosenfeld 2002).

3.1.8 Interaction avec les facteurs de transcription généraux

Les promoteurs des gènes liant l'ARN polymérase II sont reconnus par deux types de facteurs de transcription : les facteurs de transcription généraux (GTF) qui interagissent avec des éléments centraux du promoteur (ou *core promoter elements*) au niveau d'une séquence TATA et les facteurs de transcription spécifiques d'une séquence incluant, les RN, qui généralement interagissent avec leur HRE localisés plus en amont. La séquence TATA ou boîte TATA, adjacente au gène transcrit, se situe à proximité d'une séquence initiatrice qui couvre le site de départ de la transcription (TSS) où l'ARN polymérase II se lie. La plupart des facteurs impliqués dans la formation du complexe d'initiation de la transcription ont été caractérisés. En plus de l'ARN polymérase II (qui est composée d'au moins 12 sous-unités), le complexe inclue les *Transcription factors* II D (TFIID), TFIIIB, TFIIA, TFIIF, TFIIIE et TFIIF (pour une revue, voir (Wilson et al. 1996)). TFIID est composé de la protéine de liaison à la TATA-box (TBP) et les facteurs associés à la TBP (TAFII) qui sont capables de former plusieurs complexes (Roeder 1996).

Comme avec les autres protéines régulatrices de la transcription, un aspect des mécanismes par lesquels les récepteurs nucléaires affectent le taux de transcription dirigé par l'ARN polymérase II implique probablement l'interaction des récepteurs avec les composants du complexe de pré-initiation de la transcription. Cette interaction peut être directe ou indirecte

par l'action de protéines corégulatrices pouvant agir comme des facteurs de pontage. Les récepteurs nucléaires semblent pouvoir interagir avec plusieurs composants de la machinerie transcriptionnelle générale et plus particulièrement avec la protéine TBP du complexe TFIID. Ces interactions décrites pour plusieurs RN augmentent leurs pouvoirs transactivateurs puisque la surexpression de la protéine TBP augmente la capacité du RN à activer la transcription d'un gène rapporteur en présence de son ligand (Berkenstam et al. 1992; Sadovsky et al. 1995). Les TAFII qui composent également TFIID, ont également été identifiés comme des cibles potentielles pour les récepteurs hormonaux. Ainsi TAFII30 est nécessaire pour la transactivation par ER (Jacq et al. 1994), alors que l'expression de TAFII135 potentialise fortement la stimulation transcriptionnelle par les récepteurs RAR, THR ou VDR, mais n'affecte pas les réponses induites par les récepteurs ER ou RXR (Mengus et al. 1997). Par conséquent, les facteurs de transcription généraux de la famille TAFII peuvent agir comme coactivateurs de récepteurs nucléaires. Une interaction avec TFIIB a été bien documentée pour THR et VDR ainsi que pour d'autres récepteurs (Baniahmad et al. 1993; Blanco et al. 1995; Masuyama, Jefcoat, et MacDonald 1997). Bien que la fonctionnalité des interactions entre les RN et les facteurs du complexe pré-initiateur de la transcription reste encore à préciser, il apparaît clairement que ces dernières facilitent la fixation des RN au niveau de l'ADN des gènes cibles ainsi que le recrutement de complexes régulateurs de la transcription au niveau des éléments de réponse HRE des régions promotrices et *enhancers* afin de faciliter le flux de la transcription.

3.1.9 Interactions avec les facteurs de transcription séquence-spécifique : les modules transcriptionnels

Dans les promoteurs, les HRE sont généralement situés à proximité des sites de liaisons d'autres facteurs de transcription dont l'interaction avec les RN peut entraîner des effets synergiques ou inversement, un antagonisme, pouvant jouer un rôle important dans l'efficacité de la transcription (Shibata et al. 1997). Dans certains cas, il a été montré que la transcription peut dépendre d'interactions coopératives avec des facteurs de transcription adjacents aux HRE. De telles interactions peuvent servir à réguler une réponse dans les cellules qui expriment l'association adéquate de facteurs de transcription. L'expression des gènes hypophysaires apparaît être un bon exemple puisque la transcription des gènes de l'hormone de croissance et de la prolactine sont stimulés par plusieurs ligands des RN en plus de la liaison

des facteurs spécifique de l'hypophyse *Pituitary-specific Transcription factor* (PIT-1) et *Growth Hormone Factor 1* (GHF-1) à leurs sites de reconnaissance dans ces promoteurs (Castillo et al. 1999; Chuang et al. 1997; Dey et al. 1992; Tolón, Castillo, et Aranda 1998). Des interactions protéine-protéine directes entre les récepteurs nucléaires et ces facteurs hypophysaires semblent être impliqués dans cette synergie (Castillo et al. 1999; Palomino et al. 1998). De même, pour le promoteur *viral Mammary Mouse Tuor Voris* (MMTV), les facteurs de transcription *Nuclear Factor 1* (NF-1) et *Octamer-Binding Transcription Factor-1* (Oct-1) sont nécessaires pour une activation par les glucocorticoïdes ou la progestérone chez la souris, et une interaction directe entre les récepteurs GR ou PR avec Oct-1 a été décrite (Brüggemeier et al. 1991).

3.2 EFFETS NON GENOMIQUES DES RN

Au cours des vingt dernières années, des mécanismes d'action atypiques médiés par les RN ont été mis en évidence pour plusieurs membres de la superfamille. Ces actions dites « non génomiques » ne reposent pas sur la capacité transcriptionnelle des RN et induisent des effets très rapides dans la cellule (Wehling 1997; Cato, Nestl, et Mink 2002; Kelly et Levin 2001). Les androgènes par exemple exercent des effets rapides sur la mobilisation du calcium intracellulaire (Z. Guo et al. 2002), la fluidité des membranes (Whiting, Restall, et Brain 2000), puis la modulation de voies de signalisation intracellulaires (Peterziel et al. 1999). Ainsi, il apparaît que AR, tout comme d'autres RN comme ER, GR et PR, puissent fonctionner comme une protéine de signalisation intracellulaire capable d'interagir avec certains effecteurs de cascades de transduction du signal. Ces mécanismes apparaissent comme des mécanismes pouvant jouer un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. En ce sens, de nombreux travaux ont démontré que les hormones stéroïdes dont les androgènes contrôlent des voies de signalisation intracellulaires mobilisant les *MAP-kinases ERK1/2* (Peterziel et al. 1999) et *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K) pour réguler la prolifération et l'apoptose (Baron et al. 2004).

Partie 2 :
Le Farnesoid X Receptor (FXR)

1 GENERALITES

Le gène NR1H4 code pour un récepteur nucléaire appelé récepteur Farnesoid X Receptor alpha (FXR α) dont les premières études ont conduit à caractériser son rôle dans le maintien de l'homéostasie des acides biliaires. Depuis lors, d'autres fonctions de ce récepteur ont été décrites et seront développées dans ce chapitre.

La recherche de partenaires cellulaires pour le récepteur RXR α par crible d'une banque d'ADN complémentaires de foie de souris par double-hybride chez la levure a mené en 1995 à l'identification des protéines *RXR-Interacting Proteins* 14 (RIP14) et 15 (RIP15) (W. Seol, Choi, et Moore 1995). Contrairement à RIP15 dont l'expression tissulaire semblait ubiquitaire, celle de RIP14 était restreinte au foie et au rein. La poursuite de cette étude a permis d'affecter ces protéines à la superfamille des RN, puis de montrer que ces récepteurs orphelins étaient capables de lier des séquences ADN spécifiques sous la forme d'un hétérodimère avec RXR α . Ce n'est que quelques mois plus tard que la caractérisation d'une séquence homologue chez le rat par Forman a permis d'identifier le farnesol et ses métabolites comme ligands de ce récepteur, puis de le renommer Farnesoid X Receptor α (FXR α) (Forman et al. 1995). Par la suite, les travaux de trois laboratoires indépendants identifieront les acides biliaires comme ligands naturels du récepteur FXR α , permettant de le retirer de la liste des récepteurs orphelins après son adoption (Makishima et al. 1999; Parks et al. 1999; H. Wang et al. 1999).

L'exploration des banques de séquences génomiques chez l'homme et la souris a mené à l'identification d'une seconde séquence codante pour un FXR β (NR1H5) fonctionnel activable par le lanostérol chez plusieurs espèces incluant les rongeurs mais inactif chez l'homme et les autres primates (Otte et al. 2003). Les deux récepteurs FXR α et FXR β proviennent de deux gènes différents nommés NR1H4 et NR1H5 selon la classification phylogénétique. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement à FXR α .

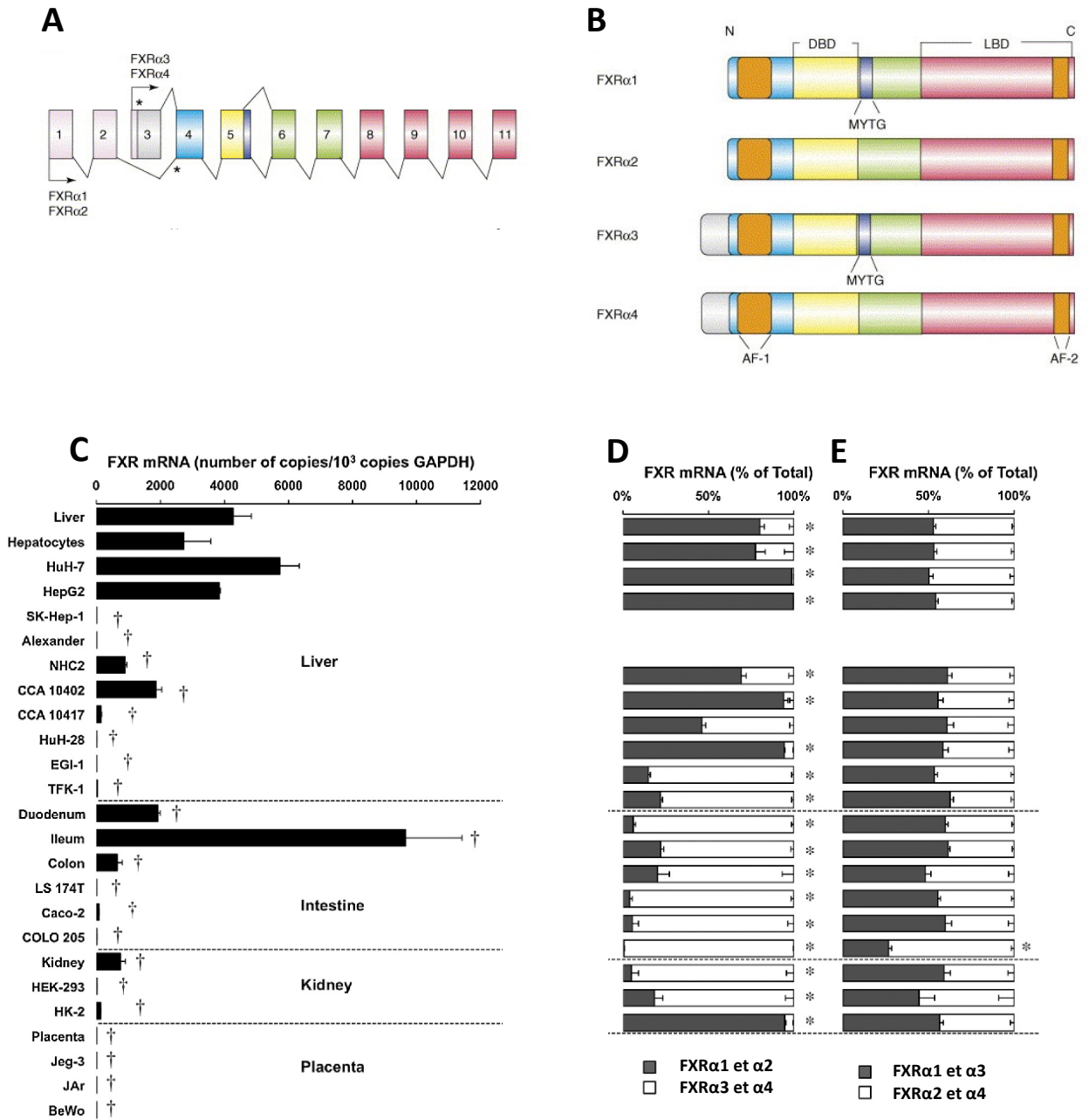


Figure 9 : Représentation schématique du gène *NR1H4* et expression des différentes isoformes du récepteur nucléaire FXR chez l'homme.

A) Les quatre isoformes caractérisées de FXRα (FXRα1 à α4) sont schématisées selon les exons (numérotés de 1 à 11) constituant leurs domaines fonctionnels. **B)** Les isoformes de FXRα découlent de l'utilisation de deux promoteur alternatifs et d'un épissage alternatif à l'extrémité de l'exon 5. Ces isoformes se distinguent par leur domaine N-terminal (bleu) et/ou l'insertion de quatre acides aminés MYTG (violet) entre le domaine de liaison à l'ADN, DBD (jaune) et la partie charnière (vert). Le domaine N-terminal et le domaine de liaison du ligand, LBD (rose) comprennent chacun une fonction activatrice, respectivement AF-1 et AF-2 (orange). **C)** Quantification de l'expression des isoformes de FXRα dans les tissus et cellules humaines. La quantité d'ARNm de FXRα est exprimée en nombre de copies/1000 copies du gène de ménage GAPDH. **D)** La proportion des isoformes groupées selon le promoteur alternatif ou **E)** la présence ou l'absence des MYTG dans chacune des lignées cellulaires est indiquée en pourcentage de transcrits sur la quantité totale d'ARNm.

Adapté de Lee et coll. 2006 Trends Biochem Sci et de Vaquero et coll. 2013 Biochem Pharmacol

2 ISOFORMES ET VARIANTS POLYMORPHIQUES DE FXR α

2.1 STRUCTURE ET EXPRESSION TISSULAIRE DES ISOFORMES DE FXR α

La structure du récepteur FXR α reprend les principaux domaines fonctionnels des RN avec un DBD fortement conservé dans la partie centrale, un domaine LBD plus variable en région carboxy-terminale, une région charnière ainsi que deux motifs activateurs (AF-1,-2). Les études structurales montrent que le gène *NR1H4*, chez l'Homme, est composé de 11 exons et 10 introns codant plusieurs isoformes de la protéine FXR α .

Huber et coll. ont montré que ces isoformes présentent une forte homologie chez plusieurs espèces (hamster syrien, souris, rat et humain) (Huber et al. 2002). A ce jour, quatre isoformes murines et humaines de FXR α ont été caractérisées dont les deux promoteurs se retrouvent en amont de l'exon 1 et de l'exon 3 pour diriger respectivement l'expression des formes FXR α 1 et 2 ou FXR α 3 et 4. En plus, un site d'épissage situé dans l'exon 5 discrimine les isoformes 1 et 3 des isoformes 2 et 4 par la présence de 4 acides aminés supplémentaires, MYTG (**Figure 9**). A noter que ces isoformes ont été classées selon différentes nomenclatures et sont parfois dénommées FXR α 1 (+), FXR α 1 (-), FXR α 2 (+) et FXR α 2(-) selon la présence ou non des acides aminés (\pm) MYTG (Yanqiao Zhang, Kast-Woelbern, et Edwards 2003). Par ailleurs, l'interrogation des bases de données publiques n'exclut pas la possibilité que d'autres isoformes de FXR α soient décrites dans les années à venir.

Le récepteur nucléaire FXR α est plus particulièrement exprimé dans le foie et l'intestin avec une abondance plus faible dans d'autres tissus comme le colon et le rein. Ces données ont pu être confirmées *in vitro* dans différentes lignées cellulaires provenant de tissus hépatiques, intestinaux et rénaux (J. Vaquero, Monte, et al. 2013). Le profil d'expression de FXR α n'est toutefois pas aussi restreint puisque des études plus récentes de séquençage haut débit du transcriptome *RNA-sequencing* (RNA-seq) montrent que d'autres tissus comme la vésicule biliaire, la glande surrénale et les gonades (testis, ovaire) expriment également des niveaux variables de FXR α (Fagerberg et al. 2014). Une étude plus détaillée a toutefois montré des différences entre l'abondance des différentes isoformes de FXR α avec une accumulation préférentielle des isoformes FXR α 1-2 dans le foie et la glande surrénale alors que les isoformes FXR α 3-4 s'accumulent plutôt dans l'intestin et le rein.

Chez la souris, les travaux de Zhang et coll. étayent davantage ces profils d'expression avec une accumulation de FXR α au niveau du tissu adipeux, du cœur, de l'estomac et des poumons en plus du foie, de l'intestin, du rein et de la glande surrénale. Par ailleurs, Otte et coll. décrivent une expression ubiquitaire de FXR β dans les tissus embryonnaires de la souris avec plusieurs isoformes réparties entre le foie et les gonades (ovaire, testis) à l'âge adulte. D'autres travaux ont également détecté une expression de FXR α dans le pancréas humain et murin (Popescu et al. 2010), dans les tissus reproducteurs (Anaya-Hernández et al. 2014; Vignozzi et al. 2011; Volle et al. 2007) et dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Li Yoyo T.Y. et al. 2007).

2.2 POLYMORPHISMES ET MUTATIONS DE FXR α

À ce jour, la régulation de l'épissage de FXR α et ses implications sur le métabolisme énergétique hépatique restent mal connues. Compte tenu du rôle central de FXR α dans le maintien de l'homéostasie des acides biliaires (AB) et la mauvaise caractérisation de certaines pathologies liées à des perturbations de leur métabolisme, des variations génétiques dans sa séquence ont été recherchées dans plusieurs pathologies. Le premier lien entre les variants géniques de FXR α et les maladies du foie a été établi par van Mill et coll., montrant que le polymorphisme nucléotide simple (SNP) rs61755050 (C > T) était associé à une fréquence plus élevée de cholestase intrahépatique de la grossesse, contrairement au variant rs56163822 (G > T). En outre, les deux variants ont été associés à une activité réduite de la signalisation induite par FXR α (van Mil et al. 2007; Marzolini et al. 2007). Dans d'autres études, le polymorphisme rs56163822 a été associé à la maladie intestinale inflammatoire, à une réduction plus élevée de cholestérol sous rosuvastatine (un inhibiteur de la synthèse du cholestérol) et à la péritonite bactérienne spontanée (SBP) chez les patients présentant une cirrhose et des ascites (Attinkara et al. 2012; M. Hu et al. 2012; Lutz et al. 2014).

L'ensemble de ces données tend à montrer qu'une seule mutation du gène codant pour FXR α est capable de perturber son mécanisme d'action et son activité.

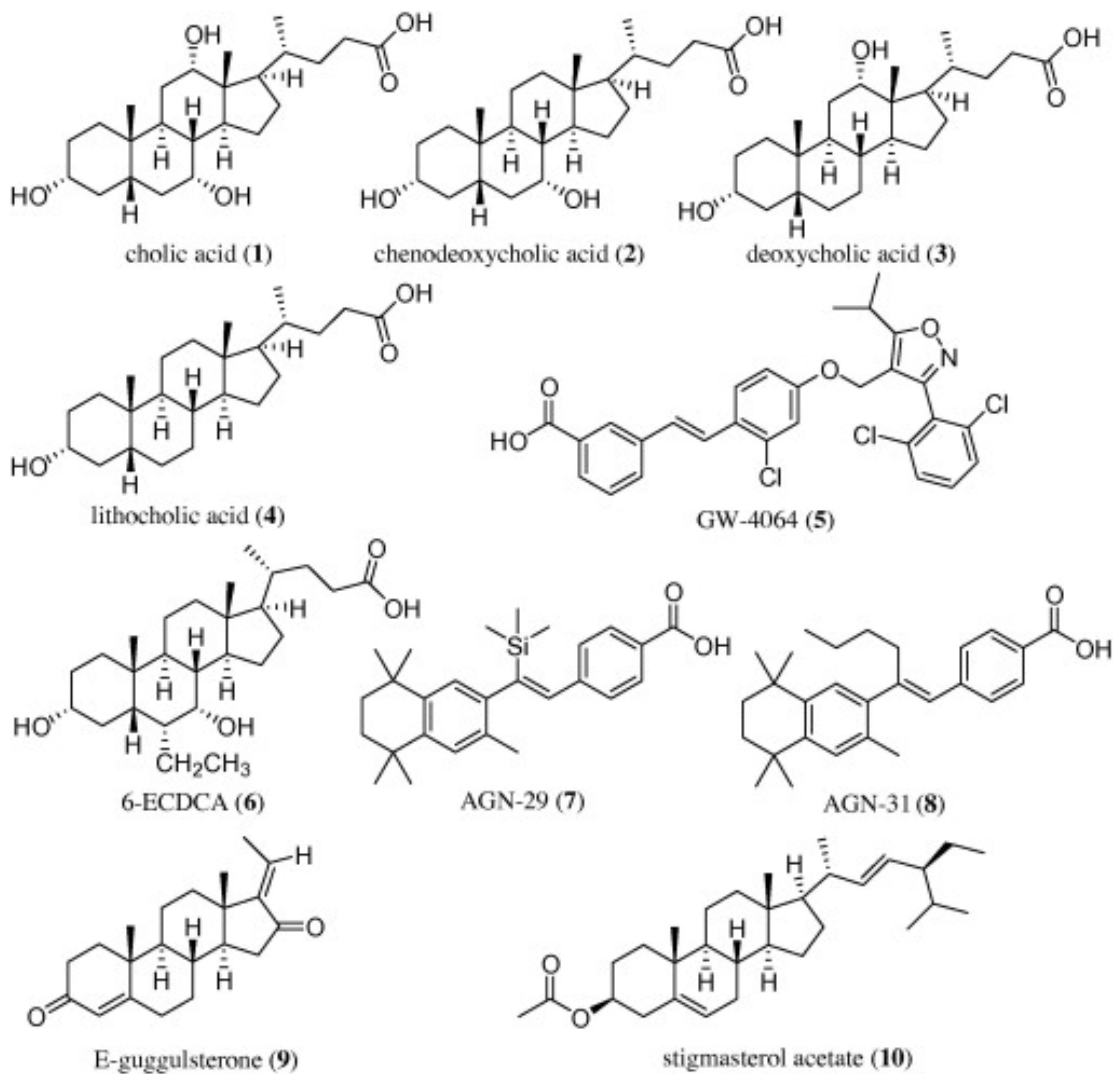


Figure 10 : Exemples de ligands endogènes et synthétiques pour le récepteur FXR α .

FXR α est activé par des ligands naturels comme les acides biliaires (1 à 4) ou des ligands synthétiques (5 à 10). *Issu de Schuster et coll. 2011 Bioorg Med Chem.*

3 LE RECEPTEUR FXR α , UN REGULATEUR DE LA TRANSCRIPTION

3.1 LIGANDS

3.1.1 Agonistes

FXR α a initialement été identifié comme un RN orphelin activé par des concentrations élevées de métabolites du farnesol (50 μ M) avant que les acides chénodéoxycholique (CDCA) (Concentration Efficace médiane (EC50) = entre 10 et 50 μ M), déoxycholique (DCA) (EC50 = 20 μ M) et lithocholique (LCA) (EC50 = 20 μ M) soient identifiés comme des ligands naturels de ce récepteur (Forman et al. 1995) (Makishima et al. 1999)(**Figure 10**). FXR α est de surcroît exprimé principalement dans le foie et l'intestin qui sont des organes majeurs de l'homéostasie des acides biliaires (Forman et al. 1995) (W. Seol, Choi, et Moore 1995). Ce nouveau rôle a mené à la dénomination de FXR α comme le récepteur BAR (*bile acid receptor*).

Le CDCA, AB primaire, a initialement été décrit chez l'homme comme ligand naturel de FXR α le plus puissant *in vitro*, avec une EC50 de 50 μ M (Makishima et al. 1999). Le DCA et le LCA, AB secondaires, ont également montré une capacité significative à activer FXR α , bien qu'avec une efficacité maximale inférieure. L'acide chénodéoxycholique (CDCA) possède la meilleure affinité pour le récepteur FXR α suivi de l'acide lithocholique (LCA) et de l'acide désoxycholique (DCA), puis de l'acide cholique (CA).

Cependant, les AB ne sont pas exclusivement des ligands de FXR α . Avec une efficacité variable, ils activent également d'autres RN, tels que le *Pregnane X Receptor* (PXR), le récepteur constitutif de l'androstane (CAR), le récepteur de la vitamine D (VDR) ainsi que le récepteur membranaire TGR5 couplé aux protéines G (Staudinger et al. 2001; Makishima et al. 2002; Saini et al. 2004; G. L. Guo et al. 2003; Kawamata et al. 2003). Pour cette raison, des molécules semi-synthétiques et synthétiques ont été développées afin d'obtenir des activateurs de FXR α plus sélectifs et plus puissants que les AB. Le plus connu d'entre eux, est le GW4064 [3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3-carboxy-2-chloro-stilben-4-yl)-oxyméthil-8-isopropyl-isoxazole] (EC50 = 90 nM). Cette molécule synthétique est un agoniste FXR α actif à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le GW4064 a aujourd'hui atteint le statut d'« agoniste de référence » par sa puissance et sa sélectivité (Sinal et al. 2000) (Maloney et al. 2000) bien que sa faible biodisponibilité exclue son utilisation en phases cliniques. Contrairement au GW-4064, le WAY-362450 [Isopropyl-3-

Status	Conditions	Interventions
Terminated	Chronic Hepatitis C	Other: guggulsterone, a natural FXR antagonist.
Recruiting	Alcohol Consumption	Drug: Placebo Drug: 10 mg Obeticholic Acid (OCA)
Completed	Obesity	Procedure: biopsy of muscle, of liver, and of adipose tissue Procedure: clamp euglycemic - hyperglycemic Behavioral: diet Other: biopsies for biological and genetic analyses
Completed	Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)	Drug: obeticholic acid Drug: placebo
Completed	Healthy	Drug: FXR 450 Drug: placebo
Recruiting	Hiv	Biological: Blood sampling
Completed	Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH)	Drug: Tropifexor (LJN452) Drug: Placebo
Terminated	Healthy	Drug: FXR-450 Drug: Placebo
Recruiting	Obesity	Drug: Obeticholic acid Drug: Obeticholic acid placebo
Active, not recruiting	Hepatitis B, Chronic	Drug: EYP001a Drug: Entecavir Drug: Pegylated interferon alpha2a
Completed	Metabolic Syndrome Familial Hypertriglyceridemia Familial Combined Hyperlipidemia	Drug: chenodeoxycholic acid Drug: placebo capsules
Active, not recruiting	Hepatitis B, Chronic	Drug: EYP001a Drug: Placebo Drug: Entecavir Drug: Tenofovir Disoproxil
Completed	NASH - Nonalcoholic Steatohepatitis Healthy	Drug: EYP001a
Completed	Hepatitis B, Chronic	Drug: EYP001a Drug: Placebo Drug: Entecavir Drug: peg-interferon alfa-2a
Completed	Hepatitis B, Chronic	Drug: EYP001a
Completed	Non Alcoholic Fatty Liver Disease	Drug: Px-104
Completed	Obesity Gallstones	Drug: Obeticholic acid Drug: Placebo
Completed	Healthy	Drug: Px-102 Drug: Placebo
Completed	Healthy	Drug: Px-102 Drug: Placebo
Completed	Primary Bile Acid Malabsorption Secondary Bile Acid Malabsorption Chronic Diarrhoea	Drug: Obeticholic acid
Completed	Healthy	Drug: EYP001a Drug: Placebo
Completed	Functional Dyspepsia	Procedure: Duodenogastroscopy Device: Duodenal aspiration catheter Dietary Supplement: Nutri drink
Completed	Liver Disease	Drug: triopifexor A Drug: tropifexor B
Completed	Morbid Obesity Vertical Sleeve Gastrectomy Metabolic Syndrome Hepatocellular Carcinoma Cholangiocarcinoma Disorder of Bile Acid and Cholesterol Metabolism	
Recruiting	Familial Partial Lipodystrophy	Drug: Obeticholic Acid Drug: Placebo
Recruiting	Liver Cirrhosis, Biliary	Drug: Obeticholic Acid (OCA) Drug: Placebo
Completed	Primary Bile Acid Diarrhea	Drug: LJN452 Drug: Placebo to LJN452
Recruiting	NASH NASH - Nonalcoholic Steatohepatitis Type 2 Diabetes Diabetes Type 2 Diabetes Fatty Liver Fatty Liver, Nonalcoholic NAFLD	Drug: MET409 Active Drug: MET409 Placebo Drug: Empagliflozin
Completed	Simple Steatosis (SS) Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) Obesity	Procedure: liver and white adipose tissue biopsies
Recruiting	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	Drug: Obeticholic acid
Recruiting	Overweight Microtia Endotoxemia Metabolic Syndrome Insulin Resistance Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	Dietary Supplement: Camu camu Dietary Supplement: Placebo
Recruiting	Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH)	Drug: Tropifexor Drug: Licogliflozin Other: Placebo
Completed	Bile Acid Malabsorption	Drug: Oral chenodeoxycholic acid stimulation
Active, not recruiting	NASH - Nonalcoholic Steatohepatitis	Drug: TERN-101 Other: Placebo
Completed	Diabetes Mellitus, Type II Fatty Liver	Drug: INT-747 Drug: Placebo
Recruiting	Obesity, Morbid	Device: AsspireAssist Other: Nutritional consulting
Completed	Hepatitis B, Chronic	Drug: EYP001 Drug: Entecavir 1 MG

Table 2: Essais cliniques terminés ou en cours impliquant FXRα

Issu de <https://clinicaltrials.gov>

(3,4-difluorobenzoyl)-1,1-diméthyl-1,2,3,6-tetrahydroazépinol[4,5-b]indol-5-carboxylat] est quant à lui un puissant agoniste sélectif ($EC_{50} = 4\text{nM}$) biodisponible par voie orale (Flatt et al. 2009).

L'acide 6 α -éthyl-chénodéoxycholic (6-ECDC), également connu sous le nom d'INT-747 ou d'acide obéticholique (OCA), une variante semi-synthétique du CDCA, affiche également un effet agoniste important avec un EC_{50} de 99nM. Ce composé montre une capacité d'activation de FXR α 100 fois supérieure au CDCA pour transcrire des gènes rapporteurs de type luciférase placés sous le contrôle d'un FXRE dans des lignées de cellules hépatiques (Pellicciari et al. 2002). En 2016, son utilisation a été validée chez des patients atteints de cholestase hépatique résistante à l'acide ursodéoxycolique (UDCA), un AB très faiblement présent chez l'homme utilisé dans le traitement des lithiases biliaires, ce qui justifie actuellement l'objet de son évaluation en essais cliniques, notamment dans le traitement de la Stéatose Hépatique Non-Alcoolique (NASH). D'autres activateurs sont ensuite apparus dont la fexaramine et la fexarine (EC_{50} 38 et 36 nM, respectivement) (Downes et al. 2003). Une étude comparative a notamment souligné les propriétés distinctes de la fexaramine, du GW-4064, et du CDCA pour activer des gènes cibles du récepteur FXR α dans les hépatocytes primaires humains. Les raisons possibles de ces activités différentielles pourraient s'expliquer par un positionnement et/ou une occupation différente de la poche de liaison du ligand, voire une régulation allostérique médiée par RXR α modifiant l'affinité de la liaison et/ou le recrutement de cofacteurs.

Un certain nombre d'autres composés a également montré une action agoniste pour FXR α avec des affinités variables, comme l'androstérone (S. Wang et al. 2006) ou des produits naturels exogènes tels que la forskoline (Howard et al. 2000), l'epigallocatechin-3-gallate (G. Li et al. 2012) et le cafestol (Ricketts et al. 2007).

Des essais cliniques évaluant les effets des agonistes de FXR α ont d'ores et déjà été menés dans divers désordres hépatiques (NASH, diabète...) tandis que d'autres sont actuellement en cours (**Table 2**).

3.1.2 Antagonistes de FXR α

Bien que les agonistes miment l'effet des ligands naturels et/ou stabilisent l'interaction de FXR α avec ses coactivateurs, les antagonistes déstabilisent le complexe récepteur-

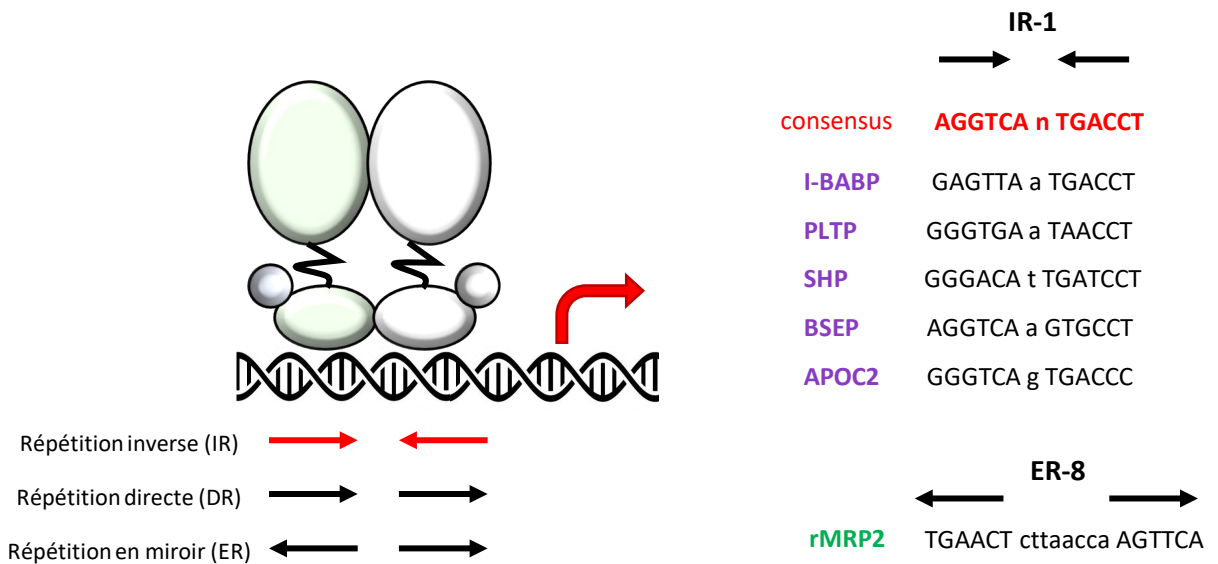


Figure 11 : Séquences spécifiques de fixation à l'ADN pour le récepteur FXRα (ou élément de réponse à FXR, FXRE)

La protéine FXRα se fixe majoritairement sur des FXRE de type IR-1 pour activer la transcription de ses gènes cibles. FXRα est aussi capable de lier un FXRE de type ER-8 chez le rat ainsi que plusieurs éléments de type DR *in vitro* bien qu'aucun gène cible ne soit encore décrit régulé par ce type d'élément de réponse.

coactivateurs (antagonistes actifs) ou stabilisent le complexe récepteur-corépresseurs (antagonistes passifs), entraînant un *silencing* génique. Les « antagonistes actifs » sont généralement plus exigeants au niveau stérique et plus volumineux que les agonistes. Leur liaison au RN empêche l'initiation de la transcription, en entravant stériquement la liaison des coactivateurs et de leur motif LXXLL à leur site de liaison sur le récepteur FXR α (Di Leva et coll., 2013).

Les études de relation structure-activité ont montré que les antagonistes de FXR α disponibles sont peu spécifiques et ne sont en réalité que des modulateurs sélectifs de son activité. Parmi eux, le plus connu est la guggulstérone, un principe actif extrait de la plante *Commiphora mukul*. Les études *in vitro* ont montré que ce composé déplace les coactivateurs et antagonise l'activité de FXR α mais il présente des activités agonistes ou antagonistes selon les gènes cibles (Urizar et al. 2002; Wu et al. 2002). Récemment, des antagonistes FXR α ont aussi été développés à partir de l'organisme marin *Theonella swinhoei* comme les theonellastéroïdes et les conicastéroïdes qui sont actuellement évalués dans des modèles précliniques de lésions hépatiques (Fiorucci, Zampella, et Distrutti 2012; Renga et al. 2012; De Marino et al. 2011).

Les effets indésirables observés en thérapeutique orientent actuellement les recherches dans le développement de ligands sélectifs, possédant de nouvelles propriétés de liaisons (site, affinité) adaptant la conformation de FXR α pour diriger sa capacité d'interaction avec ses co-régulateurs et modifier de façon sélective l'expression de ses gènes cibles (Diao et al. 2018; Merk et al. 2019).

3.2 ELEMENTS DE REPONSE A L'ADN (FXRE)

L'activation de FXR α par un ligand suit le modèle général proposé pour les membres de la famille des RN. Ce dernier se lie à des séquences ADN spécifiques nommées FXRE (FXR response element) sous la forme d'un monomère ou d'un hétérodimère avec RXR α (**Figure 11**). Le FXRE de type IR (inverse repeat) reste le plus fréquemment décrit avec une séquence palindromique consensus de type AGGTCA en répétition inversée séparée par un nucléotide (IR1) mais d'autres espacements (IR0 et IR2) sont également décrits pour lier FXR α *in vitro* (Ananthanarayanan et al. 2001; Chong et al. 2010; Grober et al. 1999; Song et al. 2001; Jiang Li et al. 2008). A ces séquences s'ajoutent aussi des FXRE de type DR (direct repeat) dans

lesquels les séquences hexanucléotidiques en répétition directe sont espacées de 2 à 5 nucléotides (DR2-5), puis des FXRE de type ER (everted repeat) correspondant à une répétition en miroir de la séquence TGAACT séparée par 8 nucléotides (Laffitte et al. 2000; Sun, Cai, et Gonzalez 2021) (Song et al. 2001).

Les progrès récents des techniques permettant d'étudier les interactions protéiques à l'échelle du génome (ChIP-seq) ont précisé les modalités d'action de FXR α dans la régulation de l'expression des gènes. Elles ont confirmé que la séquence de liaison consensuelle de FXR α est bien de type IR1. En complément, il a été démontré chez la souris que le statut métabolique pouvait aussi influencer sur la sélectivité de liaison de FXR α à ses éléments de réponse pour diriger l'expression d'un réseau de gènes cibles spécifiques probablement en fonction des complexes régulateurs présents. En ce sens, Lee et coll. ont montré qu'environ la moitié des sites de liaison pour le récepteur FXR α était différente dans les foies de souris contrôle en comparaison à des souris nourries avec un régime obésogène riche en graisses (*High Fat Diet*, HFD) ce qui semble indiquer que le répertoire de séquences de liaison de FXR α est modifié dans l'obésité pour adapter la réponse transcriptionnelle au statut métabolique (J. Lee et al. 2012). De surcroît, il n'existe que 11% des sites de liaisons de FXR α communs au foie et à l'intestin, suggérant qu'il y ait aussi une régulation spécifique de son activité et des réseaux de gènes ciblés selon les tissus et leurs activités métaboliques (Thomas et al. 2010). De même, les capacités transactivatrices et transrépressives de FXR α peuvent s'exprimer différemment selon le type tissulaire ou cellulaire.

3.3 ACTIVITES TRANSACTIVATRICES ET TRANSREPRESSIVES DE FXR α

3.3.1 Cofacteurs, régulateurs de l'activité transcriptionnelle de FXR α

A l'instar des autres RN permissifs, il apparaît que le récepteur FXR α puisse interagir en l'absence de son ligand avec les complexes corépresseurs SMRT/N-CoR afin de réprimer l'expression de ses gènes cibles (Lazar 2003). Plus d'une douzaine de cofacteurs transcriptionnels sont actuellement décrits comme modulateurs potentiels de la capacité de transactivation de FXR α . Généralement, les interactions de FXR α avec des coactivateurs tels que *BRM/SWI2-Related Gene 1* (BRG-1), p300, *Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1* (CARM1), *Protein Arginine Methyltransferase 1* (PRMT1), et *Activating Signal Cointegrator 2* (ASCOM), sont augmentées après traitement avec les agonistes de FXR α .

	Gène	Tissu	Régulation	Fonction
Métabolisme des acides biliaires	CYP7A1	foie	réprimé	Enzyme de synthèse de la voie classique des AB
	BSEP	foie	activé	Transport canaliculaire des AB dans la vésicule biliaire
	NTCP	foie	réprimé	Absorption basolatérale des AB par les hépatocytes
	OST α/β	intestin	activé	Sécrétion basolatérale des AB par les entérocytes dans la circulation portale
	I-BABP	intestin	activé	Transport intracellulaire des AB
	FGF15/19	intestin	activé	Inhibition de la synthèse d'AB
	SHP	foie	activé	Inhibition de la synthèse d'AB
Métabolisme du glucose	PEPCK	foie	activé	Néoglucogenèse
	FGF15/19	intestin	activé	Stimulation de la synthèse de glycogène et réprime la néoglucogenèse
	Insulin	pancréas	activé	Métabolisme du glucose
Métabolisme du cholestérol	ApoA1	foie	réprimé	Métabolisme des HDL
	LDLR	foie	réprimé	Absorption des LDL
	ABCG5/G8	foie	activé	Sécrétion de cholestérol
	SRB1	foie	activé	Absorption hépatique des HDL et sécrétion de cholestérol
	PCSK9	foie	réprimé	Favorise la dégradation du récepteur aux LDL
Métabolisme des acides gras	ApoC II	foie	activé	Activation de la Lipoprotéine lipase
	ApoC III	foie	réprimé	Inhibition de la Lipoprotéine lipase
	SREBP1	foie	réprimé	Lipogenèse

Table 3 : Gènes cibles du récepteur FXR α et fonctions associées.

Issu de Li et coll. 2012 J Lipids.

Les coactivateurs une fois recrutés peuvent diriger la modification post-traductionnelle des histones et induire le remodelage de la chromatine afin de réguler la transcription des gènes selon les modalités décrites ci-dessous (Kemper et al. 2009; Fang et al. 2008).

3.3.2 Transactivation

La majorité des études s'accorde pour dire que la transactivation simple est le mécanisme d'activation de la transcription le plus couramment employé par l'hétérodimère FXR α /RXR α pour coordonner la transcription de la plupart des gènes cibles de FXR α (**Table 3**). La transactivation simple représente la voie majoritaire par laquelle FXR α active la transcription de gènes cibles comme SHP, *Ileal Bile Acid-Binding Protein* (IBABP) ou *Bile Acid-CoA:Amino Acid N-Acyltransferase* (BAAT) (Goodwin et al. 2000; Grober et al. 1999; Pircher et al. 2003) (**Figure 12**). Lorsque l'hétérodimère formé avec RXR α se trouve sous forme inactive, il est lié à des cofacteurs corépresseurs sur ses éléments de réponse. Lors de la liaison du ligand, les complexes répresseurs sont libérés et des coactivateurs recrutés pour modifier la structure chromatinienne et autoriser l'accès aux facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase II au promoteur, activant ainsi la transcription du gène cible.

Néanmoins, d'autres modes de transactivation médiés par FXR α ont été décrits. Récemment, l'équipe de Chong et coll. a mis en évidence la présence d'autres demi-sites de RN à proximité des FXRE suggérant la possibilité d'un mode de transactivation composé et d'une régulation de FXR α par d'autres RN, comme LHR-1 dont le site de liaison a fréquemment été identifié à proximité des FXRE. De manière intéressante, ce type de module transcriptionnel est montré enrichi notamment dans les régions régulatrices de gènes dont les produits participent au métabolisme des lipides et des stéroïdes (Chong et al. 2010; 2012).

Bien que FXR α agisse principalement en hétérodimère avec RXR α , la transactivation monomérique a également été rapportée. En ce sens, une étude a mis en évidence que FXR α était capable de lier *in vitro* le promoteur de l'enzyme de détoxification *UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B4* (UGT2B4) et d'en activer sa transcription. En revanche l'ajout de RXR α semble capable d'inhiber la liaison de FXR α à son FXRE au sein de la région promotrice du gène de UGT2B4 et de prévenir son activation transcriptionnelle, probablement en formant des complexes inactifs compétitifs limitant l'activité de FXR α sous sa forme monomérique (Barbier et al. 2003). Une seconde étude a rapporté que le *Glucose*

Transactivation simple



Transactivation composée



Transactivation monomérique






A	FXR positive regulation	Target gene	Function in	Binding sequence	Scientific evidence				
					Reporter assay + EMSA exo. FXR	mRNA/protein levels with and without ligand	ChIP	WT-FXR ^{-/-} mRNA/protein	comparison ChIP-seq mouse liver/intestine
	IBABP	BA transport	IR-1; GGGTGAaTTACCT	●			●	●	
	FGF -19	BA biosynthesis	IR-1; AGTTCAgTGACCT	●	●		●	●	
	BSEP (ABCB11)	BA transport	IR-1; GGGACATGATCC	○	●	○	●	●	
	MDR3 (ABCB4)	Phospholipid transport	IR-1; ATGTCAaTAACCT	●	●		●	●	
	BAAT	BA conjugation	IR-1; AGGTCAaGTGCCT	●	●				
	OST α	BA transport	IR-1; OST α 1: GGGTGAaTGACCT OST α 2: AGCCCAgTGACCC	●	●			●	
	OST β	BA transport	IR-1; OST β : AGGTCAgTCACCC	●	●			●	
	SHP	BA biosynthesis + transport	IR-1; GAGTTAaTGACCT	●	●		●	●	
		About 71% of the IR-1 FXREs contained additional half sites, amongst others SHP	Unclear yet, multiple genes affected	IR-1: AGGTCAaTGACCT Coregulator half site: AGGTCA	●*		●	●	
		GLUT4	Glucose uptake	Monomeric; TGTCT	○	○			
		UGT2B4	BA detoxification	Monomeric; TGAACCT	○	●	○		
					●Experiments comparing FXR ^{-/-} and WT mice or in which synthetic FXR agonists were used. ○Experiments in which BA were used to activate FXR (but also have FXR-indirect effects). *Reporter assays only				

Figure 12 : Mécanismes de transactivation dépendant de FXR α .

La protéine FXR α est capable d'activer la transcription des gènes par trois mécanismes : la transactivation simple, transactivation composée et transactivation monomérique. Les gènes cibles régulés par FXR α sont détaillés selon leur fonction, la séquence de leur FXRE et la/les techniques qui ont permis de mettre en évidence le mécanisme de transactivation utilisé.

Adapté de Hollman et coll. 2012 Biochim Biophys Acta.

Transporter de type 4 (GLUT4) était activé par le monomère FXR α dans des cellules d'hépatocarcinome et les adipocytes. Ces travaux s'appuyant sur la technique de retardement sur gel (EMSA ou *electrophoretic mobility shift assay*) ont confirmé cette interaction fonctionnelle entre FXR α et le FXRE du gène de GLUT4 composé uniquement d'un demi-site indépendamment de la présence de RXR α et de sa fonction modulatrice (Shen et al. 2008).

3.3.3 Transrépression

Pour FXR α , la transrépression simple est documentée pour le gène de l'apolipoprotéine C3 (Apo-C3), acteur dans le contrôle du métabolisme des triglycérides ainsi que pour UGT2B7 impliqué dans la conjugaison des acides biliaires (AB) par l'acide glucuronique (Claudel et al. 2003; Yuan Lu et al. 2005) (**Figure 13**). Ce mécanisme implique une liaison du dimère sur un élément de réponse négative (nHRE) comme cela a été décrit pour le récepteur aux glucocorticoïdes GR. Bien qu'aucune séquence consensus n'ait été caractérisée, la liaison aux nHRE régule négativement la transcription *via* la liaison à des coactivateurs corépresseurs (Surjit et al. 2011; Dostert et Heinzl 2004).

FXR α a également été décrit pour réprimer la transcription des gènes par transrépression monomérique pour deux apolipoprotéines différentes. Ce phénomène a été observé pour l'inhibition de l'expression du gène de Apo-A1 par la liaison de FXR α en tant que monomère sur le second demi-site d'un FXRE de type DR1, en concurrençant le récepteur nucléaire HNF4 α (Chennamsetty et al. 2011). En outre, Claudel et coll. ont montré que FXR α régule négativement l'expression d'Apo-A1 en se liant à un FXRE négatif. En effet il apparaît que l'hétérodimère FXR α /RXR α possède une affinité moindre que FXR α seul en retard sur gel et l'utilisation d'un mutant hétérodimérique FXR α -L443R incapable d'interagir avec RXR α ne montre pas de différence quant à sa capacité à réprimer l'expression du gène d'Apo-A1 (Claudel et al. 2002). Ces résultats ont cependant été récemment remis en cause par les travaux de Gardes et coll., puisque l'expression du gène humain de l'Apo-A1 (hApo-A1) chez des souris génétiquement modifiées ainsi que l'abondance de la forme murine du gène Apo-A1 (mApo-A1) ne semblent pas diminuées par un traitement avec des agonistes de FXR α (Gardès et al. 2011).

La transrépression d'amarrage présente un mécanisme original qui a été décrit dans l'inflammation, où les facteurs de transcription pro-inflammatoires comme NF- κ B et AP-1

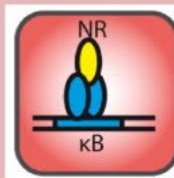
Transrépression simple




Transrépression monomérique



Transrépression d'amarrage



FXR transrepression	Target gene	Impact on	Binding sequence	Scientific evidence			
				Reporter assay + EMSA exo. FXR	mRNA/protein levels with and without ligand	ChIP	WT-FXR-/- mRNA/protein comparison
	UGT2B7	BA detoxification	ND; GATCCTTGATATTA	○	○		
	SULT2A1	BA detoxification	ND		●		●
	ApoCIII	TG metabolism	DR-1; TCCAGAgGGCAAA	●	●	○	●
	APOA	TG metabolism	Monomeric; CGCGCA	○		○	●
	Apo-AI	TG metabolism	ND; CATCCTTGAAGTCT	○	●		● ⁺
	NF-κB	Inflammatory response	Tethering of FXR to NF-κB?	●	●	●	●

●Experiments comparing FXR-/- and WT mice or in which synthetic FXR agonists were used.
○Experiments in which BA were used to activate FXR (but also have FXR-indirect effects).

Figure 13 : Mécanismes de transrépression dépendant de FXRα.

La protéine FXRα est capable de réprimer la transcription des gènes par trois mécanismes : la transrépression simple, transrépression monomérique et transrépression d'amarrage. Les gènes cibles régulés par FXRα sont détaillés selon leur fonction, la séquence de leur FXRE et la/les techniques qui ont permis de mettre en évidence le mécanisme de transrépression utilisé. *Adapté de Hollman et coll. 2012 Biochim Biophys Acta*

voient leurs activités transrégulatrices bloquées par les RN. Lors de l'amarrage d'un RN aux protéines NF- κ B et AP-1, le taux de transcription de leurs gènes cibles s'en trouve inhibé (De Bosscher, Vanden Berghe, et Haegeman 2003). Récemment, l'activation de FXR α a été démontrée pour diminuer la sévérité de l'inflammation dans l'intestin, le foie et le rein *in vivo*. En ce sens, Wang et coll. ont montré par une série d'analyses d'interaction protéine-ADN par retardement sur gel que l'interaction du facteur NF- κ B à son élément de réponse était réduite en présence du récepteur FXR α , tandis que Vavassori et coll. ont précisé le mode d'action de cette répression en apportant une démonstration mécanistique dans laquelle FXR α empêche le relargage du complexe de corépresseurs au niveau du promoteur ciblé par le facteur de transcription NF- κ B (Gadaleta et al. 2011; Vavassori et al. 2009; Y.-D. Wang et al. 2008).

En résumé le mode d'activation des RN comme FXR α , dépend de facteurs multiples, dont le type cellulaire, l'environnement des régions promotrices, le type de FXRE et l'état métabolique. Ces paramètres sont par ailleurs contrôlés par une multitude de cofacteurs, des modifications post-traductionnelles ainsi que par différents ligands.

3.4 MODULATION DE L'ACTIVITE DE FXR α

3.4.1 Régulation de l'expression de FXR α

FXR α joue un rôle important dans le métabolisme nutritionnel et énergétique en agissant comme un régulateur des taux plasmatiques de glucose, de lipides et d'acides biliaires (cf Rôles physiologiques médiés par FXR α , page 41) (**Table 3**). En retour, la concentration de ces molécules peut également participer au contrôle de l'expression de FXR α par des mécanismes de rétrocontrôle positifs et/ou négatifs afin de réguler le maintien de leur homéostasie respective.

Une étude menée par Duran-Sandoval en 2004, a montré que l'expression de FXR α était diminuée dans les foies de rat rendus diabétiques par injection de streptozotocine et que cette modification des taux de FXR α causée par un déséquilibre de l'homéostasie du glucose était normalisée par une supplémentation en insuline (Duran-Sandoval et al. 2004). En complément, la hausse des transcrits de FXR α dans les hépatocytes primaires de rat maintenus en culture en présence de glucose puis, la prévention de cet effet par l'insuline a permis de proposer que la régulation des métabolismes (lipides, acides biliaires) par FXR α ainsi

que l'expression de ce récepteur puissent être altérées chez les patients atteints de diabète ou de résistance à l'insuline. Depuis, ce lien s'est renforcé sur la base d'autres travaux ayant montré que l'activation de FXR α permettait d'améliorer l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie chez des souris modèles de diabète (db/db) (Yanqiao Zhang et al. 2006). Enfin, la préparation de modèles animaux par modification de régime a aussi étayé cette relation puisque l'administration d'un régime riche en lipides et en cholestérol chez le rat tout comme l'utilisation d'un régime obésogène altèrent les taux d'expression de FXR α au niveau hépatique (Côté et al. 2013; Ghoneim et al. 2015).

Même si les mécanismes de cette régulation ne sont pas encore totalement définis, certains acteurs semblent incriminés dans la mise en place de ces mécanismes de rétrocontrôles. Le facteur de transcription *Hepatocyte Nuclear Factor 1-alpha* (HNF1 α) par exemple semble un candidat pertinent puisque : 1- le promoteur de FXR α contient un site de liaison à l'ADN pour HNF1 α , 2- son inactivation chez la souris mène à une augmentation de l'abondance de FXR α au niveau hépatique, puis 3- la capacité de HNF1 α à contrôler l'expression de FXR α dans le foie semble conservée dans l'intestin (Shih et al. 2001; Purushotham et al. 2012). Le facteur HNF4 α qui appartient aussi à la famille des protéines HNF semble également participer à la régulation de l'expression du récepteur FXR α . D'abord connu comme cible de celui-ci, HNF4 α est capable d'induire l'expression de FXR α dans les cellules de foie chez la souris au sein d'un complexe chromatinien contenant le récepteur PPAR γ et le cofacteur PGC1 α (Yanqiao Zhang et al. 2004). D'autres RN comme le récepteur GR sont également proposés comme régulateur de l'expression du gène de FXR α . En interagissant avec FXR α , le récepteur GR permet de diminuer son activité transcriptionnelle en recrutant le complexe de corépresseurs *C-terminal Binding Protein* (CtBP) dans un modèle de souris cholestatiques (Yan Lu et al. 2012). Enfin la diminution du niveau de FXR α dans le foie des souris ayant développé une inflammation aigüe en réponse à une injection de lipopolysaccharide (LPS) interroge sur la capacité des facteurs de la signalisation pro-inflammatoire à contrôler l'expression de FXR α qui semble également perturbé dans sa capacité à lier ses éléments de réponse (M. S. Kim et al. 2003). L'inhibition de la signalisation par FXR α après activation du facteur pro-inflammatoire NF κ -B à la fois *in vitro* et *in vivo* renforce la possibilité que ce facteur puisse exercer un rétrocontrôle négatif sur la régulation de l'expression du récepteur FXR α bien que les preuves expérimentales d'une action directe de NF κ -B au niveau de la région promotrice du gène de FXR α restent limitées

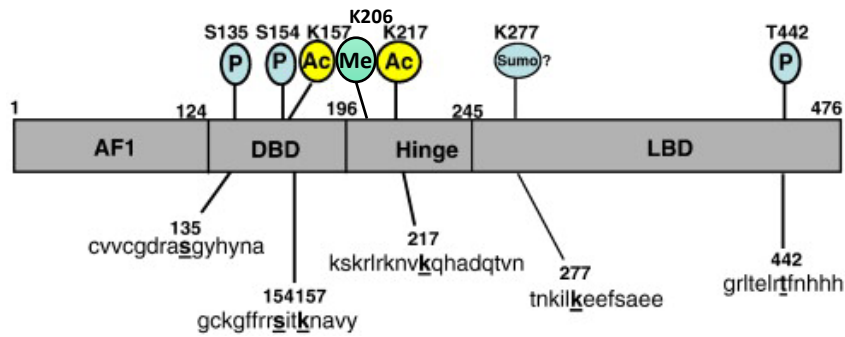


Figure 14 : Modifications post-traductionnelles de la protéine FXRα.

La protéine FXRα possède trois sites de phosphorylation dont deux dans le DBD et un dans le LBD (sérine135, sérine154 et thréonine442). Deux sites d'acétylation des lysines ont été décrits, un dans le DBD et un dans la partie charnière (lysine157 et lysine217), entre lesquels est situé un site de méthylation (lysine206). Un site de SUMOylation est suggéré dans le domaine LBD. *AF1, Activating Function ; DBD, DNA binding domain ; Hinge, domaine charnière ; LBD, Ligand Binding Domain*

Adapté de Kemper et coll. 2011 Biochim Biophys Acta.

(Y.-D. Wang et al. 2008). La recherche de motifs de fixation à l'ADN au sein des régions promotrices du gène *NR1H4* devrait contribuer à élargir le nombre de facteurs de transcription pouvant contrôler les taux de FXR α en intégrant des acteurs comme la protéine CDX2 qui par son activité participe à la différenciation et au maintien des épithéliums dans l'intestin (Modica et al. 2014).

3.4.2 Modifications post-traductionnelles (TPM) de FXR α

Actuellement le monde scientifique fait de nombreuses avancées dans la compréhension de la biologie de FXR α , notamment dans les mécanismes moléculaires employés pour réguler l'expression de ses gènes cibles et dans la régulation de son activité transcriptionnelle.

Les travaux menés au cours des dernières années ont montré que les récepteurs nucléaires agissent comme des régulateurs de la transcription pour réguler des programmes génétiques spécifiques selon l'environnement et les stimulations auxquels sont exposées les cellules de l'organisme. Dans ce contexte, plusieurs études ont renseigné la participation de FXR α à la régulation des métabolismes (acides biliaires, glucides, lipides) et de l'inflammation avec des interrogations concernant les mécanismes dirigeant la spécificité de sa fixation à l'ADN, puis sa capacité à interagir avec ses cofacteurs pour modifier de façon spécifique des réseaux de régulation génétique. Certains de ces cofacteurs interviennent pour moduler de façon spatio-temporelle l'expression de gènes en modifiant de façon post-traductionnelle non seulement les protéines histones de la chromatine mais aussi les RN et leurs protéines corégulatrices. Différentes études ont en effet montré que des Modifications Post-Traductionnelles (TPM) comme l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation, l'ubiquitylation et la méthylation pouvaient influencer sur l'activité de FXR α en modifiant sa localisation, sa stabilité ainsi que sa capacité à lier l'ADN, puis à interagir avec ses protéines partenaires (**Figure 14**).

Les travaux de Gineste et coll. ont identifié, deux sites de phosphorylation au niveau du DBD de FXR α , ciblés par la protéine kinase C. Cette modification par phosphorylation des sérines en position 135 et 154 renforce l'interaction du cofacteur PGC1 α avec le récepteur FXR α pour augmenter son pouvoir transactivateur dans les cellules HepG2 (Gineste et al. 2008). Toutefois, il apparaît également que la phosphorylation du résidu Ser154 puisse favoriser l'attachement de molécules d'ubiquitine afin d'accélérer la dégradation du récepteur FXR α par le protéasome (Hashiguchi et al. 2016). Les résidus lysines ciblés par l'ubiquitylation ne

sont pas identifiés à ce jour mais l'inhibition du protéasome par le composé organique MG132 stabilise le récepteur FXR α qui s'accumule fortement sous sa forme ubiquitinylée dans les cellules HepG2 (Kemper et al. 2009). A l'inverse, l'acétylation des résidus lysines 157 et 217 par la protéine acétyltransférase p300 semble stabiliser FXR α puisque la mutation de ces résidus lysine (K) en arginine (R) réduit le temps de demi-vie du récepteur. Bien que l'acétylation de ces résidus au niveau du DBD (K157) et de la région charnière (K217) stabilise le récepteur, ces modifications bloquent sa capacité à activer la transcription en inhibant sa capacité à former un hétérodimère avec RXR α , puis à se lier au niveau de ses éléments de réponse. La liaison d'un ligand au récepteur FXR α renforce l'interaction avec la protéine p300 pour contrôler de façon dynamique son état d'acétylation tout en prévenant sa désacétylation par la protéine SIRT1 (Kemper et al. 2009). Enfin, la méthylation de la lysine 206 par la protéine méthyltransférase SET7/09 complète les modifications post-traductionnelles décrites à ce jour au niveau de la région charnière pour accroître la capacité de FXR α à réguler l'expression de ses gènes cibles (Balasubramanian, Ananthanarayanan, et Suchy 2012).

Plusieurs résidus du domaine de liaison du ligand (LBD) et de la région carboxy-terminale de FXR α semblent aussi moduler la fonction du récepteur après modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de la thréonine 442 (T442) par la kinase PKC zéta favorise sa translocation vers le noyau et augmente sa capacité transactivatrice (Frankenberg et al. 2008) alors que la phosphorylation de la Sérine 250 (S250) par l'AMPK réduit la capacité de FXR α à activer la transcription génique (Lien et al. 2014). Enfin, les travaux de Ploton et coll. décrivent deux sites supplémentaires de phosphorylation au niveau des Sérine 325 et 357 par la kinase PKA qui confèrent une capacité plus importante à FXR α pour activer la transcription génique à partir d'un élément de réponse FXRE de type IR-1 (Ploton et al. 2018).

Enfin, l'attachement de la protéine SUMO1 aux résidus lysines (K) 122 et 275 des domaines AF1 et LBD du récepteur réduit fortement sa présence au niveau des promoteurs cibles suggérant que la sumoylation puisse éteindre l'activité transcriptionnelle de FXR α en réduisant son recrutement au niveau des FXRE (Balasubramanian et al. 2013). Or, les travaux de Kim et coll. montrent que la sumoylation pourrait plutôt jouer un rôle d'aiguillage dans l'activation d'un répertoire de gènes cibles spécifiques de FXR α pour limiter la réponse inflammatoire induite par le facteur NF- κ B. Cette inhibition par transrépression d'amarrage est néanmoins bloquée lorsque FXR α est modifié par acétylation sur sa lysine 217 ce qui met

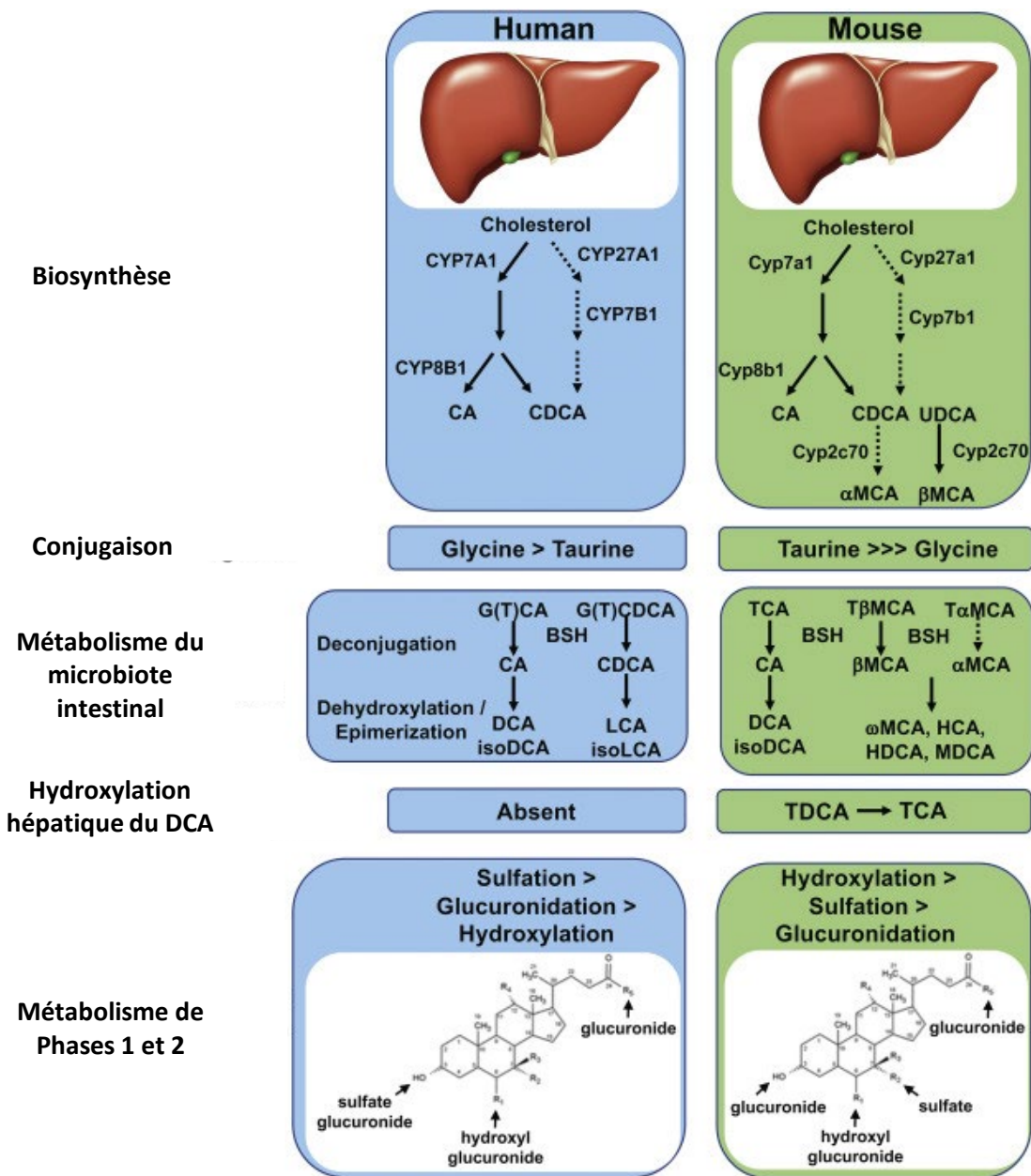


Figure 15 : Voies de synthèse et de biotransformation des acides biliaires

Les acides biliaires sont synthétisés selon deux voies à partir du cholestérol. Sous l'action de plusieurs enzymes de la famille des cytochromes P450, le cholestérol est transformé en acide cholique (CA) et en acide chénodésoxycholique (CDCA). Chez la souris, le CDCA est transformé en acide muricholique α et β (MCA). Ces AB primaires sont ensuite conjugués à la taurine ou à la glycine avant d'être sécrétés dans l'intestin où ils seront déconjugués par les bactéries du microbiote pour devenir des AB secondaires. Chez l'Homme ils sont représentés par l'acide lithocholique (LCA) et l'acide désoxycholique (DCA) tandis que chez la souris, les acides biliaires primaires sont transformés en acide muricholique ω, acide muridésoxycholique (MDCA), acide hydodésoxycholique (HDCA) et en acide hycholique (HCA). Les AB sont ensuite majoritairement réabsorbés dans la circulation portale pour regagner le foie où ils seront recyclés en AB primaires. *Adapté de Li et coll. 2019. Biochim Biophys Acta.*

en lumière une interaction fonctionnelle entre l'acétylation et la sumoylation dans le contrôle de l'expression des gènes pro-inflammatoires par FXR α avec des conséquences sur la fonction hépatique dans les maladies métaboliques comme l'obésité (Kim et al. 2015). En prolongement de ce travail, il apparaît que ce mécanisme de transrépression de FXR α s'applique également à la modulation de l'inflammation au niveau de l'intestin puisque la mutation de la lysine 277 ne permet plus à FXR α de réprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires après activation par son ligand agoniste INT-747. La sumoylation de FXR α semble montrer un effet protecteur dans un modèle de colite expérimentale chez la souris. Ainsi l'ensemble de ces observations a justifié l'intérêt de cibler les acteurs de ces modifications post-traductionnelles afin d'augmenter l'activité de FXR α en réponse à des agonistes comme l'acide obéticholique (OCA, INT-747) pour le traitement de l'inflammation induite par des lésions hépatiques et/ou des troubles métaboliques (Jiyu Zhou et al. 2020).

4 ROLES PHYSIOLOGIQUES MEDIÉS PAR FXR α

4.1 FXR α , ACTEUR DE LA REGULATION DES ACIDES BILIAIRES ET DU CYCLE ENTEROHEPATIQUE

4.1.1 Synthèse des acides biliaires

4.1.1.1 Acides biliaires : Généralités

Les acides biliaires (AB) sont des molécules amphipathiques qui permettent la digestion des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles dans l'intestin. Ils sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol puis stockés dans la vésicule biliaire avant d'être excrétés dans le lumen intestinal où ils émulsionneront les graisses (**Figure 15**). Chez l'homme, la majorité de la synthèse des AB dans les hépatocytes s'effectue par une voie classique initiée par l'enzyme cytochrome P450 7A1 (CYP7A1), facteur limitant de la synthèse. Cette voie classique majeure (neutre) forme les principaux AB appelés acide cholique (CA) et acide chénodéoxycholique (CDCA) à la suite d'un processus enzymatique à plusieurs étapes impliquant les cytochromes P450 CYP8B1 et CYP27A1. En complément, le cytochrome P450 CYP27A1 initie une voie alternative (acide) de synthèse des AB par hydroxylation et oxydation du cholestérol qui est ensuite hydroxylé en CDCA par l'enzyme CYP7B1. Peu après leur synthèse, les AB sont conjugués aux acides aminés glycine ou taurine pour former des sels de sodium (sels biliaires),

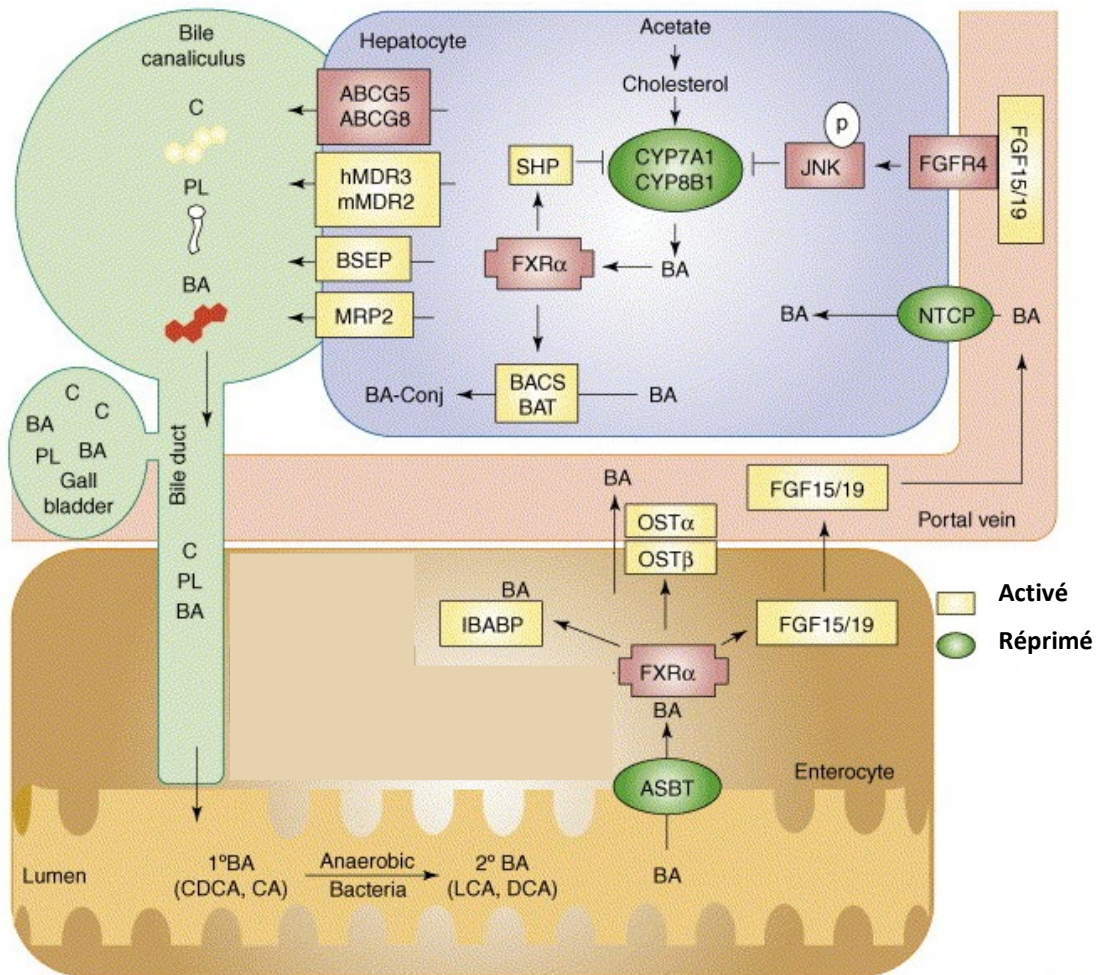


Figure 16 : Régulation du cycle entéro-hépatique des AB par FXRα.

Les acides biliaires sont synthétisés dans les hépatocytes, conjugués avec les acides aminés taurine ou glycine par les enzymes BAAT et BACS, puis excrétés par les transporteurs BSEP et MRP2 avant d'être stockés dans la vésicule biliaire. Lors d'un repas, les AB sont déversés dans l'intestine pour émulsionner les lipides alimentaires. Environ 95% des AB sont réabsorbés au niveau des entérocytes par les transporteurs ASBT. Dans les entérocytes, l'activation de FXRα par les AB induit l'expression de la protéine de liaison I-BABP et des transporteurs d'efflux OSTα et β pour libérer les AB dans la circulation portale. De retour au foie via les transporteurs membranaires NTCP, les AB stimulent FXRα pour inhiber l'expression des enzymes CYP7A1 et CYP8B1 et freiner leur synthèse via le récepteur nucléaire SHP. En parallèle, l'activation de FXRα dans l'intestin, active l'expression et la sécrétion du facteur FGF15/19 dans la veine porte qui en se fixant à son récepteur hépatique FGFR4 inhibe par un rétrocontrôle supplémentaire l'expression des enzymes CYP7A1 et CYP8B1 via la signalisation dépendante de la protéine kinase JNK . *Issu de Lee et coll. 2006 Trends Biochem Sci*

par l'action respective des enzymes *Bile Acid-CoA Synthase* (BACS) et *Bile Acid N-amine Acetyltransferase* (BAAT) (Solaas et al. 2000). Ces derniers seront ensuite dirigés vers la vésicule biliaire avant d'être libérés dans le tractus intestinal où des transformations microbiennes au sein de l'intestin convertiront les AB primaires CA et CDCA en AB secondaires correspondants, l'acide déoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA). La plupart des acides biliaires, y compris l'acide α -muricholique (α MCA) et l'acide β -muricholique (β MCA) dérivés du CDCA chez la souris, seront par la suite réabsorbés dans l'iléon et ramenés au foie par la veine porte.

Chez l'homme, le pool d'AB se compose d'environ 40% de CA, 40% de CDCA et 20% DCA. Chez la souris, la majorité des CDCA sont convertis en acide α -muricholique (MCA) et β -MCA, par conséquent, le CA et α / β -MCA sont les principaux acides biliaires primaires dans le pool d'AB de souris. Chez l'homme, l'UDCA, un acide biliaire secondaire et les MCA ne sont généralement pas détectés. Chez la souris, le pool d'acide biliaire hautement hydrophile se compose d'environ 50 % de CA et de 50 % de CA et de β -MCA. La voie alternative peut être responsable de la synthèse d'environ 50% des acides biliaires chez les rongeurs (Jianing Li et Dawson 2019).

4.1.1.2 Régulation des voies de synthèse des AB par FXR α

Les données cumulées au cours des dernières années ont montré que les acides biliaires synthétisés au niveau hépatique activent le récepteur nucléaire FXR α afin de mettre en place plusieurs boucles de rétrocontrôle pour réguler leur biosynthèse (Makishima et al. 1999; Parks et al. 1999; H. Wang et al. 1999) (**Figure 16**). La répression transcriptionnelle du gène de synthèse *CYP7A1* après activation du récepteur FXR α par les acides biliaires a permis de mettre en évidence le rôle du récepteur nucléaire SHP (Small Heterodimer Partner) dans l'inhibition du facteur LRH-1 (Liver Receptor Homolog) pour mener à l'extinction du gène de *CYP7A1* et freiner la synthèse des acides biliaires (Goodwin et al. 2000; T. T. Lu et al. 2000). La capacité de FXR α à contrôler de façon positive l'expression des gènes codant pour les enzymes BACS et BAAT a également éclairé les mécanismes par lesquels ce récepteur pouvait limiter la toxicité des acides biliaires en augmentant leur caractère hydrophile et leur solubilité par conjugaison avec les acides aminés glycine et taurine (Falany et al. 1994; Pircher et al. 2003).

L'analyse phénotypique des souris invalidées pour le gène de *Fxrα* (*Fxrα*^{-/-}) a montré que ces souris bien que phénotypiquement normales présentaient une élévation des concentrations sériques d'acides biliaires après administration d'un régime enrichi en acide cholique avec un défaut de la répression du gène de synthèse *Cyp7a1* (Kok et al. 2003; Sinal et al. 2000). Ainsi, la chute d'expression du gène de *Shp* dans le foie de ces animaux ne permet plus à *Fxrα* de freiner la voie de biosynthèse classique des AB en diminuant l'expression des gènes de *Cyp7a1* et de *Cyp8b1* qui restent élevée malgré la forte accumulation d'acides biliaires chez ces animaux. Cette dérégulation du facteur SHP mène à une levée de la répression sur les gènes de *Lrh-1* et de *Hnf4a* et au maintien de leur capacité à lier les régions promotrices des gènes de *Cyp7a1* et de *Cyp8b1* pour activer leur transcription avec une boucle de rétroaction inhibitrice supplémentaire sur *Shp* (del Castillo-Olivares et al. 2004; Goodwin et al. 2000). En complément, l'activation de *FXRα* dans l'intestin stimule l'expression et la sécrétion du facteur de croissance des fibroblastes 19 (FGF19, FGF15 dans les modèles de rongeurs) qui se lie aux complexes de récepteurs *FGFR4/β-Klotho* sur la membrane cellulaire des hépatocytes après leur trafic dans la circulation entéro-hépatique (Holt et al. 2003; Kong et al. 2012; Song et al. 2001). Cette voie de signalisation fonctionnelle entre l'intestin et le foie participe à son tour à l'inhibition de l'expression des produits géniques de *CYP7A1* et *CYP8B1* par l'activation de voies de signalisation intracellulaire mobilisant les protéines kinases Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2) et c-Jun N-terminal protein Kinase ½ (JNK1/2). Enfin, l'utilisation de souris modèles porteuses d'une mutation perte de fonction spécifique de *Fxrα* au niveau du foie ou de l'iléon a montré que cette signalisation entre l'intestin et le foie exerçait une rétroaction négative dominante par rapport à celle mise en place au niveau hépatique (Inagaki et al. 2005; I. Kim, Ahn, et al. 2007).

4.1.2 Réabsorption des acides biliaires : Cycle entéro-hépatique

4.1.2.1 Cycle entéro-hépatique

Après conjugaison avec la glycine ou la taurine, les acides biliaires sont sécrétés dans la bile, puis stockés dans la vésicule biliaire. Lors d'une prise alimentaire, les acides biliaires se retrouvent dans la lumière duodénale où ils participent à la digestion et à l'absorption des graisses alimentaires. Plus de 95% des acides biliaires déversés dans l'intestin sont réabsorbés grâce à des mécanismes de diffusion passive ainsi que de transport facilité ou actif. Sous forme

liée à l'albumine, ces molécules amphipatiques regagnent le foie par la voie portale avant d'être sécrétées de nouveau dans la bile. Ce cycle entéro-hépatique intervient six à dix fois par jour chez l'homme sain et requiert le maintien d'une synthèse hépatique d'acides biliaires pour compenser les pertes fécales. La conservation du pool d'acides biliaires dans la circulation entéro-hépatique dépend donc de l'efficacité de leur réabsorption ainsi que de leur libération dans la lumière intestinale lors de la digestion.

Dans la circulation entéro-hépatique, environ 95 % des acides biliaires sont réabsorbés par transport actif dans les entérocytes iléaux et recyclés vers le foie par la veine porte pour être à nouveau sécrétés dans le système biliaire et la vésicule biliaire. Dans chaque cycle entéro-hépatique, les hépatocytes doivent synthétiser des AB *de novo* par un processus étroitement régulé pour remplacer ceux qui sont éliminés dans les fèces après s'être échappés de l'iléon. En plus des caractéristiques physicochimiques bien décrites de ces détergents naturels dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol, de l'excrétion biliaire de composés hydrophobes et de l'absorption intestinale des graisses, il apparaît clairement que des concentrations élevées ou anormales d'AB peuvent devenir cytotoxiques pour les cellules. En régulant l'expression génique des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*) et d'enzymes du métabolisme au sein d'hétérodimères permissifs contenant le récepteur RXR α , FXR α joue donc un rôle important dans la régulation du métabolisme et de la détoxification des AB en induisant l'expression des gènes impliqués dans leur conjugaison et leur transport afin d'améliorer leur élimination.

4.1.2.2 Régulation de l'absorption par FXR α

Après leur synthèse, les AB sont sécrétés dans la bile, qui s'écoule par le canal biliaire vers l'intestin où leur réabsorption au niveau de l'iléon permettra leur retour vers le foie avant d'être à nouveau sécrétés dans la bile et la vésicule biliaire (**Figure 16**). Dans cette circulation entre le foie et l'intestin, les AB peuvent favoriser leur propre élimination biliaire en stimulant l'expression de la pompe apicale d'efflux des sels biliaires *Bile Salt Export Pump* (BSEP ; ABCB11) et de la protéine de transport *Multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2 ; ABCC2). Ces deux transporteurs de la famille *ATP Binding Cassette* (ABC) limitent le taux d'excrétion canaliculaire des AB et des ions organiques. Chez l'homme et le rongeur, la transcription à partir du promoteur du gène BSEP est activée par FXR α (Ananthanarayanan et al. 2001; Plass et al. 2002) et l'expression de BSEP dépend largement de la présence de ce

récepteur activable par les AB puisque son abondance est réduite chez les souris invalidées pour le gène codant $Fxr\alpha$ (Sinal et al. 2000; Wagner et al. 2003; Zollner et al. 2003). Contrairement au transporteur BSEP, la régulation transcriptionnelle de MRP2 implique plusieurs ensembles de RN qui se chevauchent, reflétant le spectre de substrat diversifié de MRP2. En fait, MRP2 peut contrôler l'excrétion d'une large gamme d'AB conjugués et d'anions organiques, principalement avec le glucuronidate et le sulfate formés par les enzymes de conjugaison de phase II dans les hépatocytes (Keppler et König 2000). En plus de se lier avec une haute affinité aux éléments de réponse dans les promoteurs MRP2 de l'homme et du rongeur (Heidi R. Kast et al. 2002), il apparaît que $FXR\alpha$ augmente aussi l'expression de la protéine *Multidrug Resistance protein 3* (MDR3 ; ABCB4), qui secrète les phospholipides dans les canalicules biliaires, favorisant ainsi la formation de micelles mixtes et diminuant la toxicité des AB (L. Huang et al. 2003). Alors que les AB sont excrétés dans la bile canaliculaire dans des conditions normales, la plupart des AB conjugués sont activement réabsorbés dans l'iléon par un transporteur de sels biliaires dépendant du *sodium Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter* (ASBT ; SLC10A2) situé sur le côté apical des entérocytes. Dans l'intestin grêle, $FXR\alpha$ augmente l'expression du transporteur ASBT, qui est important pour la réabsorption des AB au niveau de la lumière intestinale, ainsi que l'abondance des protéines *Ileal Bile Acid Binding-Protein* (IBABP) et *Organic Solute Transporter α/β* (OST α/β), qui sont toutes les deux importantes pour le transport transcellulaire des AB (Calkin et Tontonoz 2012; Neimark et al. 2004; Zollner et al. 2006). Les AB absorbés sont ensuite ramenés dans le sang portal par le transporteur d'acides biliaires dépendant du sodium NTCP (SLC10A1) et une famille de transporteurs d'anions organiques multi-spécifiques de la famille OATP (SLC21A), qui dirigent l'absorption des AB conjugués ou non, ainsi que de la bilirubine dans le foie (Suchy et Ananthanarayanan 2006; Trauner et Boyer 2003). La régulation du transporteur NTCP par les AB est complexe et diffère considérablement entre les humains et les rongeurs (Jung et al. 2004). L'inhibition par rétroaction négative de l'activité de la protéines NTCP chez les rongeurs (souris, rat) repose sur des mécanismes dépendants et indépendants de $Fxr\alpha$ /Shp et limite l'absorption hépatocellulaire des AB (Zollner et al. 2002). Comme pour la protéine NTCP, $Fxr\alpha$ réprime aussi le transporteur *Oatp1b1* par l'intermédiaire de Shp et de $Hnf4\alpha$, puis inhibe le système prédominant d'absorption des AB indépendant du sodium chez l'homme (Zollner et al. 2003). En revanche, *Oatp1b3*, un système de captation multi-spécifique pour les anions organiques, les xénobiotiques et potentiellement les AB, est positivement transactivé par $Fxr\alpha$

(Jung et al. 2002). Un autre efflux de faible niveau de AB dans le sang systémique à travers la membrane sinusoidale a également lieu et est médié par plusieurs transporteurs, y compris Osta/ β , Mrp/Abcc3 et Mrp4/Abcc4 (Ballatori et al. 2005; Zelcer et al. 2006).

4.1.3 Biotransformation et élimination des acides biliaires

Peu après leur synthèse, les AB sont conjugués aux acides aminés glycine et taurine pour augmenter leur solubilité dans l'eau et réduire leur cytotoxicité (Falany et al. 1994). Au fil des années, FXR α a été démontré non seulement comme un régulateur essentiel des enzymes BACS et BAAT de conjugaison des AB (Pircher et al. 2003; Solaas et al. 2000), mais aussi comme un facteur important des processus de détoxification des AB puisque l'activation de FXR α par les AB mène à l'augmentation de l'expression du cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) pour stimuler les réactions d'hydroxylation de phase I (Handschin et Meyer 2003). Le récepteur FXR α est également impliqué dans la régulation des enzymes de phase II, notamment les UDP-glucuronosyltransférases (UGT), les sulfotransférases (SULT) et les glutathion-S-transférases (GST) (Xu, Li, et Kong 2005; J. Zhou, Zhang, et Xie 2005) ce qui favorise la conjugaison de groupements hydrophiles afin d'augmenter davantage l'hydrophilie des AB. Chez l'homme, la régulation positive de l'expression du gène de la sulfatase SULT2A1 par FXR α semble jouer un rôle central dans la régulation de la sulfatation des AB et leur export par la pompe basolatérale MRP4 (Wagner et al. 2003; Assem et al. 2004; Makishima 2005). Outre leur sulfatation, les AB peuvent également être détoxifiés par glucuronidation dépendante des UDP-glucuronosyltransférases UGT2B4, UGT2B7 et UGT1A3, afin d'augmenter leur solubilité et faciliter leur élimination rénale (Barbier et al. 2003; Yuan Lu et al. 2005; Trottier et al. 2006). Enfin, les AB peuvent moduler l'expression de l'UGT2B4 et de l'UGT2B7 par l'intermédiaire de FXR α (Barbier et al. 2003; Yuan Lu et al. 2005; Sugatani et al. 2005) et il devient maintenant évident que la défaillance de FXR α à diriger l'élimination biliaire et rénale des AB conjugués et/ou de leurs métabolites potentiellement toxiques en dehors de l'organisme peut mener au développement de certains états pathologiques.

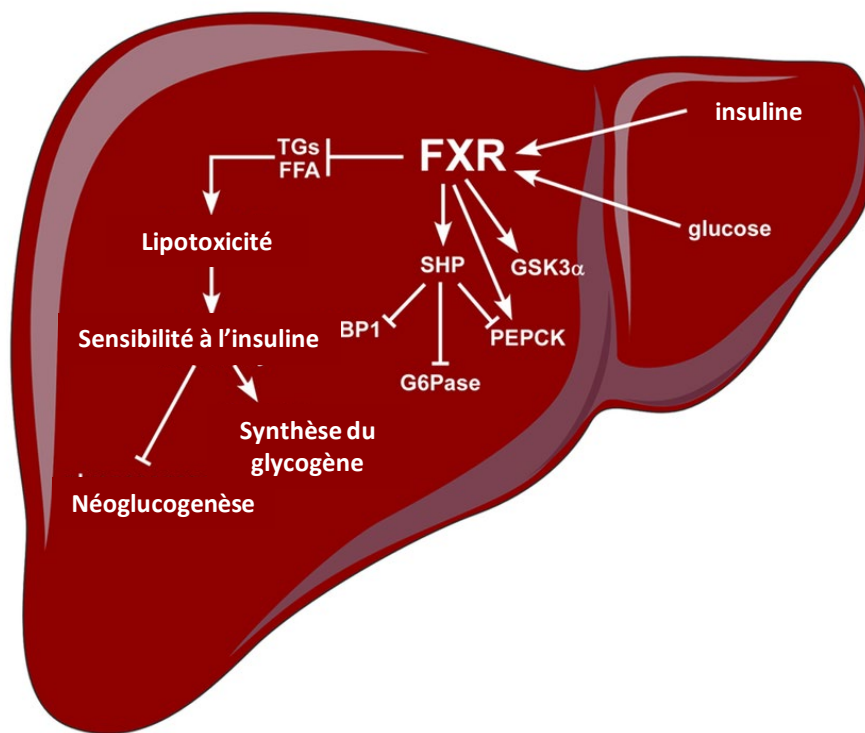


Figure 17 : Régulation du métabolisme du glucose par FXR α .

En réponse à une hausse de la glycémie et de la sécrétion d'insuline, le récepteur FXR α active l'expression des enzymes GSK α pour stimuler la synthèse de glycogène hépatique et réprimer les enzymes de la néoglucogenèse BP1, G6Pase et PEPCK via la protéine SHP. En complément, FXR α réduit les taux de triglycérides et d'acides gras dont les taux trop élevés entraînent une lipotoxicité et une perte de sensibilité à l'insuline. En limitant ces phénomènes, FXR α augmente la synthèse de glycogène et réduit la néoglucogenèse hépatique. *Adapté de Modica et coll. 2010 Nucl Recept Signal.*

4.2 FXR α ET HOMEOSTASIE DU GLUCOSE

4.2.1 Métabolisme du glucose

Le glucose se situe au carrefour de différentes voies métaboliques. Lors d'une prise alimentaire augmentant les concentrations plasmatiques de glucose, l'organisme peut stocker les excédents sous forme de glycogène dans le foie avec la possibilité de le mobiliser à nouveau de façon rapide. L'insuline sécrétée par les cellules β du pancréas agit en parallèle de ce processus au niveau du foie et des tissus périphériques (muscles squelettiques, tissu adipeux) pour activer les voies enzymatiques de la lipogenèse qui utilisent le glucose sanguin pour alimenter la synthèse de triglycérides qui seront déposés en réserve dans les adipocytes. Deux acteurs clés de cette voie de la lipogenèse sont les facteurs *Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1* (SREBP1C) et *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (ChREBP) qui active la transcription des gènes des enzymes de la lipogenèse *Fatty Acid Synthase* (FAS), *Acetyl-CoA Carboxylase* (ACC) et *Stearoyl-CoA Desaturase 1* (SCD1) en réponse à l'augmentation des concentrations de glucose.

A l'inverse, l'augmentation des besoins de l'organisme en glucose provoque la dégradation du glycogène par glycogénolyse en complément de la néoglucogenèse hépatique qui engage des substrats non glucidiques comme le pyruvate, le lactate et le glycérol, dans une cascade de transformations qui mobilise les enzymes *Phosphoenol-Pyruvate Carboxykinase* (PEPCK), *Fructose 1,6-Bis Phosphatase* (FBP1) et *Glucose-6-Phosphatase* (G6Pase). Ces processus concourent au maintien de l'homéostasie glucidique tout en rendant le glucose disponible pour les cellules qui utilisent les transporteurs de la famille GLUT pour lui permettre de passer la membrane plasmique.

4.2.2 FXR α et métabolisme glucidique

L'activation du récepteur FXR α par les acides biliaires participe notamment à cette régulation du métabolisme glucidique en améliorant la sensibilité à l'insuline et en réprimant la néoglucogenèse hépatique (**Figure 17**). Cette capacité du récepteur FXR α à augmenter la sensibilité à l'insuline concerne aussi les tissus périphériques comme le muscle squelettique et le tissu adipeux pour réguler la lipogenèse et adapter les niveaux de triglycérides et d'acides gras libres (Ma et al. 2006). La caractérisation initiale d'une résistance à l'insuline chez les souris invalidées pour Fxr α (Fxr α -/-) a établi ce lien au niveau du foie pour poser le récepteur

Fxr α comme un régulateur du métabolisme du glucose et du maintien de son homéostasie (Cariou et al., 2006; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). En accord avec cette observation, le traitement de souris diabétiques (db/db) et insulino-résistantes (ob/ob) avec l'acide cholique ou l'agoniste synthétique GW4064 améliore la sensibilité à l'insuline chez ces animaux et réduit les niveaux de glucose plasmatique (Cariou et al., 2006 ; Ma et al. 2006 ; Zhang et al., 2006). En complément, l'activation du gène de l'aldo-cétoréductase *Akr1b7* par le récepteur Fxr α pourrait également concourir à réguler la glycémie puisque la surexpression hépatique de *Akr1b7* améliore la glycémie chez les souris diabétiques db/db (Ge et al. 2012). Ces changements semblent résulter en partie d'une répression transcriptionnelle des enzymes de la néoglucogenèse *Pepck* et *G6pase* par le récepteur Fxr α en plus de sa capacité à augmenter la synthèse du glycogène (revue dans Calkin et Tontonoz, 2012). Enfin des études plus récentes indiquent que le facteur *Fgf15/19*, sécrété par l'iléon suite à l'activation du Fxr α est capable de mimer les effets de l'insuline en freinant la néoglucogenèse après inhibition des co-régulateurs transcriptionnels *cAMP Response Element Binding Protein* (CREB) et *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α* (PGC-1 α) (Kir et al., 2011; Potthoff et al., 2011; Potthoff et al., 2012; Schaap, 2012). Ces effets du facteur *Fgf15/19* semblent aussi favoriser la synthèse hépatique de glycogène indépendamment de l'insuline ainsi que l'absorption de glucose par les cellules pré-adipocytaires 3T3-L1 sans effet sur la lipogenèse (Kurosu et al. 2007; Potthoff et al. 2011).

Il a été rapporté que le traitement des cellules 3T3-L1 adipocyte-like avec FGF19 a eu comme conséquence l'absorption accrue de glucose et que FGF19 participe aux effets insuline-indépendants sur la synthèse hépatique de glycogène sans effets sur la lipogenèse (Ma et al. 2006) (Potthoff et al. 2011).

Le récepteur FXR α prévient la hausse d'expression de la pyruvate kinase au niveau du foie (*Liver-Pyruvate Kinase*, L-PK) en réponse à une élévation des taux de glucose par un mécanisme de transrépression impliquant la libération du facteur de transcription ChREBP et le recrutement du corépresseur transcriptionnel SMRT au niveau de la région promotrice du gène de la L-PK. Ainsi, en s'associant aux facteurs ChREBP et HNF4 α au niveau du promoteur du gène de la L-PK, le récepteur FXR α peut aussi réguler la glycémie en défavorisant la glycolyse du glucose en pyruvate par un mécanisme de transrépression (Caron et al. 2013).

4.3 FXR α ET METABOLISME DES LIPIDES

4.3.1 Métabolisme des lipides

4.3.1.1 *Transport des lipides dans l'organisme*

Les lipides forment une famille de molécules organiques indispensables à l'organisme. Intégrant les triglycérides, le cholestérol et les phospholipides, ils répondent à la fois aux exigences structurelles des cellules en formant la bicouche lipidique membranaire ainsi qu'à leurs besoins énergétiques. Les lipides proviennent de l'alimentation mais peuvent être synthétisés par la lipogénèse à partir du glucose comme décrit ci-dessus. De par leur hydrophobicité, les lipides circulent dans l'organisme au sein de particules de transport appelées lipoprotéines. Les lipoprotéines sont formées d'une monocouche de phospholipides amphiphiles, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Apo) dont l'organisation sphérique permet d'englober des triglycérides et du cholestérol sous sa forme estérifiée. On dénombre 5 catégories de lipoprotéines regroupant les chylomicrons, les *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), les *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL), les *Low Density Lipoproteins* (LDL) et les *High Density Lipoproteins* (HDL) (Zhang et al., 2014). Le métabolisme des lipoprotéines est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs qui distinguent trois voies majeures : la voie exogène, la voie endogène et le transport inverse du cholestérol. La voie exogène correspond au trajet effectué par les lipoprotéines issues de l'intestin à destination des autres tissus de l'organisme afin de leur fournir l'énergie dont ils ont besoin. Lors d'une prise alimentaire, les lipides sont émulsionnés par les AB puis absorbés au niveau des entérocytes. Ces molécules passent ensuite dans la circulation lymphatique sous forme d'une particule naissante appelée chylomicron, une forme initiale de lipoprotéine, riche en apolipoprotéines B48 (ApoB48) et A1 (ApoA1). Au cours de leur migration, les chylomicrons subissent une maturation grâce aux échanges d'apolipoprotéines avec les particules HDL. Les chylomicrons se déchargent en Apo-A1 et s'enrichissent en ApoE et ApoC2. L'acquisition d'ApoC2 permet au chylomicron d'activer la Lipoprotéine Lipase (LPL) dont le rôle est de dégrader les Triglycérides (TG) en Acides Gras libres (AG) puis en glycérol qui seront distribués aux tissus. Les chylomicrons hydrolysés, appelés remnants, composés alors majoritairement d'ApoE, sont ensuite captés par le foie pour être dégradés et recyclés (Nakajima et Tanaka 2017).

Au niveau du foie, les lipoprotéines empruntent la voie endogène pour rejoindre les tissus périphériques. Lorsque le taux de chylomicrons diminue dans la circulation, la source d'énergie disponible pour les tissus devient insuffisante. Le foie doit alors pallier ce déficit en synthétisant les lipoprotéines de très faible poids moléculaires pour transporter le cholestérol, les triglycérides ainsi que les ApoC1, ApoE et ApoB100. La dégradation des VLDL au cours de leur transport par la LPL libère les acides gras aux tissus avant d'être transformés au niveau plasmatique en lipoprotéines de type IDL puis LDL qui seront finalement captées par le foie grâce aux récepteurs LDL-R.

Le retour du cholestérol jusqu'au foie pour transformation en acides biliaires et/ou son élimination dans la bile correspond à la phase finale du métabolisme des lipides. Cette phase de transport inverse permet au cholestérol présent dans les tissus périphériques d'être véhiculé au foie par la capture des lipoprotéines HDL grâce à la protéine de transport Scavenger Receptor class B type 1 (SR-B1). Au cours de ce transport, *la Lécithine-Cholestérol Acyltransférase* (LCAT) et son principal cofacteur ApoA1 assurent le remodelage et la maturation des pré-HDL en estérifiant le cholestérol à leur surface. Le transfert des esters de cholestérol des HDL matures vers d'autres lipoprotéines contenant l'ApoB (telles que les LDL et les VLDL) en échange de triglycérides par la protéine de transfert *Cholesterylester Transfer Protein* (CETP) offre une seconde voie de retour indirecte vers le foie par fixation des LDL à leur récepteur LDL-R en plus de la voie directe dépendante des HDL et de leur récepteur SR-B1 (Beliard et al. 2019).

4.3.1.2 Lipogenèse et lipolyse

La plupart des tissus utilise le glucose comme source d'énergie et son stockage se fait généralement sous la forme de glycogène. Toutefois l'excès de glucose active la lipogenèse hépatique et mène au stockage des triglycérides au niveau du tissu adipeux. La libération d'insuline par les cellules pancréatiques en réponse à une hausse des taux de glucose plasmatique active l'expression du gène de la Glucoquinase (GK) ainsi que de *Acetyl-CoA Carboxylase* (ACC), *Fatty Acid Synthase* (FAS) et *Stearoyl-CoA Desaturase* (SCD-1) qui participent respectivement à la glycolyse et la lipogenèse pour alimenter la synthèse des triglycérides de réserve dans les cellules adipeuses.

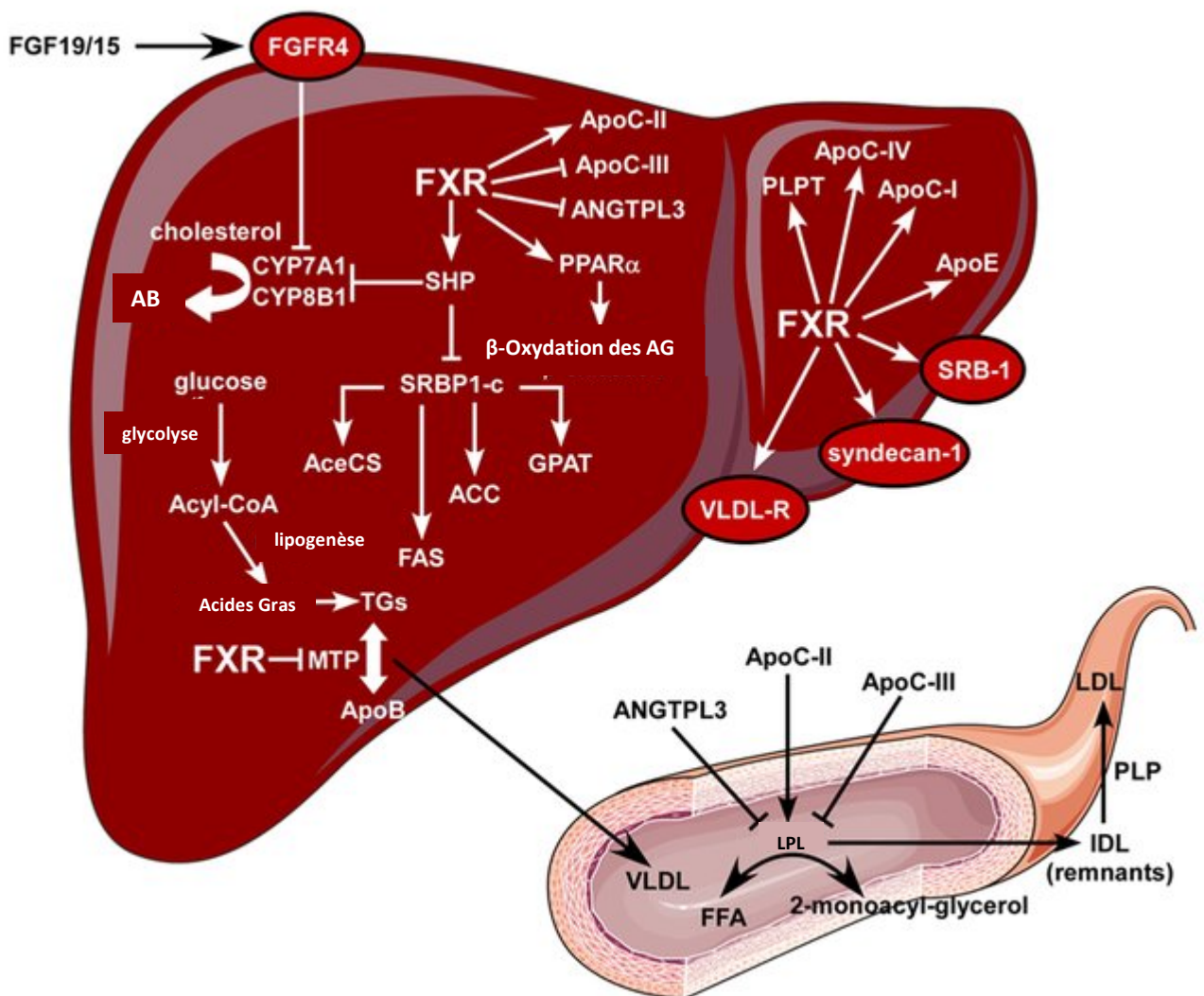


Figure 18 : Régulation du métabolisme des lipides par FXRα.

En réprimant les enzymes de synthèse des AB, CYP7A1 et CYP8B1, l'activation de FXRα mène à une accumulation de cholestérol hépatique. FXRα induit l'expression de la protéine PLPT qui transfère les phospholipides et le cholestérol des LDL aux HDL. Cela mène à une augmentation du récepteur SRB1 pour favoriser l'absorption des HDL et des lipoprotéines ApoE, ApoC1 et ApoC4. L'activation de FXRα mène aussi à la répression de la lipogenèse hépatique en inhibant l'expression du facteur SREBP1C via SHP. SREBP1C induit l'expression des gènes de synthèse des AG et de la lipogenèse comme AceCS, FAS, ACC, et GPAT. En stimulant l'expression de PPARα, FXRα favorise également le catabolisme des AG par la voie de la β-oxydation. En réprimant l'expression de MTP, l'enzyme qui contrôle la fabrication des VLDL, FXRα diminue leur production. L'activation de FXRα augmente la clairance des TG en stimulant l'activité de la Lipoprotéine lipase (LPL) via l'induction d'ApoC2, et en stimulant l'expression du récepteur au VLDL et du syndecan-1 pour l'absorption hépatique des LDL et IDL (remnants). Par ailleurs, l'activation de FXRα réduit la clairance des TG en diminuant l'expression d'ApoC3 et ANGPTL3, deux inhibiteurs de la LPL. *Adapté de Modica et coll. 2010 Nucl Recept Signal.*

Réciproquement lorsque des besoins énergétiques de l'organisme augmentent, les lipides contenus dans les adipocytes sont mobilisés et transformés par un ensemble d'enzymes afin d'obtenir des composés assimilables par la cellule. Au cours de cette lipolyse, les lipases comme la lipoprotéine lipase (LPL) dégradent les triglycérides en glycérol et acides gras. Les acides gras ainsi libérés sont découpés par β -oxydation en groupements acétyl qui seront convertis en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs et fournir de l'ATP.

4.3.2 Rôle de FXR α dans le métabolisme des lipides

Sinal et ses collaborateurs ont proposé à l'origine que FXR α puisse aussi contrôler les niveaux de lipides plasmatiques sur la base d'observations faites chez les souris *Fxr α -/-* présentant une augmentation de triglycérides plasmatiques et de cholestérol (**Figure 18**) (Sinal et al. 2000). Ces travaux ont également montré que ces souris mutantes possédaient des niveaux plasmatiques plus élevés de cholestérol associé aux lipoprotéines de hautes densités (HDL) en plus d'une expression réduite du récepteur *Srb1* au niveau hépatique menant à une baisse de la clairance des HDL circulants (Lambert et al. 2003; Zhang Yanqiao et al. 2006). La diminution des taux de LDL et de HDL circulants après activation de *Fxr α* chez des souris souffrant d'hypercholestérolémie a également permis de relier la participation de ce récepteur nucléaire à la régulation du métabolisme lipidique et au maintien de l'équilibre des concentrations sériques de lipides (Zhang Yanqiao et al. 2006).

En diminuant l'expression du gène *Srebp-1c*, l'activation de *Fxr α* prévient l'accumulation des triglycérides et la sécrétion des VLDL chez les animaux modèles d'hypertriglycéridémie (Watanabe et al. 2004). Par ailleurs, il active l'expression du gène du récepteur *Ppar α* afin de favoriser la β -oxydation des acides gras (Pineda Torra et al. 2003; Savkur et al. 2005). La répression du gène de la protéine de transfert microsomial (MPT) après activation de *Fxr α* ne permet plus de bloquer le transfert des triglycérides, des esters de cholestérol et des phospholipides vers l'apolipoprotéine B nouvellement synthétisée. Il apparaît vraisemblable que ce mécanisme de régulation moléculaire puisse contribuer pareillement à la réduction de l'activité de lipogénèse qui s'appuie notamment sur la disponibilité des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) au niveau du foie (Hirokane et al. 2004).

L'activation des gènes d'apolipoprotéines comme l'*ApoC2* par *Fxr α* semblerait plutôt favoriser l'élimination des lipoprotéines riches en triglycérides en augmentant l'expression du gène de

la lipoprotéine lipase Lpl au niveau du foie chez l'homme et les rongeurs (Heidi Rachelle Kast et al. 2001). En ce sens, les travaux de deux laboratoires indépendants montrent que l'activation du récepteur Fxr α réprime l'expression des gènes de l'Apoc3 et de la protéine apparentée à l'angiopoïétine (Angiopoietin-like 3, Angptl3) pour mener à une levée de répression de l'activité de la lipoprotéine lipase et favoriser le catabolisme des lipoprotéines des HDL matures transportant les esters de cholestérol (Claudel et al. 2003) (Watanabe et al. 2004). Enfin, la répression par Fxr α de l'enzyme de conversion Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9 (Pcsk9), qui agit comme un inhibiteur du récepteur aux LDL (LDLR) *in vitro* (Langhi et al. 2008), propose un autre mode de régulation original pour contrôler l'internalisation et la transformation du cholestérol. Si on considère que la surexpression de cette protéine chez la souris augmente les taux de LDL et de cholestérol plasmatiques, elle accélère aussi la dégradation du récepteur au LDL (LDLR) à la membrane plasmique des hépatocytes (Maxwell, Fisher, et Breslow 2005).

En plus de contrôler l'expression de gènes codants pour des régulateurs du métabolisme des lipoprotéines par les voies exogène et endogène, la capacité de Fxr α à contrôler l'expression du gène du récepteur Srb1 dans les cellules de foie semble enfin réguler le transport inverse de cholestérol au cours de son acheminement des tissus périphériques vers le foie pour une élimination biliaire (Lambert et al. 2003). A cette compétence du récepteur Fxr α à réguler l'expression du Srb1 et l'absorption hépatique des HDL, s'ajoute celle du contrôle de la protéine de transfert des phospholipides *Phospholipids Transfert Protein* (Pltp) qui commande le transfert des phospholipides et du cholestérol des lipoprotéines de faibles densités (LDL) vers les lipoprotéines de fortes densités (HDL). Cela confère au récepteur Fxr α la propriété de moduler les principaux acteurs de la clairance des esters de cholestérol sériques tout en contrôlant l'expression d'apolipoprotéines hépatiques comme l'ApoE, l'ApoC1, l'ApoC4 dans ce contexte (Modica, Gadaleta, et Moschetta 2010). Au-delà de cette régulation du récepteur Srb1 par Fxr α au niveau du foie, la transposition de ce mécanisme régulateur de l'expression de Srb1 par Fxr α au niveau de la glande surrénale élargit la fonction régulatrice de ce récepteur au métabolisme extra-hépatique du cholestérol en alimentant les voies de synthèse des hormones stéroïdes (Chao et al. 2010; Hoekstra et al. 2012). Les modalités de ce mécanisme de régulation de la stéroïdogénèse seront davantage détaillées dans la partie à suivre relative à la régulation de l'activité endocrine du testicule par le récepteur aux acides biliaires FXR α .

5 RÔLE DE FXR α EN PATHOLOGIE ET CIBLAGES THÉRAPEUTIQUES

Les premières études réalisées il y a plus de cinquante ans ont révélé que les AB agissent comme des agents clés pour solubiliser et éliminer le cholestérol hors de l'organisme, puis pour maintenir la force motrice du flux biliaire. Sur la base de ces observations, l'administration orale d'agoniste de FXR α comme l'acide chénodéoxycholique (CDCA) a été initialement utilisée pour dissoudre les cristaux de cholestérol obstruant les canaux biliaires chez les patients présentant des lithiases biliaires avant d'être remplacé par l'acide ursodéoxycholique (UDCA ou Ursodiol), un dérivé plus hydrophile permettant de réduire la cirrhose biliaire et l'hépatotoxicité (Hofmann et Roda 1984; Eirini, Emmanuel, et Dimitri 2011; Makino et al. 1975). Ainsi, l'UDCA et son analogue synthétique 24-nor-UDCA améliorent l'écoulement de la bile et l'excrétion des AB potentiellement toxiques chez les patients atteints de maladies cholestatiques causées par une obstruction mécanique des voies biliaires ou par des troubles métaboliques de la formation et du transport des AB provoqués par des défauts génétiques héréditaires, à une grossesse ou à des médicaments (Sepe et al. 2018). La section ci-dessous s'efforcera donc de répertorier les approches développées sur la base d'une modulation de l'activité du récepteur FXR α qui suscite un intérêt grandissant pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à améliorer la prise en charge des patients atteints de troubles métaboliques et de cancers.

5.1 FXR α ET PATHOLOGIES MÉTABOLIQUES

La caractérisation phénotypique de souris déficientes pour Fxr α a mis en évidence le rôle potentiel de ce récepteur nucléaire en tant que régulateur dans différentes voies métaboliques. Les souris Fxr α -/- présentent un profil lipidique caractérisé par une hausse de triglycérides plasmatiques, d'acides gras libres et de lipoprotéines (VLDL, HDL, LDL) en combinaison avec une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Malgré ce profil pro-athérogène, les souris Fxr α -/- ne développent pas de plaques détectables de façon spontanée, même lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en lipides et en cholestérol (Hanniman et al. 2005). Toutefois, certaines études ont démontré un effet bénéfique d'agonistes de FXR α comme le 6-ECDCA et le WAY-362450 pour protéger contre le développement de lésions d'athérosclérose aortique chez des souris modèles de dyslipidémie

(Mencarelli et al. 2009; Hartman et al. 2009). Ces dyslipidémies s'accompagnent également chez les animaux invalidés pour $Fxr\alpha$ d'une altération de la signalisation initiée par l'insuline dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (Duran-Sandoval et al. 2004; Yanqiao Zhang et al. 2006; Ma et al. 2006). Ainsi, la majeure partie des données disponibles à ce jour montre que l'activation de $Fxr\alpha$ par des agonistes normalise la glycémie en augmentant la sensibilité à l'insuline dans le foie et les tissus périphériques, puis en réduisant la néoglucogenèse hépatique chez les animaux nourris avec des régimes riches en graisses. Plusieurs études ont en effet suggéré que la modulation de l'activité du récepteur $Fxr\alpha$ ainsi que du métabolisme de AB puissent améliorer les paramètres glycémiques dans les modèles de souris obèses db/db et ob/ob ainsi que chez l'homme atteint de diabète de type 2 (Bays et al. 2008; Chávez-Talavera et al. 2017; Staels et Kuipers 2007; X. X. Wang et al. 2010; Yanqiao Zhang et al. 2006). Dans ce contexte, les séquestrants d'AB (cholestyramine, colesevam), utilisés en clinique pour traiter les dyslipidémies, ont aussi procuré des bénéfices importants dans la prise en charge des patients atteints de diabète de type 2 (Bays et al. 2008; Q. Shang et al. 2009; Garg et Grundy 1994; Staels et Kuipers 2007).

L'activation de $FXR\alpha$ montre également des effets protecteurs sur le développement et la progression de l'athérosclérose bien que des effets indésirables comme la réduction des HDL aient été rapportés (Moris et al. 2017). Une récente étude a montré que l'activation du $Fxr\alpha$ par l'agoniste synthétique GW-4064 stimulait la sécrétion d'adiponectine chez la souris pour diminuer le remodelage et le dysfonctionnement de la fonction cardiaque causés par un infarctus du myocarde (Xia et al. 2018). Malgré l'absence de noyau, les plaquettes expriment divers facteurs de transcription qui régulent leur fonction *via* des mécanismes indépendants de l'ADN. L'activation des plaquettes est réprimée par les ligands GW-4064 et INT-747 de $FXR\alpha$, en réponse à la stimulation des récepteurs du collagène ou de la thrombine, ce qui conduit à la réduction de la mobilisation du calcium, de la liaison du fibrinogène et de l'agrégation (Moraes et al. 2016).

5.2 $FXR\alpha$ DANS LES PATHOLOGIES HEPATIQUES

La capacité de l'UDCA à réduire l'absorption et la synthèse des AB, tout en stimulant leur élimination hépatocellulaire et biliaire, a validé son utilisation comme traitement de première ligne non seulement pour la cholestase mais aussi pour une multitude d'autres lésions

cholestatiques comme la cirrhose biliaire primitive (*Primary Biliary Cirrhosis*, PBC), la cholangite sclérosante primitive (*Primary Sclerosing Cholangitis*, PSC), la cholestase intrahépatique gravidique (*Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*, ICP) et la cholestase intrahépatique familiale progressive (*Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis*, PFIC). Cependant, l'efficacité limitée de l'UDCA à restaurer les flux biliaires a poussé le développement de nouvelles approches thérapeutiques afin de prévenir l'accumulation des AB ou de métabolites toxiques dans le foie qui pourraient générer une fibrose, une inflammation voire une cirrhose. Les études expérimentales utilisant des modèles animaux mimant des lésions hépatiques cholestatiques (ligature du canal biliaire, génie génétique, alimentation enrichie en AB) ont fortement contribué au développement d'agonistes stéroïdiens (semi)synthétiques (6-ECDCA) et non stéroïdiens de FXR α (fexaramine, GW-4064, PX20606) pour orchestrer une réponse adaptative lorsque les niveaux en AB intrahépatiques et systémiques augmentent (pour des revues, (Zollner, Wagner, et Trauner 2010; Wagner, Zollner, et Trauner 2010)).

Dans des conditions cholestatiques, les changements d'expression de protéines de synthèse et de transport des AB induits par l'activation FXR α représentent une réponse compensatoire limitant l'accumulation hépatocellulaire de ces composés en plus de fournir d'autres voies d'excrétion. Ainsi, l'activation de Fxr α par les agonistes GW-4064 ou 6-ECDCA prévient les lésions hépatiques chez des souris modèles de cholestase (Fiorucci, Clerici, et al. 2005; Y. Liu et al. 2003). De plus, l'expression de *Fgf15* induite par Fxr α au niveau de l'intestin modifie l'expression hépatique du gène de *Cyp7a1* et la composition quantitative/qualitative des AB pour prévenir les lésions cholestatiques chez ces animaux (Modica et al. 2012). Par conséquent, il n'est pas surprenant que l'agoniste de FXR α 6-ECDCA soit capable de restaurer un flux biliaire réduit et d'améliorer la cholestase chez les patients atteints de cirrhose biliaire primitive (Nevens et al. 2016).

Selon les études animales et les essais cliniques, il est noté qu'outre la cholestase, l'agoniste FXR α 6-ECDCA s'est également montré prometteur dans le traitement de la stéatose hépatique non alcoolique ainsi que de la stéatohépatite non alcoolique. La stéatose hépatique non alcoolique (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD) représente la pathogénie hépatique la plus courante et se caractérise par une accumulation de lipides dans les hépatocytes pour évoluer progressivement vers une stéatohépatite non alcoolique (*Non-Alcoholic*

Steatohepatitis, NASH), une fibrose hépatique, puis un carcinome hépatocellulaire (Hepatocellular Carcinoma, HCC) accompagné d'une insuffisance hépatique (Hardy et al. 2016). Chez les patients atteints de NAFLD, la diminution de l'expression de FXR α au niveau du foie est corrélée à une augmentation de la synthèse de triglycérides dans ce tissu (Z.-X. Yang, Shen, et Sun 2010). En accord avec les fonctions précédemment décrites de Fxr α dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides, l'activation de Fxr α par le 6-EDCDA inhibe le développement de la stéatose dans un modèle de rat obèse Zucker (fa/fa) (Cipriani et al. 2010). De plus, l'administration de l'agoniste synthétique WAY-362450 réduit la stéatose hépatique et l'inflammation associées à l'hypertriglycéridémie chez les souris nourries avec un régime riche en glucides (X. Liu et al. 2014).

La plupart des maladies hépatiques chroniques comme la NASH (ou maladie du foie gras) provoque au cours de leur évolution une réponse réactionnelle du foie qui crée des lésions fibrotiques afin d'opérer une cicatrisation en réponse aux agressions hépatiques. L'initiation de cette fibrose et sa progression dépendent de facteurs fibrogéniques produits par les cellules stellaires hépatiques activées (HSC) et de protéines de la matrice extracellulaire (Tsuchida et Friedman 2017). En induisant une inflammation, la hausse chronique des AB semble favoriser la transformation néoplasique des hépatocytes (Perez et Briz 2009). Dans ce contexte, si le récepteur FXR α a été montré pour inhiber le facteur pro-inflammatoire NF- κ B, l'activation de NF- κ B est également décrite pour réprimer l'expression du gène de FXR α *in vivo* et *in vitro* (Y.-D. Wang et al. 2008). De manière intéressante, l'activation de FXR α par l'agoniste WAY-362450 diminue néanmoins l'inflammation lors du développement de la fibrose hépatique chez des souris modèles de stéatohépatite non alcoolique (S. Zhang et al. 2009). Enfin, bien que le récepteur FXR α soit faiblement exprimé dans les cellules HSC, sa capacité à activer l'expression du gène codant le répresseur SHP inhibe leur activité pour mener à une régression de la fibrose (Fiorucci et al. 2004; 2005).

5.3 FXR α DANS LES CANCERS

Les acides biliaires sont largement incriminés dans la pathogenèse des malignités humaines, notamment dans le carcinome hépatocellulaire (CHC) (W. Zhang et al. 2015; Stanimirov, Stankov, et Mikov 2015), le cancer gastrique (Carino et al. 2016), le cancer de l'œsophage (Matsuzaki et al. 2013; Abdel-Latif et al. 2016), le cancer du pancréas (Joshi et al. 2016; Feng

et Chen 2016) et le cancer du sein (Swales et al. 2006; Giaginis et al. 2017). Sans surprise, plusieurs études associent une fonction de répresseur de tumeurs au récepteur FXR α notamment dans le foie où sa perte est associée à la progression des CHC (X. Huang, Zhao, et Huang 2015). Ainsi, les troubles du métabolisme des AB ont souvent été associés au développement des CHC et décrits chez plusieurs modèles animaux (I. Kim, Morimura, et al. 2007; F. Yang et al. 2007) ainsi que chez l'homme (T. Chen et al. 2011; Knisely et al. 2006). Les premiers travaux de De Gottari et coll. ont suggéré que la perte de FXR α contribuait à la tumorigenèse du cancer colorectal et soutenaient l'idée que les AB soient probablement cancérigènes chez l'homme et les rongeurs (Gottardi et al. 2004; Jansen 2007). Dans cette optique, les souris dépourvues de Fxr α montrent une altération du contrôle de l'homéostasie des AB et développent spontanément des carcinomes hépatocellulaires mais il apparaît que la séquestration des AB avec la cholestyramine réduit l'incidence de ces tumeurs (F. Yang et al. 2007; I. Kim, Morimura, et al. 2007). Chez l'homme, la signalisation par le récepteur FXR α est inhibée dans le foie de patients présentant un CHC (Wolfe et al. 2011; Su et al. 2012) en comparaison avec les tissus péri-tumoraux et l'expression de ce récepteur est inversement corrélée avec les caractéristiques clinico-pathologiques malignes des CHC (taille de la tumeur, grade clinique, différenciation et l'encapsulation du tissu tumoral (Wolfe et al. 2011; Su et al. 2012)). Dans l'intestin, la perte de fonction de Fxr α augmente également le taux de formation de tumeurs chez les souris et confirme le lien de causalité entre les concentrations élevées en AB et les cancer gastro-intestinaux (Maran et al. 2009).

Par conséquent, l'activation de FXR α par des ligands non dérivés des AB a été proposée comme une stratégie attrayante pour protéger contre la carcinogenèse du foie et de l'intestin, mais le mécanisme par lequel FXR α supprime la carcinogenèse reste à étudier puisque certains de ses ligands agonistes augmentent la chimiorésistance dans les cellules du colon et du foie (Herraez et al. 2012; J. Vaquero, Briz, et al. 2013). Ce mécanisme repose probablement sur l'augmentation de l'expression des gènes du métabolisme et du transport des médicaments afin d'inactiver et d'exporter les anticancéreux hors des cellules avec un impact sur le résultat de la chimiothérapie. À la lumière de ces études, les effets différentiels de ces agonistes de FXR α dans différents tissus cancéreux pourraient être dus aussi à différents variants qui présentent une expression, une affinité de liaison au ligand et une activité transcriptionnelle différentielles. Il est également possible que les polymorphismes et les modifications post-

traductionnelles contribuent aux rôles différentiels de FXR α après activation par ses ligands dans les cancers humains. Par conséquent, le développement de composés efficaces et sélectifs pour chaque variant du récepteur, en fonction de la voie de signalisation et de la maladie dans laquelle ils sont impliqués, pourrait être crucial pour valider FXR α en tant que cible thérapeutique cliniquement pertinente liée à la maladie, afin de minimiser les effets secondaires et d'améliorer l'efficacité.

5.4 ALTERATIONS METABOLIQUES ET TROUBLES DE LA FERTILITE MASCULINE.

Plusieurs études corrélaient des altérations de concentrations plasmatiques de cholestérol aux anomalies de la fonction de reproduction pour mener à l'infertilité masculine. Ce lien entre l'homéostasie lipidique et la fertilité est clairement mis en évidence chez les patients qui souffrent d'hyperlipidémie ou de syndrome métabolique (Kaplan, Meehan, et Shah 2006; Kasturi, Tannir, et Brannigan 2008; Padrón et al. 1989). Ceci a été confirmé par la génération de plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées pour des gènes régulateurs du transport et du métabolisme des lipides ainsi que chez les animaux nourris avec un régime riche en cholestérol (Lancellotti et al. 2010; Shalaby, Zorba, et Kamel 2004). L'hyperinsulinémie rencontrée fréquemment dans les maladies métaboliques semble aussi participer à l'apparition des troubles de la fertilité en altérant la fonction endocrine du testicule (Pitteloud et al. 2005). A cette étiologie complexe s'ajoute les données cliniques et expérimentales qui indiquent que l'amélioration du flux biliaire par l'acide ursodésoxycholique (UCDA) produit des effets bénéfiques sur le système reproducteur chez les patients souffrant de cholestase de longue date en prévenant l'hypogonadisme comme cela a été démontré chez le rat mâle souffrant de cholestase chronique induite par une ligature permanente du canal biliaire (Karagiannis et Harsoulis 2005; Saad et Mahmoud 2014). Ces effets positifs de l'UCDA suggèrent qu'un déséquilibre des taux d'acides biliaires plasmatiques puisse être également délétère pour les fonctions endocrines et exocrines des testicules et ont justifié de nombreuses études qui ont mis en évidence au cours des dernières années un lien significatif entre le métabolisme des AB et les troubles de la fertilité masculine (Baptissart et al. 2014). Un état des lieux des connaissances actuelles sur les étapes de développement du testicule, l'acquisition puis la régulation de ses fonctions endocrines et exocrines ainsi que sur la participation du récepteur nucléaire FXR α à la régulation de ces événements est proposé dans

le chapitre suivant afin de dégager les arguments qui ont fondé la problématique de mon projet de recherche doctoral.

Partie 3 :
FXR α dans le développement
normal et pathologique du
testicule

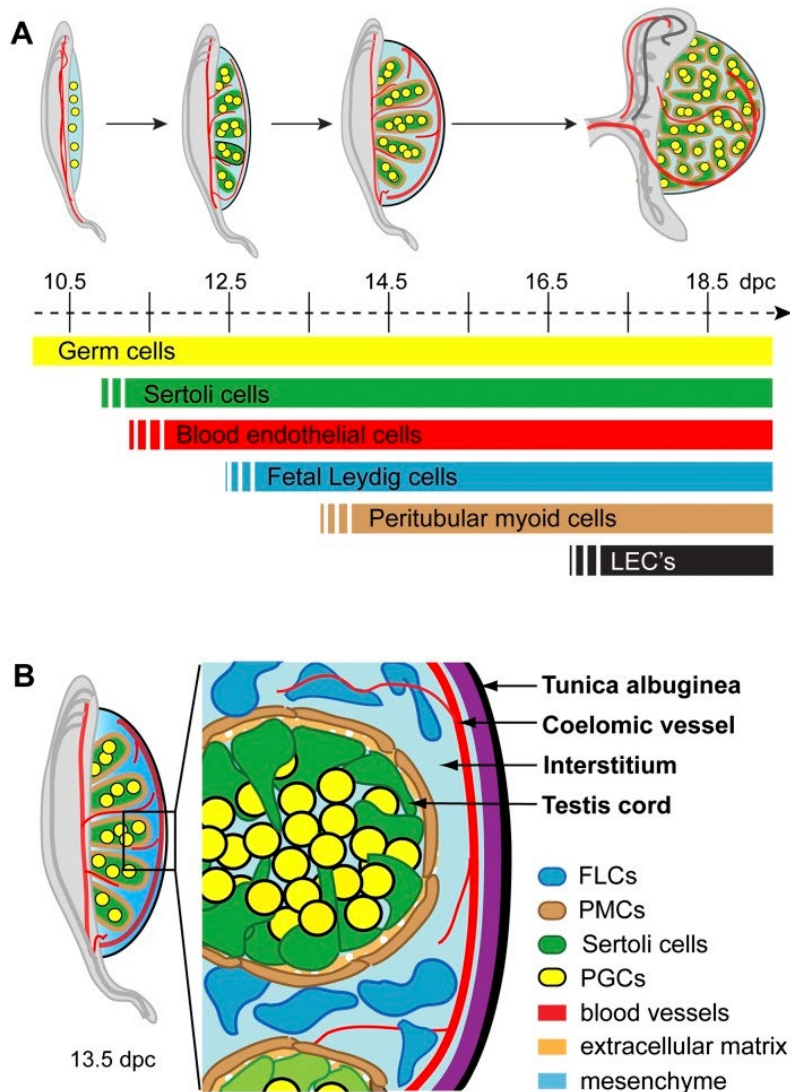


Figure 19 : Développement du testis foetal chez la souris.

A) Modèle de différenciation des lignées testiculaires au cours du développement chez la souris. Les cellules germinales (jaunes) migrent vers les crêtes génitales avant la spécification du testis. Les cellules de Sertoli (vert) sont les premières cellules somatiques à se différencier dans l'organe. Elles sont suivies par les cellules endothéliales sanguines (rouge) qui vont initier le développement d'une vascularisation artérielle primitive. Après une phase de prolifération des cellules de Sertoli, les cellules de Leydig foetales (bleu) et cellules myoïdes péritubulaires (marron) entrent en différenciation. La vascularisation s'enrichit avec l'apparition de veines et de cellules endothéliales lymphatiques (noir). **B)** A partir du jour 13,5 post coit (dpc), les compartiments testiculaires apparaissent avec développement des cordons testiculaires et de l'espace interstitiel. A ce stade, les différents types cellulaires présents chez l'adulte sont en place. Les cellules de Sertoli englobent les cellules germinales immatures tandis que les cellules de Leydig et la vascularisation sont en place dans le milieu interstitiel. *Issu de Svngen et coll. 2013 Gene Dev.*

1 PHYSIOLOGIE TESTICULAIRE : DU FŒTUS A L'ÂGE ADULTE

1.1 DEVELOPPEMENT FŒTAL DU TESTICULE

Au cours du développement normal chez l'homme, les cellules germinales primordiales (*Primary Germ Cells*, PGC) issues de l'épiblaste apparaissent à la cinquième semaine de l'embryogenèse. En réponse à la signalisation induite par le ligand KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase (KITLG ou *Stem Cell Factor*, SCF) et les chimiokines C-X-C Motif *Chemokine Ligand 12* et C-X-C Motif *Chemokine Receptor 4* (CXCL12-CXCR4) ces cellules migrent et colonisent les crêtes génitales pour devenir des gonocytes et former le futur testicule. Chez l'embryon, la présence d'un chromosome Y dirige le développement de la gonade en testicule, sous l'influence des gènes de détermination *Sex Determining Region Y* (SRY) et *SRY-Box Transcription Factor 9* (SOX9). Ces derniers induisent au sein de l'ébauche gonadique la différenciation des cellules de Sertoli constituant le premier événement de l'organogenèse testiculaire. Ces cellules aboutissent à terme à la formation des tubes séminifères qui englobent les PGC. Au sein du mésenchyme et dès la huitième semaine se différencie un contingent cellulaire qui aboutit à la formation des cellules de Leydig, sécrétant la testostérone. Sous l'influence du microenvironnement, les gonocytes se différencient en pré-spermatogonies, entrent en arrêt mitotique et perdent l'expression des antigènes embryonnaires. En parallèle, les cordons sexuels se différencient en tubules séminifères. En période postnatale, les cellules germinales devenues pré-spermatogonies se développent en spermatogonies de type A qui deviennent quiescentes pendant l'enfance. A partir de la puberté celles-ci subissent des phases de maturation et entrent en méiose pour produire les spermatozoïdes après le démarrage du processus de spermatogenèse (van de Geijn, Hersmus, et Looijenga 2009).

1.1.1 Cellules de Sertoli

Au jour embryonnaire E10.0-11.0 chez la souris et au cours de la quatrième semaine de développement chez l'homme, indépendamment du génotype de l'embryon (XX ou XY), la gonade indifférenciée peut évoluer soit vers un testicule soit un ovaire (Byskov 1986). Le gène codant SRY présent sur le chromosome Y oriente le développement des gonades vers un phénotype masculin dès le jour embryonnaire E10.5 chez la souris et entre 41 et 44 jours de

développement chez l'homme (Hacker et al. 1995; Byskov 1986) (**Figure 19**). Dans un premier temps, le gène codant SRY s'exprime dans certaines des cellules somatiques de la gonade précoce. Ce facteur est d'abord exprimé au centre de la gonade chez la souris avant de se diffuser le long de l'axe antéro-postérieur (Bullejos et Koopman 2001). Les études ont montré que le produit du gène SRY est nécessaire et suffisant pour transformer les cellules progénitrices somatiques de la gonade en cellules de Sertoli dont la différenciation constitue la première étape de l'organogenèse des testicules. Ainsi, les cellules de Sertoli dirigent la morphogenèse testiculaire au cours du développement fœtal et organisent la formation du cordon testiculaire, la vascularisation des testicules, tout en orchestrant la différenciation des cellules myoïdes périvitubulaires et des cellules de Leydig fœtales (Cool, DeFalco, et Capel 2012). Ces changements conduisent à la compartimentation des environnements somatiques en une niche spécialisée pour la spermatogenèse (cordons testiculaires) et un interstice responsable de la production d'androgènes. En complément, les cellules sertoliennes sécrètent l'Hormone Anti-Müllérienne (AMH) qui mènera à la régression des canaux de Müller, précurseurs des voies génitales femelles.

Les cordons testiculaires, futurs tubules séminifères du testicule adulte, sont organisés dans les testicules fœtaux peu de temps après le démarrage de l'expression du gène SRY dans les cellules de Sertoli fœtales. Les tubules séminifères dans les testicules adultes sont essentiels à la fertilité masculine parce qu'ils forment la niche qui maintient les cellules souches spermatogoniales et dirigent la progression de la spermatogenèse. La migration des cellules de Sertoli et des cellules germinales vers l'intérieur des cordons au cours de la formation de la gonade fœtale, délimite le milieu interstitiel dans lequel les cellules somatiques se rassemblent. La membrane basale et la couche extérieure de cellules périvitubulaires myoïdes séparent ensuite les cordons du milieu interstitiel (Cool, DeFalco, et Capel 2012; Tung, Skinner, et Fritz 1984). La différenciation de l'interstice et des cellules qu'il contient, comme les cellules myoïdes périvitubulaires et les cellules de Leydig, est étroitement liée à la formation des cordons testiculaires. Les cellules myoïdes périvitubulaires entourent la lame basale des cordons du testicule, tandis que les cellules de Leydig produisent des androgènes et le facteur de croissance Insuline-Like 3 (INSL3) qui sont nécessaires pour la virilisation de l'embryon masculin (Griswold et Behringer 2009). La croissance des cellules myoïdes et de Leydig est étroitement liée à l'activité des cellules de Sertoli. Ainsi, à partir du jour E11.5 chez la souris,

les cellules de Sertoli produisent la protéine *Desert Hedgehog* (Dhh) dont le récepteur *Protein patched homolog 1* (PTCH1) est exprimé par les cellules myoïdes et de Leydig dans l'interstitium (Bitgood, Shen, et McMahon 1996; Pierucci-Alves, Clark, et Russell 2001; Yao, Whoriskey, et Capel 2002).

La colonisation des cellules germinales au niveau des crêtes génitales coïncide avec l'initiation de l'expression des gènes de SRY et de SOX9 dans les progéniteurs des cellules de Sertoli qui englobent les PGC et les enferment dans les cordons testiculaires. Entre les jours E13.5 et E15.5 chez la souris, les PGC subissent un arrêt de leurs divisions mitotiques pour rester bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire puisque l'enzyme CYP26b1 exprimée principalement par les cellules de Sertoli inactive l'acide rétinoïque nécessaire pour initier leurs divisions méiotiques et leur différenciation.

L'établissement de l'ensemble des lignées cellulaires du testicule, puis l'entrée en quiescence des cellules germinales marquent la phase finale de développement du testicule pour conduire à la formation des tubules séminifères adultes. Ces premiers programmes de morphogenèse du testicule et de prolifération des cellules de Sertoli reposent en grande partie sur la production de *Fibroblast Growth Factor* (FGF) par les cellules de Sertoli ainsi que sur des acteurs sécrétés par les cellules de Leydig fœtales qui dirigent la multiplication des cellules de Sertoli pour mener à l'allongement des cordons testiculaires. Ainsi, chez le fœtus, les tubules séminifères contiennent les cellules de Sertoli et les cellules germinales alors que le lumen n'est pas encore bien défini avant la puberté. La poursuite de la multiplication des cellules de Sertoli jusqu'à l'âge adulte conditionne donc la production du nombre de gamètes et l'augmentation de la taille du testicule.

1.1.2 Cellules de Leydig

Au cours du développement les cellules de Sertoli jouent un rôle crucial dans la différenciation des cellules de Leydig fœtales qui doivent produire des androgènes afin de masculiniser les embryons XY. Les cellules de Leydig se différencient dans les testicules fœtaux entre les jours E12.5 à E13.5 chez les rongeurs avant de dégénérer à la naissance pour être remplacées par des cellules de Leydig adultes dans les 3 premières semaines post natales (Wen, Liu, et Gao 2011; Wen et al. 2014). Les cellules de Leydig fœtales présentes dans les testicules ne possèdent pas d'activité 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β HSD3) et sont incapables

de synthétiser la testostérone dans le testicule contrairement aux cellules de Leydig adultes (Shima et al. 2015). Au stade fœtal, les cellules de Leydig coopèrent avec les cellules de Sertoli pour produire la testostérone nécessaire au développement de l'embryon masculin (Shima et al. 2013) puisque l'androstenedione produit par les Leydig fœtales est transformé en testostérone par l'activité 17 β HSD des cellules fœtales de Sertoli. Puisque la protéine KIT s'exprime au niveau des cellules de Leydig fœtales, il est probable que l'activation du récepteur c-KIT par son ligand KITLG soit nécessaire au développement de ces dernières (Manova et al. 1990).

1.1.3 Cellules germinales

Comme vu précédemment, les cellules germinales qui expriment le récepteur c-KIT migrent dès le jour E11.5 chez la souris sous l'influence du ligand KITLG pour coloniser les crêtes génitales où elles se multiplient par mitose pour devenir des gonocytes. Ces gonocytes arrêtent graduellement leur division à partir du jour E14.5 chez la souris pour s'accumuler sous une forme quiescente jusqu'à la naissance (Western et al. 2008). Ces gonocytes expriment plusieurs marqueurs de pluripotence comme la Phosphatase Alcaline Placentaire (PLAP) et le facteur de transcription OCT3/4 ainsi que le récepteur c-KIT qui disparaît au cours du processus de maturation des cellules. Au début de la vie néonatale, les gonocytes suivent trois destins différents. En effet, 30 à 75 % d'entre eux dégénèrent par nécrose et apoptose (R.-A. Wang, Nakane, et Koji 1998; Orwig et al. 2002; Roosen-Runge et Leik 1968) et parmi les gonocytes restants, certains demeureront à un état indifférencié pour constituer une réserve de cellules souches spermatogoniales et progénitrices (Clermont et Perey 1957; Drumond, Meistrich, et Chiarini-Garcia 2011). Enfin, l'autre population de gonocytes entrera en différenciation et en méiose quelques jours plus tard pour initier le premier cycle de spermatogenèse (Yoshida et al. 2006; Kluin et de Rooij 1981) avant que leur activité mitotique ne soit stoppée jusqu'à la puberté. Bien que les cellules germinales semblent être quiescentes pendant l'enfance, le nombre de cellules germinales aura approximativement doublé avant la puberté.

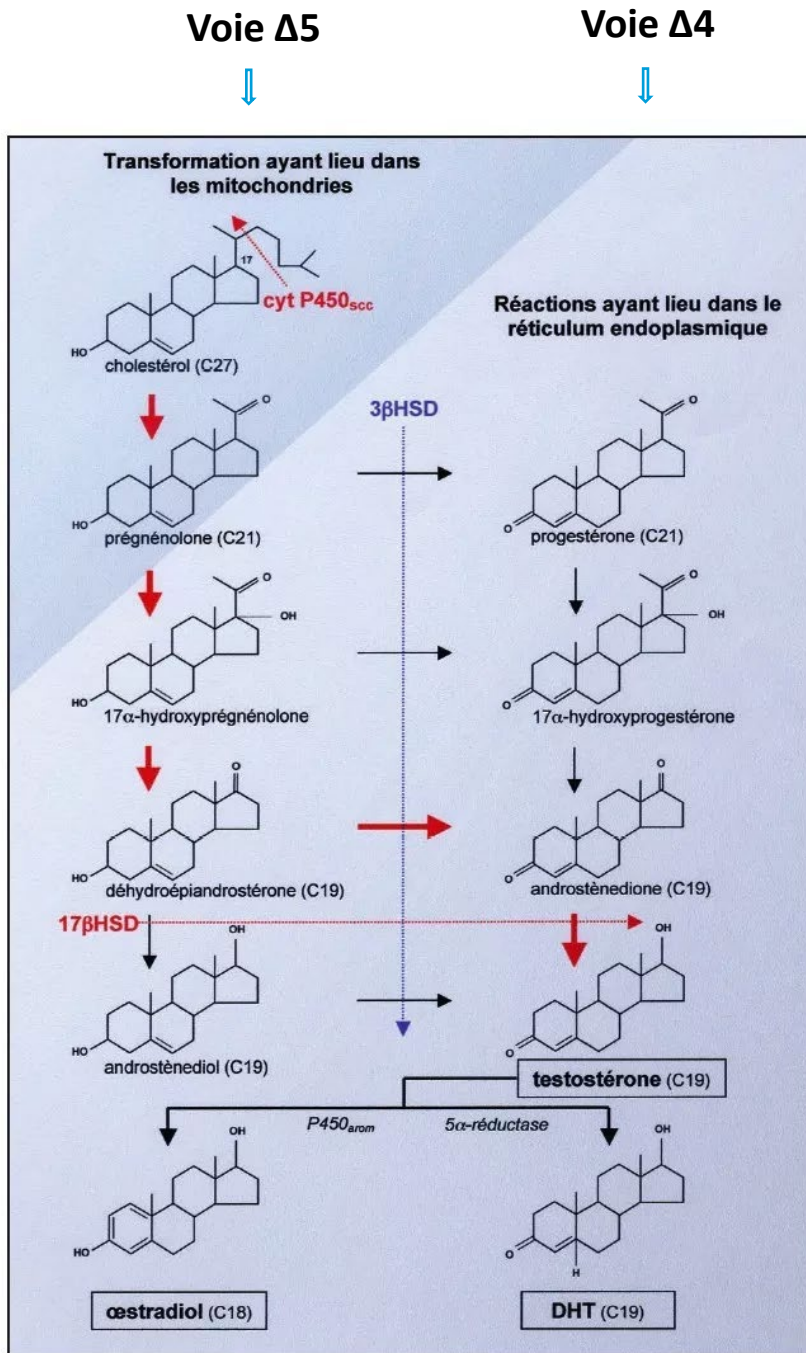


Figure 20 : Voie de synthèse des androgènes dans le testicule.

La synthèse de la testostérone dans les cellules de Leydig dérive du cholestérol qui peut suivre deux voies de synthèse, delta 4 et delta 5. Chez l'homme la voie delta 5 est majoritaire tandis que la voie delta 4 est principale chez la souris. Issu de <https://www.urofrance.org/base-bibliographique/physiologie-des-androgenes-chez-lhomme-adulte>

1.2 PUBERTE : ÉSSOR DES FONCTIONS ENDOCRINE ET EXOCRINE DU TESTICULE

1.2.1 Fonction endocrine : rôle des cellules de Leydig

1.2.1.1 Synthèse des stéroïdes

Les hormones stéroïdes les plus importantes produites par les cellules de Leydig sont les androgènes, et en particulier la testostérone. Les androgènes sont essentiels pour les fonctions masculines comme la différenciation sexuelle, le développement des caractères sexuels secondaires, la spermatogenèse, l'appareil musculosquelettique et le comportement sexuel.

La synthèse des stéroïdes par les cellules de Leydig est un processus organisé en plusieurs étapes successives (**Figure 20**). Ces molécules hydrophobes sont produites à partir du cholestérol dont le transport dans la mitochondrie est régulé par la protéine *Steroidogenic Acute Regulatory protein* (StAR) (D M Stocco, 2000). Les cellules de Leydig assurent la stéroïdogénèse à partir d'une synthèse *de novo* à partir de l'acétate et/ou par capture de lipoprotéines riches en cholestérol estérifié. La biosynthèse des stéroïdes démarre avec la coupure de la chaîne latérale du cholestérol par l'enzyme CYP11A1 (ou cytochrome P450_{scc}, side-chain clivage) pour générer la prégnénolone (M.-C. Hu et al. 2004). Celle-ci est ensuite convertie en testostérone selon deux voies enzymatiques appelées Delta 4 ($\Delta 4$) et Delta 5 ($\Delta 5$) (Conley et Bird 1997). La voie Delta 4 ($\Delta 4$) convertit la prégnénolone en progestérone sous l'action de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase/ $\Delta 5$ -4 isomérase (3 β HSD). Le cytochrome CYP17A1 (cytochrome p450 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase) transforme ensuite la progestérone en androsténédione, un substrat de l'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β HSD) qui produit la testostérone. La voie Delta 5 ($\Delta 5$) quant à elle, est initiée directement par l'enzyme CYP17A1, qui permet la conversion de la prégnénolone en Déhydroépiandrostérone (DHEA). Ce sont les enzymes 17- β HSD et 3 β HSD qui assurent sa conversion en androsténédiol ou en androsténédione, puis en testostérone. L'enzyme 3 β HSD est responsable du passage de la voie $\Delta 5$ à $\Delta 4$. Chez les humains, la voie $\Delta 5$ prédomine parce que l'enzyme CYP17A1 a une faible activité 17,20-lyase pour la conversion de 17 α -hydroxyprogestérone en androsténédione (Hammar et Petersson 1986). La testostérone produite est ensuite transformée en Dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5 α -réductase, ou en estradiol (E2) par l'activité aromatasase de CYP19A (cytochrome P450 aromatasase).

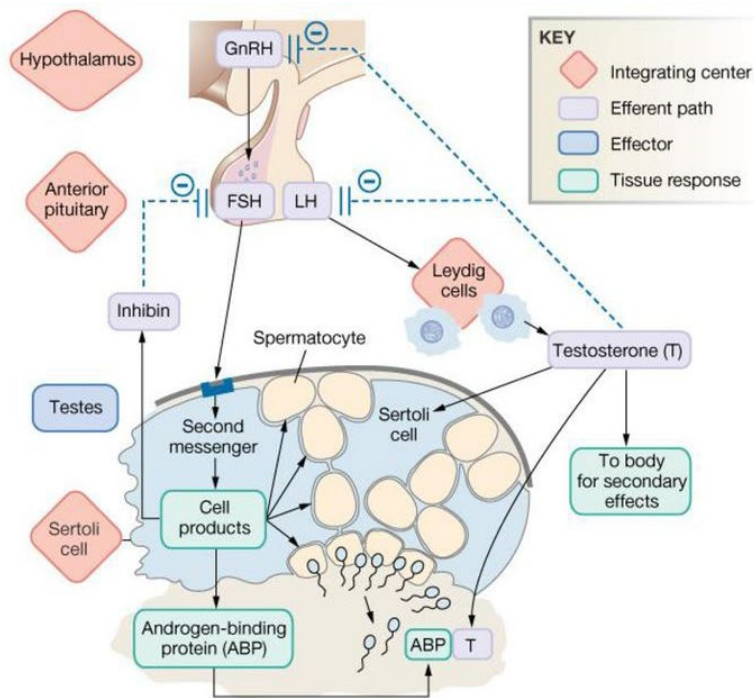


Figure 21 : Régulation de l'activité endocrine et exocrine du testicule par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

L'hypothalamus synthétise le facteur de libération des gonadotrophines (GnRH) pour activer la sécrétion de l'hormone folliculostimulante (FSH) et de l'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse antérieure. La FSH agit sur les cellules de Sertoli pour stimuler la spermatogenèse dans les tubes séminifères tandis que la LH active les cellules de Leydig pour synthétiser la testostérone dans l'espace interstitiel. La liaison à la protéine de transport ABP permet de concentrer les androgènes dans les tubes séminifères afin de stimuler les cellules de Sertoli et la différenciation des cellules germinales. En retour, l'inhibine synthétisée par les cellules de Sertoli effectue un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse pour diminuer la sécrétion de la FSH. La testostérone induit également un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH et de GnRH. *Adapté de Dee Unglaub, Human Physiology : an integrated approach.*

La production de testostérone est stimulée par l'hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone, LH) au niveau des cellules de Leydig afin de promouvoir la spermatogenèse via la stimulation des fonctions des cellules de Sertoli qui produisent la protéine de transport Androgen Binding Protein (ABP) sous l'action de la folliculostimuline (Follicle-Stimulating Hormone, FSH) afin de concentrer la testostérone dans le compartiment adluminal des tubes séminifères.

1.2.1.2 Régulation hormonale par l'axe gonadotrope

Le contrôle hormonal de la reproduction dans les deux sexes est réalisé par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique ou axe gonadotrope (**Figure 21**). La gonadolibérine (*Gonadotropin releasing hormone*, GnRH) synthétisée par l'hypothalamus contrôle la sécrétion de deux gonadotrophines par l'hypophyse antérieure : l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). La FSH et la LH agissent en retour de façon trophique sur les gonades. Bien que le contrôle primaire de la fonction gonadique ait lieu dans le cerveau, les gonades influencent également leur propre fonction. Les testicules secrètent des hormones peptidiques comme les inhibines qui agissent directement sur l'hypophyse pour freiner la sécrétion de FSH ainsi que les activines qui la stimulent (Kaprra et Huhtaniemi 2018).

La LH agit principalement sur les cellules endocrines en stimulant la production des hormones stéroïdes sexuelles et cible plus particulièrement les cellules de Leydig productrices de testostérone. La LH agit directement par son récepteur membranaire LH/CG receptor (LHCGR) sur les cellules de Leydig pour contrôler leur activité stéroïdogène. En retour, les stéroïdes sexuels exercent une rétroaction négative centrale sur leur propre synthèse en inhibant la libération hypophysaire de LH.

La FSH active indirectement la spermatogenèse en stimulant les cellules de Sertoli. En concert avec la testostérone, la FSH contrôle la prolifération, la maturation et la fonction des cellules de Sertoli qui produisent les signaux régulateurs et nutritionnels nécessaires au maintien du développement normal des cellules germinales (Oduwole, Peltoketo, et Huhtaniemi 2018).

1.2.2 Fonction exocrine : production des gamètes mâles

1.2.2.1 Rôle des cellules de Sertoli dans la fonction exocrine du testicule

1.2.2.1.1 Maturation des cellules de Sertoli à la puberté

La puberté représente un moment important dans le développement de la population de cellules de Sertoli. Au cours de leur différenciation, les cellules de Sertoli acquièrent les fonctions nécessaires pour soutenir et répondre aux besoins nutritionnels des cellules germinales (**Figure 22**) (Tarulli, Stanton, et Meachem 2012). Les transformations morphologiques et fonctionnelles des cellules de Sertoli jouent un rôle déterminant dans la physiologie du testicule adulte (capacité proliférative, organisation des protéines de jonction, perméabilité de la barrière hémato-testiculaire). Les anomalies de la mise en place des fonctions testiculaires auxquelles les cellules de Sertoli sont associées engendrent des troubles du développement regroupés dans le syndrome de dysgénésie testiculaire, comme les hypospadias, la cryptorchidie voire les cancers germino-testiculaire (Arendt et al. 2019; Nistal, Gonzalez-Peramato, et De Miguel 2013; Tarulli et al. 2013; Skakkebak, Rajpert-De Meyts, et Main 2001).

Plusieurs acteurs sont impliqués dans la différenciation cellulaire des cellules de Sertoli. On connaît bien le rôle du bouleversement hormonal pendant la puberté orchestrée par les hormones, telles que l'hormone folliculostimulante (FSH), les androgènes et l'hormone thyroïdienne. Des études montrent que les cellules germinales ont également une influence sur l'induction de la différenciation des cellules de Sertoli. Des analyses *in vitro* montrent que l'élimination des cellules germinales lors d'un choc hypotonique diminue la sécrétion de la protéine de liaison aux androgènes, de la transferrine et de l'inhibine par les cellules de Sertoli et la réintroduction des cellules germinales semble renversée cet effet (Galdieri, Monaco, et Stefanini 1984; Le Magueresse et Jégou 1988; Castellón, Janecki, et Steinberger 1989; Allenby, Sharpe, et Foster 1990). En complément d'autres travaux montrent aussi que les spermatozoïdes et les spermatides, secrètent des facteurs de croissance capables de réguler la production d'inhibine ainsi que les protéines de jonctions intercellulaires (Nicholls et al. 2009).

1.2.2.1.2 Barrière hémato-testiculaire

La Barrière Hémato-Testiculaire (BHT) est un élément structurel central dans la physiologie testiculaire dont l'objectif est de créer un microenvironnement adapté à la spermatogenèse.

Elle est assurée par les cellules de Sertoli reliées entre elles par de fortes jonctions occlusives, des desmosomes ou des jonctions communicantes permettant le cloisonnement avec l'espace interstitiel (Cheng et Mruk 2009; Cheng et al. 2010). L'intérêt de ce complexe réside en ce que les jonctions occlusives, constituent une véritable barrière anatomique aux substances issues de la circulation sanguine. La BHT peut-être caractérisée selon trois composantes : anatomique, physiologique et immunologique. La barrière anatomique est composée, par la membrane basolatérale des cellules de Sertoli, la membrane apicale et le complexe de jonctions serrées entre les cellules (Mital, Hinton, et Dufour 2011). Chacun de ces éléments régule la diffusion de l'eau, des électrolytes, des ions, des nutriments, des acides aminés et des hormones dans le compartiment adluminal (Means et al. 1980).

La BHT est donc essentielle à (i) au maintien de l'architecture des cellules de Sertoli, (ii) à la production du liquide tubulaire en créant un micro-environnement essentiel à la méiose et à la spermiogenèse, (iii) à l'intégrité de la membrane plasmique des cellules de Sertoli contenant des récepteurs membranaires comme celui de la FSH (Fawcett et Burgos, 1956). Ainsi, la BHT forme une barrière immunologique qui empêche les antigènes des cellules germinales méiotiques et post-méiotiques de générer des réactions auto-immunes délétères à la fertilité. Selon plusieurs auteurs, il apparait que la FSH et la testostérone soient impliquées dans la formation, le contrôle et le maintien de la BHT (de Kretser et Burger, 1972 ; Kerr et coll., 1993).

Malgré le système complexe de jonctions intercellulaires, la BHT n'est pas hermétique en permanence et doit permettre la migration des cellules germinales en développement jusqu'à la lumière du tube. Elle montre en effet une restructuration très dynamique à des stades spécifiques de la spermatogenèse permettant le passage des cellules germinales qui continuent d'être étroitement ancrées aux cellules de Sertoli *via* les desmosomes (Russell 1978).

1.2.2.1.3 Rôle nutritif et hormonal des cellules de Sertoli

Il est bien établi que la cellule de Sertoli produit le liquide tubulaire, des peptides, des protéines et des stéroïdes (Bardin et coll., 1988; Griswold, 1988; Jégou, 1992, 1993). Cela justifie son statut de cellule nourricière qui veille au bon déroulement de la spermatogenèse. Alors qu'une partie des produits des cellules Sertoli est adressée vers le lumen des tubules où le fluide transporte les spermatozoïdes fraîchement différenciés ; les produits nécessaires aux

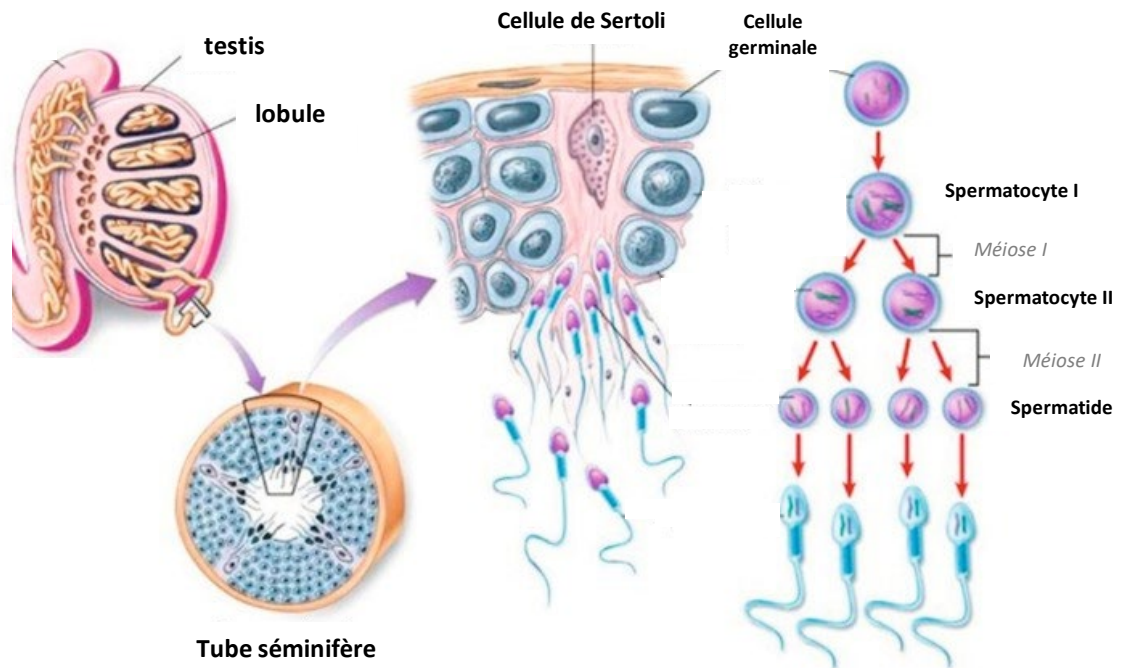


Figure 22 : Anatomie du testis et spermatogenèse.

Le testis est divisé en lobules contenant les tubes séminifères. Ces derniers sont entourés d'une lame basale sur laquelle reposent les cellules de Sertoli qui englobent les cellules germinales en cours de maturation. Au cours de la spermatogénèse, la cellule germinale immature diploïde se différencie en spermatocyte primaire, puis en spermatocytes secondaires avant d'atteindre le stade de spermatides après les deux divisions méiotiques. Ces derniers subiront différentes phases de maturation pour devenir *in fine* des spermatozoïdes. Adapté de Allais-Bonnet et coll. 2014 *Front Cell Dev Biol*.

cellules germinales précoces, cellules myoïdes périlitubulaires, et aux cellules Leydig sont sécrétés vers le compartiment basal. Ce dernier se distingue du compartiment apical dans lequel se déroule généralement les divisions mitotiques, méiotiques et la spermiogenèse (Gunsalus et Bardin, 1991; Byers et coll., 1993).

Parmi les protéines produites par les cellules de Sertoli figurent les hormones appelées inhibine et activine qui jouent respectivement un rôle clé dans les rétrocontrôles négatifs et positifs sur la production de la gonadotrophine FSH. L'hormone antimüllérienne (AMH) est une autre hormone protéique essentielle exclusivement produite par la cellule de Sertoli et dont l'activité provoque la résorption des canaux de Müller pour favoriser la masculinisation du tractus urogénital pendant la vie fœtale. Il convient de noter que l'AMH est toujours produite à tous les âges de la vie, mais son rôle paracrine (c.-à-d., dans le tubule séminifère) ainsi que sa fonction endocrine (par la circulation sanguine) sont largement inconnus chez le mâle adulte.

1.2.2.2 Spermatozoïdes : stade final de la différenciation des cellules germinales

La spermatogenèse peut être divisée en deux étapes : spermatocytogenèse et spermiogenèse. La spermatocytogenèse débute avec les spermatogonies, cellules germinales immatures dont la majorité subit des divisions mitotiques asynchrones avec une cellule fille se différenciant en spermatocyte primaire tandis que la deuxième reste spermatogonie pour entretenir la réserve de cellules souches (**Figure 22**). Les divisions mitotiques des spermatogonies durent 16 jours. Au cours de cette phase, la cellule germinale située dans le compartiment basal migre vers le compartiment adluminal. La poursuite de la maturation des spermatogonies dirige la cellule vers le stade spermatocyte primaire. Après une phase de croissance et la première division méiotique qui durent 24 jours, il devient spermatocyte secondaire. À la fin de ce processus se produit la seconde division méiotique avec la formation de deux spermatides rondes haploïdes. La durée de cette phase de la spermatogenèse ne dure que quelques heures.

La deuxième étape de la spermatogenèse correspond à la spermiogenèse au cours de laquelle une spermatide ronde se transforme en spermatozoïde. Ce processus d'environ 24 jours comprend des étapes de spécialisation comme la condensation du noyau, la formation de l'acrosome (qui contient des enzymes nécessaires à la lyse de la membrane externe de l'ovule), le développement du flagelle (indispensable à sa mobilité), et une réduction du

cytoplasme. Le spermatozoïde toujours incapable de se mouvoir par lui-même, doit subir une dernière étape de maturation dans l'épididyme pour gagner en mobilité.

1.3 REGULATION DES FONCTIONS TESTICULAIRES PAR FXR α

Plusieurs études démontrent que FXR α est exprimé dans le testicule humain depuis le premier trimestre de la grossesse ainsi que dans les testicules d'autres espèces comme la souris (Muczynski et al. 2012; Martinot, Sèdes, et al. 2017). Chez la souris adulte, l'expression de FXR α a été décrite dans l'espace interstitiel, principalement dans les cellules de Leydig (Volle et al. 2007). Cette expression a été confirmée à la puberté lorsque les cellules de Leydig commencent à produire des concentrations de testostérone caractéristiques de l'adulte (Baptissart et al. 2016). L'utilisation de modèles murins a défini l'expression spatio-temporelle du récepteur Fxr α dans le testicule tout en démontrant son expression dans la lignée germinale et plus particulièrement dans les cellules germinales indifférenciées (Martinot, Sèdes, et al. 2017). En complément, une étude réalisée chez les amphibiens a également montré l'expression de Fxr α dans les cellules germinales primordiales et les spermatogonies (Alfaro et al. 2002). Chez l'Homme, une étude récente menée par Guo *et coll.* a montré par des études transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique (Single cell) une expression de Fxr α dans les cellules de Leydig et dans les cellules germinales à plusieurs stades de maturation (Guo et al. 2018). Ces résultats suggèrent fortement que le récepteur nucléaire FXR α puisse être impliqué dans le contrôle des fonctions endocrines et exocrines du testicule.

1.3.1 FXR α et fonction endocrinienne

Le premier rôle décrit de FXR α dans le testicule repose sur sa participation à la fonction endocrinienne. En effet, l'utilisation de souris FXR α -/- en combinaison d'approches pharmacologiques utilisant l'agoniste synthétique de FXR α , GW-4064 a démontré que le gène codant pour le récepteur Shp, gène cible de Fxr α dans le foie, est également un gène cible dans les cellules de Leydig (Volle et al. 2007). Il a été démontré que l'augmentation de Shp est alors associée à la répression de l'expression et/ou de l'activité transcriptionnelle du récepteur Lrh1 et de Sf-1 qui sont décrits pour réguler positivement l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse (Volle et al. 2007). Ainsi, la diminution de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse *Star*, *Cyp11a1* et *3 β -Hsd* après l'activation du récepteur Fxr α par son agoniste

dépend du récepteur nucléaire Shp (Volle et al. 2007). La participation du récepteur Shp à cette répression est soutenue par l'absence de variation des niveaux de testostérone chez les animaux invalidés pour le récepteur Shp (Shp^{-/-}) et traités avec l'agoniste synthétique GW-4064. De plus, les souris mutantes Shp^{-/-} montrent des niveaux plus élevés de testostérone plasmatique et testiculaire liés à une maturation précoce du tractus génital masculin. En effet, la maturation sexuelle masculine est une période de développement clé selon le statut hormonal. L'identification de la participation de Fxr α sur la régulation de la fonction endocrinienne testiculaire a posé la question de son implication potentielle dans la maturation sexuelle masculine à la puberté. Ceci a été soutenu par des données associant des modèles expérimentaux des troubles hépatiques et une altération de la puberté (Van Thiel et al. 1985). Ces modèles expérimentaux ont montré des niveaux inférieurs de testostérone et de plus petits testicules. Récemment, les travaux de Baptissart ont permis d'élucider l'implication des AB et de leur récepteur Fxr α dans l'échec de la maturation sexuelle induit par une hausse des concentrations d'acides biliaires circulants lors d'une cholestase (Baptissart et al. 2016). L'administration d'un régime complétement avec de l'acide cholique ou du ligand GW4064 chez des souris mâles de 21 jours entraîne une altération de la spermatogenèse soulignant les effets délétères d'une exposition aux AB pendant la période pubertaire (Baptissart et al. 2016). Dans ce contexte, les testicules d'animaux exposés aux AB ont montré un nombre inférieur de spermatides allongés suggérant que la maturation sexuelle ait été retardée, ce qui a été corrélée à une production inférieure de sperme et à une fertilité réduite (Baptissart et al. 2016). Ce défaut dans la spermatogenèse causé par une augmentation du taux apoptotique des cellules germinales en réponse à une hausse des AB est corrigé par la testostérone renforçant le lien entre le récepteur Fxr α et la régulation de l'activité endocrine du testicule (Baptissart et al. 2016).

Chez les souris adultes, il apparait que Fxr α puisse exercer des effets locaux sur les cellules de Leydig et ce, de façon indépendante de l'axe hypothalamo-pituitaire bien que des liens existent entre la fonction de Fxr α et la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, il est montré que le récepteur Fxr α diminue la synthèse de testostérone en réprimant l'expression du gène codant pour le récepteur à la LH (Lhcgr)(Holota et al. 2019). Ceci mène à une diminution de la sensibilité à l'axe hypothalamo-hypophysaire, qui est le régulateur principal de la fonction endocrinienne du testicule. De plus, il a été démontré que l'expression

du récepteur Shp est diminuée en réponse à une stimulation par la LH dans le testis (Vega et al. 2015). Ceci suggère que les voies de signalisation locales pourraient participer à la régulation précise de la fonction endocrinienne en interaction avec l'axe gonadotrope.

Cette implication de Fxr α dans le contrôle de la synthèse des stéroïdes au niveau du testicule semble également conservée chez d'autres espèces. En effet, les cellules porcines de Leydig traitées avec l'acide chénodéoxycholique (CDCA), montrent elles aussi une baisse de la production de stéroïdes sexuels après activation du récepteur FXR α par son agoniste naturel (Gray et Squires 2013).

Même si les AB exogènes sont montrés pour réprimer la synthèse d'hormones stéroïdes dans le testicule, la question du ligand endogène de FXR α dans le testicule demeure. Récemment, l'équipe a montré que le testicule est capable de synthétiser des acides biliaires (Martinot, Baptissart, et al. 2017). L'Androstérone, un métabolite de la testostérone s'est aussi montré être un activateur FXR α (S. Wang et al. 2006). Ces données suggèrent qu'une boucle locale de rétrocontrôle sur la synthèse d'androgène pourrait exister.

A côté de la régulation de la synthèse des androgènes, certaines études ont démontré un croisement entre la signalisation initiée par le récepteur FXR α et la synthèse des œstrogènes (Baptissart et al. 2013). Des études *in vitro* ont démontré que FXR α réduisait l'expression du gène codant pour l'aromatase (Catalano et al. 2010). Au niveau moléculaire, il a été démontré que FXR α agit en concurrence avec SF1 sur des sites de liaison du gène codant pour l'aromatase et donc sur son expression. Cependant, ces mécanismes doivent encore être élucidés *in vivo*.

Les concentrations de stéroïdes plasmatiques résultent d'un équilibre entre leur synthèse et leur catabolisme. Le foie soutient essentiellement l'inactivation et l'élimination des stéroïdes. Il faut considérer que les impacts de FXR α sur les hormones sexuelles pourraient impliquer le catabolisme des stéroïdes probablement au niveau du foie. En effet, dans quelques études il a été démontré que les souris mâles adultes nourries avec un régime enrichi en acide cholique de 0,5% pendant plusieurs mois ont montré une altération de la concentration de testostérone plasmatique avec des concentrations intra-testiculaires normales (Baptissart et al. 2014). Il a ainsi été démontré que ces animaux expriment une quantité hépatique accrue de CYP3A11 et UGT2B34 suggérant un catabolisme hépatique de la testostérone (Baptissart

et al. 2014). Les acides biliaires sont capables, *via* FXR α , d'induire l'expression de plusieurs enzymes cataboliques telles que UGT2B4 ou CYP3A11.

1.3.2 FXR α dans les cellules germinales masculines

La fonction exocrine du testicule correspond à la production de spermatozoïdes pour assurer la fertilité masculine. Des études récentes chez la souris ont montré une accumulation anormale de cellules germinales indifférenciées dans les testicules de souris invalidées pour FXR α (Martinot, Sèdes, et al. 2017). Ce travail a posé l'hypothèse que FXR α puisse aider à établir et à maintenir le contingent de cellules germinales indifférenciées afin de préserver la fertilité masculine tout au long du vieillissement. En ce sens, les mâles *Fxr* α -/- montrent une production plus élevée de spermatozoïdes que des souris contrôles. Ceci est associé au maintien de la fertilité chez les animaux mâles *Fxr* α -/- tout au long du vieillissement à un moment où le déclin de la fertilité chez les souris de type sauvage est normalement observé. Ces données soutiennent donc l'idée que le récepteur FXR α participe à l'homéostasie des cellules souches spermatogoniales (SSC), qui est la seule population cellulaire à présenter une capacité régénératrice. La démonstration que FXR α contrôle l'expression de plusieurs gènes connus pour être impliqués dans l'établissement de la population de SSC rappelle le phénotype des animaux mutants perte de fonction pour la protéine déméthylase de l'histone H3 Jumonji domain-containing protein D3 (*Jmjd3*) qui présente des testicules plus lourds et une capacité à se reproduire plus longtemps que les animaux sauvages utilisés comme contrôle (Iwamori, Iwamori, et Matzuk 2013). De même, un phénotype proche aux mâles *Fxr* α -/- a été observé chez les souris déficientes pour ER β (*Ers2*) avec une augmentation du nombre de cellules germinales indifférenciées en période postnatal (Delbès et al. 2004) ce qui renforce la participation de FXR α au maintien de l'homéostasie de la lignée germinale.

D'autres études peuvent également contribuer à éclairer comment FXR α régule la biologie des cellules germinales indifférenciées en modifiant l'expression de gènes de pluripotence tels que OCT3/4 et NANOG en contrôlant l'expression de Lin28 chez la souris puisque des liens ont été démontré entre Lin28 et OCT3/4 (West et al. 2009). Même si ces différentes données suggèrent que Lin28 puisse être un médiateur de l'effet de *Fxr* α dans la formation de la réserve de cellules souches spermatogoniales (SSC). Les mécanismes par lesquels *Fxr* α contrôle l'expression de Lin28 restent à identifier. Cet impact de *Fxr* α sur l'accumulation des cellules germinales indifférenciées est également soutenu par l'utilisation de l'agoniste synthétique

GW-4064, qui conduit à un nombre plus faible de tubules séminifères positifs pour le facteur PLZF, marqueur des spermatogonies A (Sèdes et al. 2018).

En plus de sa participation au maintien du nombre de cellules germinales indifférenciées, il apparaît que ce récepteur puisse également réguler le processus de différenciation des cellules germinales puisqu'une entrée précoce des cellules spermatogoniales en méiose a été observée chez les souris mâles $Fxr\alpha^{-/-}$ (Martinot, Sèdes, et al. 2017). En prévenant la dégradation des rétinoïdes nécessaires à l'activation de la phase de division méiotique, la baisse d'expression de l'enzyme CYP26B1 chez les animaux invalidés pour $Fxr\alpha$ pourrait fournir une explication pour comprendre pourquoi ces cellules spermatogoniales s'engagent précocement en méiose en l'absence de $Fxr\alpha$. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur à l'acide rétinoïque prévient la différenciation des cellules germinales chez les mâles $FXR\alpha^{-/-}$ ce qui permet de renforcer cette hypothèse.

Ainsi l'ensemble de ces données suggère que $Fxr\alpha$ puisse contrôler certaines activités dans la lignée germinale afin de maintenir une spermatogenèse efficace et autonome. En complément, il a été démontré que $FXR\alpha$ contrôle également la survie des cellules germinales d'une manière indépendante des androgènes pendant la période postnatale, par la régulation de l'expression de la caspase-6 (Martinot et al. 2017), une cible connue des voies de signalisation activées par les acides biliaires dans le foie (Rust et al. 2009). Enfin, il n'est pas exclu que $Fxr\alpha$ puisse contrôler la différenciation de la lignée germinale en agissant sur les cellules de Sertoli puisque l'absence de $Fxr\alpha$ semble diminuer le nombre de cellules Sertoli (Martinot, Sèdes, et al. 2017), puis modifier leur maturation au cours du développement postnatal en accélérant leur alignement au niveau de la membrane basale des tubules séminifères pendant les 10 premiers jours de la vie chez la souris (Sèdes et al. 2018).

Les liens entre $FXR\alpha$, l'homéostasie testiculaire et le contrôle de la fertilité masculine sont soutenus aussi par des données qui démontrent que les souris invalidées pour le gène codant pour $Fxr\alpha$ sont plus sensibles à une exposition aux AB et qu'une exposition à court terme (15 jours) altèrent la fertilité en provoquant une diminution de la production de sperme due à une apoptose accrue de cellules germinales méiotiques indépendamment du statut d'androgène (Martinot, Baptissart, et al. 2017). Au niveau moléculaire, les mécanismes ont été en partie définis et ont mis en évidence un rôle inattendu du récepteur constitutif de l'androstane (CAR), dans le testicule. En effet, les auteurs de cette étude ont démontré que

les mâles $Fxr\alpha^{-/-}$ nourris avec un régime riche en AB présentaient une homéostasie testiculaire altérée associée à l'accumulation de métabolites intermédiaires des AB définis comme des modulateurs négatifs de CAR. Le crosstalk avec les voies de signalisation CAR dans les souris $Fxr\alpha^{-/-}$ a été soutenue par des données montrant que l'administration de l'agoniste de CAR contrecarre l'impact du régime riche en AB (Martinot, Baptissart, et al. 2017). Enfin il a été démontré que $Fxr\alpha$ est exprimé dans les spermatozoïdes et que les niveaux accrus d'acides biliaires modulent les paramètres métaboliques (triglycérides) dans les spermatozoïdes. Si les AB semblent modifier les caractéristiques du sperme, l'inhibition de $FXR\alpha$ par la guggulstérone inhibe ces modifications. Sur la base de ces données, il est aussi suggéré que les AB et le récepteur $FXR\alpha$ modifient l'homéostasie du sperme et puissent participer à l'infertilité d'origine idiopathique (Malivindi et al. 2018).

1.3.3 $FXR\alpha$, spermatogenèse et environnement

Il a été démontré dans le foie et le testicule que $FXR\alpha$ contrôle l'expression de nombreux gènes codant des transporteurs aux xénobiotiques (Maeda et al. 2004; Garcia et al. 2018). Ces données suggèrent que $FXR\alpha$ pourrait avoir un rôle majeur dans la détoxification testiculaire des molécules exogènes. Ces données ont mené à l'hypothèse qu'un lien pourrait exister entre les molécules exogènes, leurs impacts délétères sur la fertilité masculine et $FXR\alpha$ (Garcia et al. 2018).

L'incidence croissante des pathologies du tractus urogénital masculin a été associée à l'exposition à des molécules environnementales (ME). La liste des ME perturbatrices s'allonge régulièrement (polluants, pesticides, médicaments) et leur activité peut être médiée par de nombreux effecteurs. La plupart de ces ME, altérant les fonctions reproductrices masculines, ont été démontrées pour avoir des activités anti-androgènes ou œstrogénomimétiques (Casals-Casas et Desvergne 2011).

Plusieurs études ont mis en évidence les impacts des expositions aux ME sur le métabolisme des AB (Vega et al. 2014) et plusieurs ME ont également été décrites comme des modulateurs potentiels de $FXR\alpha$ (Hsu et al. 2014). Récemment, des travaux originaux ont montré que la voie de signalisation dépendante de $FXR\alpha$ pourrait être un médiateur essentiel de l'action de certaines de ces molécules environnementales. En effet, il a été démontré que l'exposition combinée pendant les périodes fœtales/néonatales au bisphénol A (BPA, un perturbateur

endocrinien bien connu) et au stigmastérol (un antagoniste naturel de FXR α) a conduit à une diminution accrue de la fertilité par rapport à l'exposition à chacune de ces molécules de façon indépendante (Sèdes et al. 2018). Ceci a été corrélé à une diminution du nombre de spermatogonies indifférenciées, de spermatides et de spermatozoïdes, puis associé à des anomalies de la fonction reproductrice masculine. La participation de Fxr α a été soutenue par le fait que les souris mâles Fxr α -/- n'étaient presque pas affectées. Il est intéressant de noter que le BPA seul a eu moins d'effet sur les mâles Fxr α -/- suggérant une interaction entre les voies de signalisation induites par le Fxr α et le BPA. Ce résultat semble cohérent avec une accumulation moins importante d'Esr2 dans les testicules des animaux Fxr α -/- (Martinot, Sèdes, et al. 2017), bien qu'une autre explication ait été donnée avec le contrôle de l'expression de Fxr α par la voie de signalisation médiée par le BPA dans les cellules germinales, par des mécanismes similaires à ceux décrits dans le foie (Susiarjo et al. 2017).

Toutes ces données démontrent que Fxr α pourrait favoriser l'activité de certaines ME telles que le BPA pour diriger leurs effets néfastes sur les fonctions du testicule et la fertilité. Il est important de noter que ces effets sont transposables à l'homme puisque les effets délétères de la co-exposition au Bisphénol A et au stigmastérol ont été observés également sur des explants de testicules humains (Sèdes et al. 2018). Par ailleurs, les travaux de Hsu ont démontré l'action antagoniste de xénobiotiques utilisés comme insecticides telles que la cyfluthrine ou la bifenthrine sur l'activité de FXR α (Hsu et al. 2014), ce qui ouvre la perspective d'une plus grande étendue du rôle de FXR α dans le développement des maladies environnementales et particulièrement des troubles de la fertilité masculine incluant les cancers germinaux du testicule.

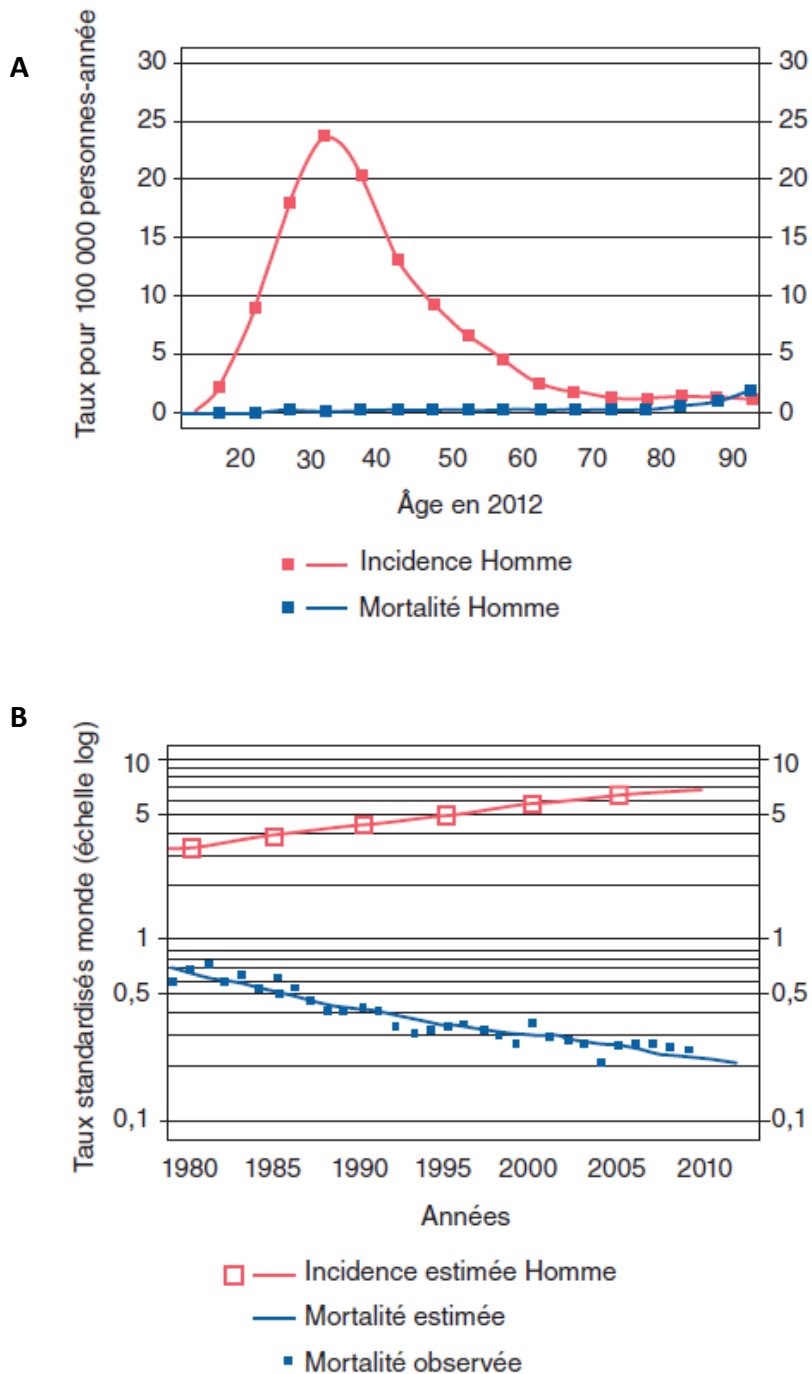


Figure 23 Incidence et mortalité du cancer du testicule.

A) La courbe de l'incidence par âge montre qu'en 2012, le pic d'incidence est atteint pour la classe d'âge 30-34 ans. **(B)** Tendence chronologique de l'incidence et de la mortalité du cancer du testicule en France. La faible mortalité des cancers du testicule est en diminution depuis 1980 passant de 0,7 à 0,2 pour 100 000 personnes-année entre 1980 et 2012. Issu de Rébillard et coll. 2013. *Prog Urol.*

2 PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE ET ETUDE DE LA FONCTION DU RECEPTEUR FXR α DANS L'ETIOLOGIE DES CANCERS GERMINAUX DU TESTICULE

Comme présenté dans les sections précédentes, la fonction testiculaire est le résultat d'un processus embryologique coordonné et initié au cours de la vie intra-utérine. Chaque étape est contrôlée de façon précise par différents gènes, protéines et/ou enzymes qui orchestrent le développement du testicule afin que ce dernier puisse remplir sa fonction endocrine (sécrétion d'hormones) et sa fonction exocrine (production de gamètes) à l'âge adulte. Les troubles de la fonction endocrine/exocrine du testicule et leurs liens avec l'apparition de tumeurs germinales du testicule ont justifié de nombreuses études au cours des dernières décennies. Bien que la part relative des facteurs génétiques et environnementaux dans l'apparition de ces tumeurs ne soit pas simple à déterminer, la hausse de leur incidence a suscité de nombreux travaux visant à identifier les facteurs de risques susceptibles d'expliquer leur forte augmentation depuis les trente dernières années (**Figure 23**). La définition de nouveaux acteurs moléculaires de la maladie représente toujours un enjeu important non seulement pour discriminer les différents types de cancers du testicule mais aussi pour valider des facteurs prédictifs de l'évolution de la maladie et de sa résistance aux traitements. Cela permettra d'ouvrir de nouvelles perspectives pour mieux comprendre la biologie de ces tumeurs, puis améliorer le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un cancer du testicule.

2.1 DES TROUBLES DE LA GAMETOGENESE COMME LESIONS PRECURSEURS DES TUMEURS GERMINO-TESTICULAIRES

Au cours des phases précoces de l'embryogenèse, la maturation et la différenciation des cellules germinales se déroulent sous l'influence de facteurs du microenvironnement. A partir de la troisième semaine de développement fœtal chez l'homme, une population de cellules germinales primitives (PGC, *primordial germ cells*) appelées gonocytes primordiaux apparaît au sein de l'endoderme du sac vitellin pour coloniser les crêtes génitales après migration au travers de l'intestin primitif de l'embryon. La motilité des PGC fait intervenir des mécanismes

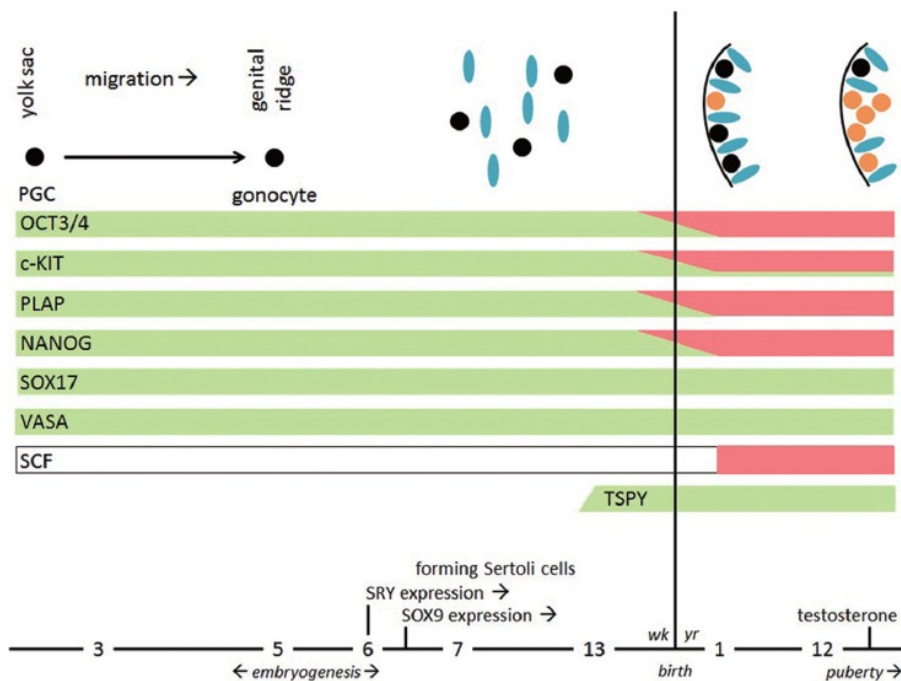


Figure 24 : Expression des marqueurs du développement normal et pathologique du testicule. A partir de la 3^e semaine de développement, les cellules germinales primordiales (*PGC, primordial germ cell*) migrent du sac vitellin vers les crêtes génitales (*genital ridge*) sous l'influence du facteur *KITLG (SCF, stem cell factor)*. A ce stade, les PGC ou gonocytes, expriment les marqueurs de la pluripotence *c-KIT, OCT3/4* et *NANOG*. Dès la 6^e semaine, l'expression des gènes *SRY* et *SOX9* dirige la formation des cordons séminifères et l'organisation des futurs tubes séminifères renfermant les gonocytes et les cellules de Sertoli. Après 13 semaines, le facteur *TSPY (testis specific protein on the Y chromosome)* des gonocytes stimulera leur prolifération qui s'accompagnera d'une chute de l'expression de *c-KIT, OCT3/4* et *NANOG* qui sont utilisés comme marqueurs de diagnostic des carcinomes *in situ (CIS)* et des TGT. ● cellules germinales; ● cellules de Sertoli; ● cellules de CIS. Séquences associées au développement normal ■ et pathologique ■ du testicule. Issu de *Elzinga-Tinke et coll. 2015 Asian J Androl.*

de chimiotactisme où le facteur de croissance KIT (KITLG ou SCF, *stem cell factor*), produit par les cellules somatiques environnantes, et le récepteur membranaire à activité tyrosine kinase c-KIT, présent à la surface des PGC, jouent un rôle prépondérant (Mahakali Zama, Hudson, et Bedell 2005; Runyan et al. 2006). Après une phase de multiplication importante dans l'épithélium des crêtes génitales, d'autres facteurs diffusibles tel que l'acide rétinoïque permettent le maintien et la différenciation des gonocytes en cellules spermatiques immatures nommées spermatogonies enserrées parmi les cellules de Sertoli (**Figure 22**). Ce microenvironnement constitué au niveau des cordons testiculaires dirige cette première étape de différenciation qui s'accompagne d'une perte de l'expression des marqueurs géniques de la pluripotence OCT3/4 (*Octamer-binding transcription factor 3/4*) et NANOG (*Nanog homeobox*) ainsi que de la migration des spermatogonies de la lumière vers la membrane basale des futurs tubes séminifères. Des facteurs sécrétés par les cellules somatiques des cordons testiculaires inhibent la multiplication des spermatogonies et leur différenciation en spermatozoïdes jusqu'à la puberté où des acteurs relais de l'action des androgènes, produits par les cellules interstitielles de Leydig, entretiennent la spermatogenèse pendant la vie adulte.

Les troubles de la prolifération et de la différenciation des gonocytes primordiaux en spermatogonies sont des altérations souvent incriminées pour expliquer l'histoire naturelle des Tumeurs Germino-testiculaires (TGT) (Skakkebak, Rajpert-De Meyts, et Main 2001). Ces lésions précurseurs appelées néoplasies germinales intratubulaires (*Germ Neoplasia In Situ*, GNIS) s'apparentent aux gonocytes primordiaux et expriment les gènes de pluripotence OCT3/4 et NANOG ainsi que le récepteur c-KIT suggérant une participation du facteur de croissance KITLG dans la prolifération, la migration et la survie de ces cellules souches germinales (**Figure 24**) (Meyts et al. 1998). L'origine de ces perturbations n'est pas encore comprise mais il apparaît vraisemblable qu'une combinaison de facteurs (épi)génétiques et (micro)environnementaux perturbe le développement des cellules de Sertoli et de Leydig pour créer un environnement délétère à la différenciation des cellules germinales primitives. Ces arguments, en plus de la description de GNIS chez les nouveau-nés renforcent l'hypothèse d'une composante fœtale de la maladie. En complément, l'évolution de ces lésions en carcinome *in situ* (CIS) à partir de la puberté suggère également l'existence d'une composante potentiellement endocrinienne (Elzinga-Tinke, Dohle, et Looijenga 2015). Dans ce contexte,

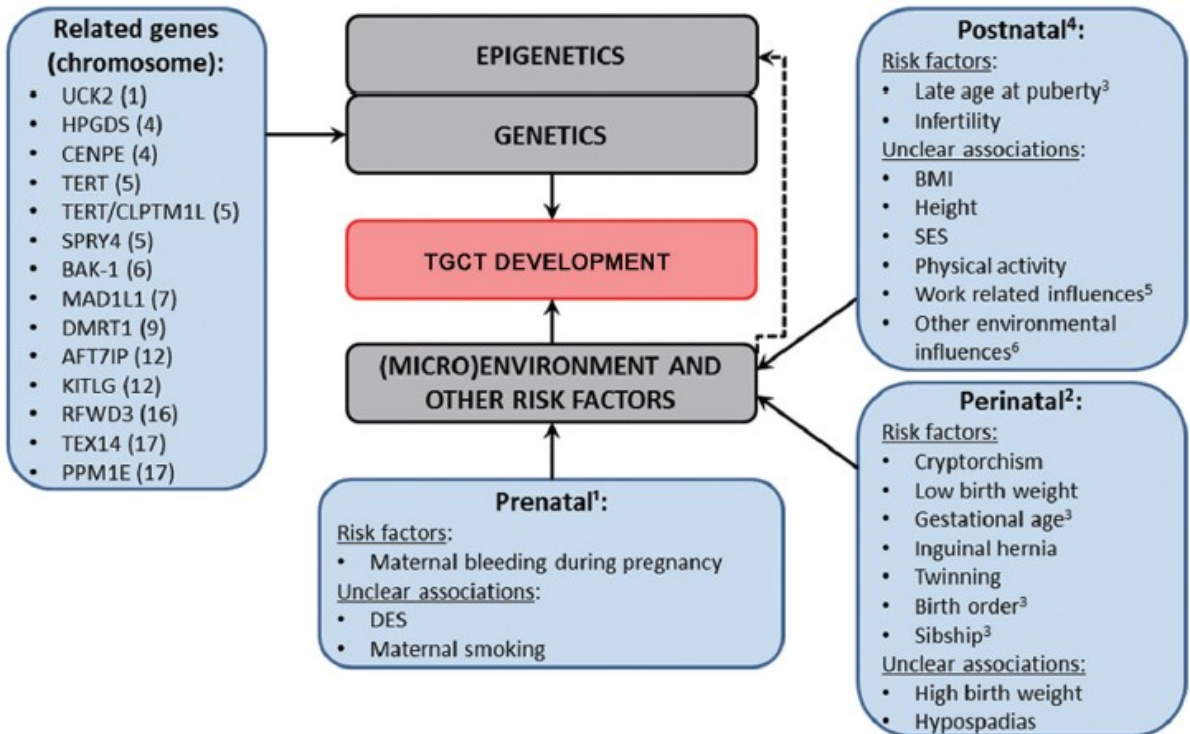


Figure 25 : Modélisation des risques (épi)génétiques et (micro)environnementaux du cancer germlinal du testicule. Présentation des principaux facteurs d'étiologie des tumeurs germinales du testicule. *Issu de Elzinga-Tinke et coll. 2015. Asian J Androl.*

les modifications hormonales se manifestant à des moments sensibles du développement du testicule semblent également favoriser une phase pendant laquelle les cellules de carcinome *in situ* issues de GNIS prolifèrent pour former une tumeur chez le jeune adulte.

2.2 PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUES ET ALTERATIONS DECRITES DANS LES TGT

A ce jour, les antécédents familiaux, les syndromes de dysgénésie gonadique (hypospade, cryptorchidie) les infertilités, les altérations (épi)génétiques et les expositions à des molécules environnementales sont considérés comme des facteurs de risques du cancer du testicule (**Figure 25**). Si de nombreux arguments montrent que des altérations de la prolifération et de la différenciation des PGC pendant la vie fœtale jouent un rôle déterminant dans le cancer du testicule, peu de facteurs (épi)génétiques clairement responsables du cancer ont été identifiés jusqu'à présent. Parmi les nombreux produits de gènes étudiés sur la base d'arguments épidémiologiques et d'antécédents familiaux, ceux qui contrôlent la voie de signalisation activée par KITLG et son récepteur c-KIT semblent jouer un rôle important dans la pathogénie des TGT. En effet l'expression de ce récepteur, normalement perdue dans les cellules germinales différenciées, est maintenue dans les cellules de CIS renforçant l'idée que les cellules précurseurs de ces néoplasies sont en fait des gonocytes dont la différenciation en spermatogonies a été bloquée (Rajpert-De Meyts 2006). Des études de génomiques multifactorielles ont défini plusieurs gènes candidats supplémentaires pour décrire l'étiologie des GNIS et leur transition du stade de CIS vers un stade invasif. Bien que le rôle de ces derniers ne soit pas encore précisé, des polymorphismes, mutations et/ou amplifications géniques sont fréquemment associés à des gains et des pertes d'activité. C'est particulièrement le cas pour le gène régulateur du cycle cellulaire *Tumor Protein P53* (TP53), ainsi que pour les gènes *Kirsten/Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS/NRAS), *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1* (BRAF) et *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) qui amplifient de façon inappropriée des signaux de prolifération et de survie cellulaire. A ces changements s'ajoutent d'autres altérations comme les défauts de méthylation des histones qui favorisent aussi le processus tumoral (Lambrot et Kimmins 2011). Enfin les modifications de gènes impliqués dans le métabolisme des hormones stéroïdes, notamment des enzymes de la famille CYP (cytochrome P450) et HSD17 (hydrosystéroïde déshydrogénase) interviennent également dans le processus de la maladie en réduisant la quantité

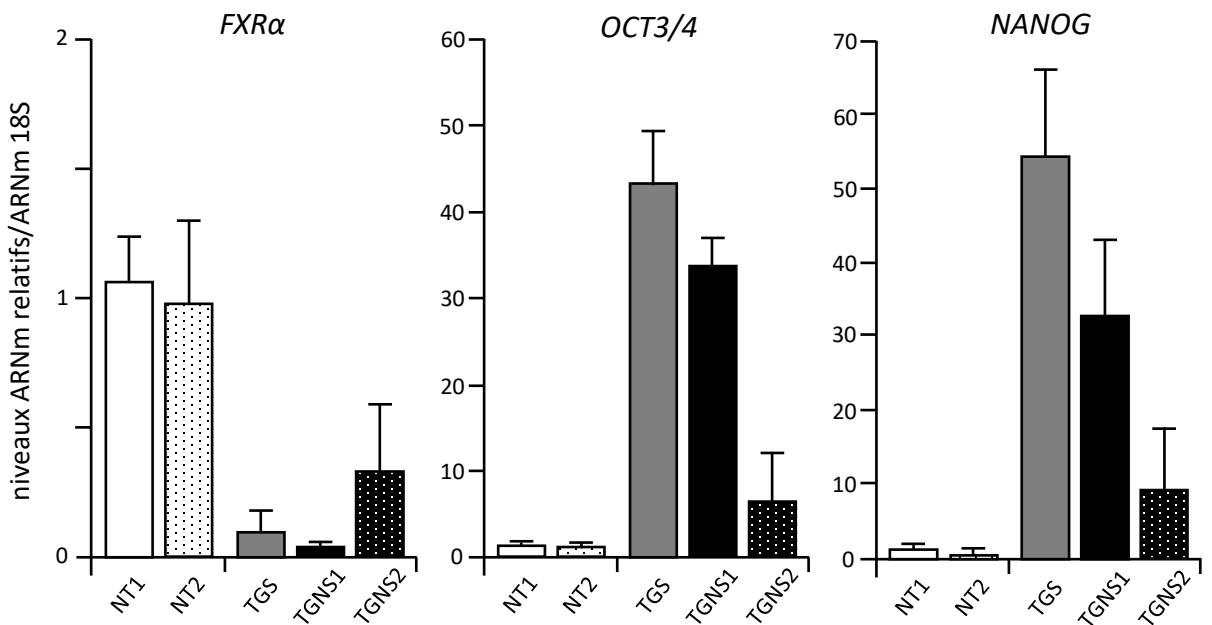


Figure 26 : Expression relative des facteurs *FXRα* (*NR1H4*), *OCT3/4* et *NANOG* dans des échantillons de testicule humain non transformé et dans des tumeurs germinales du testicule. Les ARN messagers préparés à partir de tissus non tumoraux (NT) et de tumeurs germinales séminomateuses (TGS) ou non séminomateuses (TGNS) ont été analysés par RT-qPCR avec des amorces spécifiques des transcrits des gènes *NR1H4*, *OCT3/4* et *NANOG*. NT1, azoospermie excrétoire (obstructive); NT2, azoospermie sécrétoire; TGS, séminome; TGNS1, carcinome embryonnaire; TGNS2, tératome (données non publiées).

d'androgènes biologiquement actifs pour altérer le microenvironnement des cellules germinales qui ne peuvent plus se différencier en spermatogonies ce qui mène à une accumulation inadéquate de gonocytes fœtaux indifférenciés à l'âge adulte dans le testicule malade (Sonne et al. 2009).

2.3 PRESENTATION DE LA PROBLEMATIQUE ET RESUME DU PROJET DE RECHERCHE.

Plusieurs travaux démontrent que le récepteur FXR α est exprimé dans le testicule humain depuis le premier trimestre de la grossesse, ainsi que dans les testicules fœtaux de souris. Les études récentes réalisées chez la souris ont montré une accumulation anormale de cellules germinales indifférenciées dans le testicule des animaux invalidés pour *Fxr α* (FXR $\alpha^{-/-}$) (Martinot, Sèdes, et al. 2017; Muczynski et al. 2012). En complément, la description d'une hausse des taux d'acides biliaires dans le testicule d'animaux *Fxr $\alpha^{-/-}$* souligne l'existence d'une voie métabolique active dans ce tissu (Martinot, Baptissart, et al. 2017). Or, la perte d'activité et/ou d'expression de *Fxr α* , tout comme la hausse inappropriée des concentrations en acides biliaires, sont associées à des troubles de la prolifération ainsi qu'à des modifications de la résistance à l'apoptose dans plusieurs tissus pour favoriser les transformations néoplasiques (Koutsounas, Giaginis, et Theocharis 2012).

De manière intéressante, les travaux réalisés par l'équipe d'accueil avant mon arrivée au laboratoire ont montré que l'abondance de FXR α est réduite dans les TGT chez l'homme en comparaison avec le testicule sain alors que les gènes de la pluripotence *OCT3/4* et *NANOG* sont augmentés (**Figure 26**). De plus, la perte d'activité et/ou de son expression augmente de façon anormale le nombre de cellules germinales souches (CGS) indifférenciées chez la souris pour générer des altérations semblables aux lésions précurseurs des TGT. Ces données interrogent sur la participation de ce récepteur à l'étiologie de la maladie et le travail qui m'a été confié s'est intégré dans la thématique générale du laboratoire qui vise à définir comment FXR α intervient pour contrôler la physiologie des CGS en lien avec le développement et la progression des TGT. **Avec pour objectif de déterminer si le récepteur nucléaire FXR α participe à l'étiologie des tumeurs germinales du testicule, mon travail de thèse s'est attaché à caractériser des lignées cellulaires modèles de tumeurs germinales séminomateuses et non séminomateuses en évaluant d'une part l'expression et l'abondance du récepteur aux acides biliaires FXR α , puis en validant d'autre part l'état**

fonctionnel de sa signalisation en présence d'agonistes synthétiques. En complément une analyse de banque de données publiques a complété cette approche afin de définir le profil d'expression de FXR α dans les tumeurs germinales du testicule. Enfin, la réalisation de ce travail a mené à l'identification d'un nouveau variant du récepteur aux acides biliaires FXR α dépourvu de sa seconde moitié du domaine de liaison à l'ADN que je me suis efforcé de caractériser au niveau moléculaire et fonctionnelle.

Méthodologie expérimentale et Résultats

Méthodologie

1 CULTURE CELLULAIRE ET ANALYSES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

1.1 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules humaines de tumeurs germinales séminomateuses TCam-2 (données par Ewa Rapjert de Meyst) (de Jong et al. 2008) et non séminomateuses NCCIT (ATCC®/CRL-2073) (Teshima et al. 1988) ont été maintenues en culture dans du milieu RPMI-1640 Gibco® contenant du sérum de veau fœtal (SVF;10% v/v), des antibiotiques (pénicilline/streptomycine 100U/ml) et de la L-Glutamine (2mM).

Les cellules de carcinome hépatique HepG2 (ATCC®/ HB-8065™), de carcinome embryonnaire N-Tera2 (ATCC®/CRL-1973™) et de GC-1 spg (ATCC®/CRL-2053™), cellules modèles de spermatogonies B de souris de 10 jours (ATCC/CRL-2053™), ont été toutes maintenues en culture dans du milieu DMEM, supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF;10%v/v), antibiotiques (pénicilline/streptomycine 100U/ml) et en L-Glutamine (2mM).

Les cellules MA-10 (ATCC®/ CRL-3050™), cellules de Leydig de souris, ont été entretenues dans du milieu Waymouth (Life Technologies) contenant 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine complétée par du sérum de cheval (HS;10% v/v).

Les cellules C18.4 (Hofmann et Roda 1984), cellules modèles de spermatogonies A, ont été cultivées dans du milieu DMEM F12 Gibco® contenant du sérum de veau fœtal (SVF;5% v/v), des antibiotiques (pénicilline/streptomycine 100U/ml) et de la L-Glutamine (2mM).

L'ensemble de ces lignées est disposé en milieu humide à 37°C, avec 5% de CO₂.

1.2 TRANSFECTION TRANSITOIRE

Pour les transfections transitoires avec les ARN interférents, 3-4 x 10⁵ /puit de cellules NCCIT ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et le lendemain, des transfections transitoires ont été réalisées avec le siRNA smart pool contre FXRα (ON-TARGETplus Human NR1H4 (9971) siRNA) et le siGFP (Baptissart et al. 2014) selon le protocole du transfectant Interférinte (PolyPlus transfection). Les cellules ont été récupérées 24h plus tard.

1.3 NUMERATIONS CELLULAIRES

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 4×10^5 cellules/puit dans du milieu RPMI ou DMEM sans rouge de phénol contenant 0,5% de SVF destéroïdé (v/v). Après 24 heures d'incubation, les agonistes synthétiques de FXR α GW4064 ([3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3' carboxy-2-chlorostilben-4yl)-oxymethyl-8 isopropylisoxazole] ; R&D System, cat#2473) et INT-747 (6-EthylChenoDeoxyCholic Acid ; Abcam #ab144246) ont été ajoutés aux cellules pour une incubation supplémentaire de 48 heures. Les cellules ont été ensuite décollées à la trypsine et récupérées dans un volume final de 1ml pour numération à l'aide d'un compteur automatique de cellules LUNA-IITM (Logos Biosystems).

1.4 ANALYSE DE L'ACTIVITE MITOCHONDRIALE

Les cellules NCCIT, TCam-2 et HepG2 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à des densités de $2,5 \times 10^3$, 5×10^4 et 1×10^5 cellules/puit dans leur milieu respectif sans rouge de phénol contenant 0,5% SVF destéroïdé (v/v). Le lendemain, des concentrations croissantes d'agonistes GW-4064 et INT-747 (0,1 à 50 μ M) ont été ajoutées pour 48 heures additionnelles, puis la viabilité cellulaire a été mesurée par transformation d'un sel de tétrazolium (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT ; Sigma M5655). Après 4 heures d'incubation, les cristaux de formazan formés ont été solubilisés par un solvant de reprise [80% isopropanol, 10% HCl 1N, 10% TritonX100], puis quantifiés par spectrophotométrie à l'aide d'un lecteur de plaques (Multiskan Go, Thermo scientific) à 570 et 690nm afin d'évaluer le nombre de cellules viables sur la base de leur activité mitochondriale.

2 EXTRAITS PROTEIQUES ET ANALYSES PAR WESTERN BLOT

2.1 EXTRAITS PROTEIQUES

Pour les extraits totaux, les cellules ont été rincées avec du D-PBS (Gibco, cat# 14200) 1X [138mM NaCl (pH 7.4), 8.06mM Na₂HPO₄-7H₂O, 1.47mM KH₂PO₄, 2.67mM KCl, 0.901mM CaCl₂, 0.493mM MgCl₂-6H₂O, 5.56mM D-glucose, 0.327mM sodium pyruvate] et récupérées dans 100 μ l de tampon RIPA [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate] contenant du PMSF (1mM), du NaF (1mM) du

Na_3VO_4 (10nM) et des inhibiteurs de protéases (Complete Boeringer Mannheim). Après un cycle de congélation et décongélation dans l'azote liquide, les cellules ont été lysées dans la glace par 2 cycles de sonication (15 sec) puis, les extraits ont été clarifiés par centrifugation à 14,000 rpm pendant 20 min à 4°C. Pour les fractions protéiques, les cellules ont été récupérées dans du D-PBS 1X et remises en suspension dans 200µl de tampon A hypotonique [10mM HEPES (pH 7.9), 10mM KCl, 1.5mM de MgCl_2 , 0.34M sucrose, 10% glycérol, 1mM DTT et inhibiteurs de protéases] additionné de Triton X 100 pour obtenir une concentration finale de 0,1% comme précédemment décrit (Kim et al. 2007). Les cellules ont ensuite été lysées avec une seringue munie d'une aiguille 26 Gauge, puis centrifugées pendant 5 min à 1,300 rcf à 4°C. Les surnageants S1 obtenus ont été centrifugés à 20,000 rcf pendant 5 min à 4°C pour constituer la fraction protéique cytosolique S2. Les culots P1 ont, quant à eux, été lavés dans 200µl de tampon A après élimination des surnageants, et remis en suspension dans 100µl de tampon B [3mM EDTA, 0.2mM EGTA, 1mM DTT et inhibiteurs de protéases]. Après une incubation de 30 min sur glace, les extraits P1 ont été centrifugés pendant 5 min à 1700 rcf à 4°C puis, les surnageants récupérés pour constituer la fraction nucléoplasmique (S3). Après un lavage avec 100µl de tampon B, puis centrifugation à 1,700 rcf pendant 5min à 4°C, les culots ont été conservés pour constituer la fraction enrichie en chromatine (P3). Pour chacune des fractions, les concentrations protéiques ont été évaluées à 562nm en présence d'acide bicinchoninique en milieu alcalin (BCA Assay).

2.2 WESTERN-BLOT

Après dosage, les échantillons protéiques ont été dénaturés à 95°C pendant 5 minutes dans un tampon de charge [62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), Glycérol 10%, Sodium Dodecyl Sulfate 2%, 2β-mercaptoéthanol 0,7M, Bleu de Bromophénol 0,05%], puis séparés par électrophorèse simple dimension pendant 45 minutes à 160V sur des gels de polyacrylamide SDS-PAGE.

Les protéines séparées ont ensuite été électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham) pendant 1 heure à 100V et l'homogénéité des dépôts confirmée par coloration au rouge Ponceau. Les membranes ont subi une étape de saturation pendant 1 heure, dans une solution de Régilait écrémé 10%-TBS [500mM Tris-HCl (pH 8.4), 2mM NaCl] contenant 0,1% de Tween20 (TBST) puis incubées une nuit à 4°C dans la solution Régilait 10%-

TBST en présence d'anticorps primaires. Pour la détection de FXR α nous avons utilisé un anticorps primaire (Perseus Proteomics) ciblant la partie N-terminale de la protéine. Nous avons validé l'homogénéité des dépôts, en utilisant des anticorps contre la β -Actine (Sigma A2066) et les protéines histones H3 (Santa Cruz -sc-8654). Après un lavage de 15 minutes puis 3 lavages successifs de 5 minutes (TBST), les membranes ont été incubées pendant 60 minutes supplémentaires en présence des anticorps secondaires anti-IgG de chèvre (BI2407, Abliance), anti-IgG de lapin (BI2403, Abliance) ou anti-IgG de souris (BI2413C, Abliance) couplés à la peroxidase (Horseradish Peroxydase, HRP). Après plusieurs lavages successifs de 15 minutes (TBST), les complexes antigènes-anticorps ont été révélés par chemoluminescence (Western Lightning Plus ECL, PerkinElmer, Inc) et les images capturées à l'aide du système MFChemIBIS 3.2 (Bio Imaging System).

3 EXTRACTION DES ARN ET ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES

3.1 EXTRACTION DES ARN

Les cellules en culture ont été rincées avec du D-PBS 1X et lysées dans 1ml de solution RNeasy selon le protocole du fabricant (Molecular Research Center). Les culots recueillis ont été repris dans 20 μ l d'eau ultra-pure. Les ARN de souris ont été isolés à partir de tissus adultes (animaux C57Bl/6) à l'aide du kit d'extraction Nucleospin RNA L (Macherey Nagel) selon le protocole du fabricant.

3.2 RT-PCR ET RT-QPCR

Les concentrations des échantillons ARN ont été mesurées par spectroscopie (Nanodrop, Thermo scientific) et les échantillons conservés à -20°C. Un microgramme d'ARN total a été dénaturé et rétro-transcrit à 37°C pendant 60 minutes dans un volume final de 12,5 μ l contenant 5pmoles d'amorces hexanucléotidiques (Random primer[®], Promega, Charbonnière Les Bains, France), 200 unités de rétrotranscriptase inverse M-MLV (MuMLV RT, Promega), 2mM dNTP et 20 unités d'inhibiteur de RNase (RNAsine, Promega). Les ADN complémentaires obtenus ont ensuite été utilisés dilués (1:10) dans de l'eau stérile pour une analyse en PCR quantitative (qPCR) selon le protocole MESA Green qPCR[™] (Mastermix Plus for SYBR Assay,

Eurogentec, Angers, France) à l'aide d'un appareil LightCycler480 (Roche). Les fragments de cDNA ont été amplifiés grâce aux primers suivants : hFXR (antisens) 5'-acagaacaagtggcaggtc-3' et (sens) 5'-ctgaagaaaccttacaccctc-3' ; mFxr (antisens) 5'-tcctgaggcattctctgtttg-3' et (sens) 5'-aaaaggggatgagctgtgtg-3' ; hShp (antisens) tcggggtgaagaggatggt-3' et (sens) 5'-tggccaagatgctgtgac-3' ; hBcrp (antisens) 5'-gaatctcattaatgatgtcca-3' et (sens) 5'-ggccttgggatactttgaatc-3' ; hMrp2 (antisens) 5'-aacaagccaacagtgtccc-3' et (sens) 5'-aggttgccagttatccgtg-3' ; hActine (antisens) 5'-tcaccggagtccatcacga-3' et (sens) 5'-cgcgagaagatgaccagatc-3'.

L'analyse quantitative de l'expression des gènes a été déterminée par la méthode du $\Delta\Delta Ct$ et le gène de la β -ACTINE a été utilisé comme référence pour la normalisation. Les produits de qPCR ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour vérification de la taille des amplicons.

4 GEL-SHIFT ASSAY ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAYS (EMSA)

Les retards de mobilité (EMSA) ont été réalisés comme décrit précédemment (Aigueperse et al. 2001) à partir d'extraits nucléaires de NCCIT et de HepG2 mélangés à des sondes FXRE radiomarquées dont les séquences sont les suivantes : mShp (antisens) 5'-acaggtcaTTAACCCAGGGATC-3', (sens) 5'-gatccctgggtaatgaccctgt-3'; hShp (antisens) 5'-acaaggtcattaactcaggatc-3' et (sens) 5'-gatccctgagtaatgaccttg-3'; mShp muté (antisens) 5'-acaggaacattattccaggatc-3' et (sens) 5'-gatccctggaataatgttcttg-3' ; FXRE IR-1 (antisens) 5'-ccccgaggtcattgaccttgcccatc-3' et (sens) 5'-gatggccaaggtcaatgacctcgggg-3' ; rMrp2 (antisens) 5'-atcacttcagttgaacttggttaagagttcacagagatgtaa-3' et (sens) 5'-ttaacatctctgtaactctaaccaagttaaaccgaagtgat-3'. Les monocouches cellulaires ont été rincées brièvement avec du PBS 1X et grattées dans 500 μ l de PBS à 10% de glycérol. Les cellules ont été culotées par centrifugation à 500 \times g pendant 5 min, lavées dans 500 μ l de tampon A (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 0,15 mM spermine, 0,5 mM spermidine, 0,5 mM saccharose, 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyle, 1 mM dithiothréitol, 1 % aprotinine) et centrifugées. Les culots ont été remis en suspension dans 500 μ l de tampon A avec 0,5 % de Nonidet P-40 (NP40) et mélangés au vortex. Les cellules ont été incubées pour lyse hypotonique pendant 15 min sur la glace. Les homogénats ont été centrifugés 10 min à 2

500 × g et rincés avec le tampon A sans NP-40. Après une centrifugation à 2 500 × g pendant 10 min pour culotter les noyaux, 25-50µl de tampon C (20 mM HEPES, 0,45 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 0,15 mM spermine, 0,5 mM spermidine, 0,5 mM sucrose, 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyle, 1 mM dithiothréitol, 1% aprotinine) ont été ajoutés et les échantillons ont été lysés pendant 10 min sur glace. Le lysat nucléaire a ensuite été clarifié pendant 20 min à 13 000 × g à 4° C, et le surnageant ont été conservés à - 80 °C. Les extraits nucléaires (5 µg) ont été incubés pendant 30 min à 4 °C dans un tampon EMSA contenant 1 µg d'acide polydésoxy-inosinique-désoxy-cytidylique (PolydIdC) et les complexes ont été résolus par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide non dénaturant à 6 % dans un tampon d'électrophorèse de 0,5 × Tris-borate-EDTA (TBE). Les gels ont ensuite été séchés et analysés par autoradiographie à l'aide d'un système automatique d'imagerie moléculaire (GE Amersham Thyphoon).

5 ANALYSES *IN SILICO*

5.1 DONNEES SUR LES TGT

Les données brutes, traitées et cliniques utilisées dans cette étude sont disponibles dans les archives du Genomic Data Commons (GDC) du National Cancer Institute (<https://portal.gdc.cancer.gov/legacy-archive/search/f>) et la page de publication (<https://gdc.cancer.gov/about-data/publications/>). Les données TCGA peuvent également être explorées sur le portail du Broad Institute FireBrowse (<http://gdac.broadinstitute.org>) et le Memorial Sloan Kettering Cancer Center cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>).

5.2 PROCEDURE EXPERIMENTALE

Les analyses ont été effectuées à partir de 150 échantillons de tumeurs germinales du testicule dont 63 tumeurs mixtes, 63 séminomes, 17 carcinomes embryonnaires, 3 tératomes et 3 tumeurs du sac vitellin. Les analyses menées sur les non-séminomes incluent les tumeurs mixtes, les carcinomes embryonnaires, les tératomes et les tumeurs du sac vitellin. Les études sur les tératomes comprennent les 3 échantillons de tératomes purs ainsi que 33 tumeurs mixtes à dominante tératomateuse.

Après détermination de la médiane des niveaux d'expression de FXR α (médiane Me=10) exprimés en RNA-Seq by Expectation-Maximization (RSEM), les tumeurs ont été classées en deux catégories : FXR+ (RSEM>10) et FXR- (RSEM \leq 10). Les résultats des Analyses en Composante Principale (PCA) ont été obtenus grâce à l'outil DESeq2 sur Rstudio. Le graphique de corrélation entre les expressions logarithmiques de RAR α et FXR α est issu du portail cBioportal.

Pour les études en *Gene Ontology*, nous avons utilisé une liste des gènes corrélés à FXR α obtenue à partir du site cBioportal. Pour les gènes corrélés à FXR α dans l'ensemble des TGT et dans les tératomes, nous avons choisis les gènes dont la corrélation de Spearman est $> 0,4$ ou $< -0,4$. La Gene Ontology a été réalisée sur le portail en ligne Genetrail et sur le logiciel Génomatix.

6 ANALYSES STATISTIQUES

La significativité des expériences est estimée à l'aide du test T de *Student*. Une différence est considérée comme significative pour $p < 0,05$. Dans les figures, les barres représentent l'erreur standard (SEM, *standard error of the mean*). Le test de significativité utilisé dans les analyses de bioinformatique repose sur le test de Chi-deux.

Résultats

Tumeurs germinales (90 à 95%)		Tumeurs non germinales (5 à 10%)
<i>Tumeurs non séminomateuses</i>	Carcinome embryonnaire	Tumeurs à cellules de Leydig
	Choriocarcinome	Tumeurs à cellules de Sertoli
	Tératome	Gonadoblastome
	Tumeur du sac vitellin	Adénocarcinome du <i>rete testis</i>
<i>Séminomes</i>		
<i>Mixtes</i>		

Table 4 : Classification des tumeurs germinales du testicule.

1 ANALYSE DE L'EXPRESSION DE FXR α *IN VITRO* DANS DES LIGNEES MODELES DE TGT

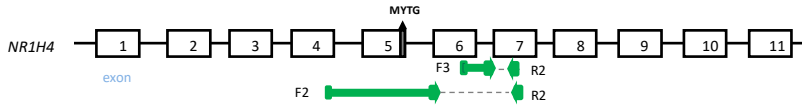
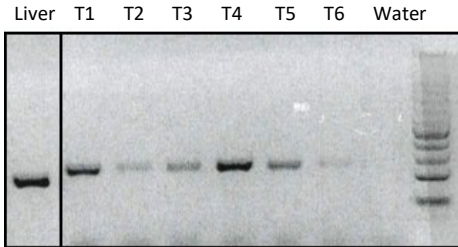
1.1 SOUS TYPES HISTOLOGIQUES DE TGT

Les TGT se caractérisent par une hétérogénéité histologique conséquente en raison de la présence concomitante de cellules pluripotentes et de cellules entrées dans une différenciation somatique aberrante. Actuellement, le système de classification le plus couramment utilisé est celui de l'*Organisation Mondiale de la Santé* (OMS) dont la dernière version date de 2016 (Moch et al. 2016). Les TGT sont maintenant divisées en deux groupes principaux selon leur origine. Seules les TGT dérivant des GNIS seront l'objet de ce chapitre car elles représentent les tumeurs les plus fréquemment rencontrées (> 90%).

L'histologie et la pathogénie des TGT dépendent du stade de différenciation de la cellule germinale dont la tumeur est issue. Les tumeurs issues des GNIS sont classées en 2 sous-types : les séminomes et non-séminomes (**Table 4**). Les séminomes sont morphologiquement homogènes, ils représentent 60 % des tumeurs avec un pic d'incidence à 35 ans. A l'inverse, les non-séminomes forment un groupe de tumeurs très hétérogènes, dont l'incidence plus précoce atteint son pic à 25 ans. Ils incluent le carcinome embryonnaire, la tumeur du sac vitellin, le choriocarcinome et le tératome. Les différents sous-types histologiques dépendent du stade et des voies de différenciation empruntée par les cellules. Elles présentent soit un profil indifférencié (le carcinome embryonnaire, composé de cellules souches embryonnaires pluripotentes transformées) soit différencié (le tératome avec une différenciation somatique, la tumeur du sac vitellin et choriocarcinome avec une différenciation extra-embryonnaire).

1.2 LIGNEES MODELES DE TGT

Afin de caractériser *in vitro* l'expression de FXR α nous avons utilisé des lignées modèles de tumeurs germinales testiculaires. Nous avons principalement analysé les cellules NCCIT, modèle de tumeur germinale mixte. Les NCCIT sont des cellules indifférenciées situées à un stade intermédiaire entre le séminome et carcinome embryonnaire. En réponse à l'acide rétinoïque, ces cellules souches pluripotentes sont capables de se différencier en tissus

A**B**

1. Liver
2. Testis T1 (azoospermie obstructive)
3. Testis T2 (azoospermie obstructive)
4. Testis T3 (azoospermie obstructive)
5. Testis T4 (azoospermie non obstructive)
6. Testis T5 (azoospermie non obstructive)
7. Testis T6 (azoospermie non obstructive)
8. Water

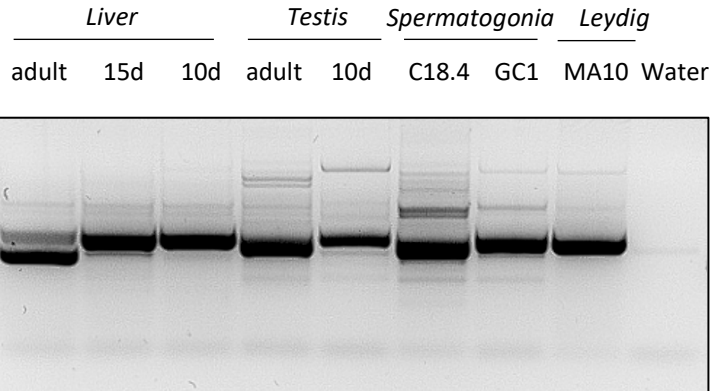
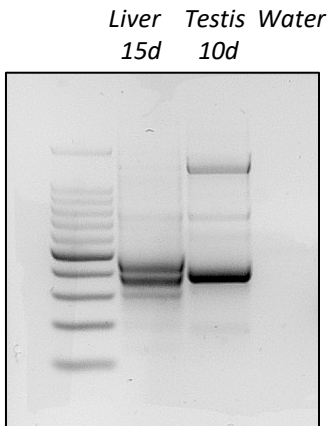
C

Figure 27 : Expression et abondance de FXR α dans différents tissus humains et testis murin. Position des amorces FT (sens) et RT (anti-sens) utilisées pour l'amplification de FXR α (A) et analyse électrophorétique sur gel d'agarose des ADNc obtenus par RT-PCR de la banque d'ARN de tissus humains et d'échantillons de testis issus de patients atteints d'azoospermie de type sécrétoire et excrétoire (B). Expression d'ADNc de FXR murin dans des échantillons de foie et de testis d'individus de 10jours, 15jours et d'adultes ainsi que dans des lignées cellulaires modèles de spermatogonies (C18.4 et GC1) et de cellules de Leydig (MA10) (C).

somatiques ou extra-embryonnaire comme les tumeurs vitellines, choriocarcinome ou tératome.

Dans notre recherche de caractérisation des sous-types histologiques de TGT, nous avons également utilisé d'autres lignées comme les TCam-2, modèle de séminome et les N-Tera2, modèle de carcinome embryonnaire capable de se différencier en tissus somatiques neuroectodermiques en réponse à l'acide rétinoïque. Malheureusement leur très faible capacité de prolifération *in vitro* ne nous a pas permis de les utiliser en routine.

1.3 EXPRESSION ET ABONDANCE DE FXR α .

De plus en plus d'études menées sur le récepteur nucléaire aux acides biliaires FXR α incriminent les altérations de son abondance et de son activité dans les pathologies incluant les cancers. A l'appui de cela, l'activation de FXR α par des agonistes synthétiques dans des cellules de carcinomes hépatiques diminue leur capacité proliférative, migratoire et invasive après une xénogreffe orthotopique chez la souris suggérant que ce récepteur puisse exercer un effet protecteur (Kim et al. 2007). Ainsi, la démonstration récente par l'équipe d'une forte diminution des ARN messagers de FXR α dans des échantillons humains de TGT par rapport à des échantillons sains interroge quant à la participation de ce récepteur nucléaire à l'étiologie de la maladie.

Afin de caractériser le taux d'expression et l'état fonctionnel de la signalisation induite par ce récepteur, nous avons initialement mesuré de façon qualitative les niveaux d'ARN messagers de FXR α dans des banques d'ARN de tissus humains, des échantillons de testicule ainsi que dans des lignées cellulaires. Grâce à des échantillons déjà présents dans l'équipe, nous avons évalué la présence de FXR α dans des extraits d'ARN dérivés de foie et six échantillons de testis humains provenant de patients atteints d'azoospermie d'origine obstructive et non obstructive (**Figure 27A**). A l'aide d'amorces amplifiant une région commune à l'ensemble des isoformes de FXR α , nous avons identifié après RT-PCR et migration sur gel d'agarose, un fragment de taille attendue dans l'ensemble des échantillons confirmant les données de l'équipe (données non publiées, **Figure 26**). Corroborant ces premiers résultats, l'analyse de l'abondance de FXR α en RT-PCR a confirmé sa présence dans des échantillons de foie et de testicule chez la souris C57BL/6J (**Figure 27B**). De surcroît, Fxr α semble exprimé à différents

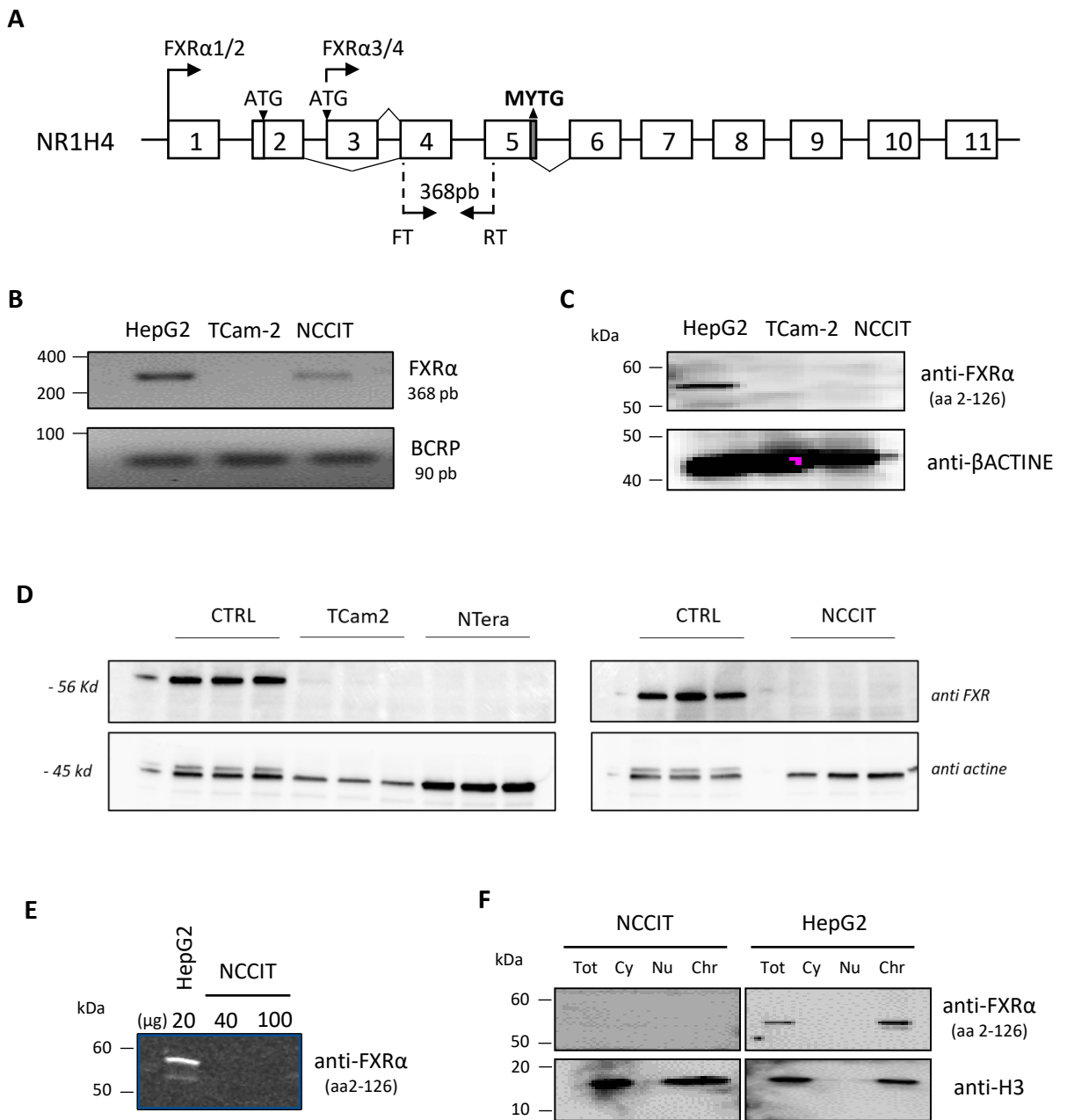


Figure 28 : Expression et abondance de FXR α dans les cellules de tumeurs germinales du testicule. Position des amorces FT (sens) et RT (anti-sens) utilisées pour l'amplification de FXR α (A) et analyse électrophorétique (B) des ADNc obtenus par RT-PCR pour les cellules TCam-2 et NCCIT. Les ADNc ont été amplifiés pendant 35 cycles à partir des produits de RT (dilution 1: 5) synthétisés à partir des ARN totaux (1 μ g) des cellules HepG2, TCam-2 et NCCIT. Les cellules de foie HepG2 ont été utilisées comme référence pour l'amplification de FXR α avec le gène de BCRP comme contrôle de la réaction. Analyses par western blot de l'abondance de FXR α et de la β -actine à partir d'extraits protéiques totaux de cellules HepG2, TCam-2, NCCIT sauvages et NCCIT transfectées par un plasmide codant pour FXR α (contrôle) (C, D, E) Accumulation de FXR α dans les fractions totales (tot), cytoplasmiques (cy), nucléo-plasmiques (nu) et chromatiniennes (chr). 20 μ g de chacune des fractions ont été analysées par western blot avec les anticorps indiqués (F) .

stades de la vie de l'animal comme l'atteste la présence d'ARNm dans les échantillons de foie d'individus de 10 jours, 15 jours et adultes ainsi que dans les testicules de 10 jours et adultes. Deux lignées modèles de spermatogonies murines, C18.4 et GC1, expriment également FXR α à l'instar des MA10, lignée modèle de cellules de Leydig murine. Ces derniers résultats confirment la présence de Fxr α dans les cellules germinales à différents stades de différenciation ainsi que dans les cellules endocrines du testicule sécrétant la testostérone (**Figure 27B**). Sachant que les études de l'équipe mettent en évidence une chute des niveaux de FXR α dans les tissus de TGT en comparaison à des testis non tumoraux, l'objectif premier de ce travail de thèse repose sur la validation des modèles cellulaires de TGT *in vitro*. A cette fin, les niveaux d'abondance de FXR α dans les lignées cellulaires TCam-2 et NCCIT ont été caractérisés en comparaison avec la lignée de référence HepG2. Comme présenté à la Figure 28A, l'utilisation d'amorces spécifiques reconnaissant l'exon 4 de FXR α et sa jonction avec l'exon 5 a permis d'amplifier un fragment à partir d'ADN complémentaires (ADNc) produits par transcription inverse des ARN de cellules NCCIT. Une comparaison après migration électrophorétique de la taille du fragment avec celui attendu de 368 nucléotides pour les cellules HepG2 suggère que le gène *NR1H4* est transcrit dans les cellules NCCIT à la différence des cellules TCam-2 pour lesquelles aucun fragment n'a pu être amplifié dans les mêmes conditions expérimentales (**Figure 28B**). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la région amino-terminale de FXR α (aa 2-126 ; Perseus Proteomics) a validé la présence de ce récepteur dans les cellules HepG2 mais pas dans les cellules NCCIT, TCam-2 ou N-Tera2 (**Figure 28C et 28D**) alors qu'un anticorps contre la protéine β -ACTINE contrôle l'homogénéité des dépôts. Le renouvellement de l'analyse avec des quantités plus importantes d'extraits protéiques totaux (**Figure E**) ou avec des fractions subcellulaires n'a pas permis de détecter FXR α dans les cellules NCCIT. Comme présenté dans la **Figure 28F**, FXR α est détecté dans la fraction enrichie en chromatine (validée avec l'histone H3) des cellules HepG2. En revanche, l'analyse des fractions totales (tot), cytoplasmiques (cy), nucléoplasmiques (Nu) et chromatiniennes (Chr) n'a pas permis de révéler la présence de FXR α dans les cellules NCCIT.

1.4 LES NCCIT EXPRIMENT-ELLES UNE PROTEINE FXR α ?

L'approche par Western-blot ne permettant pas de confirmer la présence d'une protéine FXR α et désirant s'affranchir de la possibilité que la protéine ne soit pas détectée par l'anticorps

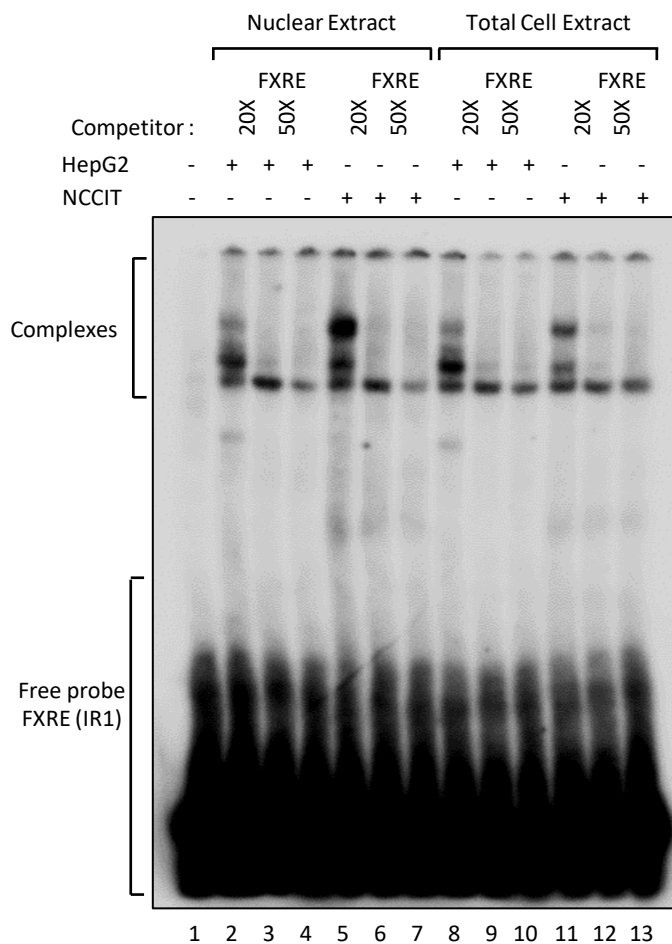


Figure 29 : Les FXRE se lient à des complexes protéiques présents dans les NCCIT.

Un EMSA a été réalisé à partir d'extraits protéiques nucléaires et totaux issus des cellules NCCIT et HepG2 (contrôle positif). La séquence des sondes d'oligonucléotides radiomarquées correspond à la séquence consensus d'un FXRE de type IR-1 issu du promoteur de SHP. Des sondes non radiomarquées (ou sondes froides), agissant comme compétiteurs ont été ajoutées en excès (20X et 50X) dans les puits 3-4-6-7-9-10-12-13.

utilisé (Perseus), nous avons dans un premier temps évalué la présence de protéines capables de se fixer aux sites de liaison de FXR α sur l'ADN, les FXRE. A cette fin, un essai de retardement de migration électrophorétique (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) a été réalisé à partir d'extraits de cellules NCCIT et HepG2 (**Figure 29**). Des sondes radiomarquées correspondant à la séquence consensus FXRE de type IR-1 ont été préparées puis mélangées à des extraits protéiques nucléaires et totaux de NCCIT. Des complexes protéiques se liant aux sondes IR-1 ont été ainsi mis en évidence à partir des extraits nucléaires de cellules NCCIT comme avec ceux de la lignée contrôle HepG2. Cette interaction protéine-ADN a été observée à la fois dans les extraits nucléaires et les extraits totaux. L'ajout d'un excès de sonde froide FXRE agissant en compétition de la sonde radiomarquée a permis de déplacer les complexes ce qui atteste de la spécificité de la liaison des protéines à leur élément de réponse de type IR1. Ainsi, ces résultats montrent que des protéines présentes dans les NCCIT sont capables de lier spécifiquement les sites de liaison de FXR α sur l'ADN.

Sachant que la protéine FXR α est capable de se fixer à différents FXRE, différentes sondes non radiomarquées ont été testées en compétition avec la sonde FXRE consensus IR-1 dans les extraits nucléaires de cellules NCCIT ou de cellules HepG2. Nous avons pour cela utilisé des sondes de type FXRE IR-1 du gène SHP humain, Shp murin et Shp murin muté pour confirmer la spécificité de liaison à la séquence (**Figure 30**). Un autre FXRE de type ER8 a également été utilisé en créant une sonde empruntant le site de liaison de FXR α dans le promoteur de Mrp2 chez le rat. Nous observons que les sondes SHP humain, Shp murin et rMrp2 sont capables de titrer les complexes protéiques comme en témoigne la diminution ou la disparition des complexes fixées à la sonde FXRE IR-1 consensus radiomarquée. La mutation présente dans la séquence FXRE du promoteur du gène Shp murin ne permet plus à la séquence de titrer les protéines et de déplacer les complexes protéines-ADN ce qui renforce la possibilité que des isoformes de FXR soient présentes dans les cellules NCCIT.

Afin d'évaluer si les complexes protéiques capables de se lier aux sondes FXRE IR-1 contiennent la protéine FXR α , un EMSA supplémentaire a été réalisé avec des extraits de cellules NCCIT transfectées avec un ARN interférent dirigé contre FXR α (siFXR α) (**Figure 31**). L'efficacité de l'ARN interférent utilisé a été confirmée dans la lignée HepG2 en western-blot comme l'atteste la forte diminution de la protéine FXR α en présence du siFXR α par rapport au siRNA contrôle (ciblant une séquence GFP). Cette baisse n'a pu être confirmée dans la lignée

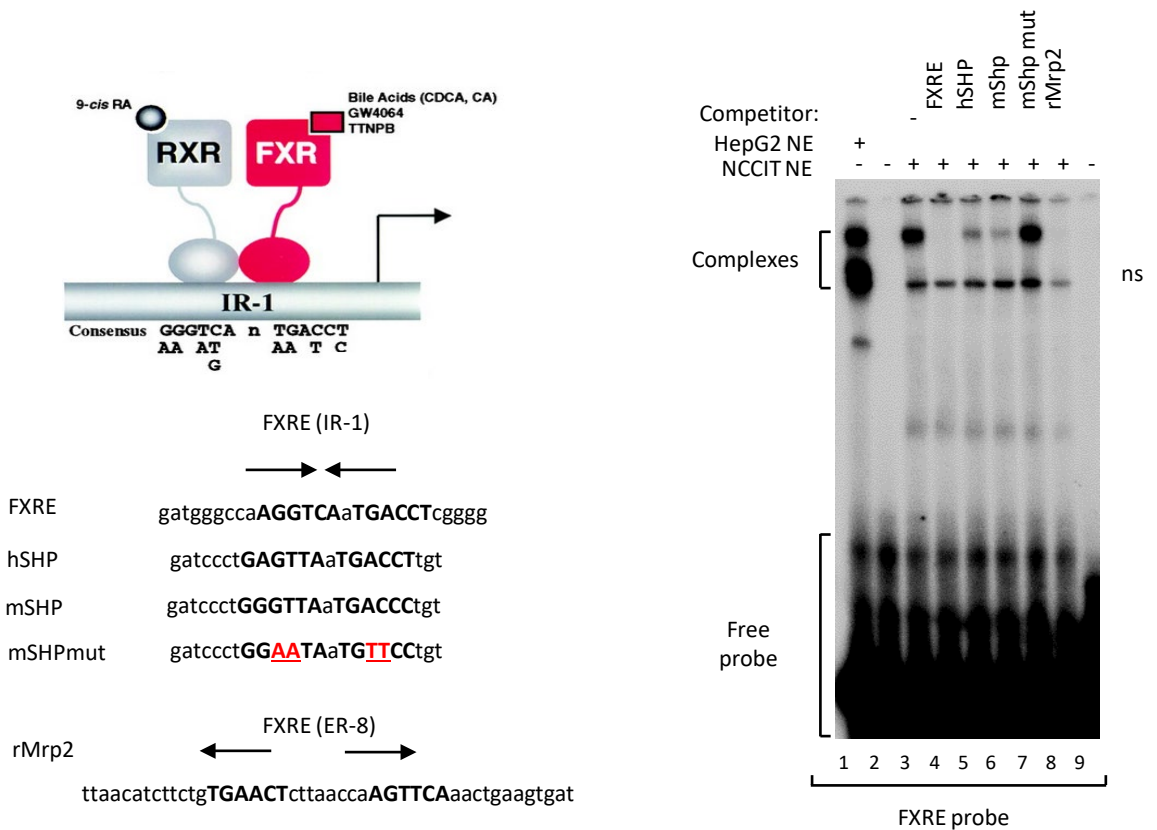


Figure 30 : Des complexes protéiques présents dans les NCCIT se fixent sur différents FXRE de type IR-1 et ER-8.

Un EMSA a été réalisé à partir d'extraits protéiques nucléaires issus des cellules NCCIT et HepG2 (contrôle positif). Plusieurs séquences de sondes d'oligonucléotides radiomarquées ont été utilisées : FXRE de type IR-1 issu du promoteur de SHP humain, murin, murin muté et de type ER-8 issu du promoteur de MRP2 chez le rat. Des sondes non radiomarquées (ou sondes froides), agissant comme compétiteurs ont été ajoutées en excès (20X et 50X) dans les puits 4 et 11.

NCCIT en accord avec l'absence de protéine FXR α détectable en western blot avec les outils immunologique disponible. L'analyse par EMSA a confirmé les résultats précédemment obtenus en montrant la présence de complexes protéiques capables de lier la sonde FXRE radiomarquée avec des extraits de cellules NCCIT non transfectées et la perte de ces complexes par compétition en présence de la sonde froide ajoutée en excès. La transfection des NCCIT avec l'ARN interférant dirigé contre FXR α semble diminuer la quantité de complexes protéiques en comparaison avec le siRNA contrôle. Ce résultat tend donc à montrer la possible présence de la protéine FXR α dans les NCCIT.

1.5 L'ACTIVITE DES CELLULES DE TGT EST MODIFIEE PAR LES AGONISTES DE FXR α .

En complément des études relatives à la mesure de l'expression et de l'abondance de FXR α dans les lignées de cellule de TGT, nous avons exploité les propriétés des agonistes GW-4064 et INT-747 pour analyser l'état fonctionnel de la signalisation induite par ce récepteur. Ces deux molécules présentent des concentrations efficaces médianes (EC50) inférieures à 0,1 μ M et ont fait l'objet de nombreuses études pour leur capacité à activer la transcription des gènes par FXR α . Pour la suite de notre travail, nous avons donc maintenu les cellules NCCIT et TCam-2 en culture en présence de quantités croissantes de GW-4064 ou d'INT-747. L'ajout de 0,1 et 1,0 μ M de GW-4064 aux cellules HepG2 a augmenté d'environ 30 à 40% le nombre de cellules après 48 heures d'incubation par rapport au véhicule DMSO (**Figure 32**). Cette hausse n'est cependant pas retrouvée pour les cellules NCCIT dont le nombre chute de plus de 70% ($p < 0,05$) pour des concentrations supérieures à 1,0 μ M. Cette baisse de la numération cellulaire est aussi observée dans les cellules HepG2 mais pour des concentrations supérieures à 5,0 μ M pour atteindre seulement 20% ($p < 0,05$) du nombre de cellules retrouvées de la condition de référence avec le véhicule DMSO. Cette dernière observation suggère que de fortes concentrations d'agonistes de FXR α puissent affecter la viabilité des cellules. Pour répondre à cela, les cellules HepG2, NCCIT et TCam-2 ont étéensemencées à des densités de 25x10³, 50x10³ et 100x10³/puits en plaque 96 puits, puis traitées dans les mêmes conditions expérimentales afin d'évaluer leur activité métabolique. Après quatre heures d'incubation supplémentaire à 37°C avec une solution de sel de tétrazolium (MTT ; 1,5mg/ml), la quantité de formazan produit par l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale a été mesurée par spectrométrie à 570nm après dissolution des précipités. La figure 33 montre que

l'activité métabolique des cellules HepG2 et NCCIT augmente d'environ 10 à 30% en présence de 0,1 et 1,0 μ M de GW4064 avant de chuter de plus de la moitié et de s'inactiver à partir de 5,0 μ M dans les cellules NCCIT et TCam-2. Cette chute est beaucoup moins marquée pour les cellules HepG2 pour lesquelles l'activité reste inchangée jusqu'à 10,0 μ M. A la différence du GW-4064, l'INT-747 n'affecte pas la viabilité des lignées cellulaires étudiées pour l'ensemble des concentrations utilisées (**Figure 33**). De par la capacité de FXR α à freiner la prolifération et à stimuler l'apoptose dans les cellules de cancers du sein (Alasmael et al. 2016) nous avons exploré la possibilité que la chute d'activité mitochondriale et la diminution du nombre de cellules causées par le GW-4064 soient liées à l'activation d'une mort programmée par apoptose. L'analyse des niveaux de la protéine PARP-clivée a été déterminée mais doit être confirmée par d'autres approches expérimentales (données non montrées). Un marquage des cassures ADN par incorporation de désoxyribonucléotides (TUNEL, Tdt-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) en complément d'études sur la nécrose et/ou l'autophagie pourraient renseigner les causes de la baisse de viabilité des cellules HepG2 et TCam-2.

1.6 LES AGONISTES DE FXR α MODIFIENT LE PROFIL DE GENES CIBLES DANS LES CELLULES DE TGT.

Par son activité de facteur de transcription inductible, FXR α apparaît comme un acteur clé dans la régulation du métabolisme des glucides et des lipides notamment en contrôlant l'expression de gènes codants pour des enzymes, des transporteurs membranaires ainsi que des protéines régulatrices de la transcription. Pour caractériser davantage l'état d'activation de la signalisation induite par FXR α , nous avons évalué les profils d'expression des gènes cibles *SHP* et *MRP2* dans les cellules NCCIT et TCam-2 en absence et en présence des agonistes de FXR α . Comme attendu, des incubations avec 1,0 μ M de GW4064 ont augmenté les niveaux d'ARN messagers de *SHP* d'un facteur 1,5 ($\pm 0,14$; $P < 0,05$) à 2,2 ($\pm 0,1$; $P < 0,05$) alors que la stimulation induite par l'INT-747 est plus modeste avec une hausse d'environ 30 à 70% (1,31 $\pm 0,06$ vs 1,69 $\pm 0,09$; $P < 0,05$) respectivement après 24 et 48 heures de traitement (**Figure 34A**). Cet effet activateur n'a pas été retrouvé pour le gène *MRP2* déjà décrit comme une cible de l'activité transcriptionnelle de FXR α dans des cellules HepG2 qui le surexpriment après transduction virale (Kast et al. 2002). De manière intéressante, l'accumulation des ARNm *SHP* et *MRP2* est augmentée dans les cellules TCam-2 en présence de GW4064 ($\Delta\Delta Ct$ *SHP*=3,3 \pm 0,4 ; $\Delta\Delta Ct$ *MRP2*=3,3 \pm 0,6) et d'INT-747 ($\Delta\Delta Ct$ *SHP*=7,5 \pm 0,5; $\Delta\Delta Ct$ *MRP2*=2,1 \pm 0,2) après 48 heures

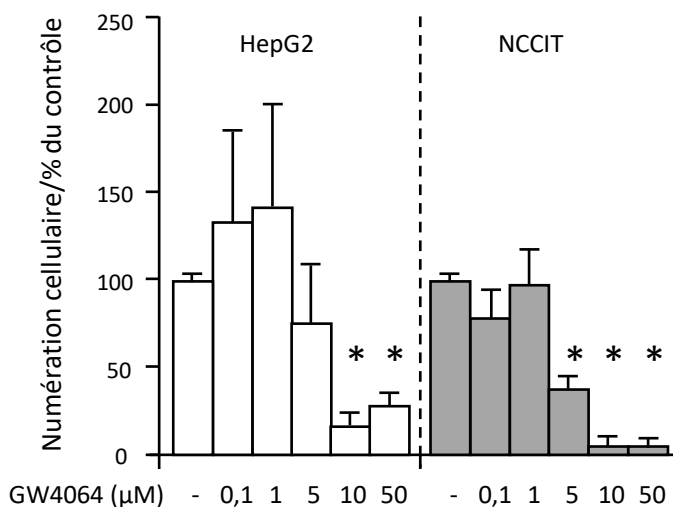


Figure 32 : Effet de l'agoniste GW4064 de FXR α sur la multiplication des cellules HepG2 et NCCIT. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 4×10^5 cellules/puits en plaque 6 puits. Après 48 heures de stimulation avec des concentrations croissantes d'agoniste GW4064, les cellules adhérentes ont été récupérées et comptées à l'aide d'un compteur automatique LUNA-II™. Le nombre de cellules dénombrées est présenté en pourcentage par rapport au nombre de cellules après 48 heures de traitement avec le véhicule (DMSO). Les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student (moyenne \pm écart-type avec $n=3$; (* : $p < 0,05$)).

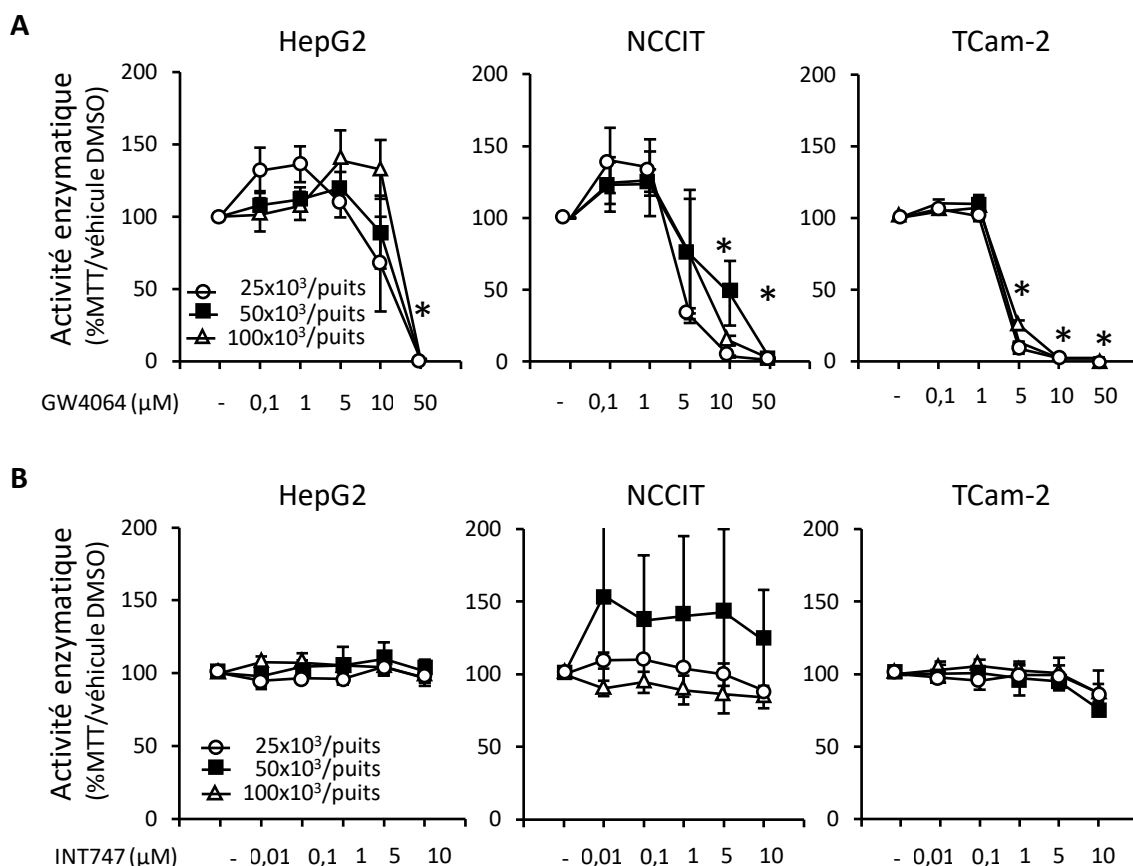


Figure 33 : Effets de l'agoniste INT-747 de FXR α sur la viabilité des cellules HepG2, NCCIT et TCam-2. Les cellules ont étéensemencées en plaques 6 puits pour 48 heures de stimulation avec des concentrations croissantes de GW-4064 (A) ou d'INT-747 (B), puis l'activité enzymatique mitochondriale a été mesurée après 4 heures supplémentaire d'incubation avec le sel de tétrazolium (MTT). Le pourcentage d'activité enzymatique est présenté par rapport à la condition de référence (DMSO). Les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student (moyenne \pm écart-type avec $n=3$; (* : $p < 0,05$)).

de traitement. Ces profils sont spécifiques de la lignée TCam-2 puisque les agonistes influent peu ou pas sur l'expression de MRP2 dans les cellules NCCIT alors que l'expression de SHP diminue de moitié dans ces cellules après 48 heures de traitement (**Figure 34B**)

2 ANALYSE IN SILICO DE L'EXPRESSION DE FXR α DANS LES TGT

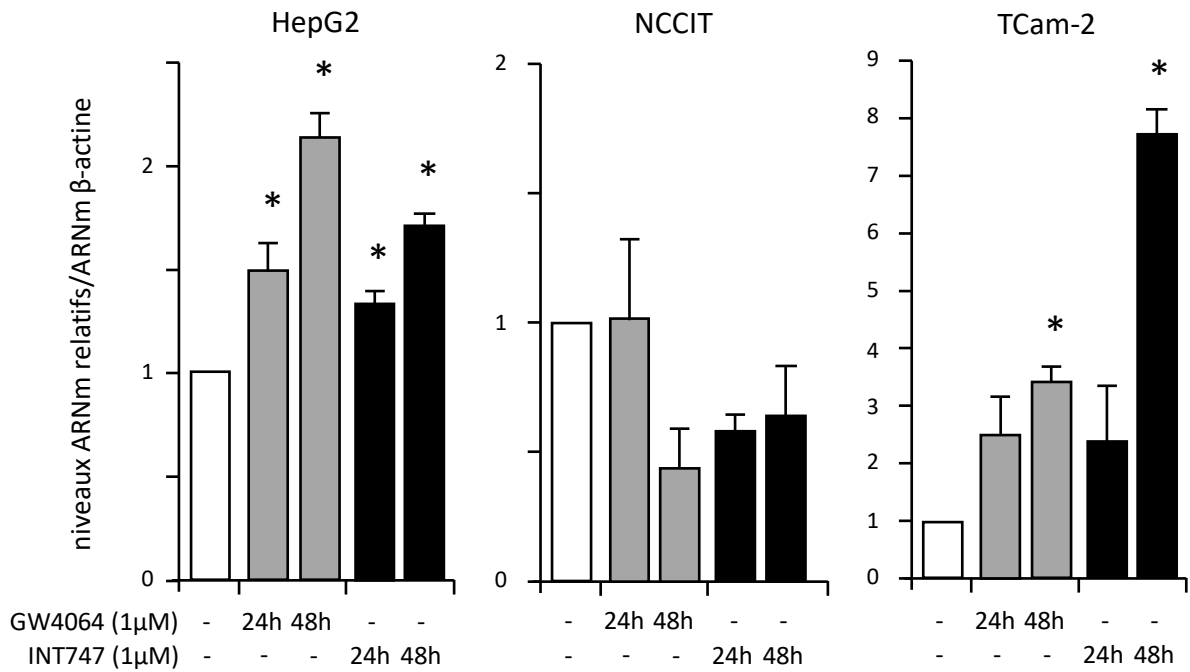
2.1 SOUS-TYPES TUMORAUX EXPRIMANT FXR α

Dans l'optique de corrélérer nos résultats expérimentaux aux données disponibles dans les bases de données, nous avons réalisé plusieurs analyses en bioinformatique à partir des échantillons de TGT issues de la banque TCGA (The Cancer Genome Atlas). Nous avons ainsi pu récupérer les données génomiques, histologiques et cliniques de 150 tumeurs germinales du testicule dont 63 séminomes et 86 non-séminomes. A partir du transcriptome de chaque échantillon tumoral, nous avons réalisé une analyse en composante principale (PCA) afin d'évaluer la variabilité d'expression génomique des échantillons selon le type de tumeur (**Figure 35**). Cette étude a permis de distinguer 3 populations exprimant un transcriptome proche. En corrélant l'identité histologique des échantillons à chaque transcriptome visualisé sur la PCA, nous avons pu associer le type de tumeurs contenu dans chaque cluster.

La première d'entre eux, dont les échantillons sont représentés en bleu foncé sur la PCA (**Figure 35A**) correspond à des tumeurs de type séminomes. Les deux autres clusters, symbolisés en rose représentent les non-séminomes. Parmi les non-séminomes, deux sous populations se distinguent. L'une caractérise les carcinomes embryonnaires, tumeurs indifférenciées, tandis que l'autre comprend les tératomes et tumeurs du sac vitellin. Sachant que 63 tumeurs sont mixtes, on remarque que le transcriptome se retrouve dans le cluster du type histologique dominant.

Afin d'étudier l'expression de FXR α dans les tissus, nous avons caractérisé chaque tumeur selon un profil FXR positif (+) ou FXR négatif (-). Le seuil a été choisi à 10 *RNA-Seq by Expectation-Maximization* (RSEM), correspondant à la médiane des échantillons. Cette seconde étude montre que les tumeurs FXR+ se concentrent majoritairement dans la population de non-séminomes et plus particulièrement, dans le contingent

A SHP



B MRP2

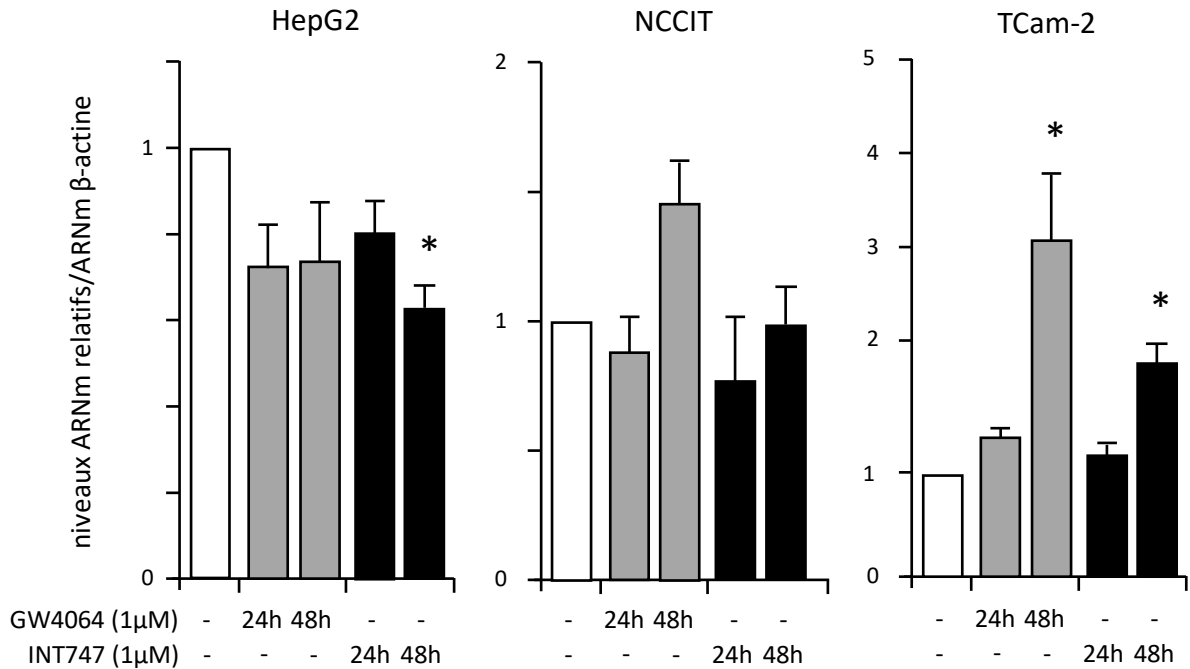


Figure 34 : Analyse de l'expression des gènes cibles de l'activité de FXRα. Après une stimulation de 24 et 48 heures avec des agonistes de FXRα, l'accumulation des transcrits de *SHP* (A) et *MRP2* (B) a été mesurée par RT-qPCR. Les données sont normalisées par rapport au gène de ménage β-actine et exprimées en proportion de la condition de référence (véhicule DMSO) à partir de 3 échantillons ± écart-type (n = 3). Les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student (* : p < 0,05).

tératomes/tumeurs du sac vitellin qui sont les tumeurs les plus différenciées parmi les TGT (**Figure 35B**).

Afin de confirmer le lien entre le niveau d'expression de FXR α et le profil histologique des tumeurs, des études de corrélation ont été réalisées (**Figure 35C**). La figure 35C montre la proportion de tumeurs FXR α + et FXR α - parmi les groupes de tumeurs "séminomes" et "non séminomes". Cette étude montre une proportion de tumeurs FXR α + plus importante dans les non-séminomes que dans les séminomes qui contiennent en quasi-totalité des tumeurs négatives pour FXR α . L'association entre l'expression de FXR α et le type de tumeurs est confirmé par le test statistique qui donne une p-value < 0,0038. Sachant que le groupe des non-séminomes associe un ensemble de tumeurs hétérogènes, nous avons réalisé une étude plus détaillée sur la corrélation entre les niveaux de FXR α et les sous-types histologiques (**Figure 35D**). Dans cette seconde analyse, les niveaux de FXR α sont comparés aux sous-types histologiques incluant les tumeurs mixtes. Ce graphique confirme le résultat précédent mais montre de surcroît que FXR α est exprimé exclusivement dans les tumeurs de type "tératomes" et les tumeurs mixtes à dominante "tératomes". Dans les autres sous-types histologiques, les niveaux de FXR α semblent très faibles voire nuls.

L'ensemble de ces résultats montre donc que les séminomes sont des tumeurs exprimant faiblement ou n'exprimant pas FXR α tandis que les tumeurs à dominante tératomes, qui sont des tumeurs à caractère différencié, l'expriment fortement.

2.1.1 FXR α et différenciation

Les tératomes sont des tumeurs dérivant des 3 feuillets embryonnaires : endoderme, ectoderme et mésoderme. Ils représentent donc une catégorie de tumeurs à contingence cellulaire hétérogène avec des cellules entrées à différents stades de leur différenciation. La différenciation des cellules embryonnaires implique plusieurs mécanismes dont la régulation médiée par les récepteurs RAR α /RXR qui inhibent l'expression des gènes de pluripotence et activent celle des facteurs de différenciation (Chatagnon et al. 2015). Par conséquent nous avons souhaité connaître le statut en RAR α dans les échantillons de TGT en libre accès sur le site du TCGA. Sur la **Figure 36A**, nous mettons en évidence que toutes les tumeurs expriment RAR α . Cependant, les tumeurs exprimant majoritairement ce récepteur correspondent aux tumeurs à caractère différencié. En effet, les séminomes et carcinomes embryonnaires, les

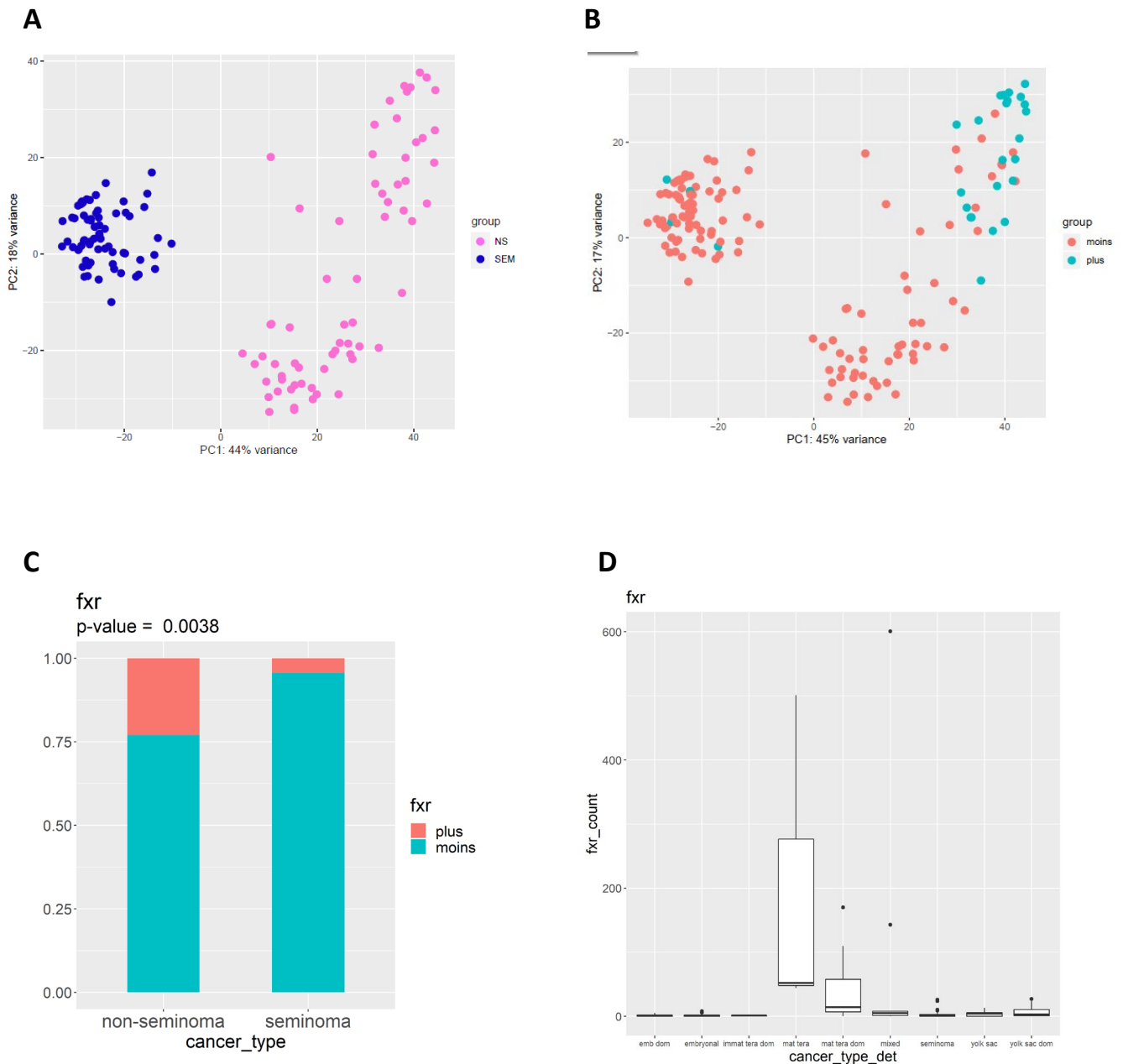


Figure 35 : Analyse *in silico* de l'expression du gène FXR α dans des échantillons de tumeurs germinales du testicule. Après une sélection de 149 TGT sur la base de données cBioportal, leur transcriptome a été analysé en PCA et deux populations de séminomes (bleu) et non séminomes (rose) ont été discriminées (**A**). L'expression de FXR α dans chaque échantillon a été examinée permettant de discriminer les tumeurs FXR α + (bleu) des FXR α - (rouge) (**B**). Dans les sous types SE (n=63) et NSE (n=86), la proportion des tumeurs FXR α + (rouge) et FXR α - (bleu) a été mesurée). Le test de significativité a été calculé par le test du Chi-2 (**C**). Un box-plot des TPM normalisés de FXR α de chaque échantillon a ensuite été créé en classant les TGT par sous-type tumoral (**D**).

tumeurs contenant les cellules les plus immatures, correspondent aux échantillons exprimant les niveaux les plus faibles de RAR α . A l'inverse, les tumeurs de type « tératomes » et « tumeurs du sac vitellin » sont celles qui expriment le plus RAR α . En outre, les tératomes matures sont les tumeurs les plus riches en RAR α confirmant le lien entre niveaux de RAR α et stade de différenciation des cellules.

L'ensemble de nos données précédentes montrent que les non-séminomes de type « tératomes », tumeurs les plus différenciées, sont celles qui expriment le plus fortement les récepteurs FXR α et RAR α . Par conséquent nous avons voulu explorer si l'expression de FXR α pouvait être liée à celle de RAR α .

Afin d'évaluer le lien entre l'expression de RAR α et de FXR α nous avons effectué une analyse de corrélation entre l'expression des transcrits des deux gènes dans l'ensemble des TGT (**Figure 36B**). Les résultats ont montré une corrélation positive entre l'expression de RAR α et FXR α , avec une corrélation de Spearman de 0,52.

Grâce à un séquençage du transcriptome (*RNA-sequencing*) réalisé précédemment dans l'équipe (Martinot et al. 2017), comparant le transcriptome de testicules de souris C57BL/6 invalidées pour *Fxr* (*Fxr* α -/-) avec des souris contrôle C57BL/6 (WT), nous avons exploré le lien entre l'expression de FXR α et celle de gènes de la signalisation RAR α (**Figure 36C**).

Lors d'une première analyse nous avons regardé les gènes les plus dérégulés entre les deux conditions *Fxr* α -/-/WT grâce au logiciel d'analyse GSEA. A partir de cette liste de gènes nous avons analysé les processus biologiques en Gene Ontology (GO) grâce à l'outil en ligne Amigo2. Parmi les ontogénie génique (GO) enrichies, nous avons retrouvé un ensemble de fonctions liées à la régulation de la différenciation cellulaire (regulation of cell differentiation) à corrélation positive (fold 1,32 : p-value 3,69^E-12) en comparant FXR α -/- vs WT.

2.1.2 FXR α et profils de méthylation

Les données de la littérature montrent que les non-séminomes sont des tumeurs hyperméthylées tandis que les séminomes sont hypométhylées. Par ailleurs, les tumeurs type "tératomes" présentent les profils de méthylation des îlots CpG les plus élevés. Par conséquent, nous avons voulu explorer la corrélation dans les tumeurs entre les niveaux de FXR α et les taux de méthylation des échantillons (**Figure 37**). Les résultats ont montré une

corrélation positive entre les deux facteurs, avec une valeur augmentée lorsque l'on compare exclusivement le taux de méthylation et l'abondance de FXR α aux échantillons de non-séminomes puis aux tératomes.

2.1.3 Ontologies et voies de signalisation des gènes corrélés à FXR α dans les TGT

Les données obtenues par les approches de bioinformatique montrent que les niveaux de FXR α sont corrélés à plusieurs processus retrouvés dans les tératomes. Par conséquent, nous avons voulu savoir dans quels processus biologiques étaient impliqués les gènes dont l'expression est corrélée à celle de FXR α . Cette étude a été réalisée dans un premier temps dans l'ensemble des TGT (**Figure 38 et 39**), puis dans un second uniquement dans les tératomes (**Figure 40**).

Après avoir sélectionné les 1228 gènes dont la corrélation de Spearman est $>0,4$ ou $<-0,4$ et la p-value $<0,01$ pour l'ensemble des TGT, nous avons analysé des processus biologiques liés à ces gènes en GO (**Figure 38**). Pour cela nous avons comparé plusieurs outils dont "Genetrail", "Genomatix" et Panther. Les processus les plus représentés en GO sont liés notamment aux capacités d'adhésion des cellules et au métabolisme des acides nucléiques.

Nous avons répété le même protocole pour analyser avec le logiciel Genomatix afin d'obtenir des informations sur la corrélation de ces gènes avec les réseaux de signalisation (**Figure 39**). Cette démarche a confirmé les données obtenues précédemment en retrouvant des liens avec la signalisation des rétinoïdes et l'organisation de la matrice extracellulaire. Les gènes corrélés avec l'expression de FXR α sont positivement régulés avec l'expression des gènes impliqués dans la signalisation des rétinoïdes et la dégradation du récepteur RAR α . De surcroît, cette analyse a confirmé la relation inverse entre l'expression de FXR α et celle des facteurs de pluripotence. En effet, les gènes corrélés à l'expression de FXR α dans les TGT sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle des cellules souches pluripotentes comme défini avec le logiciel Genomatix. Ces observations confortent les données initiales de l'équipe qui mettaient en évidence une chute de l'expression de FXR α associée à une augmentation des facteurs de pluripotence OCT3/4 et NANOG.

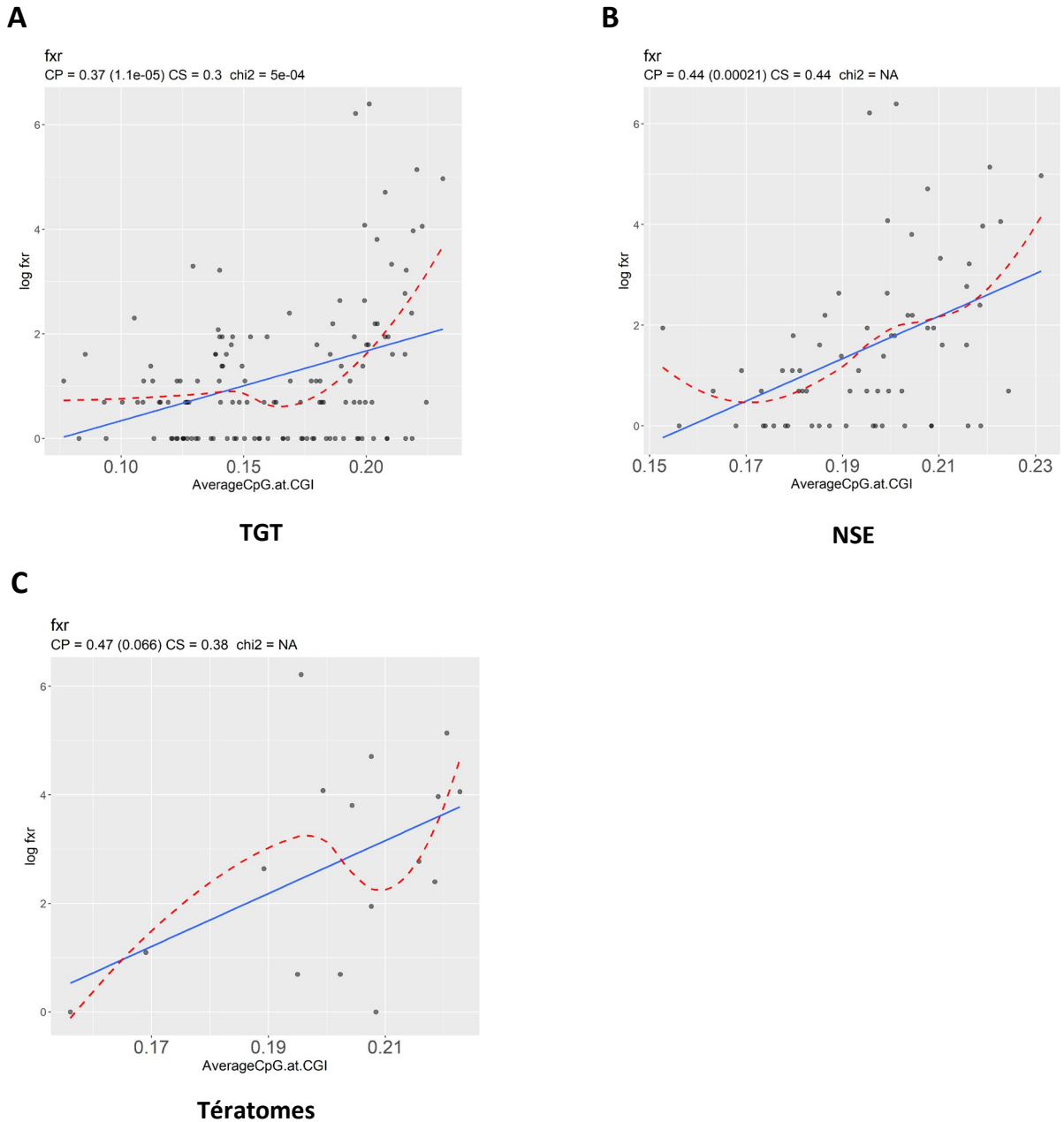


Figure 37 : Corrélation des niveaux d'expression de FXR α avec la méthylation globale des îlots CpG dans les TGT.

Les taux moyens de méthylation des îlots CpG de chaque échantillon de TGT ont été corrélés avec les niveaux d'expression de FXR α pour chaque échantillon de TGT **(A)**, de NSE **(B)** ou de Téréatomes **(C)**. Les tests de corrélation ont été calculés par les méthodes de Pearson (CP) et Spearman (CS) ainsi que la significativité du test de Chi-2. Les courbes de tendances sont illustrées en bleu et rouge.

Bien que l'ensemble de ces résultats ne nous ait pas permis de conclure sur l'expression de FXR α dans ces lignées cellulaires de TGT, nos analyses *in silico* confortent les résultats de l'équipe quant à la possible implication de FXR α dans l'étiologie des TGT. Par ailleurs, de nouvelles tentatives de clonage par RT-PCR menées dans les cellules NCCIT et la lignée contrôle HepG2, a permis d'identifier une nouvelle isoforme caractérisée que nous nous sommes efforcés de caractériser dans la section suivante.

Sachant que la perte de FXR α est associée au développement tumoral dans plusieurs tissus, notre identification récente d'un nouveau variant d'épissage du récepteur FXR α , et son accumulation dans différentes lignées de cellules cancéreuses, interrogent sur les propriétés/fonctions de ce facteur dépourvu de la moitié de son domaine de liaison à l'ADN après excision de son exon 5 (Δ Ex5). Nous avons formulé l'hypothèse que les activités de ce variant FXR α 1 Δ E5 participe au développement normal et pathologique avec pour objectif d'évaluer la contribution de ce dernier à la biologie des tumeurs germinales du testicule (TGT). Pour cela, nous avons proposé d'explorer les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ce facteur, de définir ses capacités d'interaction avec l'ADN et le partenaire RXR α , puis de dresser une liste de ses gènes cibles tout en renseignant les voies métaboliques qu'il contrôle à l'aide d'analyses du génome à haut-débit. Au final, il était attendu par ce travail que nous définissions les propriétés de ce nouveau variant de FXR α tout en validant son expression et celles des réseaux de gènes cibles que nous identifierions avec un retour vers les TGT pour comprendre comment les altérations fonctionnelles du récepteur FXR α pourraient participer au développement tumoral et à la progression des TGT.

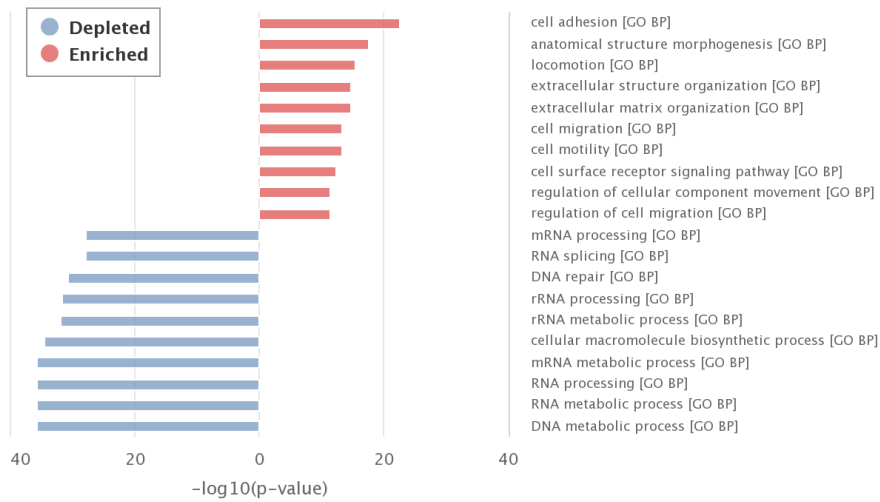
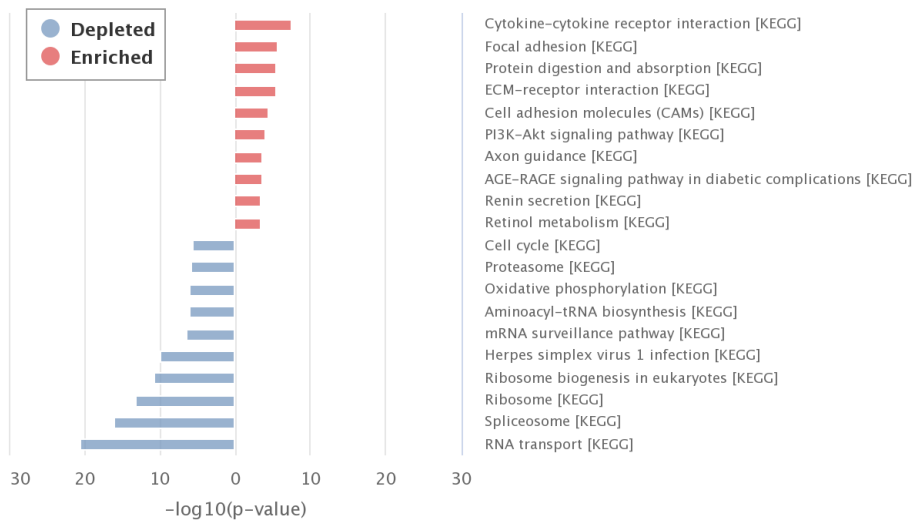
A**B**

Figure 38 : Ontologies et voies de signalisations médiées par les gènes corrélés à l'expression de FXR α dans les TGT.

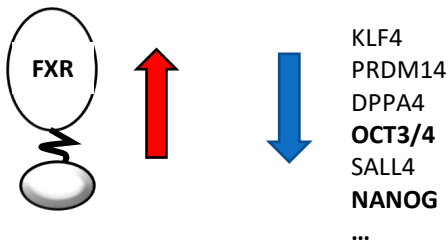
Les dix processus biologiques **(A)** et voies de signalisation **(B)** les plus importants, positivement (rouge) ou négativement (bleu) régulés par les gènes corrélés à l'expression de FXR α (spearman >0,4 et <-0,4) dans les TGT (source GO et KEGG).

A

Network	P-value
Biological oxidations	7,51E-06
Signaling by Retinoic Acid	1,97E-05
Extracellular matrix organization	1,07E-04
Beta1 integrin cell surface interactions	5,56E-04
FOXA1 transcription factor network	6,22E-04
Transcriptional regulation of pluripotent stem cells	1,03E-03
VEGF and VEGFR signaling network	1,16E-03
Validated transcriptional targets of TAp63 isoforms	3,40E-03
akt signaling pathway	5,98E-03
atm signaling pathway	5,98E-03
chaperones modulate interferon signaling pathway	5,98E-03
Alpha9 beta1 integrin signaling events	6,33E-03
Integrin signalling pathway	7,66E-03
Signaling by PDGF	8,48E-03
degradation of the rar and rxr by the proteasome	8,64E-03

 genomatix

B



C

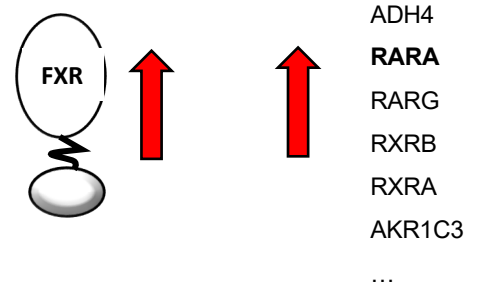


Figure 39 : Réseaux de gènes médiés par les gènes corrélés à l'expression de FXR α dans les TGT.

Les quinze réseaux de gènes les plus significatifs (logiciel Génomatix) impliquant les gènes corrélés à FXR α (spearman >0,4 et <-0,4) **(A)** et confortant la corrélation inverse entre FXR α et les gènes de pluripotence OCT3/4 et NANOG observée par l'équipe (Figure 26) **(B)** et celle de FXR α avec la voie des rétinoïdes **(C)**.

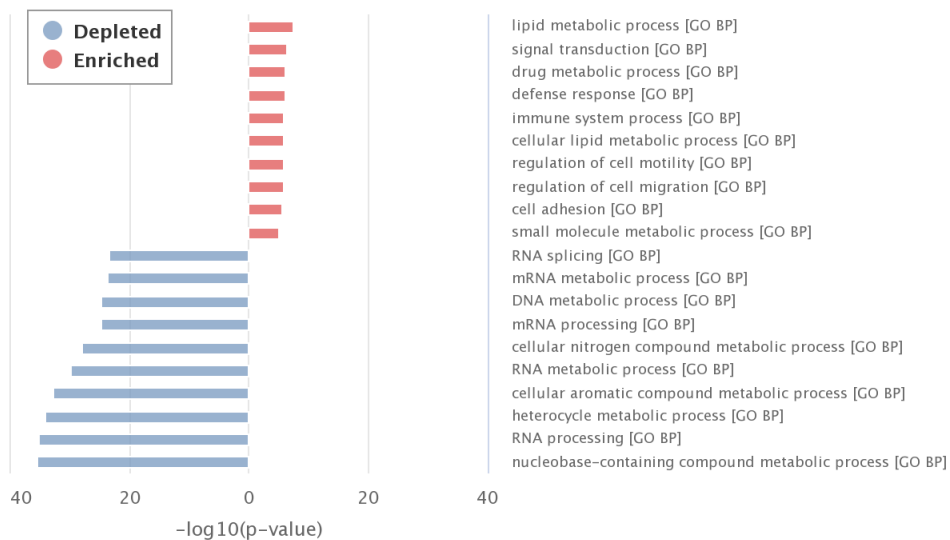
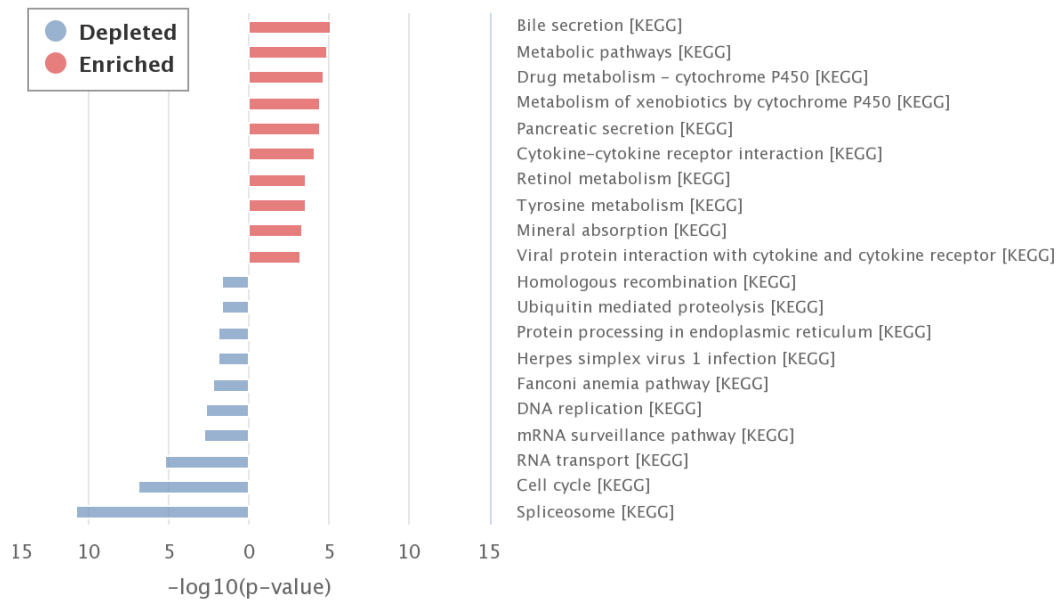


Figure 40 : Ontologies et voies de signalisations médiées par les gènes corrélés à l'expression de FXR α dans les térâtes.

Les dix processus biologiques **(A)** et voies de signalisation **(B)** les plus importants, positivement (rouge) ou négativement (bleu) régulés par les gènes corrélés à l'expression de FXR α (spearman >0,4 et <-0,4) dans les térâtes (n=35) (source GO et KEGG).

1 **Functional Analysis of a Novel Naturally Occurring DBD-binding domain FXR α**
2 **Splice Variant with different capacity for transcriptional activation.**

3

4 Manon Garcia¹, Hélène Holota¹, Yasmine Chebaro², Laura Thirouard¹, Mélusine Monrose¹,
5 Angélique De Haze¹, Isabelle ML Billas³, Françoise Caira¹, Gérard Benoit⁴, David H Volle¹ and
6 Claude Beaudoin^{1,5}

7

8 ¹Universit   Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR6293, INSERM U1103, 28 Place Henri
9 Dunant, BP38, F-63001 Clermont-Ferrand, France ; ²Department of Genetics and Genomic
10 Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, 10029, NY, USA; ³Department
11 of Integrative Structural Biology, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology,
12 CNRS UMR7104, Inserm U964, Universit   de Strasbourg, F-67404 Illkirch, France; ⁴Laboratoire
13 de Biologie et de Modélisation de la Cellule, CNRS UMR5239, Ecole Normale Supérieure de
14 Lyon, University of Lyon, F-69364, France ; ⁵Centre de Recherche en Nutrition Humaine
15 d' Auvergne, 58 Boulevard Montalembert, F-63009 Clermont-Ferrand, France.

16

17 **Correspondence**

18 Address correspondence to: Dr David H Volle or Prof Claude Beaudoin. Universit   Clermont
19 Auvergne, GReD, CNRS UMR6293, INSERM U1103, 28 Place Henri Dunant, BP38, F-63001
20 Clermont-Ferrand, France. E-mail : david.volle@inserm.fr ; claud.beaudoin@uca.fr

21

22 **Keywords**

23 Nuclear receptor, FXR alpha spliced variant, DNA-binding domain, transcription activation,
24 interacting capacities.

25

1 **Acknowledgments**

2 We are very grateful to Jean-Paul Saru for its technical assistance. This work was granted by
3 the French National Center for Scientific Research (CNRS), the Clermont Auvergne University
4 (UCA), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the French
5 League Against Cancer (R19037CC, Puy-de-Dôme committee) and the I-SITE CAP 20-25
6 Emergence program (IR20BEAUDOIN). MG is holder of a studentship from the French
7 Foundation for Medical Research (FRM). LT and MR are fellows of the French Ministry of
8 Higher Education, Research and Innovation (MESRI).

9

10 **Conflict of Interest**

11 The authors disclose no conflicts

12

13 **CRediT Autorship Contributions**

14 All the authors listed made substantial, direct, and intellectual contributions to the work and
15 approve it for publication.

16

1 **Summary**

2 **Background & Aims:** The farnesoid X receptor alpha (FXR α , NR1H4) is a bile acid-activated
3 nuclear receptor that sets the expression of target genes by interacting with FXR α -responsive
4 elements as a heterodimer with the 9-*cis*-retinoic acid receptor (RXR). Jointly with recruited
5 cofactors, the four current FXR α isoforms reported so far in human and rodent have been
6 described to regulate both isoform- and tissue-specific gene expression profiles. We described
7 here the identification and the characterization of a novel alternatively spliced form of FXR α 1
8 lacking exon 5 (FXR α 1 Δ Ex5) within the DNA-binding regulatory domain with still undescribed
9 biological functions. **Methods:** We evaluated global FXR α 1 Δ Ex5 expression profile in human
10 and mouse tissues using Genotype-Tissue Expression (GTEx) resources portal and reverse
11 transcription polymerase chain reaction, followed by assessment of DNA-binding and
12 transcription activation using mobility shift assays and luciferase reporters. We analyzed and
13 compared the transcriptome of HepG2 cells overexpressing FXR α 1 and exon 5 spliced variant
14 isoforms using RNA sequencing and validated the gene expression profiles by quantitative
15 PCR. Interaction with the RXR α partner and integration of ligand-dependent signals across the
16 dimer interface were also evaluated. **Results:** We show that the FXR α 1 Δ Ex5 is expressed in all
17 FXR α -expressing tissues and cells from human and mouse, and that is not able to either bind
18 to its response element or activate FXR α dependent transcriptional networks although it is
19 found in chromatin-enriched fraction probably by occurring protein-protein interactions.
20 Moreover, this splice variant exhibits a weak dominant negative effect on transcriptional
21 activity of the full length FXR α 1 and modified interaction capacities with its obligate
22 heterodimer partner RXR α that may account for silencing of this permissive dimer for signal
23 transduction *via* a still unknown structural mechanism. **Conclusions:** All together, these
24 findings highlighted a novel mechanism by which alternative splicing regulates FXR α gene

1 function to fine-tune adaptive and/or metabolic response to chemical signals. Taking this into
2 account could deepen our understanding on how splicing events may adapt FXR α to activate
3 specific transcriptional programs in tissues and cells.

4

1 **Introduction**

2 The farnesoid X receptor (FXR, NR1H4) is a member of the nuclear receptor (NR)
3 superfamily of ligand-dependent transcription factors that operates as a heterodimer with the
4 retinoid X receptor α (RXR α)(Forman et al., 1995; Makishima et al., 1999). Like most NR, FXR α
5 retains a DNA-binding domain (DBD) coupled by a flexible linker to a ligand-binding domain
6 (LBD) that serves as a transcriptional switch for ligand-dependent recruitment of coregulatory
7 proteins and transcriptional modulation of FXR α target genes [recently reviewed in (Garcia et
8 al., 2018)]. Over the years, FXR α has been shown to be highly expressed in enterohepatic
9 tissues such as the liver and intestine, and to play a key role in maintaining cholesterol and
10 bile acid levels as well as in regulating fatty acid and glucose metabolisms (Cariou and Staels,
11 2007; Wang et al., 2008; Gadaleta et al., 2015). Besides these metabolic functions, we and
12 other have highlighted the relevance of FXR α signaling in other biological processes such as
13 steroidogenesis, germ cell fate determination and male reproduction function with an impact
14 on male fertility since genetic ablation of FXR α promotes an abnormal accumulation of
15 undifferentiated germ cells in mouse testis (Volle et al., 2007; Baptissart et al., 2016; Martinot
16 et al., 2017).

17 Owing to the variety of molecular responses induced by FXR α signaling under physiological
18 and pathological conditions, many efforts have been made in order to understand how this
19 NR regulates a broad transcriptional program to promote ligand-dependent functions
20 following FXR α /RXR α heterodimerization to FXR α response element (FXRE). As for the other
21 NRs, two zinc finger motifs allow FXR α to interact with its response element which contains
22 two copies of a consensus AGGTCA-like DNA sequence reiterated directly (DR), inverted (IR)
23 or everted (ER) with various inter half-site spacing. Even though the FXR α /RXR α heterodimer
24 binds mostly to the consensus IR-1 (IR spaced by 1 base pair) sequence, this complex also

1 binds to and activates a variety of other FXREs in conjunction with transcriptional co-activators
2 or co-repressors that coordinate either gene activation or repression following post-
3 translational modifications of histones and non-histone proteins (Becares et al., 2017;
4 Kemper, 2011).

5 In human and rodent, four biologically active variants have been described so far from a
6 single *NR1H4* locus (Huber et al., 2002; Zhang et al., 2003). These distinct isoforms that differ
7 in both tissue- and species-specific expression as well as in ligand-dependent transcriptional
8 activities arise from an alternatively spliced 12-bp extension (amino acid sequence: MYTG) of
9 the DNA-binding domain (DBD) in conjunction with the usage of two alternative promoters
10 located in the first and the third exon of the gene (Otte et al., 2003; Vaquero et al., 2013).
11 These transcript variants termed FXR alpha1 and FXR alpha2 with (+) and without (-) the MYTG
12 insertion (also denominated FXR alpha1 through alpha4) contrast in their activating function
13 domain (AF-1) at the N-terminus as well as in the hinge region immediately adjacent to the
14 DNA-binding domain (Fig 1A). Indeed, this latter insert was shown to affect FXR α isoforms
15 ability to bind specific DNA sequences in the promoter region of FXR α target genes (Zhang et
16 al., 2003). Moreover, most metabolic effects regulated by FXR α in mouse and human liver
17 cells were recently reported to be regulated by the FXR α 2 isoforms (corresponding to the
18 FXR α 1 - MYTG) exclusively bound to specific DNA sequences that correspond to ER and IR
19 motifs (Correia et al., 2015; Ramos Pittol et al., 2020). This indicates that cell-specific pattern
20 of FXR α isoforms might be involved in the differential response of FXR α target genes to
21 its activation.

22 In the present study, we reported an unidentified naturally occurring spliced variant of
23 FXR α which harbors a deletion of exon 5 encoding the second zinc finger of the DNA-binding
24 domain. The frequency of exon 5 skipping in human (normal and tumor) cell lines and tissues

1 as well as in different mouse tissues suggests that this is a legitimate event with a potential
2 biological relevance to modulate FXR α activity and transcriptional activity. Here, we proposed
3 alternative splicing of the DBD as a novel mechanism of modulating FXR α activity.

4

5 **Methods**

6 ***Materials and Plasmids***

7 Gibco supplies the Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, cat#31053) and antibiotics
8 (Penicillin-Streptomycin, cat#15140122). Fetal bovine serum (cat#CVFSVF00-01), L-Glutamine
9 (cat#CSTGLU00-0U) and DPBS (cat#CS1PBS01-01) were obtained from Eurobio Scientific (Les
10 Ulis, France). Antibodies used were mouse monoclonal anti-FXR α (N20, A9033A, Perseus
11 Proteomics); rabbit polyclonal anti-RXR α (D20, sc-553, Santa Cruz Biotechnology); goat
12 polyclonal anti-H3 (C16, sc-86534, Santa Cruz Technologies); and rabbit polyclonal anti- β actin
13 from Sigma-Aldrich (cat#A2066). Immune complexes were detected with horseradish
14 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Ref#B12407) or goat anti-mouse (Ref#BI2413C) or
15 rabbit anti-goat (Ref#BI2403) immunoglobulin G secondary antibodies (Abliance, Compiègne,
16 France). The FXR α expression vectors were constructed by subcloning the full-length wild-type
17 and exon 5 skipped FXR α 1 isoforms PCR fragments amplified by reverse transcription of
18 HepG2 total RNA (Forward primer, 5'-GATCGGATCCGGATCAAAAATGAATCTCATTG-3'; Reverse
19 primer 5'-GATCTCTAGACTGCACGTCCCAGATTTACAG-3') directly into the BamHI/XbaI sites of
20 the pcDNA3.2 vector (Life Technologies, CA, USA) in-frame with the Flag and HA epitopes. All
21 DNA constructs were analyzed using restriction enzymes, agarose gel electrophoresis and
22 Sanger sequencing. Both *Shp* and *Akr1b7*-luciferase reporter genes used in this study have
23 been already described (Volle et al., 2004; Vega et al., 2015)

24

1 ***Cell Culture and transfection assays.***

2 HepG2, HeLa and HEK293 cells were cultured in 10 cm plates in DMEM supplemented with
3 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a humidified atmosphere containing
4 5% CO₂. NCCIT cells were maintained in complete RPMI medium containing 10% heat-
5 inactivated SVF and antibiotics. For transient transfections, 3-4 x 10⁵ cells per well were plated
6 in 6 well-plates and the next day, transient transfections were performed using the JetPEI
7 procedure (Polyplus, Illkirch, France). Two days later, cells were lysed and the luciferase
8 activity was measured as described (Oba et al., 2003).

9

10 ***RNA extraction, PCR analysis and sequencing.***

11 Normal human skeletal muscles (HR-102), small intestine (HR-306), colon (HR-311), liver
12 (HR-314), testis (HR-401), ovary (HR-406), adrenal (HR-501), lung (HR-601), kidney (HR-901)
13 and gallbladder (R1234118-10) total RNAs were purchased from AMS Biotechnologies Europe
14 LTD (Abingdon, UK). Mouse total RNA were isolated from adult tissues (male and female
15 C57Bl/6 animals) using Nucleospin RNA L (Macherey Nagel). cDNA were synthesized from total
16 RNA with the MMLV reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega). Specific
17 primers pairs used for RT-PCR and qPCR assays are available upon request. Real-time PCR
18 measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for
19 SYBR Assay; Eurogentec) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex
20 system. Standard curves were generated with pools of cDNA and the results were analyzed
21 using the $\Delta\Delta C_t$ method. For RNA sequencing, human HepG2 hepatocarcinoma cells were
22 transfected with FXR α 1(-) and FXR α 1 Δ Ex5 expressing vectors and total RNA was extracted
23 using Nucleospin RNA isolation kit (Macherey Nagel), according to the manufacturer's
24 instructions. Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the "France

1 Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009). Briefly, cDNA libraries were prepared using
2 TruSeq Stranded mRNA library prep kit for sequencing on Illumina Hi-Seq 4000 platform (1x
3 50bp, IGBMC Ilkirch, France). Reads were mapped onto the hg38 assembly of Homo sapiens
4 genome using STAR v2.5.3a. (Dobin et al., 2013) and the Bowtie 2 v2.2.8 aligner (Langmead
5 and Salzberg, 2012). Gene expression quantification was performed from uniquely aligned
6 reads using htseq-count v0.6.1p1 (Anders et al., 2015) with annotations from Ensembl release
7 99. Only non-ambiguously assigned reads have been retained for further analyses and the
8 Simple Error Ratio Estimate (SERE) coefficient has been used to quantify global RNA-seq
9 sample differences (Schulze et al., 2012). Read counts were normalized across libraries with
10 the method proposed by Anders and Huber (Anders and Huber, 2010). Comparisons of
11 interest were performed using the test for differential expression proposed by Love et al.
12 (Love et al., 2014) and implemented in the Bioconductor package DESeq2 v1.16.1. P-values
13 were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and
14 Hochberg, 1995). Raw data are deposited at GEO with the accession number GSEXXXXX)

15

16 ***Protein extraction and western blotting***

17 To make the whole-cell lysates, cells were washed with 1X PBS and resuspended in ice cold
18 RIPA buffer. After brief sonication on ice and clarification for 30 min at 15,000 x *g*, 40µg of
19 proteins were resolved through SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose
20 membranes. Membranes were blocked with BSA buffer [5% BSA in Tris-buffered saline (TBS)-
21 Tween 20] for 1 h and incubated with the indicated primary antibodies in BSA buffer overnight
22 at 4°C. The membranes were washed three times with TBS-Tween 20 and then incubated 90
23 min with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, goat anti-mouse or rabbit anti-
24 goat immunoglobulin G secondary antibodies, followed by enhanced chemiluminescence with

1 Clarity Western ECL Blotting Substrate (BioRad Laboratories, Richmond CA, USA). Small-scale
2 biochemical fractionation was performed as described previously (Wysocka et al., 2001).
3 Briefly, $1-2 \times 10^7$ cells were collected, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and
4 resuspended at 4×10^7 cells/ml in buffer A (10 mM HEPES [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM
5 $MgCl_2$, 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitor cocktail
6 [Boehringer]). Triton X-100 was added (0.1% final concentration), the cells were incubated on
7 ice for 8 min, and nuclei (fraction P1) were collected by centrifugation (5 min, $1,300 \times g$, $4^\circ C$).
8 The supernatant (fraction S1) was clarified by high-speed centrifugation (5 min, $20,000 \times g$,
9 $4^\circ C$), and the supernatant (fraction S2) was collected. The P1 nuclei were washed once in
10 buffer A and lysed for 30 min in buffer B (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, and
11 protease inhibitor cocktail [Boehringer]), and insoluble chromatin (fraction P3) and soluble
12 (fraction S3) fractions were separated by centrifugation (5 min, $1,700 \times g$, $4^\circ C$). After an
13 additional wash, the P3 fraction was resuspended in buffer B for western blotting with the
14 indicated antibodies.

15

16 ***GST pull-down experiments***

17 GST control protein as well as GST-fused proteins with either the DBD or the LBD of RXR α
18 were obtained by transforming expressing plasmids into BL21 (DE3) pLysS strain-competent
19 cells followed with 1 mM isopropyl-D-thiogalactoside induction. GST fusion proteins were
20 then purified by glutathione-agarose as instructed by the manufacturer (Sigma Aldrich, St-
21 Louis MO, USA). Cold methionine-labelled FXR α proteins were generated *in vitro* using the
22 TNT T7/T3-coupled reticulocyte lysate system (Promega Corp, Madison WI, USA).
23 Recombinant FXR proteins (3 μ l) were mixed by rocking with the glutathione-agarose bound
24 GST proteins at $4^\circ C$ for 2h to perform the pull-down assay as described previously (Léotoing

1 et al., 2008). The washed glutathione-agarose beads were boiling for 5 min in Laemmli buffer
2 and the bound FXR α proteins were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-
3 polyacrylamide gel and visualized by western blot using a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad).

4

5 ***Gel-shift assay Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA in text)***

6 Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed as described previously
7 (Aigueperse et al., 2001) using the radiolabeled FXRE consensus probe (IR-1: 5'-
8 GATGGGCCAAGGTCAATGACCTCGGGG -3'). Nuclear extracts were prepared from confluent
9 HeLa and HepG2 cells transiently transfected with wild-type and exon 5 deleted FXR α variant.
10 Briefly, cell monolayers were rinsed once with PBS 1X and scraped in 500 μ l of 10% glycerol
11 PBS. The cells were pelleted by centrifugation at 500 \times g for 5 min, washed in 500 μ l buffer A
12 (20 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.25 mM EGTA, 0.15 mM spermine, 0.5 mM
13 spermidine, 0.5 mM sucrose, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 1%
14 aprotinin) and pelleted. Pellets were resuspended in 500 μ l buffer A with 0.5% Nonidet P-40
15 and vortexed. The cells were expanded for 15 min on ice. The homogenates were centrifuged
16 10 min at 2,500 \times g and rinsed with buffer A without NP-40. After a centrifugation at 2,500 \times
17 g for 10 min to pellet the nuclei, 25-50 μ l buffer C (20 mM HEPES, 0.45 M NaCl, 1 mM EDTA,
18 0.25 mM EGTA, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 0.5 mM sucrose, 1 mM
19 phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, 1% aprotinin) were added, and the
20 samples were expanded for 10 min on ice. The nuclear lysate was then centrifuged for 20 min
21 at 13,000 \times g at 4 C, and the supernatant was placed into a fresh microfuge tube and stored
22 at - 80 C. Nuclear extracts (5 μ g) were incubated for 30 min at 4°C in EMSA buffer containing
23 1 μ g poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid (PolyIdC) and complexes were resolved by
24 electrophoresis through 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 0.5 \times Tris-borate-EDTA

1 (TBE) electrophoresis buffer. The gels were then dried and analyzed by autoradiography using
2 an automatic molecular imaging system (GE Amersham Thyphoon).

3

4 **Statistics Software**

5 Statistical significance was analyzed by using the Student's *t* test or ANOVA followed by a
6 Mann-Whitney *U* test. All values are reported as means \pm SD. Values of *P* < 0.05 were
7 considered significant.

8

9 **Results**

10 ***Identification and cloning of a novel FXR α spliced variant in human cells and tissues.***

11 While cloning FXR α from testicular germ cell cancer cell lines by PCR, we discerned a
12 shorter fragment also amplifying from HepG2 and NCCIT cells (Figure 1B). Further sequencing
13 of this PCR fragments identified a FXR α splice variant lacking the entire exon 5 of the *NR1H4*
14 gene transcript (Fig. 1 A, C). This new variant we called FXR α 1 Δ Ex5 aligns with the FXR α 1(+/-)
15 and FXR α 2(+/-) isoforms known so far but lacks the second zinc finger of the DNA-binding
16 domain although the fusion of exon 4 and 6 preserves the normal FXR α open reading frame
17 resulting in a 47 amino acid truncated protein as shown by *in vitro* translation of the
18 FXR α 1 Δ Ex5 transcript followed by western blotting (Fig 1D, E, F). Because, FXR α 1 Δ Ex5
19 transcript was detectable in model cell lines of tumorigenesis (Fig 1G) including liver (HepG2),
20 colon (Caco2), kidney (HEK293) and adrenal (H295), we wonder whether this novel isoform
21 might be found in normal human tissues. As shown in Figure 2A, publicly available RNA
22 sequencing (RNA-seq) data in the Genotype-Tissue Expression portal (GTEx;
23 <https://gtexportal.org/home/>) supported the evidence of exon 5 skipping in enterohepatic
24 and extra-enterohepatic tissues in human (upper panel). This is further strengthened by the

1 RT-PCR expression profiling of the FXR α 1 Δ Ex5 isoform that shows a strong accumulation in
2 the liver, kidney, adrenal and gallbladder, and to a lesser extent in the intestine, colon, testis
3 and ovary in human (Fig 2B). Interestingly, RT-PCR assays in different male and female mouse
4 tissues revealed that alternative splicing of the second zinc-finger of FXR α is a common event
5 since we were able to detect an equivalent spliced isoform in the liver, kidney, ileon, colon,
6 adrenal and gonads in both male and female adult mice (Fig 2C). Thus this splicing event that
7 occurs in human cell types and tissues and the conservation in mouse let us hypothesize that
8 this naturally occurring splice variant lacking a portion of the DBD (encoded by the exon 5)
9 might not transduce the same ligand-dependent and/or ligand-independent signaling cascade
10 as the wild-type receptor.

11

12 ***Exon 5 skipping disrupts FXR gene regulatory function.***

13 In order to evaluate whether the FXR α 1 Δ Ex5 isoform is able to act as ligand-dependent
14 and/or a ligand-independent transcription factor, we assayed its ability to transactivate
15 luciferase reporter genes driven by the IR-1 FXRE element of the *Shp* and *Akr1b7* promoters.
16 To do so, HepG2 cells were transfected with various amounts of FXR α 1 Δ Ex5 encoding plasmid
17 or full-length FXR α 1(-)-encoding plasmid since this isoform is shown to possess the highest
18 transcriptional activity among all the FXR α isoforms according to precedent works (Huber et
19 al., 2002; Zhang et al., 2003; Vaquero et al., 2013). As shown in Figure 3A, increasing amount
20 of FXR α 1 Δ Ex5 (100 to 500 ng) did not stimulate transcription of these two different FXRE-
21 driven luciferase gene reporters in HepG2 cells either in the absence or the presence of the
22 selective INT-747 agonist (1 μ M for 24h). In contrast, INT-747 treatment highly induced *Shp*
23 and *Akr1b7* promoter activities when full length FXR α 1(-) expressing plasmid is transfected.
24 Increasing the amount of FXR α 1(-) plasmid resulted in a higher level of luciferase activity while

1 the splicing variant failed to stimulate transcription even at higher dose. Ectopic expression of
2 FXR α 1 Δ Ex5 upon transient expression of HepG2 cells indicate that this isoform is highly
3 expressed and seems as stable as the full-length receptor (Fig 3B) confirming that the absence
4 of transcriptional activation by this shorter isoform alternatively spliced for exon 5 can unlikely
5 results from a reduced stability and/or difference in expression levels. To verify whether and
6 to what extent the FXR α 1 Δ Ex5 isoform may modulate FXR α transcriptional network through
7 specific binding to other FXRE DNA sequence motifs, we used RNA sequencing to explore the
8 transcriptome of HepG2 overexpressing either FXR1 α (-) or FXR α 1 Δ Ex5. By comparing genes
9 regulated by these two FXR α isoforms with the empty control vector, we generated the
10 heatmap presented in Figure 3C and the principal component analysis plot (Fig 3D). Analyses
11 indicate that FXR α 1(-) isoform regulated a large gene sets in comparison with the FXR α 1 Δ Ex5
12 isoform. Strikingly, none of the 179 genes upregulated by FXR1 α at 48 hours are modulated
13 by this isoform alternatively spliced for the second half of the DNA binding domain.
14 Experimental validation of the gene expression data by qRT-PCR (Fig 3E, F) clearly show that
15 exon 5 splicing significantly impairs gene activation by FXR α and that the FXR α 1 Δ Ex5 isoform
16 is unable to recapitulate the gene programs activated by FXR α 1(-), suggesting a contrasting
17 effect due to the loss of key structural motif in the DBD with an impact on FXR α -regulated
18 signaling pathway. These results raised questions regarding the ability of this variant to
19 interact with its heterodimer partner RXR α and to bind efficiently to specific DNA motifs, an
20 issue that has been addressed below.

21

22 ***Loss of exon 5 modifies RXR α interaction and impairs DNA binding of FXR α /RXR α***
23 ***heterodimers.***

1 The DNA binding domain of FXR α isoforms contains two highly conserved zinc finger motifs
2 that form right angle orientated helix ensuring contact with the major groove of the DNA and
3 receptor dimerization with RXR α through molecular interactions that are not totally clear.
4 Given the importance of heterodimerization with RXR α in FXR α -driven transcriptional
5 network, we thus addressed the question whether the loss of the second zinc finger of the
6 DNA-binding domain may affect protein-protein and/or protein-DNA interactions required for
7 cooperative dimeric binding of FXR α with RXR α to specific FXRE motifs. Therefore, we
8 generate glutathione S-transferase (GST) fusion proteins with the DBD and the LBD domains
9 of RXR α and used *in vitro*-synthesized FXR α to measure the binding capacities of the
10 FXR α 1 Δ Ex5 isoform. As shown in Figure 4A, FXR α 1(-) strongly associated with both the DBD
11 and the LBD domains of RXR α (compare lanes 3 with 5 and 7) while the interaction of the
12 FXR α 1 Δ Ex5 isoform is abrogated for the DBD domain of RXR α (compare lanes 5 and 6). On the
13 contrary, the binding affinity of this isoform for the LBD domain of RXR α is markedly enhanced
14 in the same condition (Fig 4A, compare lanes 3 and 4 with lanes 7 and 8). Since dimerization
15 with RXR α has been described to induce FXR α allosteric conformational changes and to
16 enhanced its transcriptional activity (Laffitte et al., 2000; Wang et al., 2018b; Zheng et al.,
17 2018), we thus studied the interaction of the alternatively spliced FXR α 1 Δ Ex5 isoform for its
18 DNA binding site using an electrophoretic mobility-shift assay. Expression vectors for both
19 isoforms were transfected individually (or along with RXR α) in HeLa cells and nuclear extracts
20 (NE) where incubated with a ³²P-labeled double strand IR1 consensus FXRE oligonucleotide for
21 FXR α /RXR α DNA binding assessment. Specific FXR α -FXRE complexes were formed when full-
22 length FXR α 1(-) was present in the nuclear extracts (Fig 4B, compare lanes 2 and 3) and the
23 presence of RXR α increased as expected the intensity of the band containing specific FXR α -
24 FXRE complexes (Fig 4B compare lanes 3 and 5). No specific complexes were detected with

1 the FXR α 1 Δ Ex5 spliced isoform in either the absence or presence of RXR α (lanes 4 and 6) and
2 cytoplasmic cell (CE) extracts as a source of protein also failed to identify sequence-specific
3 binding for FXR α 1 Δ Ex5 (lanes 7-9) although comparable protein levels were detected in
4 nuclear (Nucl) and cytoplasmic (Cyt) extracts by western blot analysis (Fig 4C, compare lanes
5 1-2 and lanes 3-10). These results imply that deletion of the second zinc finger interferes with
6 the capacity of FXR α to heterodimerize with RXR α and to properly bind to a consensus IR-1
7 motif.

8

9 ***Exon 5 splicing altered FXR α transcriptional properties and subcellular localization.***

10 Since the alternatively spliced FXR α 1 Δ Ex5 isoform is apparently present in HepG2 cells
11 along with FXR α (Fig 5A, left), it was of interest to examine its subcellular localization and to
12 determine whether it could interfere with the activity of the full length receptor or with its
13 permissive RXR α heterodimer partner. To address these questions, we first performed a small-
14 scale biochemical fractionation of HepG2 cells by devising a total cell extract (TCE) into three
15 fractions consisting of soluble cytosolic components (Cy), a soluble nuclear components (Nu),
16 and an insoluble pellet fraction containing chromatin and nuclear matrix components (Chr) as
17 described in the methods section. Using these fractions, we found that the large majority of
18 FXR α isoforms were recovered in the chromatin-containing pellet (Fig 5A, right). Attempts
19 were not made to analyze the abundance of these isoforms but we can assume from the RT-
20 PCR amplification (Fig 1B) and from Figure 5A that the splicing variant lacking exon 5 represent
21 a very small proportion in HepG2 cells and especially in the chromatin-rich fraction compared
22 to FXR α 1(-). This chromatin association of the FXR α 1 Δ Ex5 isoform is surprising since we
23 previously showed that this latter is not able to bind to a consensus IR-1 FXR α /RXR α -binding
24 site (Fig 4B). Yet, identical results were obtained with HepG2 transiently transfected with

1 FXR α 1(-) and FXR α 1 Δ Ex5 plasmids (Fig 5B) suggesting that this spliced isoform might be
2 tethered to DNA into chromatin complexes.

3 To further analyze the transcriptional properties of this alternatively spliced FXR α 1 Δ Ex5
4 isoform, we co-transfected FXRE-containing luciferase reporter genes with increasing amount
5 of the spliced isoform plasmid in HepG2 cells. Results from these experiments indicate that
6 increasing amount of FXR α 1 Δ Ex5 isoform resulted in approximately 20% (molecular ratio 1x,
7 2x and 4x; p=0,055) inhibition of the induced level of luciferase activity by the *Shp* promoter
8 (Fig 5C). To investigate whether this inhibition is exerted at the level of DNA binding, a gel
9 mobility shift assay was performed in which nuclear extracts from HepG2 cells overexpressing
10 either FXR α 1(-) or its spliced exon 5 isoform were incubated with a ³²P-labelled FXRE
11 consensus probe. As expected, the nuclear extracts of non-transfected HepG2 cells were able
12 to form specific FXR α -FXRE complexes, which could be enhanced with increasing amount of
13 transfected FXR α 1(-) in HepG2 cells (Fig 5D, lanes 2-5) but not with FXR α 1 Δ Ex5 that rather
14 slightly decreased the intensity of the complexes (lanes 6-9) although FXR α 1 Δ Ex5 by itself was
15 unable to bind to the FXRE (Fig 4b). All these results let us conclude that the FXR α 1 Δ Ex5
16 isoform might act as a weak repressor and ask whether it can interfere with additional ligand-
17 dependent signals integrated by other nuclear receptors and especially with the permissive
18 dimer partner RXR α across the dimer interface since the isoform strongly interact with the
19 LBD of RXR α that has been recently described to rheostat RXR α permissiveness by
20 conformational dynamic changes (Kojetin et al., 2015).

21 Using a series of transient transfection assays, we show that the RXR-specific agonist
22 LG100268 (LG268) stimulates transactivation of both *Shp*-, and *Akr1b7*-driven luciferase
23 reporter genes by FXR α 1(-)/RXR α in three different cell lines (NCCIT, germ cell tumor; HeLa,
24 cervix cancer; HEK293, embryonic kidney) and can produce either additive or synergistic

1 effects (Fig 6A) with the FXR α agonist INT-747. However, the overexpression of the FXR α 1 Δ Ex5
2 isoform silence the integration of signals by RXR α and let us hypothesize that the loss of the
3 second zinc-finger render FXR α non permissive for RXR α heterodimer since the signal
4 transmission by the two ligand-dependent signaling pathways is abrogated in the
5 FXR α 1 Δ Ex5/RXR heterodimer. Although a small fraction of the exon 5 spliced isoform was
6 found in the cytoplasmic fraction of NCCIT cells used in these transactivation assays, it unlikely
7 accounts for the silencing of RXR signaling because both partners are highly detected in the
8 chromatin-enriched pellet by western blotting (Fig 6B, lane 12). Actually, the structural
9 mechanism affecting signal transmission by RXR and the heterodimer partner FXR α 1 Δ Ex5 are
10 still unknown but we cannot exclude that loss of the second zinc finger of FXR α may promote
11 allosteric modifications that contribute to reinforce interaction with RXR α LBD, leading to
12 conformational changes of the dimer interface and disruption of the adjacent co-regulator-
13 and/or ligand-binding sites for silencing RXR permissive heterodimers.

14

15 **Discussion**

16 The nuclear receptor FXR α acts as a ligand-inducible transcription factor that governs
17 distinct biological processes through the modulation of target gene expression with its
18 obligate RXR α heterodimer partner. Advances in the structural characterization and modeling
19 of the *NR1H4* gene lead to the description of four FXR α isoforms in humans and mice up to
20 now as a result of differential use of promoters and alternative RNA splicing. Therefore, many
21 FXR α target genes are reported to be regulated in an isoform-specific manner with different
22 magnitude according to an extended N-terminus, which encompasses the defined activation
23 function 1 (AF1) domain, and the presence or absence of a four amino acid MYTG motif
24 located at the 3' end of the DNA-binding domain. Thus, as for most common multi-exons

1 genes, alternative splicing may play a pivotal role for triggering the diverse set of functions
2 that the *NR1H4* gene employs to transduce an adaptive and physiologic response after binding
3 of small lipophilic ligands that serve as a transcriptional switch.

4 We show here that alternative splicing generates a novel FXR α isoform identical to the
5 human FXR α 1 but lacking the entire exon 5 (Δ Ex5) that encodes the second zinc finger of the
6 DNA binding domain. This isoform FXR α 1 Δ Ex5 we described in human cells and tissues also
7 exists in male and female adult mouse tissues. Indeed, based on amino acid alignments (this
8 study and (Huber et al., 2002)), it would be expected that this splicing event affects FXR α 2
9 isoforms in human as well as FXR α RNA transcripts in other species than mice although these
10 possibilities have not been tested yet. Interestingly, a recent work has documented a naturally
11 occurring splice variants pattern for the human nuclear receptors (NR) family with a cassette
12 exon visualization pictograph methodology for illustrating the location of modular, cassette
13 exons, in all groups of *NR* genes (Annalora et al., 2020). From this, the elaborate cassette exon
14 signatures of the *NR1H4* gene highlights a large array of cassette exons that includes exon 5
15 suggesting that further FXR α splice variants might be generated with different DNA-binding
16 properties, heterodimer interactions, and subcellular trafficking proceedings in order to refine
17 complex physiological responses along with coregulatory proteins. At the moment, the
18 specific factors possibly involved in FXR α exon 5 skipping need to be further investigated but
19 it is tempting to speculate about the spliceosome U2 snRNP auxiliary factor 2 (U2AF2) since
20 FXR-regulated gene programs controlling primary bile acids synthesis and steroid hormone
21 biosynthesis are among the most enriched and up-regulated genes in U2AF2 knocked-down
22 HepG2 cells according to the large-scale data sets generated by The ENCODE Project
23 Consortium.

1 Structure analysis of DNA-binding domain of steroid receptors have shown that the second
2 zinc finger allows the receptor to interact with its homo- or hetero-dimeric partner while the
3 first zinc finger makes the receptor-DNA contact by binding to a specific hormone response
4 element. As described for other DBD-spliced steroid NRs such as the estrogen receptor (Wang
5 and Miksicek, 1991), it is thus not surprising that the exon 5 skipped FXR α isoform cannot bind
6 to its consensus FXRE response element either in the presence or absence of its RXR α
7 heterodimeric partner. This could be explained in part by the loss of the D-box included at the
8 N-terminus of the second zinc finger since this five amino acid motif is known to regulate DNA
9 dimerization and DNA binding of the glucocorticoid receptor (GR) whereas it does not bind
10 DNA by itself (Dahlman-Wright et al., 1991; Luisi et al., 1991). Interestingly, many NR variants
11 with skipped DBD encoding exons have been associated with human disease including cancer
12 (Annalora et al., 2020), however the structural consequence of exon 5 FXR α splicing in human
13 diseases promotion and health resilience are currently difficult to predict. Nevertheless, in-
14 frame insertion in the first zinc finger module of FXR α leading to disruption of DNA binding,
15 and dysregulation of the splicing machinery have been both reported in the development of
16 liver diseases and may support this hypothesis (Gomez-Ospina et al., 2016; del Río-Moreno et
17 al., 2019).

18 In addition to alternative splicing, changes in posttranslational modifications (PTM) also
19 affect NR activities and their regulatory effects on FXR α localization and binding under
20 physiological and pathological conditions have drawn attention to conserved phosphorylation
21 and acetylation sites within the second zinc finger motif of the DBD. On the one hand,
22 acetylation of lysine 157 and lysine 217 have been reported to be dynamically regulated by
23 the p300 acetyltransferase and the deacetylase SIRT1 with functional consequence on FXR α
24 DNA binding and heterodimerization capacities (Kemper et al., 2009). On the other hand,

1 serine 135 and serine 154 can be phosphorylated by protein kinase C leading to increased
2 binding to coactivators and enhanced transcriptional activity without affecting DNA binding
3 or nuclear localization (Gineste et al., 2008). Likewise, extensive PTMs of the DBD are closely
4 linked to the tight modulation of FXR α activity and our western blotting analysis showed that
5 FXR α 1 Δ Ex5 isoform did not undergo PTMs anymore in HepG2 cells when compared to the full
6 length FXR α 1. Therefore, excision of exon 5 recapitulated many of the PTM-related changes
7 in FXR α DNA binding and transcription activation capacities and prompt us to check whether
8 the exon FXR α 1 Δ Ex5 spliced variant modifies its subcellular localization and/or tempers its
9 ability to interact with RXR α and to form FXR α /RXR DNA complexes onto chromatin through
10 protein-protein interactions even though it is not able to bind directly to a consensus FXRE
11 response element *in vitro*.

12 Our small scale biochemical fractionation indicates that removal of exon 5 which contains
13 the Ser154 phosphorylation site closely to the Lys 157 acetylation site is partially delocalized
14 into the cytoplasmic compartment in a cell-dependent context suggesting thus that this
15 variant might not be totally tethered in the nucleus in certain circumstance due to the absence
16 of a given set of PTMs and/or modification of cofactor interactions. Consistent with this
17 observation, posttranslational regulation of subcellular trafficking has been reported for the
18 PPAR γ nuclear receptor through its direct interaction with the ERK cascade component
19 MAPK/ERK-kinases 1/2 (MEKs) in order to orchestrate non-genomic events (Burgermeister
20 and Seger, 2007; Papageorgiou et al., 2007). The ability of FXR α 1 Δ Ex5 to activate noncanonical
21 FXR α general signaling pathways warrants further investigations to determine whether and to
22 what extent this variant might contribute to independent transcription activation responses.
23 This should provide novel insights into molecular mechanisms associated to anti-apoptotic
24 and metabolic action of FXR α , an outcome that is in line with the recent finding that FXR α

1 interacts with caspase 8 into the cytoplasm and inhibits the formation of death inducing
2 signaling complexes to prevent apoptosis in hepatocytes (Wang et al., 2018a).

3 Finally, pull down assays, luciferase reporters, and transcriptome sequencing of HepG2
4 cells overexpressing either FXR α 1 or FXR α 1 Δ Ex5 isoforms reveal that exon 5 splicing confers
5 exclusive properties to the FXR α metabolic receptor for binding and gene transcription
6 activation. *In vitro* interaction assay revealed that FXR α 1 Δ Ex5 strongly interacts with the
7 ligand-binding domain (LBD) of RXR α but not with the DNA-binding domain (DBD) contrarily
8 to full length FXR α 1 that interacts equally with both RXR α DBD and LBD. One plausible
9 explanation for these differential molecular interactions between FXR α 1 variants and RXR α
10 may reside in the unique feature of the DNA-binding domain of FXR α 1 Δ Ex5 that lacks the
11 second zing finger motif that encompasses the D-box, and the carboxyterminal extension
12 (CTE) of the DNA-binding domain making an unfavorable global folding pattern for the
13 interaction with the DNA-binding domain of RXR α . Recently, intramolecular interactions
14 between the DBD and the LBD of the CAR nuclear receptor has been shown to regulate its
15 conversion between an inactive or an active heterodimer with RXR α (Shizu et al., 2018). Of
16 interest, this previous work also showed that deletion of the hinge region reduced the
17 flexibility of the CAR nuclear receptor to correctly position its DBD relative to the LBD and
18 abrogate its ability to form an active RXR α heterodimer. Based on these observations, we
19 postulated that FXR α 1 exon 5 skipping by alternative splicing reduced the separation between
20 the DBD and the LBD to hinder intramolecular interactions and make an inactive FXR α partner
21 that silences the permissive RXR α heterodimer as observed in our luciferase reporter gene
22 assays. Hence, crystal structure and three-dimensional DNA modeling of the FXR α 1 should be
23 of great interest to better understand the structural consequence of exon 5 splicing on FXR α
24 transcription activation and signaling outputs within its permissive RXR heterodimer. Although

1 inactive in reporter gene transactivation assays, both heterodimer partners are found in a
2 chromatin-enriched fraction even if the Δ Ex5 spliced FXR α 1 variant was unable to bind either
3 alone or with RXR α to a specific FXRE DNA sequence in a gel mobility assay. This let us conclude
4 that auxiliary protein-protein interactions may be required to stabilize the heterocomplex
5 onto chromatin and raised several concerns that need to be addressed in order to identified
6 their coregulatory proteins and the site within the DNA to which they bind. This should be
7 easily performed by chromatin immunoprecipitation-based screen to identify functional
8 genomic binding sites for these sequence-specific factors and to determine how this new FXR α
9 variant may exert its dominant negative inhibition of FXR α transactivation including for the
10 new potential target genes identified in this study. In summary, these findings established
11 alternative splicing as a complementary mechanism of FXR α signaling regulation, opening new
12 prospective avenues for the study of FXR α in physiological and/or pathologic conditions in
13 which it is involved.

14

15 **References**

- 16 Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veyssiere, G., Jean, C.,
17 and Martinez, A. (2001). SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding
18 protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective
19 promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene
20 (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 93–111.
- 21 Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. 12.
- 22 Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-
23 throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.

1 Annalora, A.J., Marcus, C.B., and Iversen, P.L. (2020). Alternative Splicing in the Nuclear
2 Receptor Superfamily Expands Gene Function to Refine Endo-Xenobiotic Metabolism. *Drug*
3 *Metab. Dispos.* 48, 272–287.

4 Baptissart, M., Martinot, E., Vega, A., Sédes, L., Rouaisnel, B., de Haze, A., Baron, S.,
5 Schoonjans, K., Caira, F., and Volle, D.H. (2016). Bile acid-FXR α pathways regulate male
6 sexual maturation in mice. *Oncotarget* 7, 19468–19482.

7 Becares, N., Gage, M.C., and Pineda-Torra, I. (2017). Posttranslational Modifications of Lipid-
8 Activated Nuclear Receptors: Focus on Metabolism. *Endocrinology* 158, 213–225.

9 Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and
10 Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300.

11 Burgermeister, E., and Seger, R. (2007). MAPK- Kinases as Nucleo-Cytoplasmic Shuttles for
12 PPAR γ . *Cell Cycle* 6, 1539–1548.

13 Cariou, B., and Staels, B. (2007). FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends*
14 *Pharmacol. Sci.* 28, 236–243.

15 Correia, J.C., Massart, J., de Boer, J.F., Porsmyr-Palmertz, M., Martínez-Redondo, V., Agudelo,
16 L.Z., Sinha, I., Meierhofer, D., Ribeiro, V., Björnholm, M., et al. (2015). Bioenergetic cues
17 shift FXR splicing towards FXR α 2 to modulate hepatic lipolysis and fatty acid metabolism.
18 *Mol. Metab.* 4, 891–902.

19 Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A., and Carlstedt-Duke, J. (1991). Interaction of
20 the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a
21 short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* 266, 3107–3112.

22 Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M.,
23 and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.*
24 29, 15–21.

1 Forman, B.M., Goode, E., Chen, J., Oro, A.E., Bradley, D.J., Perlmann, T., Noonan, D.J., Burka,
2 L.T., McMorris, T., Lamph, W.W., et al. (1995). Identification of a nuclear receptor that is
3 activated by farnesol metabolites. *Cell* *81*, 687–693.

4 Gadaleta, R.M., Cariello, M., Sabbà, C., and Moschetta, A. (2015). Tissue-specific actions of FXR
5 in metabolism and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 30–39.

6 Garcia, M., Thirouard, L., Sedès, L., Monrose, M., Holota, H., Caira, F., Volle, D.H., and
7 Beaudoin, C. (2018). Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A
8 Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *19*,
9 3630.

10 Gineste, R., Sirvent, A., Paumelle, R., Helleboid, S., Aquilina, A., Darteil, R., Hum, D.W.,
11 Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2008). Phosphorylation of Farnesoid X Receptor by Protein
12 Kinase C Promotes Its Transcriptional Activity. *Mol. Endocrinol.* *22*, 2433–2447.

13 Gomez-Ospina, N., Potter, C.J., Xiao, R., Manickam, K., Kim, M.-S., Kim, K.H., Shneider, B.L.,
14 Picarsic, J.L., Jacobson, T.A., Zhang, J., et al. (2016). Mutations in the nuclear bile acid
15 receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Commun.* *7*, 10713.

16 Huber, R., Murphy, K., Miao, B., Link, J., Cunningham, M., Rugar, M., Gunyuzlu, P., Haws, T.,
17 Kassam, A., Hollis, G., et al. (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms
18 through the use of alternative promoters. *Gene* *290*, 35–43.

19 Kemper, J.K. (2011). Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging
20 roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*,
21 842–850.

22 Kemper, J.K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S.-Y.,
23 Chiang, C.-M., and Veenstra, T.D. (2009). FXR Acetylation Is Normally Dynamically

1 Regulated by p300 and SIRT1 but Constitutively Elevated in Metabolic Disease States. *Cell*
2 *Metab.* *10*, 392–404.

3 Kojetin, D.J., Matta-Camacho, E., Hughes, T.S., Srinivasan, S., Nwachukwu, J.C., Cavett, V.,
4 Nowak, J., Chalmers, M.J., Marciano, D.P., Kamenecka, T.M., et al. (2015). Structural
5 mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. *Nat. Commun.* *6*,
6 8013.

7 Laffitte, B.A., Kast, H.R., Nguyen, C.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., and Edwards, P.A. (2000).
8 Identification of the DNA Binding Specificity and Potential Target Genes for the Farnesoid
9 X-activated Receptor*. *J. Biol. Chem.* *275*, 10638–10647.

10 Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat.*
11 *Methods* *9*, 357–359.

12 Léotoing, L., Meunier, L., Manin, M., Mauduit, C., Decaussin, M., Verrijdt, G., Claessens, F.,
13 Benahmed, M., Veysseyre, G., Morel, L., et al. (2008). Influence of nucleophosmin/B23 on
14 DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell.
15 *Oncogene* *27*, 2858–2867.

16 Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and
17 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.

18 Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991).
19 Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*
20 *352*, 497–505.

21 Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D.,
22 Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids.
23 *Science* *284*, 1362–1365.

1 Martinot, E., Sèdes, L., Baptissart, M., Holota, H., Rouaisnel, B., Damon-Soubeyrand, C., De
2 Haze, A., Saru, J.-P., Thibault-Carpentier, C., Keime, C., et al. (2017). The Bile Acid Nuclear
3 Receptor FXR α Is a Critical Regulator of Mouse Germ Cell Fate. *Stem Cell Rep.* *9*, 315–328.

4 Oba, Y., Ojika, M., and Inouye, S. (2003). Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-
5 dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase. *FEBS Lett.* *540*,
6 251–254.

7 Otte, K., Kranz, H., Kober, I., Thompson, P., Hofer, M., Haubold, B., Rimmel, B., Voss, H.,
8 Kaiser, C., Albers, M., et al. (2003). Identification of farnesoid X receptor beta as a novel
9 mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 864–872.

10 Papageorgiou, E., Pitulis, N., Msaouel, P., Lembessis, P., and Koutsilieris, M. (2007). The non-
11 genomic crosstalk between PPAR- γ ligands and ERK1/2 in cancer cell lines. *Expert Opin.*
12 *Ther. Targets* *11*, 1071–1085.

13 Ramos Pittol, J.M., Milona, A., Morris, I., Willemsen, E.C.L., van der Veen, S.W., Kalkhoven, E.,
14 and van Mil, S.W.C. (2020). FXR Isoforms Control Different Metabolic Functions in Liver
15 Cells via Binding to Specific DNA Motifs. *Gastroenterology* *159*, 1853-1865.e10.

16 del Río-Moreno, M., Alors-Pérez, E., González-Rubio, S., Ferrín, G., Reyes, O., Rodríguez-
17 Perálvarez, M., Sánchez-Frías, M.E., Sánchez-Sánchez, R., Ventura, S., López-Miranda, J., et
18 al. (2019). Dysregulation of the Splicing Machinery Is Associated to the Development of
19 Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *104*, 3389–3402.

20 Schulze, S.K., Kanwar, R., Gölzenleuchter, M., Therneau, T.M., and Beutler, A.S. (2012). SERE:
21 Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq. *BMC Genomics* *13*,
22 524.

1 Shizu, R., Min, J., Sobhany, M., Pedersen, L.C., Mutoh, S., and Negishi, M. (2018). Interaction
2 of the phosphorylated DNA-binding domain in nuclear receptor CAR with its ligand-binding
3 domain regulates CAR activation. *J. Biol. Chem.* *293*, 333–344.

4 Vaquero, J., Monte, M.J., Dominguez, M., Muntané, J., and Marin, J.J.G. (2013). Differential
5 activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms
6 and the bile acid pool composition. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 926–939.

7 Vega, A., Martinot, E., Baptissart, M., De Haze, A., Saru, J.-P., Baron, S., Caira, F., Schoonjans,
8 K., Lobaccaro, J.-M.A., and Volle, D.H. (2015). Identification of the Link Between the
9 Hypothalamo-Pituitary Axis and the Testicular Orphan Nuclear Receptor NROB2 in Adult
10 Male Mice. *Endocrinology* *156*, 660–669.

11 Volle, D.H., Repa, J.J., Mazur, A., Cummins, C.L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veyssiere,
12 G., Mangelsdorf, D.J., and Lobaccaro, J.-M.A. (2004). Regulation of the Aldo-Keto Reductase
13 Gene *akr1b7* by the Nuclear Oxysterol Receptor LXR α (Liver X Receptor- α) in the Mouse
14 Intestine: Putative Role of LXRs in Lipid Detoxification Processes. *Mol. Endocrinol.* *18*, 888–
15 898.

16 Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.-M.A.,
17 Verhoeven, G., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). The small heterodimer partner is a
18 gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* *21*, 303–315.

19 Wang, Y., and Miksicek, R.J. (1991). Identification of a dominant negative form of the human
20 estrogen receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *5*, 1707–1715.

21 Wang, H., Ge, C., Zhou, J., Guo, Y., Cui, S., Huang, N., Yan, T., Cao, L., Che, Y., Zheng, Q., et al.
22 (2018a). Noncanonical farnesoid X receptor signaling inhibits apoptosis and impedes liver
23 fibrosis. *EBioMedicine* *37*, 322–333.

1 Wang, N., Zou, Q., Xu, J., Zhang, J., and Liu, J. (2018b). Ligand binding and heterodimerization
2 with retinoid X receptor α (RXR α) induce farnesoid X receptor (FXR) conformational
3 changes affecting coactivator binding. *J. Biol. Chem.* *293*, 18180–18191.

4 Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Moore, D.D., and Huang, W. (2008). FXR: a metabolic regulator and
5 cell protector. *Cell Res.* *18*, 1087–1095.

6 Wysocka, J., Reilly, P.T., and Herr, W. (2001). Loss of HCF-1–Chromatin Association Precedes
7 Temperature-Induced Growth Arrest of tsBN67 Cells. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3820–3829.

8 Zhang, Y., Kast-Woelbern, H.R., and Edwards, P.A. (2003). Natural Structural Variants of the
9 Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor Affect Transcriptional Activation. *J. Biol. Chem.* *278*,
10 104–110.

11 Zheng, W., Lu, Y., Tian, S., Ma, F., Wei, Y., Xu, S., and Li, Y. (2018). Structural insights into the
12 heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR. *J. Biol. Chem.* *293*, 12535–
13 12541.

14

15

1 **Figure legends**

2 **Figure 1: Identification of a novel alternative splice variant in the human *NR1H4* locus. (A)**

3 Schematic representation of the human *NR1H4* gene locus with 11 exons and 10 introns.
4 FXR α 1 and FXR α 2 are transcribed from exon 1 and exon 3 respectively. The 12-bp insertion is
5 located at the 3' end of exon 5. Alternative splicing between exon 5 and 6 produces the forms
6 that contain (+) or do not contain (-) the 12-bp insert (amino acid sequence: MYTG). Position
7 of the forward (F1) and reverse (R1) primers are indicated. **(B)** RT-PCR amplification of FXR α 1(-
8) and FXR α 1 Δ Ex5 isoforms from HepG2 and NCCIT cell lines. **(C)** Sequencing of the RT-PCR
9 amplified fragments from B. Chromatograms of FXR α 1(-) and FXR α 1 Δ Ex5 (left and right panels
10 respectively) revealed that the splice variant lacks the entire exon 5. **(D)** Alignment of the
11 FXR α 1(-) and FXR α 1 Δ Ex5 sequences between exons 4 and 6 (amino acid sequence 111 to 226).
12 Zinc finger 1 and 2 are highlighted. **(E)** The highly conserved zinc-finger domain of the human
13 FXR α protein. The amino acid sequence corresponding to the second zinc finger deleted by
14 exon 5 splicing is boxed. Adapted from (Gomez-Ospina et al., 2016) **(F)** *In vitro* translation of
15 plasmids encoding FXR α 1(-) and FXR α 1 Δ Ex5, followed by western blotting with anti-FXR α
16 antibody. **(G)** FXR α 1 Δ Ex5 expression in liver (1. HepG2), colon (2. Caco2), adrenal (3. H295R)
17 and kidney (4. HEK293) cell line models. Water (5) was used as a negative control.

18

19 **Figure 2: Analysis of FXR α alternative splicing and frequency of exon 5 skipping in human**

20 **and mouse tissues. (A)** FXR α exon 5 splicing in different human tissues according to
21 transcriptomic sequencing (RNA-seq) data from the Genome-Tissue Expression portal (GTEx).

22 **(B and C)** Representative gel images of three independent RT-PCR assays for the FXR α isoforms
23 in human (B) and murine tissues (C). β -actin was used as a reference gene. Sequence for

24 Forward and Reverse primers are available in table 1.

1

2 **Figure 3: Effect of alternative exon5 splicing on the transcriptional activation of gene**

3 **network by FXR α .** (A) HepG2 cells were co-transfected with the indicated reporter plasmids

4 and various amount (100 to 500 ng) of expression plasmids encoding for FXR α 1(-) and Δ Ex5

5 spliced FXR α 1 variant as indicated. After 12 hours, the cells were treated with 1 μ M of INT-

6 747 or with the vehicle (DMSO) and firefly luciferase activities were measured the following

7 day. Luciferase activities were normalized relative to protein concentrations and results of the

8 assay were expressed as fold-induction over empty vector (fixed to 1). The data shown are

9 means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. (* p <0.05, ** p <0.01,

10 *** p <0.001). (B) Transfected HepG2 cells were treated with cycloheximide (CHX, 50 μ M) for

11 the indicated time period and Flag-FXR α levels in cell extracts were detected. (C) Heatmap of

12 gene expression profiles in HepG2 overexpressing FXR α 1 and FXR α 1 Δ Ex5 spliced isoforms. (D).

13 Venn diagrams showing the number of FXR α 1-induced genes (left) and FXR α 1 Δ Ex5-modulated

14 genes (right) in HepG2 cells 24 and 48 hours after transfections. (E, F) Detail of the heatmap

15 in C (time point 24 hours) and relative mRNA quantification (qPCR) of selected FXR α -

16 modulated genes from independent co-transfection assays in HepG2 cells after 24 hours (open

17 bars) and 48 hours (dotted bars) versus control cells (Ctrl). β -actin was used as a reference

18 gene, and data are shown as means \pm SD from three independent experiments. * p <0.05,

19 ** p <0.01, *** p <0.001.

20

21 **Figure 4: Exon 5 splicing alters FXR α binding properties.** (A) GST alone, or fused to the DBD

22 or the LBD of human RXR α were expressed in *E. coli* and then purified with Glutathione-

23 agarose beads. Fusion protein-bound beads were incubated with *in vitro* translated FXR α

24 isoforms, washed and then separated by 10% SDS-PAGE. Bound-FXR α isoforms were

1 visualized by western blotting using an anti-FXR α antibody. **(B)** Electrophoretic mobility-shift
2 assay performed with the consensus IR1 FXRE and nuclear extract (NE) from HeLa cells
3 overexpressing either FXR α 1(-) or FXR α 1 Δ Ex5 individually or along with mouse RXR α as
4 indicated. **(C)** Analysis of nuclear (Nucl) and cytosolic (Cyt) fractions by western blotting using
5 the indicated antibodies. Histone H3 detection was used to confirm the nuclear extract
6 fractions.

7

8 **Figure 5: Analysis of FXR α 1 Δ Ex5 subcellular localization and effects on FXR α -driven**

9 **transcription activation. (A)** Western blot analysis of FXR α isoforms abundance and
10 subcellular localization in HepG2 cells. Arrows indicated FXR1 α and FXR1 Δ Ex5 spliced isoforms

11 **(B)** Transiently transfected HepG2 cells overexpressing FXR α 1 (lanes 1 and 3 to 5) or its spliced

12 FXR α 1 Δ Ex5 isoform protein (lanes 2 and 6 to 8) were subjected to biochemical fractionation

13 and cytosolic (Cy), soluble nuclear (Nu) and chromatin-enriched (Chr) fractions were

14 analyzed by western blotting with an anti-FXR α antibody. Immunoblot analysis for histone H3

15 was used to validate appropriated fractionation of the chromatin-containing pellet. TCE, total

16 cellular extracts. **(C)** HepG2 cells were co-transfected with the *Shp*-luciferase reporter gene

17 alone or with increasing amount of FXR α 1 Δ Ex5. Cells were incubated for 24 hours with DMSO

18 (vehicle) or with 1 μ M INT-747. Luciferase activities were measured as described. Data are

19 means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate ($p=0,055$; Student T-

20 tests) **(D)** Increasing amount of either FXR α 1(-) or expressing vector were transfected in

21 HepG2 cells and nuclear extracts were incubated with a radiolabeled probe containing the

22 consensus IR1 FXRE. Complexes were detected using gel mobility assay and non-specific

23 complex formed between the FXRE and HepG2 nuclear extract is indicated (ns).

24

1 **Figure 6: FXR α 1 Δ Ex5 splice variant inhibits ligand dependent RXR permissiveness. (A)** Co-
2 transfected cells (NCCIT, HeLa, HEK293) with full length FXR α 1 or exon 5 skipped isoforms
3 expression plasmid, RXR α expression plasmid and FXRE-responsive luciferase reporter genes.
4 Cells were treated with vehicle (unstim), 1 μ M INT-747 (INT) and/or 1 μ M LG100268 for 24
5 hours. Luciferase activity is shown normalized to vehicle-treated cells (fixed to 1) and was
6 performed in triplicate, plotted with the average \pm SEM and representative of at least three
7 independent experiments. **(B)** Transient transfected NCCIT cells overexpressing RXR with
8 either FXR α 1 and its FXR α 1 Δ Ex5 variant were subjected to biochemical fractionation and
9 probed as in figure 5 using the indicated antibodies.

10

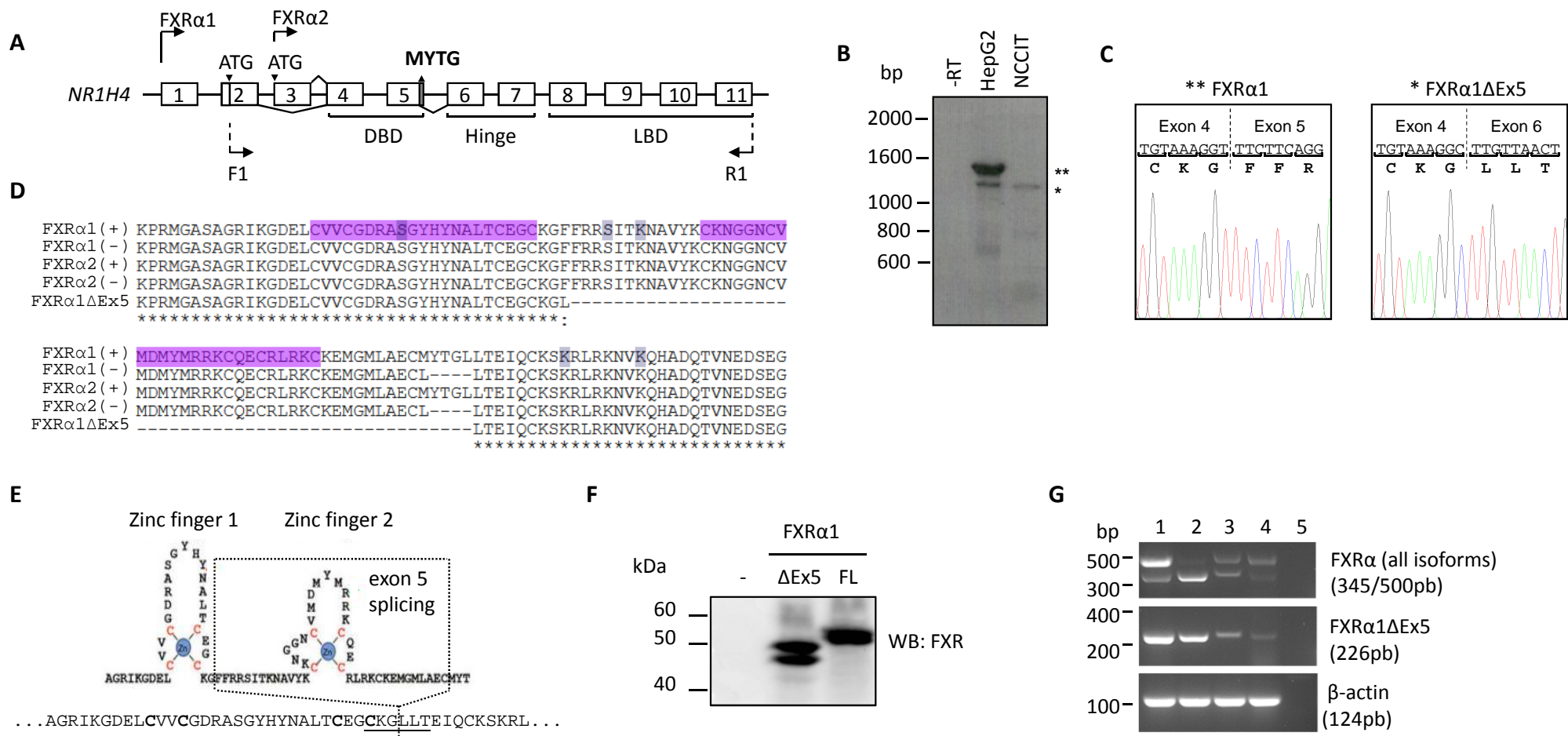


Figure 1, Garcia et al.

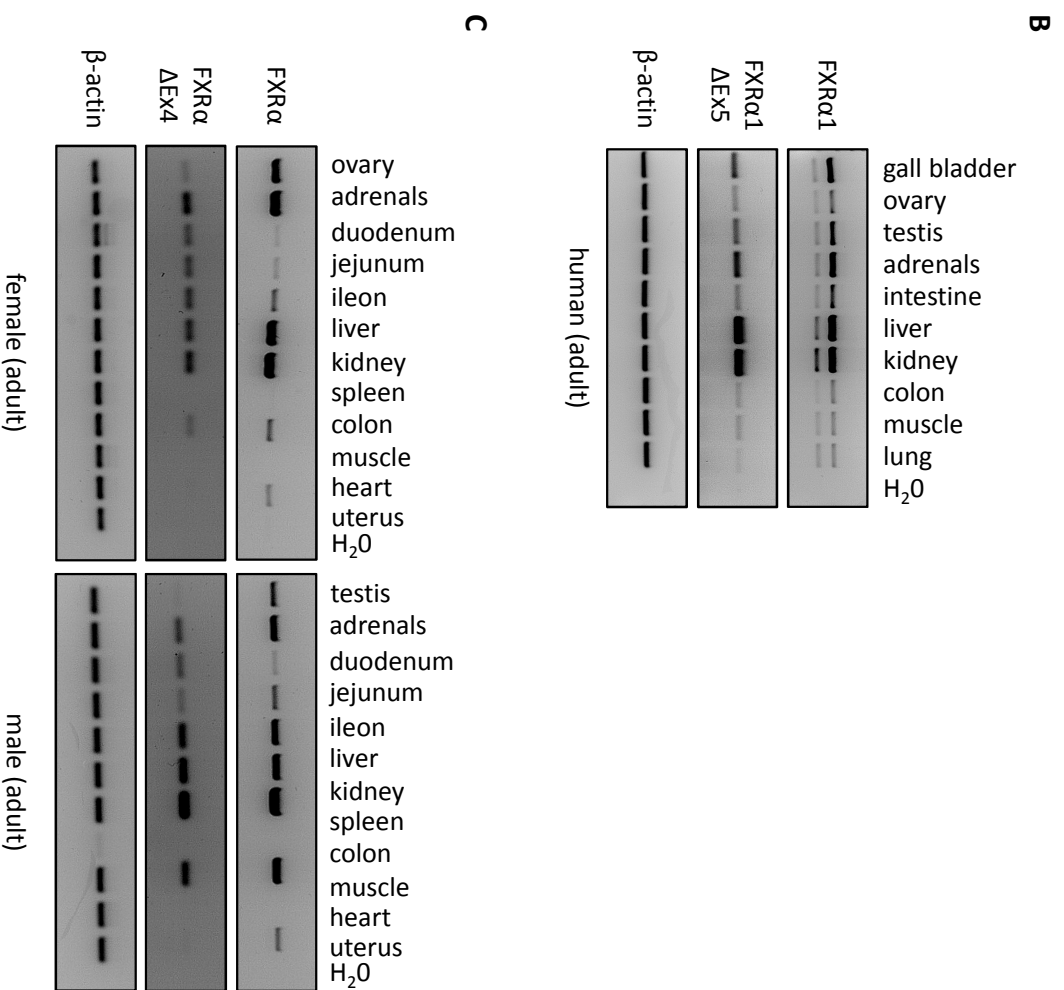
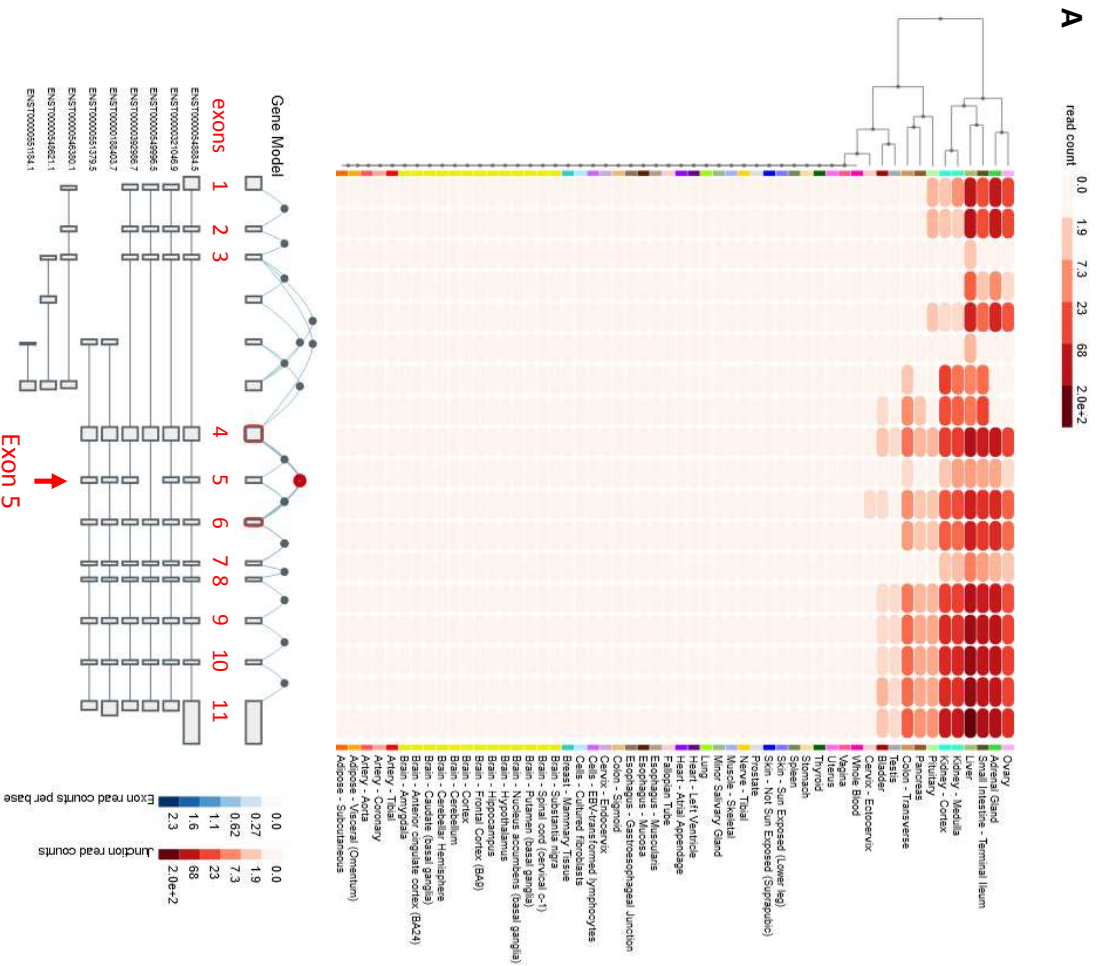


Figure 2, Garcia et al.

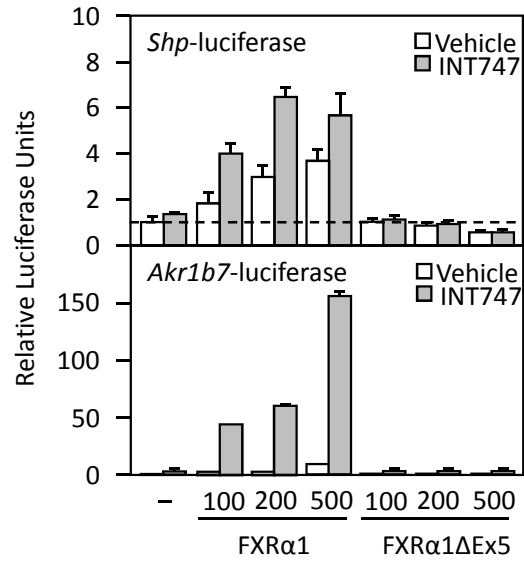
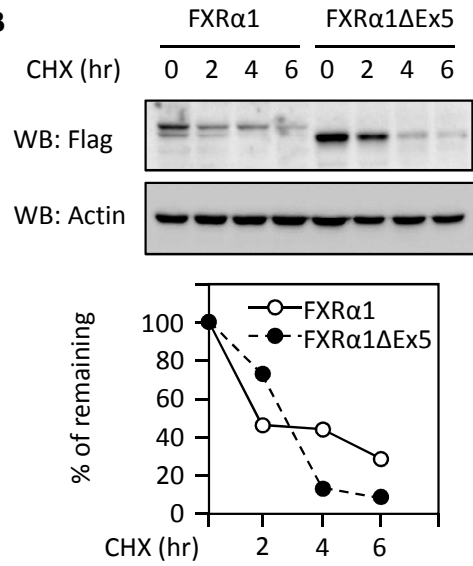
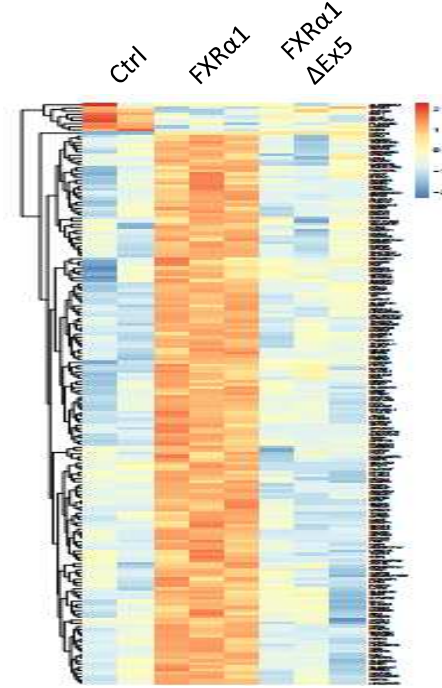
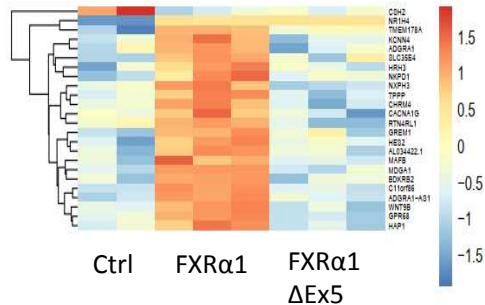
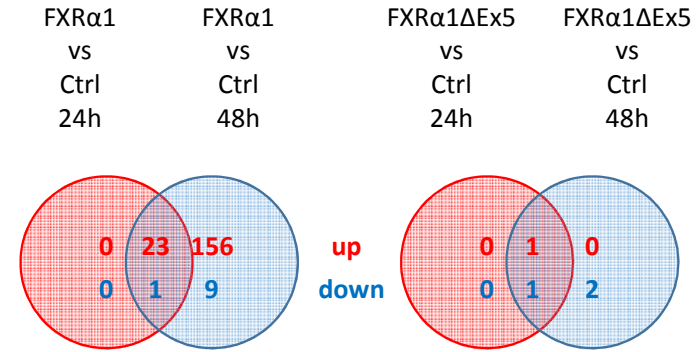
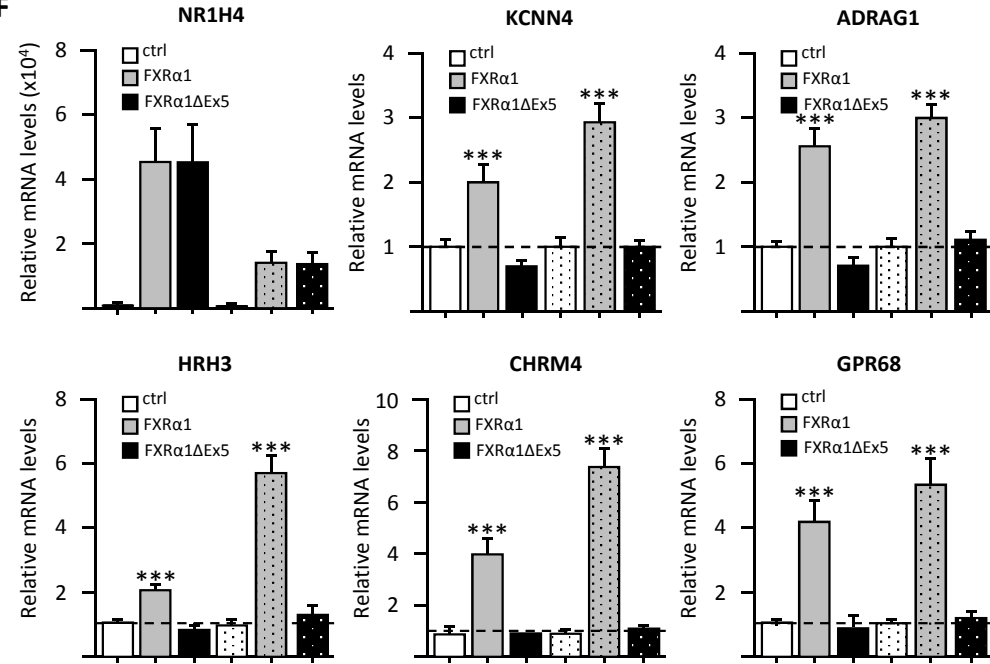
A**B****C****E****D****F**

Figure 3, Garcia et al.

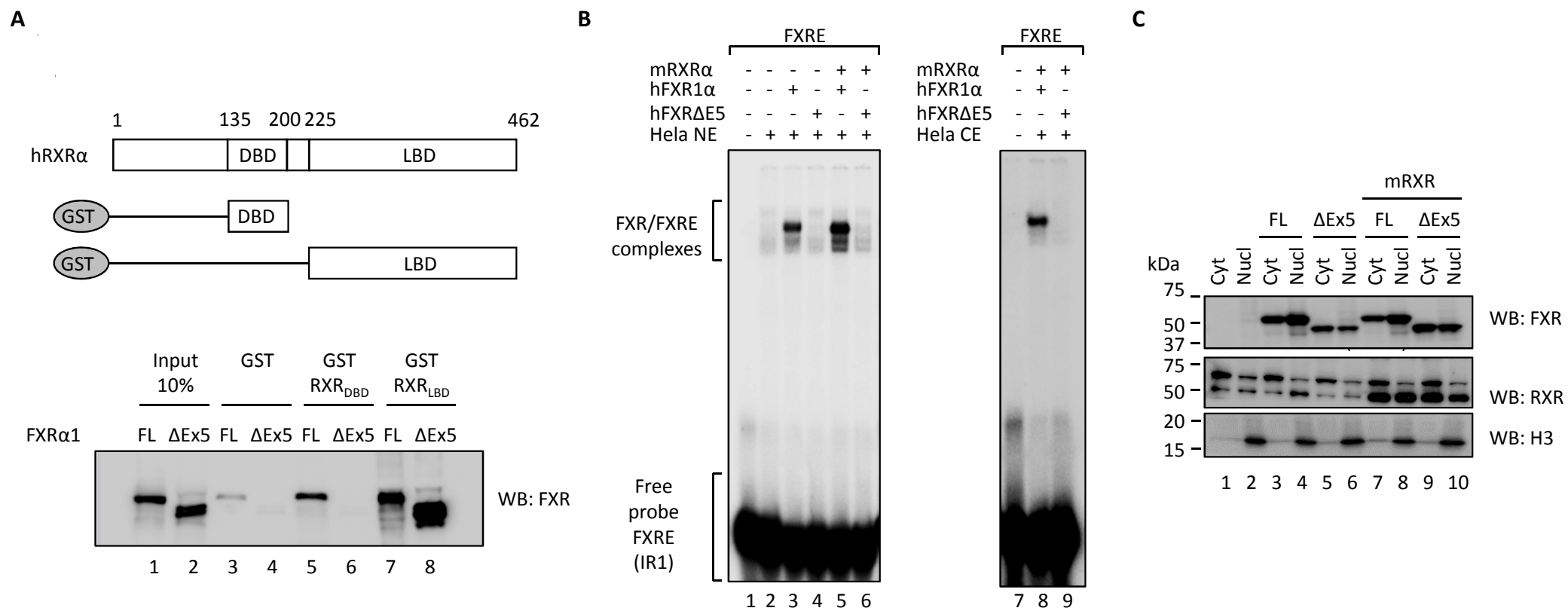


Figure 4, Garcia et al.

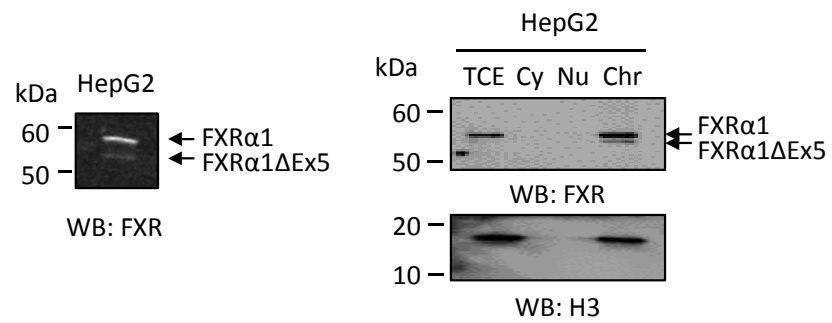
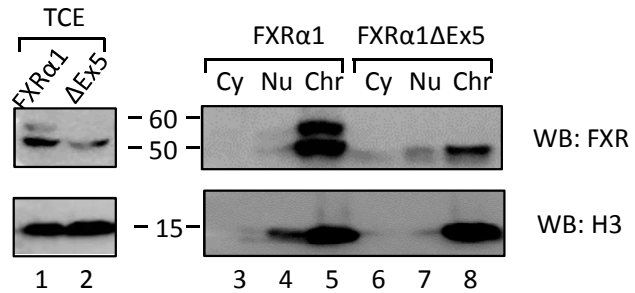
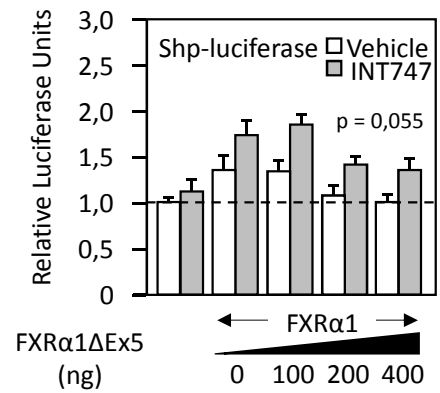
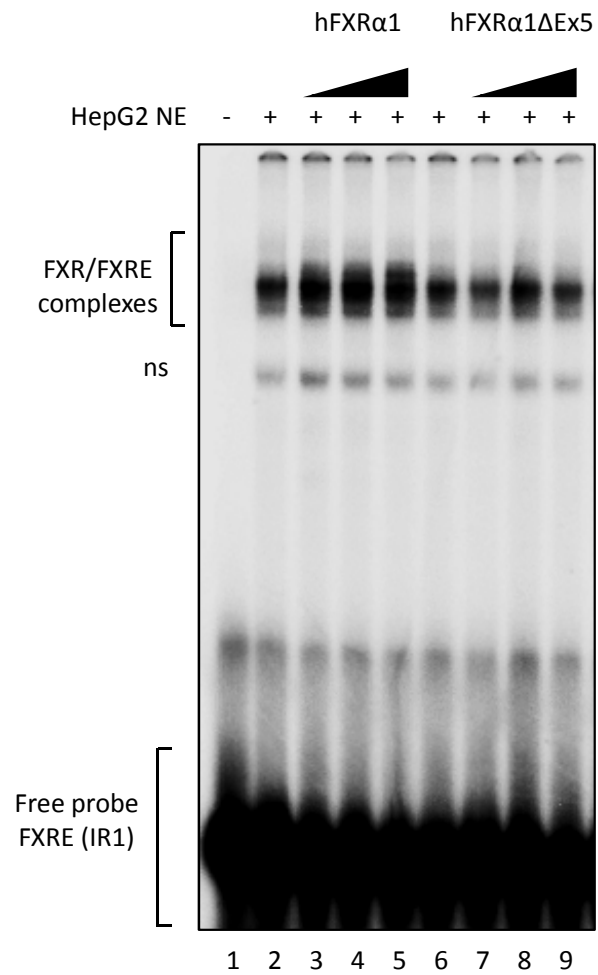
A**B****C****D**

Figure 5, Garcia et al.

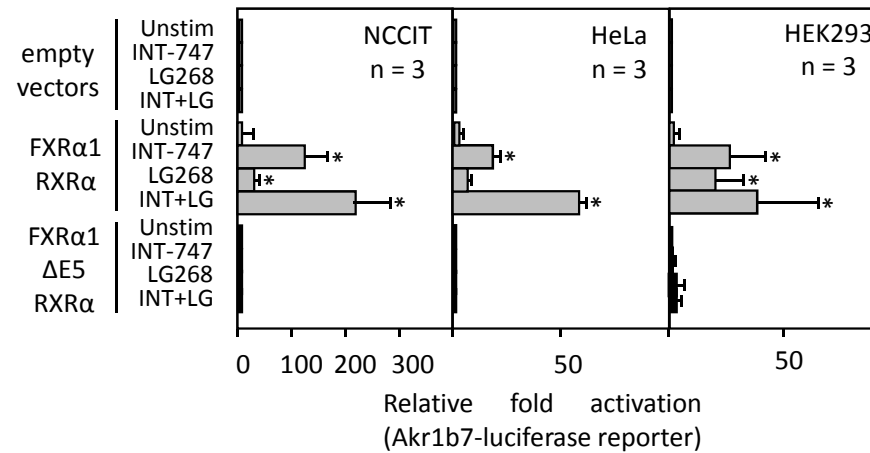
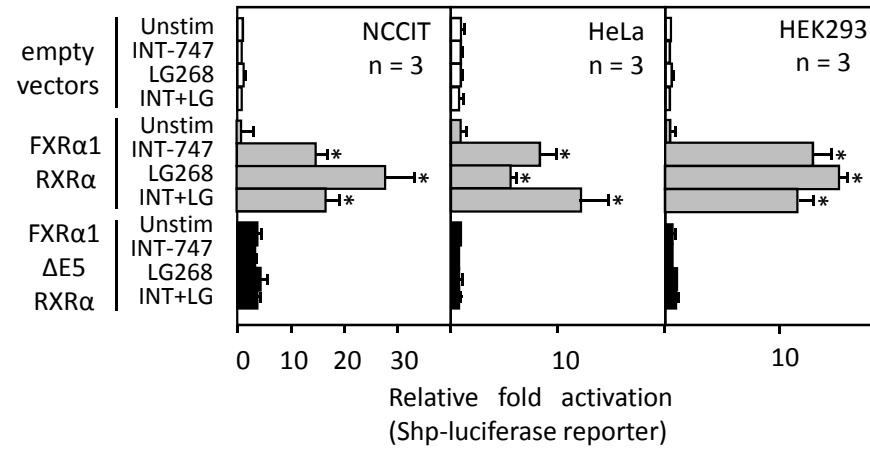
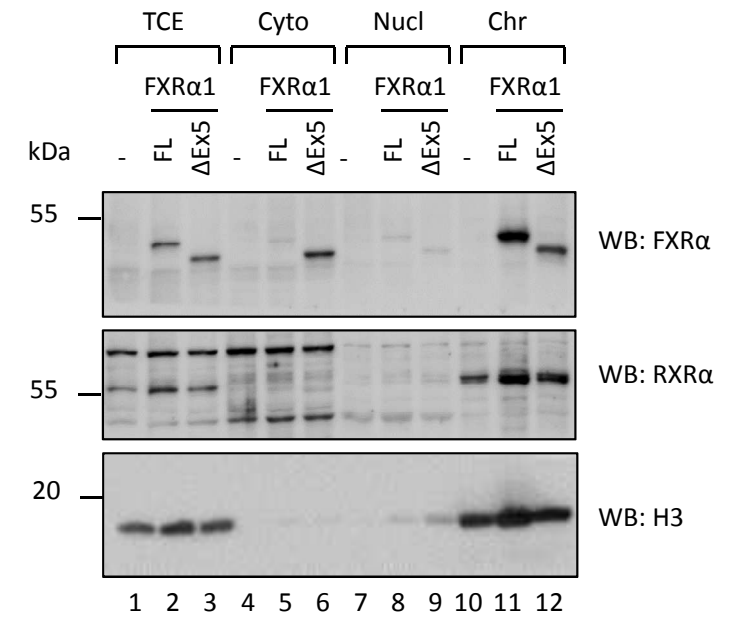
A**B**

Figure 6, Garcia et al.

Discussion

1 EXPRESSION DE FXR α DANS LES TUMEURS GERMINO-TESTICULAIRES

1.1 EXPRESSION DE FXR α DANS LE TESTICULE

Nous avons identifié des transcrits de FXR α dans des échantillons de testicules issus de patients atteints d'azoospermie sécrétoire et excrétoire à l'instar des tissus exprimant habituellement FXR α comme le foie et les reins. Ceci est cohérent avec des données publiées montrant chez l'homme FXR α est décrit dans le testicule dès le 1^{er} trimestre de la grossesse (Muczynski et al. 2012). A l'appui de ces résultats, une étude dirigée par Guo et coll. a identifié par des analyses de transcriptome de cellule unique (single cell), des transcrits de FXR α dans les cellules de Leydig et les cellules germinales humaines à différents stades de la gamétogenèse (Guo et al. 2018).

Chez la souris, nous avons pu observer la présence de FXR α dans des échantillons de testicules de 10 jours ou adultes, ainsi que dans deux lignées cellulaires de spermatogonies (C18.4 et GC1) et de Leydig murines (MA10). Ces données nous ont permis de confirmer les résultats précédents de l'équipe (Baptissart et al. 2016; Volle et al. 2007; Martinot et al. 2017), décrivant la présence de FXR α dans les cellules germinales et de Leydig. FXR α est également exprimé dans les cellules germinales de souris dès la naissance ainsi que dans les cellules germinales primordiales et spermatogonies primaires du triton newt marbré (Alfaro et al. 2002). Chez la souris, une analyse de séquençage ARN (RNA-seq) menée à différentes étapes du développement *in utero* jusqu'à l'âge adulte, met en évidence une expression de FXR α dans le testicule, du stade embryonnaire E11.5 jusqu'à 28 jours post-natal (Cardoso-Moreira et al. 2019).

Dans les cellules de Leydig, FXR α est un régulateur de la fonction endocrine comme le montre la diminution de la synthèse de testostérone en réponse à son agoniste GW-4064 entraînant une apoptose androgéno-dépendante des cellules germinales murines (Baptissart et al. 2016). Dans les cellules germinales, FXR α semble contribuer à l'établissement et au maintien du pool de cellules indifférenciées et à la fertilité des souris mâles tout au long de leur vie. Il semble également participer au processus de différenciation des cellules germinales comme l'illustre l'entrée précoce en méiose des mâles FXR α -/- (Martinot et al. 2017).

De précédents travaux de l'équipe, non publiés, ont montré une chute des niveaux de transcrits de FXR α dans les échantillons de TGT en comparaison à des testicules humains non tumoraux (**Figure 26**). Ces mêmes échantillons présentent une forte augmentation des gènes de pluripotence *OCT3/4* et *NANOG*. Nous retrouvons une relation identique chez la souris puisque l'inactivation de FXR α mène à une augmentation des transcrits d'*Oct3/4* et *Nanog* ainsi qu'à un nombre plus important de cellules positives pour le facteur de cellules indifférenciées PLZF dans les tubes séminifères. En complément, les mâles FXR α KO montrent une accumulation de cellules indifférenciées dans le testicule. L'ensemble de ces données structure les fondements de mon travail de thèse sur l'analyse de l'expression et des rôles potentiels de FXR α dans la tumorigenèse testiculaire.

Afin d'explorer si FXR α pouvait participer à divers processus de la tumorigenèse testiculaire, nous avons abordé une approche *in silico*. Nous avons ainsi observé une expression très faible voire nulle de FXR α dans les séminomes et les carcinomes embryonnaires alors que les taux les plus élevés sont identifiés dans les tératomes (matures et tumeurs mixtes à dominance tératomateuse), tumeurs les plus différenciées. Par ailleurs, l'analyse des niveaux de FXR α dans les échantillons de TGT réalisée par l'équipe (**Figure 26**) conforte ces résultats en montrant des niveaux supérieurs de FXR α dans les tératomes en comparaison aux carcinomes embryonnaires et séminomes.

Dans un second temps, nous avons souhaité caractériser son expression dans trois lignées modèles de TGT: 1- les cellules NCCIT dérivées d'un carcinome embryonnaire et dont les caractéristiques se rapprochent des non-séminomes (Teshima et al. 1988), 2- les cellules N-Tera2, lignée modèle de carcinome embryonnaire capable de se différencier en tératomes, puis 3- les cellules TCam-2 issues d'une lésion primaire du testicule et dont les propriétés s'apparentent aux TGS (de Jong et al. 2008). L'utilisation d'amorces dirigées contre l'ARNm de FXR α a permis d'amplifier un fragment spécifique dans les cellules NCCIT comparable à celui obtenu à partir des cellules HepG2 qui expriment fortement ce récepteur. Le fragment d'ADNc amplifié correspond à l'exon 4 du gène *NR1H4* qui code pour la première moitié du domaine de liaison à l'ADN de FXR α . Ce domaine conservé à l'identique entre les 4 isoformes de FXR α ne permet pas de discriminer les formes $\alpha1/2$ et $\alpha3/4$ produites par l'activité des promoteurs alternatifs localisés dans les exons 1 (FXR $\alpha1/2$) et 3 (FXR $\alpha3/4$) du gène *NR1H4*. Alors qu'une première série de digestions enzymatiques a permis de confirmer l'identité du fragment

d'ADNc amplifié (données non présentées), l'utilisation d'amorces complémentaires reste encore requise pour affiner ce travail de caractérisation moléculaire de(s) isoforme(s) présente(s) dans les cellules NCCIT. Pour cela, il conviendrait de combiner des amorces en orientation sens dirigées contre l'exon 1 ou l'exon 3 du gène *NR1H4* en combinaison avec des amorces anti-sens chevauchant la jonction des exons 5 et 6 qui contient une séquence de 12 nucléotides correspondant à l'insertion MYTG en fin de domaine de liaison à l'ADN des isoformes $\alpha 2$ et $\alpha 4$.

Dans la situation où l'anticorps utilisé ne nous permettrait pas d'identifier une protéine FXR α nous avons abordé la recherche de protéine grâce à une autre approche expérimentale. La réalisation d'Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) permet d'identifier la présence de complexes protéiques fixés au site de liaison de FXR α à l'ADN. Par l'utilisation de sondes radioactives du FXRE consensus de type IR-1, nous avons identifié des complexes protéiques dans les extraits nucléaires et les extraits totaux, capables de se fixer spécifiquement à la sonde radioactive dans les NCCIT et HepG2. Par ailleurs, il semblerait que les protéines soient plus concentrées dans l'extrait nucléaire suggérant que les protéines capables de se fixer au FXRE soient des protéines majoritairement localisées dans le noyau comme c'est le cas pour FXR α .

Les complexes protéiques observés en gel retard lorsque nous mélangeons les extraits nucléaires de cellules NCCIT avec une sonde radiomarquée FXRE de type IR1, semblent spécifiques puisque l'utilisation de sondes FXRE froides contenant des motifs IR1 (FXRE consensus, Shp humain, Shp murin) et ER8 (MRP2 rat) déplace les complexes formés contrairement à la sonde Shp de souris mutée. Cela signifie que les complexes protéines-ADN observés en retard sur gel sont spécifiques et ne sont pas dépendants d'un motif IR1 puisque nous observons aussi ce complexe pour un motif ER8.

En complément, l'utilisation d'un ARN interférent contre FXR α a permis de diminuer la quantité de protéines capables de se fixer au FXRE IR-1 suggérant que FXR α puisse être présent au sein des complexes. Afin de soutenir ces résultats, la réalisation d'un « super shift » permettrait de confirmer la présence de FXR α . Malheureusement, au cours de nos premières tentatives, l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale (Perseus, Proteomics) ne nous a pas permis de valider cette hypothèse. En suggérant la présence des isoformes FXR $\alpha 3/\alpha 4$ dans les NCCIT, potentiellement non reconnaissable par l'anticorps utilisé, il serait

intéressant de réitérer cette expérience avec d'autres anticorps ciblant FXR α sur différentes régions de la protéine. Il serait également envisageable de récupérer les complexes protéiques fixés à la sonde et de réaliser un séquençage protéique en spectrométrie de masse pour valider leur identité. Mais la quantité de protéines fixées dans les EMSA semble trop faible.

La difficulté à confirmer la présence de FXR α dans les lignées modèles de séminomes et/ou carcinome embryonnaire associée à des niveaux d'expression faibles ou nuls en transcriptomique dans ces sous-types histologiques confortent l'hypothèse d'une chute de l'expression de FXR α dans les tumeurs les plus indifférenciées.

1.2 SIGNALISATION FXR α

Bien que l'identité de FXR α ne soit pas tranchée à l'issue de cette première série de travaux, nos résultats montrent que l'induction de la signalisation dépendante de FXR α par des agonistes synthétiques modifie l'activité des cellules de TGT maintenues en culture ainsi que leur profil d'expression pour certains gènes cibles de FXR α . En ce sens, notre étude montre que les doses les plus élevées de GW-4064 diminuent la viabilité des cellules NCCIT et TCam-2. Cela se traduit par une réduction du nombre de cellules, une chute de l'activité enzymatique mitochondriale, et une activation de l'apoptose après 48 heures de traitement avec des concentrations supérieures à 1,0 μ M. Les cellules HepG2 quant à elles semblent plus résistantes à l'apoptose induite par le GW-4064 et une explication possible repose sur l'expression plus élevée de FXR α qui pourrait exercer un effet protecteur dans cette lignée. Or le renouvellement de ces études avec un deuxième agoniste INT-747 n'a pas reproduit l'activation de l'apoptose induite par le GW-4064 dans les cellules NCCIT et TCam-2, ainsi que dans les cellules HepG2 dans une moindre mesure. Même si la fonction de FXR α dans l'activation de l'apoptose a déjà été décrite dans les cellules de cancer du sein (Alasmael et al. 2016), nous ne pouvons pas exclure que cet effet du GW-4064 soit indépendant de FXR α puisque cet agoniste est déjà décrit pour activer d'autres récepteurs nucléaires comme ERR α de façon non spécifique à des concentrations supérieures à 1,0 μ M (Dwivedi et al. 2011). Il faudrait donc valider la spécificité de l'impact du GW-4064 *via* FXR α par l'utilisation d'un siRNA ou d'une approche CRISPR/CAS9. Le fait que les agonistes GW-4064 et INT-747 ne génèrent pas la même réponse apoptotique peut aussi résulter des surfaces d'interaction créées après liaison de l'agoniste dans la poche de liaison du ligand avec comme conséquence de mener au

recrutement de différents cofacteurs activateurs ou non de gènes pro-apoptotiques. Cependant les données obtenues ont permis néanmoins de valider la dose à utiliser de nos agonistes pour la suite de notre travail. Le gène de SHP est fortement exprimé dans les cellules HepG2 comme attendu et cette expression est doublée en réponse à un traitement de 48 heures avec des agonistes de FXR α . Malgré des niveaux de base plus faibles, l'expression de SHP est multipliée par $3,3\pm 0,4$ et $7,4\pm 0,5$ dans les cellules TCam-2 après 48 heures d'incubation avec le GW4064 et l'INT-747 ($p=0,002$) (données non montrées). L'activation illégitime du gène *SHP* par un autre récepteur semble peu probable puisque les deux agonistes de FXR α utilisés ont mené à une hausse des transcrits de SHP mais la transfection des cellules TCam-2 avec un ARN interférent contre FXR α permettrait de garantir la spécificité de cette régulation, puis d'apporter un élément supplémentaire pour valider la présence de ce récepteur dans cette lignée de TGS. Cette approche semble difficile pour l'instant puisque nous n'avons pas défini l'isoforme FXR α exprimée dans cette lignée cellulaire, or cela est un pré-requis pour dessiner l'ARN interférent. En complément, les agonistes de FXR α augmentent les niveaux de MRP2 de façon significative dans les cellules NCCIT et TCam-2 après 48 heures de traitement. Cela reste cohérent avec l'activation transcriptionnelle du gène MRP2 par FXR α déjà décrite dans les cellules HepG2 par Kast et ses collaborateurs (Kast et al. 2002). Toutefois, ce résultat diffère de celui obtenu dans le cadre de notre travail et pourrait s'expliquer par l'apport exogène d'un ADNc de FXR α dans les cellules HepG2 lors de cette précédente étude.

2 FXR α ET ETIOLOGIE DES TGT

2.1 FXR α ET PLURIPOTENCE

Sachant que la pluripotence est une caractéristique des non-séminomes de sous-types carcinomes embryonnaires (CE), des séminomes (SE) et des GNIS, nous avons exploré les corrélations entre l'expression de FXR α et des gènes de pluripotence sur la base de données cBioportal. Nous avons mis en évidence une corrélation à tendance négative entre l'expression de FXR α et les gènes NANOG, OCT3/4, DPPA4, LIN28, TFAP2C ET STELLAR (données non montrées) (CP et CS comprises entre $\pm 0,4$ et $0,5$; p -value $< 0,01$). Ces gènes sont surexprimés dans les GNIS, les SE et les CE, dont les cellules ressemblent

morphologiquement et génétiquement aux gonocytes (Kristian Almstrup et al. 2004; Sonne et al. 2009). Ces résultats confortent la précédente étude publiée par l'équipe qui a mis en évidence une accumulation de cellules indifférenciées associée à l'augmentation de l'expression d'Oct3/4, Nanog, Lin28 chez les souris mâles KO pour FXR α (Martinot et al. 2017). Cet impact de FXR α sur le pool de cellules germinales indifférenciées a également été soutenu par l'utilisation de son agoniste GW-4064 qui a conduit à une diminution du nombre de tubes séminifères positifs pour le marqueur de cellules indifférenciées PLZF (Sèdes et al. 2018). Ces données soutiennent les résultats obtenus sur les échantillons de TGT humaines dont l'étude en RT-qPCR montre une relation inverse entre FXR α et les facteurs de pluripotence (**Figure 26**).

Les données de la littérature montrent que l'augmentation de NANOG suffit à augmenter l'expression des gènes OCT3/4 et SOX2 brisant la balance entre pluripotence et malignité et que la progression des GNIS en TGT peut être influencée par le ratio NANOG : OCT3/4 (Korkola et al. 2009; Kristian Almstrup et al. 2004; Skotheim et al. 2005). Nous émettons l'hypothèse qu'en entraînant la surexpression des gènes de pluripotence, l'absence de FXR α conduise à la perte de la balance NANOG-OCT3/4 pouvant ainsi participer à l'étiologie et/ou à la progression tumorale.

Pour conforter cette hypothèse, il serait intéressant d'analyser les promoteurs de FXR α et des gènes de pluripotence. Nous pourrions ainsi identifier des sites de liaison à l'ADN pour les facteurs de transcription NANOG et/ou OCT3/4 dans le promoteur de FXR α ou inversement, des FXRE dans les séquences promotrices de NANOG et/ou OCT3/4. Pour cela nous pouvons utiliser des logiciels comme Genomatix ou des outils en ligne comme Transfac voire analyser des ChIP-Seq disponibles dans les publications en ligne. Aussi, il serait intéressant d'évaluer sur les lignées modèles de TGT *in vitro*, l'impact d'une transfection d'un plasmide codant pour FXR α sur les niveaux d'expression des gènes de pluripotence. A l'inverse, grâce à des approches d'inhibition comme le CRISPR/Cas9 ou l'ARN interférence nous pourrions bloquer/diminuer l'expression des gènes de pluripotence puis évaluer son impact potentiel sur l'apparition d'une expression de FXR α .

Par ailleurs nous avons observé *in silico* une corrélation positive entre FXR α et le taux global des niveaux de méthylation dans les îlots CpG. Cette relation est d'autant plus importante quand on restreint l'analyse aux non-séminomes puis aux tératomes. En effet, les tératomes

sont décrits comme hyperméthylés tandis que les séminomes sont hypométhylés. Le processus de méthylation est un processus nécessaire au développement normal du testicule et à la maturation des cellules germinales (Biermann et Steger 2007). L'ADN des cellules germinales fœtales est généralement hypométhylé, et devient hyperméthylé après la naissance. Les faibles niveaux de méthylation présents dans les GNIS et les séminomes sont associés à une structure de chromatine permissive ainsi qu'à une activité transcriptionnelle et proliférative élevées (K. Almstrup et al. 2010). Par ailleurs, chez les souris KO pour FXR α , les enzymes à activité méthyltransférase (DNMT) favorisant les processus de méthylation, ne semblent pas impactées par l'absence du récepteur. Cependant, de manière surprenante, toutes les enzymes de déméthylation de type lysine déméthylase (KDM) voient leur expression diminuée ou inchangée. L'enzyme la plus impactée par l'absence de FXR semble être KDM5C dont l'expression chute de 23%. Cette enzyme est décrite dans le cancer de la prostate dans lequel sa surexpression est significativement associée à une diminution de la survie sans rechute (relapse free survival) chez les patients ayant subi une prostatectomie (Stein et al. 2014). De surcroît, son inhibition *in vitro* semble altérer la prolifération cellulaire. Les enzymes de la famille KDM5, notamment KDM5B qui est également surexprimé dans les cancers de la prostate est décrit comme un coactivateur du récepteur aux androgènes AR (Xiang et al. 2007). Contrairement à ce qui est observé chez la souris FXR α KO, l'analyse de l'expression des enzymes de la famille KDM sur cbiportal montre une corrélation négative entre leur expression et celle de FXR α dans les TGT. En conclusion, nous observons dans les tumeurs *in silico* que l'expression de FXR α est associée à une diminution de l'expression de la plupart des déméthylases de type KDM ainsi qu'à une augmentation des niveaux de méthylation. A l'inverse, la perte de FXR α chez la souris mène à une diminution de certaines KDM. Nous ne pouvons exclure un profil de régulation épigénétique différent entre les testicules tumoraux humains et le testicule non tumoral d'une souris FXR α ^{-/-}.

Il serait intéressant d'investiguer ces données *in vitro* dans les lignées modèles de TGT. Nous pourrions explorer l'incidence d'une transfection de doses croissantes de FXR α sur l'expression des déméthylases KDM. Si un lien est avéré entre les deux, nous pourrions émettre l'hypothèse que l'augmentation de FXR α mène à une chute de l'expression des enzymes à activité déméthylase, pouvant contribuer au profil d'hyperméthylation associé au tératome, qui sont des tumeurs de mauvais pronostic.

2.2 FXR α ET DIFFERENCIATION

Comme FXR α est majoritairement exprimé dans les tératomes, tumeurs les plus différenciées, et qu'inversement, son invalidation est associée à un phénotype de pluripotente, nous avons voulu explorer le lien entre l'expression de FXR α et le processus de différenciation des cellules germinales. En effet, une entrée précoce en méiose a été observée chez les mâles FXR $\alpha^{-/-}$ (Martinot et al. 2017). L'interférence avec la voie des rétinoïdes, un signal majeur pour les cellules germinales d'entrée en méiose, a été démontrée par une diminution de l'expression de l'enzyme dégradant les rétinoïdes, le cytochrome Cyp26b1 et l'augmentation de la protéine de transport CRABP2 chez les souris mâles FXR $\alpha^{-/-}$. En complément, l'antagoniste de RAR α bloque la différenciation des cellules germinales, même chez les mâles FXR $\alpha^{-/-}$.

Nous avons confirmé l'hypothèse selon laquelle RAR α serait plus exprimé dans les tumeurs différenciées. A partir des transcriptomes de TGT nous avons identifié que RAR α était présent dans tous les types histologiques avec l'expression la plus élevée dans les tératomes matures et TGT mixtes à dominance tératomateuse. En complément, les expressions de FXR α et RAR α semblent corrélées dans les échantillons de TGT (CP = 0,54 ; p-value = $1,52 \times 10^{-12}$ / CS=0,52 ; p-value = $1,37 \times 10^{-11}$). Cependant nous ne pouvons nous affranchir d'une simple co-expression des deux récepteurs dans un sous-type tumoral. Par ailleurs, l'étude en Gene Ontology menée sur les gènes corrélés à FXR α dans l'ensemble des TGT puis dans les tératomes, montre que la signalisation aux rétinoïdes est positivement régulée (**Figure 38**).

Comme les lignées cellulaires de TGT n'expriment peu ou pas FXR α , il serait intéressant d'évaluer la quantité de RAR α présent dans les cellules puis de quantifier les ARNm de RAR α lors de doses croissantes de plasmides codant pour la protéine FXR α . Nous pourrions ainsi savoir si la modulation des niveaux de FXR α peut modifier l'expression de RAR α et de ses gènes cibles. Inversement, si RAR α est exprimé dans ces lignées, nous pourrions utiliser un ARN interférant contre RAR α puis analyser les niveaux de FXR α en RT-qPCR ou Western-blot. Ces données nous permettraient de confirmer la présence d'une interaction entre les deux voies de signalisations.

Dans un second temps, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la différenciation des cellules sur l'expression de FXR α . Pour cela nous avons réalisé une première approche *in silico* à partir de publications de RNA-Seq réalisés sur des cellules NCCIT, T-Cam2 et N-Tera2 soumises à un

traitement différenciant par l'agoniste de RAR α , l'acide tout trans rétinoïque (ATRA). Malheureusement la profondeur des analyses RNA-Seq ne nous a pas permis d'identifier la présence de FXR α dans aucune condition expérimentale. Il serait pertinent de réaliser cette expérience de différenciation *in vitro* à partir des cellules de TGT en notre possession afin d'identifier ou non la présence de FXR α en RT-qPCR. En outre, beaucoup de données disponibles sur le lien entre FXR α et RAR α , reposent sur des profils d'expression d'ARNm. Il serait judicieux de confirmer ces résultats à l'échelle protéique pour les deux récepteurs à l'aide de Tissue micro-array (TMA) contenant différents sous-types histologiques de TGT. Il faudra en amont identifier la ou les isoformes de FXR α présentes afin de choisir un anticorps adapté puisque celui dirigé contre la partie N terminal (N20, A9033A, Perseus Proteomics) ne semblait pas convenir. Nous pourrions ainsi identifier et quantifier les niveaux protéiques de FXR α et RAR α et étayer l'hypothèse selon laquelle FXR α est un maillon nécessaire à la différenciation des TGT.

2.3 FXR α ET ALTERATIONS DU MICROENVIRONNEMENT

L'analyse *in silico* des gènes corrélés à FXR α dans les TGT a mis en évidence l'importance du récepteur dans les interactions intercellulaires (**Figure 38**). Les ontologies réalisées sur cette liste de gènes montrent qu'ils favorisent les processus biologiques impliqués dans l'adhésion cellulaire, l'organisation de la matrice extracellulaire, la mobilité et la migration des cellules. Ce sont des processus naturellement retrouvés dans les germinales. D'une part on sait que FXR α est exprimé par les cellules germinales et que ces dernières migrent vers la lumière des tubes séminifères au cours de leur maturation. D'autre part, les cellules germinales sont ancrées entre les cellules de Sertoli avec lesquelles elles sont reliées par différentes jonctions intercellulaires. Au cours du développement les gonocytes sont majoritairement unis aux Sertoli par des molécules d'adhésion comme les Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) chez le rat (Orth et al. 2000). Les gènes codant pour les NCAM (NCAM1 et NCAM2) semblent corrélés positivement à FXR α dans l'ensemble des TGT (CS=0,43 pour NCAM1). Cependant cette relation diminue fortement lorsque l'on prend la liste des gènes corrélés à FXR α uniquement dans les tératomes (CS=0,25). Il serait pertinent de réaliser cette analyse en utilisant les gènes corrélés à FXR α dans les tumeurs indifférenciées comme les SE ou CE afin de déterminer si la corrélation augmente dans ce type de tumeurs. Dans cette situation, nous

pourrions émettre l'hypothèse que l'expression de FXR α est associée à celle des molécules d'adhésion NCAM exprimées au stade gonocyte. Par ailleurs, d'autres molécules impliquées dans les interactions cellules-cellules peuvent présenter des pistes intéressantes. Les Sertoli et cellules germinales sont liées par des jonctions notamment de type desmosomes. L'action des phtalates, perturbateurs endocriniens incriminés dans l'étiologie des TGT, peuvent entraîner des altérations de la vimentine, protéine des filaments intermédiaires des desmosomes, perturbant les interactions gonocytes-sertoli chez le rat (Kleymenova et al. 2005). Comme pour le gène NCAM1, les analyses de corrélation montrent que le gène codant pour la vimentine, VIM, semble corrélé positivement à FXR α (CS=0,37) dans l'ensemble des TGT mais pas dans les tératomes.

Ces observations corroborent les données de l'équipe montrant chez les mâles FXR α -/- des anomalies du nombre de cellules de Sertoli à 10 jours post-natal et à l'âge adulte associées à des modifications de leur transcriptome ainsi qu'une augmentation de la spermatogenèse (Martinot et al. 2017). Il a été montré que les voies de signalisation médiées par FXR α pourraient modifier la maturation des cellules de Sertoli au cours du développement post-natal précoce comme illustré par leur alignement prématuré à la membrane basale des tubes séminifères après l'exposition à l'agoniste de FXR α , le GW-4064 au cours des 10 premiers jours de la vie (Sèdes et al. 2018). Ces résultats rappellent les perturbations décrites dans le syndrome de dysgénésie testiculaire qui constitue un facteur de risque élevé d'évolution en TGT. Les gonades dysgénésiques présentent des déséquilibres du microenvironnement par une altération fonctionnelle des cellules de Sertoli qui structurent les tubes séminifères et des cellules de Leydig qui synthétisent la testostérone dans le milieu interstitiel. Ces déficiences de la gonade en développement peuvent perturber la différenciation normale des cellules germinales menant à une expression prolongée des gènes de pluripotence et d'un état indifférencié comme cela est observé chez les souris FXR α KO qui présentent une accumulation de cellules germinales indifférenciées PLZF+.

Nous émettons l'hypothèse que la perte de FXR α dans les tumeurs indifférenciées pourrait perturber les interactions entre cellules de Sertoli et cellules germinales nécessaires au développement normal du testicule. Ce phénomène pourrait favoriser l'altération du microenvironnement comme décrit dans les syndromes de dysgénésie testiculaires, associés à un risque élevé de transformation en TGT. Les désordres à l'origine du syndrome de

dysgénésie testiculaire sont associés à des facteurs héréditaires comme le syndrome d'insensibilité aux androgènes, 45X0/46X et/ou environnementaux, sous l'influence de perturbateurs endocriniens impactant le métabolisme des stéroïdes souvent par des actions anti-androgéniques ou œstrogénomimétiques.

3 PERTINENCE DE FXR α COMME NOUVEAU MARQUEUR BIOLOGIQUE ?

3.1 FXR α ET MARQUEURS DIAGNOSTIQUES

Le contrôle des fonctions cellulaires de Leydig, y compris la stéroïdogénèse, est principalement médiée par l'axe hypothalamo-hypophysaire via la LH/gonadotropine chorionique (CG) (Attia, Abou-Setta, et Al-Inany 2013). Une étude récente de l'équipe a mis en évidence que l'expression de FXR α est régulée par l'axe hypothalamo-pituitaire (HP) et plus particulièrement par la voie de signalisation hCG dans les cellules de Leydig (Holota et al. 2019). Le traitement *in vivo* avec la gonadotropine chorionique humaine (hCG) a comme conséquence l'accumulation de transcrits codant pour FXR α dans le testicule de souris entraînant un rétrocontrôle négatif sur la synthèse des stéroïdes pendant une fenêtre de temps de 2 à 24h. L'hCG ayant pour fonction de stimuler la stéroïdogénèse chez l'embryon, on suppose que ce mécanisme de régulation médié par FXR α permettrait d'éviter une hyperstéroïdogénèse.

Dans les échantillons de TGT, l'expression de l'hCG est associée aux tumeurs présentant un caractère embryonnaire. Il en résulte une sécrétion anormale de cette hormone, sécrétée normalement au cours de la grossesse pour le développement gonadique de l'embryon. On peut supposer que la présence de cette hormone chez l'homme adulte puisse perturber la stéroïdogénèse souvent impactée dans les TGT et favorisant la pathogénèse.

3.2 RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE DANS LES TGT

FXR α est majoritairement exprimé dans les tératomes qui sont des tumeurs présentant une résistance intrinsèque à la chimiothérapie, associant cisplatine, bléomycine et étoposide (Bilen et al. 2016). Nos analyses ont montré que les gènes corrélés à FXR α dans les tératomes semblent impliqués dans les signalisations liées aux rôles connus de FXR α comme la sécrétion

biliaire, le métabolisme des lipides ainsi que les voies de détoxication. Or, plusieurs voies de signalisation et processus biologiques impliquant le métabolisme des drogues et des xénobiotiques sont positivement régulées dans les tératomes. Nous avons démontré que les agonistes de FXR α régulent SHP dans les lignées de TGT. Or une étude menée par Wang et coll. a montré une potentialisation de l'apoptose de cellules tumorales des voies biliaires en associant des agonistes de FXR α avec du cisplatine (Wang et al. 2016). Ils ont confirmé le bénéfice de l'activation de FXR α sur la cytotoxicité dans des lignées résistantes et sensibles au cisplatine. Fait intéressant, les données *in vivo* montrent que le GW-4064 peut améliorer l'effet antinéoplasique du Cisplatine et semble diminuer les effets indésirables du traitement. Le mécanisme d'action semble médié par SHP pour *in fine* activer l'apoptose en modulant les protéines pro et anti apoptotiques BCL-2, Bid et Bcl-xL.

Par ailleurs, FXR α a un rôle bien connu dans la régulation des transporteurs et des enzymes de détoxication. Les gènes cibles de FXR α impliqués dans cette fonction sont souvent associés à des mécanismes de résistance comme les gènes de Mrp2 ou du cytochrome Cyp3A4. Un rapport publié par Hinoshita et coll. montre que la surexpression du transporteur membranaire MRP2, est considérée comme l'un des mécanismes les plus importants dans l'échec thérapeutique au Cisplatine dans le cancer du côlon (Hinoshita et al. 2000). De manière cohérente, nous avons démontré que les agonistes de FXR α régulent l'expression de MRP2 dans les lignées de TGT. La protéine MRP2 semble impliquée dans le transport et la résistance de plusieurs traitements dont le Cisplatine et ce, dans de nombreuses lignées cellulaires (Koike et al. 1997; Kool et al. 1997). Cependant, le mécanisme de la surexpression de MRP2 en réponse à FXR α semble complexe car le Cisplatine est connu pour avoir des effets directs sur l'expression de FXR α (Herraez et al. 2012).

Des altérations des voies de réparation de l'ADN semblent impliquées dans la sensibilité au Cisplatine. Cette donnée peut être reliée à la Gene Ontologie GO réalisée sur les gènes corrélés à FXR α dans l'ensemble des TGT. Nous avons pu mettre en évidence que ces gènes étaient associés à une diminution du processus biologique de réparation à l'ADN. Par ailleurs les GO réalisées sur les gènes corrélés à FXR α uniquement dans les tératomes (**Figure 38**), montre une augmentation du processus biologique lié au métabolisme des médicaments notamment par l'activité des cytochromes CYP450 connus en thérapeutique pour leur métabolisation des différents traitements médicamenteux. En explorant les gènes inclus dans cette GO et leur

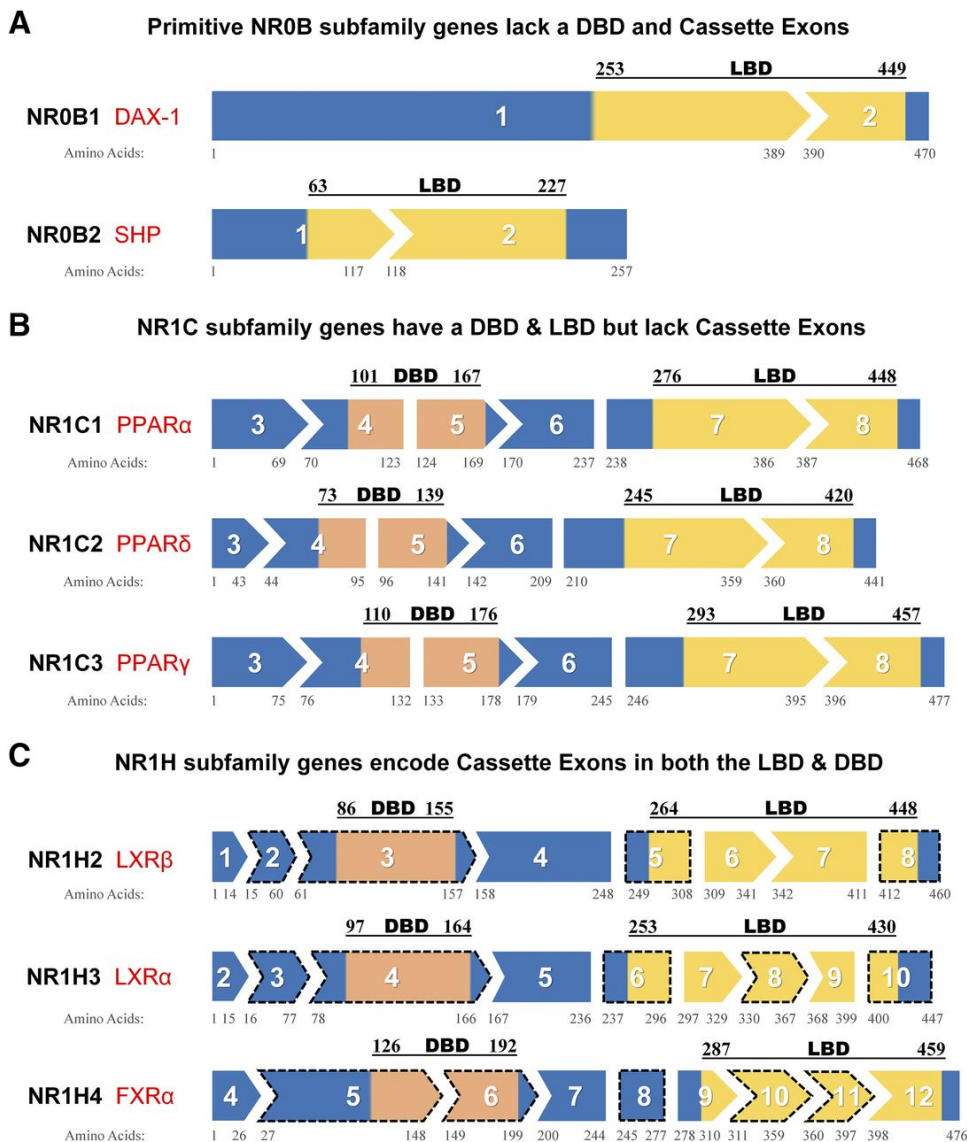


Figure 41 : Caractérisation des exons cassettes pour les gènes des sous-familles de récepteurs nucléaires NR0 et NR1.

A) Les gènes de la sous-famille NR0B (DAX-1 et SHP) ne possèdent pas de DBD canonique, mais codent un LBD classique segmenté sur deux exons standard et non cassette. **B)** Les gènes plus évolués de la sous-famille NR1C (PPAR) contiennent une organisation similaire du domaine LBD et C-terminal, mais contiennent un domaine N-terminal étendu contenant le DBD canonique (orange) codé par deux exons standard. La sous-famille NR1C est distincte de toutes les autres sous-familles NR1, qui contiennent toutes au moins un exon cassette. **(C)** Les signatures élaborées d'exon cassette de la sous-famille NR1H [NR1H3 (LXR α), NR1H2 (LXR β) et NR1H4 (FXR α)] mettent en évidence l'expansion de l'utilisation des exons cassette dans la famille NR1, chaque gène incorporant quatre à cinq exons cassette. Les implications fonctionnelles de ces différences sont actuellement inconnues, mais elles peuvent soumettre ces gènes à des niveaux plus élevés d'épissage alternatifs spécifiques aux tissus. *Issu de Annalora 2020, Drug Metab Dispos.*

activité dans la résistance aux TGT, ces données pourraient soutenir le constat fait sur la résistance intrinsèque des tératomes.

Nous avons envisagé d'étudier la résistance au cisplatine sur les lignées modèles de TGT. Nous aurions pu ainsi évaluer l'influence du cisplatine sur les niveaux de FXR α . Aussi nous aurions testé l'action de doses croissantes de FXR α dans les lignées et leur effet sur l'apoptose des cellules par des approches de mort cellulaire comme le TUNEL, l'annexine V en cytométrie ou les niveaux de caspases et/ou PARP clivé.

4 L'ÉPISSAGE ALTERNATIF COMME SOURCE DE VARIANTS DU RECEPTEUR FXR α

Après une première série d'études visant à déterminer la participation du récepteur FXR α dans l'étiologie du cancer germlinal du testicule, nous avons isolé un ADN complémentaire correspondant à une nouvelle forme de ce récepteur par RT-PCR à partir d'ARN totaux de cellules modèles de TGT non séminomateux NCCIT, et de cellules d'hépatocarcinome HepG2. Bien que l'abondance des transcrits se soit montrée relativement faible dans ces cellules, cela ne veut pas dire pour autant que cette nouvelle forme de récepteur ne soit pas importante pour le contrôle de la signalisation induite par les acides biliaires dans les cellules de foie et de tumeurs germinales du testicule. Au cours de la caractérisation fonctionnelle de notre nouveau variant de FXR α délété de l'exon 5, Annalora et ses collaborateurs ont proposé un nouveau schéma de visualisation de la structure génétique des 48 récepteurs nucléaires afin d'expliquer la production de plusieurs variants d'épissage à partir de la séquence d'un seul gène (Annalora, Marcus, et Iversen 2020). Cela a permis de définir un répertoire d'exons cassettes pour l'ensemble des membres des sous-familles de récepteur nucléaire NR0 à NR6. Ces exons cassettes modulaires, inclus ou non dans les ARN messagers, présentent le plus large éventail dans la sous-famille des gènes *NR1H* qui inclut le gène *NR1H4*. Comme présenté à la figure 41 l'exploration du gène de FXR α a mené à la définition d'une signature d'exons cassettes répartis sur l'ensemble des domaines structuraux avec un exon cassette localisé dans la seconde partie du domaine de liaison à l'ADN de FXR α (voir **Figure 41C**). Ce travail, en complément des données que nous avons collectées, a donc renforcé l'existence de notre variant de FXR α dépourvu de son exon 5 et de la deuxième moitié de son DBD qui contient le

second doigt de zinc porteur de la boîte D. Selon le nombre d'exon cassettes identifiés, il est fort probable que l'épissage alternatif du gène *NR1H4* augmente d'avantage la diversité des transcrits de FXR α par inclusion ou exclusion de différents exons en fonction de la conservation de séquences spécifiques trouvées au niveau des jonctions exon-intron (site 5' ou donneur), des jonctions intro-exon (site 3' ou accepteur) et des sites de branchement situés environ 30 nucléotides en amont des sites accepteurs (**Figure 42**). Si ces variants ne sont pas encore tous décrits dans la littérature, il n'est pas impossible que la poursuite des travaux exploratoires dans les tumeurs germinales du testicule mène à la caractérisation de l'un d'entre eux ce qui expliquerait les profils d'interaction protéine-ADN en retard de migration électrophorétique (EMSA) ainsi que la modification d'expression de gènes cibles de FXR α en réponse à une activation agonistique comme décrit dans la première partie de mon travail. Cela serait compatible avec un épissage des cassettes 8, 10 et 11 localisées dans la région charnière ainsi que dans le domaine de liaison du ligand (LBD) avec toutefois une conservation des cassettes 5 et 6 qui composent le domaine de liaison à l'ADN (DBD).

A l'heure actuelle, les facteurs d'épissage et les conditions responsables de la production de ce variant ne sont pas encore définis mais la conservation d'un variant similaire chez la souris souligne que l'expression du variant FXR α 1 Δ Ex5 n'est probablement pas restreint qu'à l'espèce humaine. D'ailleurs les alignements de séquences réalisés au cours de notre travail à valider ainsi que ceux publiés par Huber et ses collaborateurs montrent une identité protéique très élevée pour les isoformes de FXR α notamment au niveau de son domaine de liaison à l'ADN chez l'homme, la souris, le rat et le hamster (Huber et al. 2002). D'autres espèces comme le porc sont également susceptibles d'exprimer ce variant en plus des isoformes actuellement décrites pour FXR α sur la base de leur identité de séquence (Gray et Squires 2013). De manière intéressante, les séquences donneurs (AUgtatgtatac) et accepteurs (tctcccacagGU) de part et d'autre de l'exon 5 du gène *NR1H4* sont totalement conservées dans le gène *Nr1h4* de souris ce qui renforce d'avantage la possibilité que l'épissage puisse répondre globalement à un mécanisme de régulation de la signalisation induite par le récepteur FXR α .

La réaction d'épissage fait appel à de petites protéines nucléaires (snRNPs) qui reconnaissent les séquences des sites 3' accepteurs et 5' donneurs ainsi qu'à des facteurs régulateurs comme les ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (hnRNP) et les protéines SR (riches en arginine

et sérine) qui lient des séquences activatrices (ESI, *exonic splice enhancer* ; ISE, *intronic splice enhancer*) ou inhibitrices (ESS, *exonic splice silencer* ; ISS, *intronic splice silencer*) au niveau des exons et des introns (**Figure 42C**) (Parent et Bisailon 2006; Corcos et Solier 2005). Une première approche d'analyse bio-informatique des données issues du séquençage ARN (RNA-seq) de cellules inhibées pour les facteurs de la machinerie d'épissage pourrait nous permettre de cibler quelques acteurs impliqués dans la production de notre variant. En ce sens, les données de séquençage générées par le projet du consortium ENCODE montrent que l'inhibition du facteur auxiliaire d'épissage U2AF2 (qui facilite la liaison de la protéine snRNP U2) est liée à une augmentation des gènes de régulation de l'homéostasie des acides biliaires (BAAT, CAYP7A1) dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2, ainsi que de plusieurs gènes du métabolisme des stéroïdes appartenant à la famille des sulfotransférases (SULT) et des glucuronosyltransférases (UGT). L'inhibition génétique de ce facteur (RNAi, CRISPR/Cas9) dans les cellules HepG2 permettrait de valider sa participation dans la production de l'isoforme FXR α 1 Δ Ex5, de relier sa fonction à la régulation de l'activité de FXR α , tout en validant notre stratégie expérimentale afin de définir les acteurs et les conditions pouvant mener à l'excision et/ou la conservation de l'exon 5 pour adapter une réponse-spécifique induite par cette nouvelle isoforme. Ces informations complèteraient celles déjà disponibles sur l'épissage de la séquence des 4 acides aminés MYTG à l'extrémité de l'exon 5 qui semble réduire la capacité de FXR α à activer la transcription de ses gènes cibles. Ainsi, la moindre affinité des isoformes FXR α 1 et FXR α 3 (contenant la séquence MYTG) pour un élément de réponse FXRE en comparaison avec les isoformes FXR α 2 et FXR α 4 ainsi que la plus faible activation du gène cible I-BABP par les isoformes ayant conservé la séquence MYTG (FXR α 1 et FXR α 3) soulignent donc les différences de capacité des isoformes de FXR α (Zhang, Kast-Woelbern, et Edwards 2003). Ces observations interrogent quant aux propriétés de notre nouveau variant ainsi que sur son profil d'expression tissulaire sachant que les différentes isoformes possèdent des spécificités dans leurs profils d'expression et leurs activités.

5 EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DU VARIANT FXR α 1 Δ Ex5

L'étude du profil d'expression tissulaire du variant FXR α 1 Δ Ex5 montre que ce dernier ne diffère pas de celui de l'isoforme FXR α 1. L'utilisation d'amorces discriminantes dirigées contre

la jonction des exons 4 et 6, puis contre l'extrémité de l'exon 6 de FXR α 1 nous a permis d'amplifier spécifiquement l'isoforme délétée de l'exon 5. Avec cette approche, nous avons amplifié par RT-PCR des fragments de tailles attendues à partir des ARN messagers de plusieurs tissus humains incluant le foie, la vésicule biliaire, le rein, la surrénale, puis à un niveau moindre de l'intestin, du colon et des gonades. La présence de cette nouvelle isoforme a également été confirmée dans les lignées cellulaires modèles d'hépatocarcinome (HepG2), d'adénocarcinome colorectal (CaCo-2), de corticosurrénales (H295R) et de rein embryonnaire (HEK293). A l'appui de ces résultats, l'association des données *in silico* de caractérisation du génome, de l'exome et du transcriptome disponibles en libre accès sur le portail GTExPortal a permis de retrouver les transcrits correspondants au variant d'épissage FXR α 1 Δ Ex5 dans le foie, les glandes surrénales, l'iléon, l'ovaire, les reins et le colon transverse mais pas dans le pancréas et la rate contrairement à FXR α 1 (voir article Figure 2). Les niveaux d'expression de ce variant s'avèrent cependant bien inférieurs à ceux des isoformes FXR α 1 à 4 avec une limite de détection dans plusieurs tissus qui peut s'expliquer par un manque de couverture par séquençage lors des analyses réalisées. Bien que les approches d'analyse par séquençage de l'exome (*Whole Exome Sequencing*, WES) et des ARN (*RNA-Sequencing*, RNA-Seq) aient permis d'identifier les exons et de spécifier les jonctions exon-exon des différents transcrits séquencés, la fiabilité de ces résultats pour les expressions les plus faibles pose question puisque l'expression de chacune des isoformes est modélisée par l'utilisation de différents outils d'analyse bio-informatique. En raison des multiples méthodes d'études et de la variabilité des résultats générés par les outils d'analyse exploités, la qualité des informations obtenues doit être appréhendée avec réserve et justifierait qu'une étude complémentaire soit engagée afin de quantifier l'abondance des transcrits du variant FXR α 1 Δ Ex5 dans les tissus entéro-hépatiques et extra entéro-hépatiques. Cela offrirait la possibilité d'évaluer si son ratio par rapport aux autres isoformes de FXR α présentes dans les tissus montre des différences comme décrit par l'étude de Vaquero et ses collaborateurs (Vaquero et al. 2013). L'importance de cette information prendrait tout son sens dans l'éventualité d'une fonction transrépressive portée par ce variant dépourvu d'une partie de son domaine de liaison à l'ADN puisque ce dernier pourrait interférer avec la signalisation induite par FXR α .

Enfin, nos données d'expression ont également permis de valider la présence d'un variant identique chez la souris avec un profil d'expression superposable à celui de FXR α 1 et mimant

la distribution tissulaire observée chez l'homme. Cela est non seulement conforme avec les travaux de Huber et de ses collaborateurs qui ont caractérisé des isoformes équivalentes de FXR α 1-4 chez d'autres animaux comme le rat, la souris et le hamster (Huber et al. 2002) mais indique aussi que la production de cette isoforme ne semble pas espèce-spécifique ni associée à une condition physiologique et/ou pathologique bien qu'il ne soit pas impossible qu'une modification de son ratio puisse participer à des dérégulations du métabolisme et mener à l'apparition de désordres ou de maladies. La détection de ce variant dans les échantillons de testicule de patients atteints d'azoospermie obstructive (sécrétoire) et non obstructive (excrétoire) ainsi que dans les lignées modèles C18.4 et GC1 de spermatogonie de souris sont des arguments qui soutiennent l'existence d'une isoforme de FXR α dans les cellules germinales qu'il conviendrait d'explorer en lien avec la multiplication, la différenciation et l'apoptose des cellules souches germinales ainsi que des cellules de tumeurs germinales du testicule.

6 CAPACITE DE LIAISON ET REGULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR LE VARIANT FXR α 1 Δ Ex5.

Dans ce travail, nous montrons que l'épissage alternatif génère une nouvelle isoforme de FXR α 1 dépourvue de l'exon 5 (Δ Ex5) qui code pour le second doigt de zinc du domaine de liaison à l'ADN. Cette isoforme FXR α 1 Δ Ex5 que nous avons décrite dans les cellules et les tissus humains existe aussi dans les tissus de souris adultes mâles et femelles. De plus, il est fort probable que cet événement d'épissage concerne les isoformes FXR α 2 chez l'homme ainsi que les transcrits de FXR α chez d'autres espèces en plus de l'homme et des rongeurs. Les études fonctionnelles entreprises pour caractériser l'activité de ce variant montrent que ce dernier est incapable d'activer la transcription d'un gène rapporteur de type luciférase contrôlé par un promoteur cible de son activité (Shp-luc et Akr1b7-luc) contrairement à l'isoforme FXR α 1. Cela semble s'expliquer en partie par l'incapacité du variant FXR α 1 Δ Ex5 à former un complexe *in vitro* avec une sonde ADN radiomarquée contenant une séquence de fixation spécifique de type FXRE malgré la présence de son partenaire obligatoire RXR α . Ce constat semble cohérent si on considère que le deuxième doigt de zinc, qui est perdu dans ce variant d'épissage, permet généralement au récepteur nucléaire d'interagir avec son partenaire homo- ou hétéro-

dimérique pendant que le premier doigt de zinc établit le contact entre le récepteur et la séquence ADN de son élément de réponse. Comme pour d'autres récepteurs stéroïdiens épissés dans leur DBD dont le récepteur aux œstrogènes ER Δ Ex3 (Wang et Miksicsek 1991), il n'est donc pas surprenant que l'isoforme FXR α dépourvu de son exon 5 (Δ Ex5) ne puisse plus se lier à un élément de réponse consensus FXRE de type IR-1, en présence ou en l'absence de son partenaire RXR α . Toutefois, la capacité de ce variant à lier d'autres séquences FXRE de type DR et ER reste encore à étudier. Cela pourra dire si la perte de capacité de liaison peut s'expliquer en partie par la perte de la boîte D incluse à l'extrémité N-terminale du deuxième doigt de zinc puisque ce motif de cinq acides aminés a été montré pour régler la dimérisation du récepteur des glucocorticoïdes (GR) et sa liaison à l'ADN sans capacité de la boîte D à s'y lier directement (Dahlman-Wright et al. 1991; Luisi et al. 1991). Le récepteur de la vitamine D (VDR) représente un autre exemple de récepteur nucléaire modifié dans son deuxième doigt de zinc après retrait de son exon 3 (Annalora et al. 2019). Bien que ce récepteur VDR Δ Ex3 conserve la première hélice de son DBD pour reconnaître et fixer l'ADN, la perte de sa seconde hélice en amont du second doigt de zinc, orientée de façon perpendiculaire, confère une action dominante négative à ce dernier. A la différence des récepteurs nucléaires ER Δ Ex3 et VDR Δ Ex3, le récepteur FXR α 1 Δ Ex5 n'exerce qu'une faible activité transrépressive sur la capacité du récepteur FXR α 1 endogène à activer la transcription d'un gène rapporteur de type luciférase et à interagir avec le motif IR1 de la séquence FXRE en retard de migration électrophorétique (EMSA). Il s'agit d'une propriété que nous proposons d'étudier dans un premier temps en générant des lignées de cellules hépatiques par édition du génome (CRISPR/Cas9) afin d'exciser l'exon 5 du gène *NR1H4* pour mieux apprécier les capacités de liaison et de transactivation du variant FXR α 1 Δ Ex5 avec la possibilité de réintroduire par transfections transitoires les autres isoformes du récepteur FXR α afin d'étudier l'éventualité d'une compétition.

Il est intéressant de noter que de nombreux variants de récepteurs nucléaires avec excision d'exons codant pour une partie ou la totalité du DBD sont associés à des maladies humaines, y compris les cancers (Annalora, Marcus, et Iversen 2020), toutefois la conséquence structurale de l'épissage de l'exon 5 de FXR α dans la promotion des maladies humaines ne peut être démontrée en l'absence de données cliniques sur son activité et son profil d'accumulation dans les pathologies. Néanmoins, le dérèglement de la machinerie d'épissage

ainsi que la perte de fonction de FXR α par insertion en phase au niveau du premier module en doigt de zinc chez les patients atteints de cholestase intrahépatique progressive familiale (PCIF) ont tous deux été rapportés dans le développement de maladies du foie et peuvent donc soutenir cette hypothèse (Gomez-Ospina et al. 2016; del Río-Moreno et al. 2019).

En plus de l'épissage alternatif, les changements dans les modifications post-traductionnelles (PTM) affectant également l'activité des RN et leurs effets régulateurs sur la localisation et la liaison de FXR α dans des conditions physiologiques et pathologiques, ont attiré l'attention sur les sites de phosphorylation et d'acétylation conservés au sein du deuxième motif en doigt de zinc du DBD. D'une part, l'acétylation de la lysine 157 et de la lysine 217 est réglée de façon dynamique par l'acétyltransférase p300 et la déacétylase SIRT1 avec une conséquence fonctionnelle sur les capacités de liaison à l'ADN et d'hétérodimérisation de FXR α (Kemper et al., 2009). D'autre part, la sérine 135 et la sérine 154 sont modifiables par phosphorylation par la protéine kinase C ce qui augmente la liaison de FXR α à ses coactivateurs pour stimuler son activité transcriptionnelle sans affecter sa liaison à l'ADN ou sa localisation nucléaire (Gineste et al., 2008). De même, les PTM réparties au niveau du DBD sont étroitement liées à la modulation de l'activité de FXR α et notre analyse protéique par western blot a montré que l'isoforme FXR α 1 Δ Ex5 n'était plus modifiée de façon post-traductionnelle dans les cellules HepG2 par rapport à FXR α 1. Par conséquent, l'excision de l'exon 5 semble reproduire les changements induits par les modifications post-traductionnelles sur les capacités de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription de FXR α . Cela nous a naturellement incité à vérifier si le variant dépourvu de son exon 5 (Δ Ex5) présentait une modification de sa localisation subcellulaire et/ou différence de capacité à interagir avec RXR α et à former des complexes au niveau de la chromatine par le biais d'interactions protéine-protéines, même si ce dernier s'est montré incapable de se lier directement à un élément de réponse FXRE consensus *in vitro*.

Notre fractionnement biochimique indique que l'excision de l'exon 5 qui contient le site de phosphorylation Ser154 proche du site d'acétylation Lys157 délocalise partiellement le variant dans le compartiment cytoplasmique dans un contexte cellulaire dépendant, suggérant ainsi que cette isoforme de FXR α pourrait ne pas être totalement séquestrée au niveau du noyau dans certaines situations liées à l'absence de modifications post-traductionnelles et/ou d'interactions avec des cofacteurs. En accord avec cette observation, une régulation post-traductionnelle du trafic subcellulaire a été préalablement décrite pour d'autres récepteurs

nucléaires comme le récepteur PPAR γ par le biais de son interaction directe avec des protéines effectrices de la cascade de signalisation ERK MAPK/ERK-kinases 1/2 (MEKs) pour mener à l'activation d'événements non génomiques (Burgermeister et Seger 2007; Papageorgiou et al. 2007). La capacité de FXR α 1 Δ Ex5 à activer les voies de signalisation générale non canoniques de FXR α justifie des investigations supplémentaires pour déterminer si et dans quelle mesure ce variant pourrait contribuer à des réponses indépendantes de l'activation de la transcription. Cela devrait fournir de nouvelles perspectives pour éclairer les mécanismes moléculaires associés à l'action anti-apoptotique et métabolique de FXR α , un résultat qui est en adéquation avec la démonstration récente d'une interaction de FXR α avec la caspase 8 au niveau du cytoplasme pour inhiber la formation de complexes de signalisation activateurs de l'apoptose dans les hépatocytes (Wang et al., 2018a). Il est donc envisageable dans notre système d'utiliser le variant FXR α 1 Δ Ex5 comme protéine appât afin d'identifier des partenaires d'interaction au niveau du cytoplasme par des approches de chromatographie d'affinité, qui en plus pourraient s'étendre aux protéines nucléaires afin de préciser les modalités d'interaction de ce variant au niveau de la chromatine.

Enfin, la combinaison de nos approches de chromatographie d'affinité (GST pull-down), d'activation de la transcription (gène rapporteurs luciférase) et de séquençage du transcriptome indiquent que l'épissage de l'exon 5 confère des propriétés particulières au récepteur métabolique FXR α pour la liaison et l'activation de la transcription génique. Un test d'interaction *in vitro* a révélé que FXR α 1 Δ Ex5 interagit fortement avec le domaine de liaison au ligand (LBD) de RXR α mais pas avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD), contrairement à FXR α 1 qui interagit également avec le DBD et le LBD de RXR α . Une explication plausible de ces interactions moléculaires différentielles entre les variantes de FXR α 1 et RXR α peut résider dans la caractéristique unique du domaine de liaison à l'ADN de FXR α 1 Δ Ex5 qui a perdu le deuxième motif de doigt de zinc qui englobe la boîte D, et l'extension carboxyterminale (CTE) du domaine de liaison à l'ADN. Cela pourrait créer un repliement tridimensionnel globalement défavorable pour l'interaction avec le domaine de liaison à l'ADN de RXR α . Récemment, il a été démontré que les interactions intramoléculaires entre le DBD et le LBD du récepteur nucléaire CAR contrôlent son activation au sein de l'hétérodimère avec RXR α (Shizu et al. 2018). Fait intéressant, ces travaux antérieurs ont également montré que la délétion de la région charnière réduisait la flexibilité du récepteur nucléaire CAR pour positionner

correctement son DBD par rapport au LBD et abroger sa capacité à former un hétérodimère RXR α actif. Sur la base de ces observations, nous postulons que l'excision de l'exon 5 de FXR α 1 par épissage alternatif puisse perturber les interactions intramoléculaires et créer un partenaire inactif pouvant aussi inhiber l'hétérodimère RXR α permissif, comme observé dans nos essais d'activation de la transcription avec des gènes rapporteurs de luciférase. Par conséquent, la structure cristalline et la modélisation tridimensionnelle de l'ADN du FXR α 1 devraient être d'un grand intérêt pour mieux comprendre la conséquence structurelle de l'épissage de l'exon 5 sur l'activation de la transcription par FXR α et les pertes de signalisation de l'hétérodimère RXR permissif. Bien qu'inactifs dans les essais de transactivation de gènes rapporteurs, les deux partenaires de l'hétérodimère se retrouvent dans une fraction enrichie en chromatine, même si le variant FXR α 1 Δ Ex5 n'arrive pas à se lier, seul ou avec RXR α , à une séquence d'ADN FXRE spécifique dans un essai de retardement de mobilité électrophorétique. Cela nous a permis de conclure que des interactions protéine-protéine sont probablement nécessaires pour stabiliser l'hétérocomplexe sur la chromatine et a soulevé plusieurs questions qui doivent être abordées afin d'identifier les protéines corégulatrices de ces complexes, puis de cartographier les sites auxquels se lient le variant FXR α 1 Δ Ex5 au niveau de la chromatine. Ceci devrait être réalisable par une approche d'immunoprécipitation de chromatine pour définir les sites de liaison dans le génome pour ces facteurs spécifiques, puis pour déterminer comment ce nouveau variant de FXR α peut exercer son action sur l'activation de la transcription des gènes cibles de FXR α , y compris pour les nouveaux gènes cibles potentiels identifiés dans cette étude. En résumé, les résultats de cette seconde partie suggère que l'épissage alternatif intervienne comme un mécanisme complémentaire de régulation de la signalisation par FXR α , ouvrant de nouvelles perspectives pour l'étude de FXR α dans les conditions physiologiques et/ou pathologiques.

En conclusion de ce travail, nous proposons que le récepteur FXR α puisse participer au maintien de l'homéostasie des cellules germinales souches en agissant sur les événements moléculaires sous-jacents à leur différenciation et/ou au maintien de leur état différencié. Nous appuyons ce postulat sur les précédents travaux de l'équipe qui montrent que l'absence de FXR α chez la souris (Fxr α -/-) augmentent le nombre de cellules souches spermatogoniales indifférenciées, puis sur les études conduites pendant ce travail de thèse qui nous amène à

définir un profil d'accumulation de FXR α qui distingue les sous-types de tumeurs germinales différenciées comme les tératocarcinomes, des tumeurs germinales du testicule moins ou peu différenciées. Cela suggère un lien fonctionnel entre le caractère pluripotent des cellules souches germinales et l'expression de FXR α qui reste encore à préciser en lien avec la signalisation par l'acide rétinoïque qui agit comme un agent de la différenciation des cellules germinales. A l'heure actuelle, notre travail ne permet pas de définir si la perte d'expression et/ou d'activité de FXR α participe à l'étiologie des tumeurs germinales du testicule. Toutefois, il serait tentant d'incriminer que la présence de nouveaux variant d'épissage de FXR α puisse intervenir dans la perte de l'homéostasie des cellules souches germinales et participer à l'étiologie de la maladie puisque le variant FXR α 1 Δ Ex5 est retrouvé dans des lignées de cellules germinales de souris ainsi que dans certains troubles de la fertilité comme l'azoospermie non obstructive (excrétoire). La poursuite des études visant à caractériser la fonction de ce nouveau variant de FXR α délété de son exon 5 s'intégrera dans cette démarche afin d'éclairer la participation de ce récepteur dans le développement des troubles de la fertilité et du cancer germinale du testicule. D'un point de vue plus fondamental, la caractérisation fonctionnelle du variant FXR α 1 Δ Ex5 pourra également ouvrir un nouveau champ d'investigation dans l'équipe centré sur l'étude de l'épissage alternatif par des exons cassette comme source de diversité des récepteurs nucléaires FXR α et des mécanismes d'adaptation des réseaux d'expression génique contrôlés par ce récepteur selon les stimuli auxquels sont exposés les cellules de l'organisme. La disponibilité de ce variant offre un cadre d'étude pour évaluer les changements structuraux et dynamiques des modifications du domaine de liaison à l'ADN par épissage et il sera intéressant de savoir comment ce variant du récepteur FXR α reconnaît ses différents cofacteurs tout en précisant dans quelle mesure les changements de conformation induits par un ligand modifient cette reconnaissance avec un impact sur les réponses transcriptionnelles.

Références bibliographiques

- « A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily ». 1999. *Cell* 97 (2): 161-63. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80726-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80726-6).
- Abdel-Latif, Mohamed Mahmoud M., Hiroyasu Inoue, Dermot Kelleher, et John V. Reynolds. 2016. « Factors Regulating Nuclear Factor-Kappa B Activation in Esophageal Cancer Cells: Role of Bile Acids and Acid ». *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 12 (1): 364-73. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.174525>.
- Aigueperse, Christelle, Pierre Val, Corinne Pacot, Christian Darne, Enzo Lalli, Paolo Sassone-Corsi, Georges Veyssiere, Claude Jean, et Antoine Martinez. 2001. « SF-1 (Steroidogenic Factor-1), C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein), and Ubiquitous Transcription Factors NF1 (Nuclear Factor 1) and Sp1 (Selective Promoter Factor 1) Are Required for Regulation of the Mouse Aldose Reductase-Like Gene (AKR1B7) Expression in Adrenocortical Cells ». *Molecular Endocrinology* 15 (1): 93-111. <https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0577>.
- Alasmael, Noura, Rati Mohan, Lisiane B. Meira, Karen E. Swales, et Nick J. Plant. 2016. « Activation of the Farnesoid X-Receptor in Breast Cancer Cell Lines Results in Cytotoxicity but Not Increased Migration Potential ». *Cancer Letters* 370 (2): 250-59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.031>.
- Alfaro, J. M., M. Ricote, M. V. T. Lobo, M. Royuela, B. Fraile, R. Paniagua, et M. I. Arenas. 2002. « Immunohistochemical Detection of the Retinoid Acid Receptors (RXR- α , - β , - γ) and Farnesoid X-Activated Receptor (FXR) in the Marbled Newt along the Annual Cycle ». *Molecular Reproduction and Development* 62 (2): 216-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrd.10104>.
- Allenby, Gary, Richard M. Sharpe, et Paul M. D. Foster. 1990. « Changes in Sertoli Cell Function in Vitro Induced by Nitrobenzene ». *Fundamental and Applied Toxicology* 14 (2): 364-75. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(90\)90216-7](https://doi.org/10.1016/0272-0590(90)90216-7).
- Almstrup, K., J. E. Nielsen, O. Mlynarska, M. T. Jansen, A. Jørgensen, N. E. Skakkebaek, et E. Rajpert-De Meyts. 2010. « Carcinoma in Situ Testis Displays Permissive Chromatin Modifications Similar to Immature Foetal Germ Cells ». *British Journal of Cancer* 103 (8): 1269-76. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605880>.
- Almstrup, Kristian, Christina E. Hoei-Hansen, Ute Wirkner, Jonathon Blake, Christian Schwager, Wilhelm Ansorge, John E. Nielsen, Niels E. Skakkebaek, Ewa Rajpert-De Meyts, et Henrik Leffers. 2004. « Embryonic Stem Cell-like Features of Testicular Carcinoma in Situ Revealed by Genome-Wide Gene Expression Profiling ». *Cancer Research* 64 (14): 4736-43. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0679>.
- Ananthanarayanan, M., N. Balasubramanian, M. Makishima, D. J. Mangelsdorf, et F. J. Suchy. 2001. « Human Bile Salt Export Pump Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (31): 28857-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011610200>.
- Anaya-Hernández, Arely, Maribel Méndez-Tepepa, Hernández-Aragón Laura G., Pablo Pacheco, Margarita Martínez-Gómez, Francisco Castelán, et Estela Cuevas. 2014. « Farnesoid X Receptor Immunolocalization in Reproductive Tissues of Adult Female

Rabbits ». *Acta Histochemica* 116 (6): 1068-74.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.05.003>.

- Annalora, Andrew J., Marija Jozic, Craig B. Marcus, et Patrick L. Iversen. 2019. « Alternative Splicing of the Vitamin D Receptor Modulates Target Gene Expression and Promotes Ligand-Independent Functions ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 364 (février): 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.12.009>.
- Annalora, Andrew J., Craig B. Marcus, et Patrick L. Iversen. 2020. « Alternative Splicing in the Nuclear Receptor Superfamily Expands Gene Function to Refine Endo-Xenobiotic Metabolism ». *Drug Metabolism and Disposition* 48 (4): 272-87. <https://doi.org/10.1124/dmd.119.089102>.
- Arendt, Linn Håkonsen, Andreas Ernst, Lea Lykke Braskhøj Lauridsen, Nis Brix, Jørn Olsen, et Cecilia Høst Ramlau-Hansen. 2019. « Timing of Pubertal Development in Boys Born with Cryptorchidism and Hypospadias: A Nationwide Cohort Study ». *Asian Journal of Andrology* 21 (6): 551-56. https://doi.org/10.4103/aja.aja_3_19.
- Assem, Mahfoud, Erin G. Schuetz, Markos Leggas, Daxi Sun, Kazuto Yasuda, Glen Reid, Noam Zelcer, et al. 2004. « Interactions between Hepatic Mrp4 and Sult2a as Revealed by the Constitutive Androstane Receptor and Mrp4 Knockout Mice* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (21): 22250-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314111200>.
- Attia, Abdelhamid M., Ahmed M. Abou-Setta, et Hesham G. Al-Inany. 2013. « Gonadotrophins for Idiopathic Male Factor Subfertility ». *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n° 8. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005071.pub4>.
- Attinkara, Ragam, Jessica Mwinyi, Kaspar Truninger, Jaroslaw Regula, Pawel Gaj, Gerhard Rogler, Gerd A. Kullak-Ublick, Jyrki J. Eloranta, et Swiss IBD Cohort Study Group. 2012. « Association of Genetic Variation in the NR1H4 Gene, Encoding the Nuclear Bile Acid Receptor FXR, with Inflammatory Bowel Disease ». *BMC Research Notes* 5 (août): 461. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-461>.
- Baek, Sung Hee, Kenneth A. Ohgi, David W. Rose, Edward H. Koo, Christopher K. Glass, et Michael G. Rosenfeld. 2002. « Exchange of N-CoR Corepressor and Tip60 Coactivator Complexes Links Gene Expression by NF- κ B and β -Amyloid Precursor Protein ». *Cell* 110 (1): 55-67. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00809-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00809-7).
- Balasubramaniyan, Natarajan, Meena Ananthanarayanan, et Frederick J. Suchy. 2012. « Direct Methylation of FXR by Set7/9, a Lysine Methyltransferase, Regulates the Expression of FXR Target Genes ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 302 (9): G937-47. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00441.2011>.
- Balasubramaniyan, Natarajan, Yuhuan Luo, An-Qiang Sun, et Frederick J. Suchy. 2013. « SUMOylation of the Farnesoid X Receptor (FXR) Regulates the Expression of FXR Target Genes ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (19): 13850-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443937>.
- Ballatori, Nazzareno, Whitney V. Christian, Jin Young Lee, Paul A. Dawson, Carol J. Soroka, James L. Boyer, Michael S. Madejczyk, et Na Li. 2005. « OST α -OST β : A Major Basolateral Bile Acid and Steroid Transporter in Human Intestinal, Renal, and Biliary

Epithelia ». *Hepatology* 42 (6): 1270-79.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.20961>.

- Baniahmad, A, I Ha, D Reinberg, S Tsai, M J Tsai, et B W O'Malley. 1993. « Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (19): 8832-36.
- Bannister, Andrew J, et Tony Kouzarides. 2011. « Regulation of chromatin by histone modifications ». *Cell Research* 21 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Baptissart, Marine, Emmanuelle Martinot, Aurélie Vega, Lauriane Sédes, Betty Rouaisnel, Angélique de Haze, Silvère Baron, Kristina Schoonjans, Françoise Caira, et David H. Volle. 2016. « Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice ». *Oncotarget* 7 (15): 19468-82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153>.
- Baptissart, Marine, Aurelie Vega, Emmanuelle Martinot, Silvère Baron, Jean-Marc A. Lobaccaro, et David H. Volle. 2013. « Farnesoid X Receptor Alpha: A Molecular Link between Bile Acids and Steroid Signaling? » *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (23): 4511-26. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1387-0>.
- Baptissart, Marine, Aurélie Vega, Emmanuelle Martinot, Aurélien J. Pommier, Sander M. Houten, Geoffroy Marceau, Angélique de Haze, et al. 2014. « Bile Acids Alter Male Fertility through G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 Signaling Pathways in Mice ». *Hepatology* 60 (3): 1054-65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.27204>.
- Barbier, Olivier, Ines Pineda Torra, Audrey Sirvent, Thierry Claudel, Christophe Blanquart, Daniel Duran-Sandoval, Folkert Kuipers, Vladimir Kosykh, Jean-Charles Fruchart, et Bart Staels. 2003. « FXR Induces the UGT2B4 Enzyme in Hepatocytes: A Potential Mechanism of Negative Feedback Control of FXR Activity ». *Gastroenterology* 124 (7): 1926-40. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00388-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00388-3).
- Baron, Silvère, Michèle Manin, Claude Beaudoin, Laurent Leotoing, Yves Communal, Georges Veyssiere, et Laurent Morel. 2004. « Androgen Receptor Mediates Non-Genomic Activation of Phosphatidylinositol 3-OH Kinase in Androgen-Sensitive Epithelial Cells* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (15): 14579-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306143200>.
- Bashamboo, A., et K. McElreavey. 2010. « NR5A1/SF-1 and Development and Function of the Ovary ». *Annales D'endocrinologie* 71 (3): 177-82. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.013>.
- Båvner, Ann, Sabyasachi Sanyal, Jan-Åke Gustafsson, et Eckardt Treuter. 2005. « Transcriptional Corepression by SHP: Molecular Mechanisms and Physiological Consequences ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (10): 478-88. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.10.005>.
- Bays, Harold E., Ronald B. Goldberg, Kenneth E. Truitt, et Michael R. Jones. 2008. « Colesevelam Hydrochloride Therapy in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Treated with Metformin: Glucose and Lipid Effects ». *Archives of Internal Medicine* 168 (18): 1975-83. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.18.1975>.

- Beato, M., P. Herrlich, et G. Schütz. 1995. « Steroid Hormone Receptors: Many Actors in Search of a Plot ». *Cell* 83 (6): 851-57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90201-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90201-5).
- Beliard, S., B. Cariou, T. Gautier, E. Nobecourt, et R. Valero. 2019. « Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme ». [//www.em-premium.com/data/traites/gn/10-84692/](http://www.em-premium.com/data/traites/gn/10-84692/), juin. <https://www-em-premium-com.ezproxy.uca.fr/article/1297616/resultatrecherche/1>.
- Berkenstam, A., M. M. Vivanco Ruiz, D. Baretino, M. Horikoshi, et H. G. Stunnenberg. 1992. « Cooperativity in Transactivation between Retinoic Acid Receptor and TFIID Requires an Activity Analogous to E1A ». *Cell* 69 (3): 401-12. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90443-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90443-g).
- Bevan, C. L., S. Hoare, F. Claessens, D. M. Heery, et M. G. Parker. 1999. « The AF1 and AF2 Domains of the Androgen Receptor Interact with Distinct Regions of SRC1 ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8383-92. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.8383>.
- Biermann, Katharina, et Klaus Steger. 2007. « Epigenetics in Male Germ Cells ». *Journal of Andrology* 28 (4): 466-80. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.002048>.
- Bilen, Mehmet Asim, Kenneth R. Hess, Matthew T. Campbell, Jennifer Wang, Russell R. Broaddus, Jose A. Karam, John F. Ward, et al. 2016. « Intratumoral heterogeneity and chemoresistance in nonseminomatous germ cell tumor of the testis ». *Oncotarget* 7 (52): 86280-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13380>.
- Bitgood, Mark J, Liya Shen, et Andrew P McMahon. 1996. « Sertoli Cell Signaling by Desert Hedgehog Regulates the Male Germline ». *Current Biology* 6 (3): 298-304. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00480-3).
- Blanco, J. C., S. Minucci, J. Lu, X. J. Yang, K. K. Walker, H. Chen, R. M. Evans, Y. Nakatani, et K. Ozato. 1998. « The Histone Acetylase PCAF Is a Nuclear Receptor Coactivator ». *Genes & Development* 12 (11): 1638-51. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1638>.
- Blanco, J C, I M Wang, S Y Tsai, M J Tsai, B W O'Malley, P W Jurutka, M R Haussler, et K Ozato. 1995. « Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (5): 1535-39.
- Bourguet, William, Pierre Germain, et Hinrich Gronemeyer. 2000. « Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications ». *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (10): 381-88. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01548-0](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01548-0).
- Bourguet, William, Valérie Vivat, Jean-Marie Wurtz, Pierre Chambon, Hinrich Gronemeyer, et Dino Moras. 2000. « Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains ». *Molecular Cell* 5 (2): 289-98. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80424-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80424-4).
- Brüggemeier, U., M. Kalff, S. Franke, C. Scheidereit, et M. Beato. 1991. « Ubiquitous Transcription Factor OTF-1 Mediates Induction of the MMTV Promoter through Synergistic Interaction with Hormone Receptors ». *Cell* 64 (3): 565-72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90240-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90240-y).

- Bullejos, Monica, et Peter Koopman. 2001. « Spatially Dynamic Expression of Sry in Mouse Genital Ridges ». *Developmental Dynamics* 221 (2): 201-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvdy.1134>.
- Burgermeister, Elke, et Rony Seger. 2007. « MAPK- Kinases as Nucleo-Cytoplasmic Shuttles for PPAR γ ». *Cell Cycle* 6 (13): 1539-48. <https://doi.org/10.4161/cc.6.13.4453>.
- Byskov, A. G. 1986. « Differentiation of mammalian embryonic gonad ». *Physiological Reviews* 66 (1): 71-117. <https://doi.org/10.1152/physrev.1986.66.1.71>.
- Calkin, Anna C., et Peter Tontonoz. 2012. « Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (4): 213-24. <https://doi.org/10.1038/nrm3312>.
- Cardoso-Moreira, Margarida, Jean Halbert, Delphine Valloton, Britta Velten, Chunyan Chen, Yi Shao, Angélica Liechti, et al. 2019. « Gene Expression across Mammalian Organ Development ». *Nature* 571 (7766): 505-9. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1338-5>.
- Carino, Adriana, Luigina Graziosi, Claudio D'Amore, Sabrina Cipriani, Silvia Marchianò, Elisabetta Marino, Angela Zampella, et al. 2016. « The bile acid receptor GPBAR1 (TGR5) is expressed in human gastric cancers and promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cell lines ». *Oncotarget* 7 (38): 61021-35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10477>.
- Caron, Sandrine, Carolina Huaman Samanez, Hélène Dehondt, Maheul Ploton, Olivier Briand, Fleur Lien, Emilie Dorchies, et al. 2013. « Farnesoid X Receptor Inhibits the Transcriptional Activity of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Human Hepatocytes ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (11): 2202-11. <https://doi.org/10.1128/MCB.01004-12>.
- Casals-Casas, Cristina, et Béatrice Desvergne. 2011. « Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption ». *Annual Review of Physiology* 73 (1): 135-62. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>.
- Castellón, E., A. Janecki, et Anna Steinberger. 1989. « Age-Dependent Sertoli Cell Responsiveness to Germ Cells in Vitro ». *International Journal of Andrology* 12 (6): 439-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1989.tb01334.x>.
- Castillo, Ana I., Ana M. Jimenez-Lara, Rosa M. Tolon, et Ana Aranda. 1999. « Synergistic Activation of the Prolactin Promoter by Vitamin D Receptor and GHF-1: Role of the Coactivators, CREB-Binding Protein and Steroid Hormone Receptor Coactivator-1 (SRC-1) ». *Molecular Endocrinology* 13 (7): 1141-54. <https://doi.org/10.1210/mend.13.7.0320>.
- Castillo-Olivares, Antonio del, José A. Campos, William M. Pandak, et Gregorio Gil. 2004. « The Role of A1-Fetoprotein Transcription Factor/LRH-1 in Bile Acid Biosynthesis: A KNOWN NUCLEAR RECEPTOR ACTIVATOR THAT CAN ACT AS A SUPPRESSOR OF BILE ACID BIOSYNTHESIS* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (16): 16813-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400646200>.

- Catalano, Stefania, Rocco Malivindi, Cinzia Giordano, Guowei Gu, Salvatore Panza, Daniela Bonofiglio, Marilena Lanzino, Diego Sisci, Maria Luisa Panno, et Sebastiano Andò. 2010. « Farnesoid X Receptor, through the Binding with Steroidogenic Factor 1-Responsive Element, Inhibits Aromatase Expression in Tumor Leydig Cells * ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5581-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052670>.
- Cato, Andrew C. B., Andrea Nestl, et Sigrun Mink. 2002. « Rapid Actions of Steroid Receptors in Cellular Signaling Pathways ». *Science's STKE* 2002 (138): re9-re9. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.138.re9>.
- 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>.
- Chao, Fan, Wei Gong, Yingru Zheng, Yuan Li, Gang Huang, Min Gao, Jialin Li, et al. 2010. « Upregulation of Scavenger Receptor Class B Type I Expression by Activation of FXR in Hepatocyte ». *Atherosclerosis* 213 (2): 443-48. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.016>.
- Chatagnon, Amandine, Philippe Veber, Valérie Morin, Justin Bedo, Gérard Triqueneaux, Marie Sémon, Vincent Laudet, Florence d'Alché-Buc, et Gérard Benoit. 2015. « RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements ». *Nucleic Acids Research* 43 (10): 4833-54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv370>.
- Chávez-Talavera, Oscar, Anne Tailleux, Philippe Lefebvre, et Bart Staels. 2017. « Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Gastroenterology, Advances in Obesity: Causes, Consequences, and Therapy*, 152 (7): 1679-1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>.
- Chawla, Ajay, Joyce J. Repa, Ronald M. Evans, et David J. Mangelsdorf. 2001. « Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files ». *Science* 294 (5548): 1866-70. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1866>.
- Chen, H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nakatani, et R. M. Evans. 1997. « Nuclear Receptor Coactivator ACTR Is a Novel Histone Acetyltransferase and Forms a Multimeric Activation Complex with P/CAF and CBP/P300 ». *Cell* 90 (3): 569-80. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80516-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80516-4).
- Chen, Tianlu, Guoxiang Xie, Xiaoying Wang, Jia Fan, Yunping Qiu, Xiaojiao Zheng, Xin Qi, et al. 2011. « Serum and Urine Metabolite Profiling Reveals Potential Biomarkers of Human Hepatocellular Carcinoma* ». *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (7): M110.004945. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004945>.
- Cheng, C. Yan, et Dolores D. Mruk. 2009. « An Intracellular Trafficking Pathway in the Seminiferous Epithelium Regulating Spermatogenesis: A Biochemical and Molecular Perspective ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44 (5): 245-63. <https://doi.org/10.1080/10409230903061207>.

- Cheng, C. Yan, Elissa W. P. Wong, Helen H. N. Yan, et Dolores D. Mruk. 2010. « Regulation of Spermatogenesis in the Microenvironment of the Seminiferous Epithelium: New Insights and Advances ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 315 (1-2): 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.004>.
- Chennamsetty, Indumathi, Thierry Claudel, Karam M. Kostner, Anna Baghdasaryan, Dagmar Kratky, Sanja Levak-Frank, Sasa Frank, Frank J. Gonzalez, Michael Trauner, et Gert M. Kostner. 2011. « Farnesoid X Receptor Represses Hepatic Human APOA Gene Expression ». *The Journal of Clinical Investigation* 121 (9). <https://doi.org/10.1172/JCI45277>.
- Choi, Jang Hyun, Alexander S. Banks, Jennifer L. Estall, Shingo Kajimura, Pontus Boström, Dina Laznik, Jorge L. Ruas, et al. 2010. « Anti-Diabetic Drugs Inhibit Obesity-Linked Phosphorylation of PPAR γ by Cdk5 ». *Nature* 466 (7305): 451-56. <https://doi.org/10.1038/nature09291>.
- Chong, Hansook Kim, Jacob Biesinger, Young-Kyo Seo, Xiaohui Xie, et Timothy F Osborne. 2012. « Genome-wide analysis of hepatic LRH-1 reveals a promoter binding preference and suggests a role in regulating genes of lipid metabolism in concert with FXR ». *BMC Genomics* 13 (février): 51. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-51>.
- Chong, Hansook Kim, Aniello M. Infante, Young-Kyo Seo, Tae-Il Jeon, Yanqiao Zhang, Peter A. Edwards, Xiaohui Xie, et Timothy F. Osborne. 2010. « Genome-Wide Interrogation of Hepatic FXR Reveals an Asymmetric IR-1 Motif and Synergy with LRH-1 ». *Nucleic Acids Research* 38 (18): 6007-17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq397>.
- Chuang, F. Max, Brian L. West, John D. Baxter, et Fred Schaufele. 1997. « Activities in Pit-1 Determine Whether Receptor Interacting Protein 140 Activates or Inhibits Pit-1/Nuclear Receptor Transcriptional Synergy ». *Molecular Endocrinology* 11 (9): 1332-41. <https://doi.org/10.1210/mend.11.9.9978>.
- Cipriani, Sabrina, Andrea Mencarelli, Giuseppe Palladino, et Stefano Fiorucci. 2010. « FXR activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats ». *Journal of Lipid Research* 51 (4): 771-84. <https://doi.org/10.1194/jlr.M001602>.
- Claudel, Thierry, Yusuke Inoue, Olivier Barbier, Daniel Duran-Sandoval, Vladimir Kosykh, Jamila Fruchart, Jean-Charles Fruchart, Frank J Gonzalez, et Bart Staels. 2003. « Farnesoid X Receptor Agonists Suppress Hepatic Apolipoprotein CIII Expression ». *Gastroenterology* 125 (2): 544-55. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00896-5](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00896-5).
- Claudel, Thierry, Ekkehard Sturm, Hélène Duez, Inés Pineda Torra, Audrey Sirvent, Vladimir Kosykh, Jean-Charles Fruchart, et al. 2002. « Bile Acid-Activated Nuclear Receptor FXR Suppresses Apolipoprotein A-I Transcription via a Negative FXR Response Element ». *The Journal of Clinical Investigation* 109 (7): 961-71. <https://doi.org/10.1172/JCI14505>.
- Clermont, Y., et B. Perey. 1957. « Quantitative Study of the Cell Population of the Seminiferous Tubules in Immature Rats ». *The American Journal of Anatomy* 100 (2): 241-67. <https://doi.org/10.1002/aja.1001000205>.
- Conley, A. J., et I. M. Bird. 1997. « The Role of Cytochrome P450 17 α -Hydroxylase and 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Integration of Gonadal and Adrenal

- Steroidogenesis via the $\Delta 5$ and $\Delta 4$ Pathways of Steroidogenesis in Mammals ». *Biology of Reproduction* 56 (4): 789-99. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.789>.
- Cool, Jonah, Tony DeFalco, et Blanche Capel. 2012. « Testis Formation in the Fetal Mouse: Dynamic and Complex de Novo Tubulogenesis ». *WIREs Developmental Biology* 1 (6): 847-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wdev.62>.
- Corcos, Laurent, et Stéphanie Solier. 2005. « Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire ». *médecine/sciences* 21 (3): 253-60. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005213253>.
- Côté, Isabelle, Emilienne Tudor Ngo Sock, Émile Lévy, et Jean-Marc Lavoie. 2013. « An Atherogenic Diet Decreases Liver FXR Gene Expression and Causes Severe Hepatic Steatosis and Hepatic Cholesterol Accumulation: Effect of Endurance Training ». *European Journal of Nutrition* 52 (5): 1523-32. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0459-5>.
- Cotnoir-White, David, David Laperrière, et Sylvie Mader. 2011. « Evolution of the Repertoire of Nuclear Receptor Binding Sites in Genomes ». *Molecular and Cellular Endocrinology, Evolution of Nuclear Hormone Receptors*, 334 (1): 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.10.021>.
- Culig, Zoran, Alfred Hobisch, Marcus V. Cronauer, Christian Radmayr, Jan Trapman, Anton Hittmair, Georg Bartsch, et Helmut Klocker. 1994. « Androgen Receptor Activation in Prostatic Tumor Cell Lines by Insulin-like Growth Factor-I, Keratinocyte Growth Factor, and Epidermal Growth Factor ». *Cancer Research* 54 (20): 5474-78.
- Dahlman-Wright, K, A Wright, Gustafsson Ja, et Carlstedt-Duke J. 1991. « Interaction of the Glucocorticoid Receptor DNA-Binding Domain with DNA as a Dimer Is Mediated by a Short Segment of Five Amino Acids ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (5). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/1993683/>.
- Daniel, Andrea R., Angela L. Gaviglio, Lauren M. Czaplicki, Christopher J. Hillard, Daniel Housa, et Carol A. Lange. 2010. « The Progesterone Receptor Hinge Region Regulates the Kinetics of Transcriptional Responses through Acetylation, Phosphorylation, and Nuclear Retention ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 24 (11): 2126-38. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0170>.
- De Bosscher, Karolien, Sofie J. Desmet, Dorien Clarisse, Eva Estébanez-Perpiña, et Luc Brunsveld. 2020. « Nuclear Receptor Crosstalk — Defining the Mechanisms for Therapeutic Innovation ». *Nature Reviews Endocrinology* 16 (7): 363-77. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0349-5>.
- De Bosscher, Karolien, Wim Vanden Berghe, et Guy Haegeman. 2003. « The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression ». *Endocrine Reviews* 24 (4): 488-522. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0006>.
- De Marino, Simona, Raffaella Ummarino, Maria Valeria D'Auria, Maria Giovanna Chini, Giuseppe Bifulco, Barbara Renga, Claudio D'Amore, Stefano Fiorucci, Cécile Debitus, et Angela Zampella. 2011. « Theonellasterols and Conicasterols from *Theonella swinhoei*.

- Novel Marine Natural Ligands for Human Nuclear Receptors ». *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (8): 3065-75. <https://doi.org/10.1021/jm200169t>.
- Delbès, Géraldine, Christine Levacher, Catherine Pairault, Chrystèle Racine, Clotilde Duquenne, Andrée Krust, et René Habert. 2004. « Estrogen Receptor β -Mediated Inhibition of Male Germ Cell Line Development in Mice by Endogenous Estrogens during Perinatal Life ». *Endocrinology* 145 (7): 3395-3403. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1479>.
- Delmotte, M. H., A. Tahayato, P. Formstecher, et P. Lefebvre. 1999. « Serine 157, a Retinoic Acid Receptor Alpha Residue Phosphorylated by Protein Kinase C in Vitro, Is Involved in RXR.RARalpha Heterodimerization and Transcriptional Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 38225-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38225>.
- Dey, A, A M Thornton, M Lonergan, S M Weissman, J W Chamberlain, et K Ozato. 1992. « Occupancy of upstream regulatory sites in vivo coincides with major histocompatibility complex class I gene expression in mouse tissues. » *Molecular and Cellular Biology* 12 (8): 3590-99.
- Diao, Yanyan, Jing Jiang, Shoude Zhang, Shiliang Li, Lei Shan, Jin Huang, Weidong Zhang, et Honglin Li. 2018. « Discovery of Natural Products as Novel and Potent FXR Antagonists by Virtual Screening ». *Frontiers in Chemistry* 6: 140. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00140>.
- Dostert, A., et T. Heinzel. 2004. « Negative Glucocorticoid Receptor Response Elements and Their Role in Glucocorticoid Action ». *Current Pharmaceutical Design* 10 (23): 2807-16.
- Downes, Michael, Mark A. Verdecia, A. J. Roecker, Robert Hughes, John B. Hogenesch, Heidi R. Kast-Woelbern, Marianne E. Bowman, et al. 2003. « A Chemical, Genetic, and Structural Analysis of the Nuclear Bile Acid Receptor FXR ». *Molecular Cell* 11 (4): 1079-92. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00104-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00104-7).
- Drumond, Ana Luiza, Marvin L. Meistrich, et Hélio Chiarini-Garcia. 2011. « Spermatogonial Morphology and Kinetics during Testis Development in Mice: A High-Resolution Light Microscopy Approach ». *Reproduction* 142 (1): 145-55. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0431>.
- Duran-Sandoval, Daniel, Gisèle Mautino, Geneviève Martin, Frédéric Percevault, Olivier Barbier, Jean-Charles Fruchart, Folkert Kuipers, et Bart Staels. 2004. « Glucose Regulates the Expression of the Farnesoid X Receptor in Liver ». *Diabetes* 53 (4): 890-98. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.890>.
- Dwivedi, Shailendra Kumar Dhar, Nidhi Singh, Rashmi Kumari, Jay Sharan Mishra, Sarita Tripathi, Priyam Banerjee, Priyanka Shah, et al. 2011. « Bile Acid Receptor Agonist GW4064 Regulates PPAR γ Coactivator-1 α Expression Through Estrogen Receptor-Related Receptor α ». *Molecular Endocrinology* 25 (6): 922-32. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0512>.
- Eirini, Lioudaki, S. Ganotakis Emmanuel, et P. Mikhailidis Dimitri. 2011. « Lipid Lowering Drugs and Gallstones: A Therapeutic Option? » *Current Pharmaceutical Design* 17 (33): 3622-31.

- Elzinga-Tinke, Jenny E, Gert R Dohle, et Leendert HJ Looijenga. 2015. « Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for preinvasive diagnosis ». *Asian Journal of Andrology* 17 (3): 381-93. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.148079>.
- Eriksson, M. A., et L. Nilsson. 1999. « Structural and Dynamic Differences of the Estrogen Receptor DNA-Binding Domain, Binding as a Dimer and as a Monomer to DNA: Molecular Dynamics Simulation Studies ». *European Biophysics Journal: EBJ* 28 (2): 102-11. <https://doi.org/10.1007/s002490050189>.
- Evans, Ronald M., et David J. Mangelsdorf. 2014. « Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang ». *Cell* 157 (1): 255-66. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>.
- Fagerberg, Linn, Björn M. Hallström, Per Oksvold, Caroline Kampf, Dijana Djureinovic, Jacob Odeberg, Masato Habuka, et al. 2014. « Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13 (2): 397-406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>.
- Falany, C. N., M. R. Johnson, S. Barnes, et R. B. Diasio. 1994. « Glycine and Taurine Conjugation of Bile Acids by a Single Enzyme. Molecular Cloning and Expression of Human Liver Bile Acid CoA:Amino Acid N-Acyltransferase. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (30): 19375-79. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32178-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32178-6).
- Fang, Sungsoon, Stephanie Tsang, Ryan Jones, Bhaskar Ponugoti, Hyeryoung Yoon, Shwu-Yuan Wu, Cheng-Ming Chiang, Timothy M. Willson, et Jongsook Kim Kemper. 2008. « The P300 Acetylase Is Critical for Ligand-Activated Farnesoid X Receptor (FXR) Induction of SHP ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (50): 35086-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803531200>.
- Fayard, Elisabeth, Johan Auwerx, et Kristina Schoonjans. 2004. « LRH-1: An Orphan Nuclear Receptor Involved in Development, Metabolism and Steroidogenesis ». *Trends in Cell Biology* 14 (5): 250-60. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.008>.
- Feng, Hui-Yi, et Yang-Chao Chen. 2016. « Role of bile acids in carcinogenesis of pancreatic cancer: An old topic with new perspective ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (33): 7463-77. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i33.7463>.
- Fernandez, Elias J. 2018. « Allosteric pathways in nuclear receptors — Potential targets for drug design ». *Pharmacology & Therapeutics* 183 (mars): 152-59. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.014>.
- Fiorucci, Stefano, Elisabetta Antonelli, Giovanni Rizzo, Barbara Renga, Andrea Mencarelli, Luisa Riccardi, Stefano Orlandi, Roberto Pellicciari, et Antonio Morelli. 2004. « The Nuclear Receptor SHP Mediates Inhibition of Hepatic Stellate Cells by FXR and Protects against Liver Fibrosis ». *Gastroenterology* 127 (5): 1497-1512. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.001>.
- Fiorucci, Stefano, Carlo Clerici, Elisabetta Antonelli, Stefano Orlandi, Bryan Goodwin, Bahman M. Sadeghpour, Giuseppe Sabatino, et al. 2005. « Protective Effects of 6-Ethyl Chenodeoxycholic Acid, a Farnesoid X Receptor Ligand, in Estrogen-Induced

- Cholestasis ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313 (2): 604-12. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.079665>.
- Fiorucci, Stefano, Giovanni Rizzo, Elisabetta Antonelli, Barbara Renga, Andrea Mencarelli, Luisa Riccardi, Antonio Morelli, Mark Pruzanski, et Roberto Pellicciari. 2005. « Cross-Talk between Farnesoid-X-Receptor (FXR) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Contributes to the Antifibrotic Activity of FXR Ligands in Rodent Models of Liver Cirrhosis ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315 (1): 58-68. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.085597>.
- Fiorucci, Stefano, Angela Zampella, et Eleonora Distrutti. 2012. « Development of FXR, PXR and CAR Agonists and Antagonists for Treatment of Liver Disorders ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12 (6): 605-24. <https://doi.org/10.2174/156802612799436678>.
- Flatt, Brenton, Richard Martin, Tie-Lin Wang, Paige Mahaney, Brett Murphy, Xiao-Hui Gu, Paul Foster, et al. 2009. « Discovery of XL335 (WAY-362450), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR) ». *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (4): 904-7. <https://doi.org/10.1021/jm8014124>.
- Font de Mora, Jaime, et Myles Brown. 2000. « AIB1 Is a Conduit for Kinase-Mediated Growth Factor Signaling to the Estrogen Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (14): 5041-47.
- Forman, Barry M, Elizabeth Goode, Jasmine Chen, Anthony E Oro, David J Bradley, Thomas Perlmann, Daniel J Noonan, et al. 1995. « Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites ». *Cell* 81 (5): 687-93. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90530-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90530-8).
- Frankenberg, Tamara, Tamir Miloh, Frank Y. Chen, Meena Ananthanarayanan, An-Qiang Sun, Natarajan Balasubramaniyan, Irwin Arias, Kenneth D. R. Setchell, Frederick J. Suchy, et Benjamin L. Shneider. 2008. « The Membrane Protein ATPase Class I Type 8B Member 1 Signals through Protein Kinase C Zeta to Activate the Farnesoid X Receptor ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (6): 1896-1905. <https://doi.org/10.1002/hep.22431>.
- Fu, Maofu, Chenguang Wang, Jian Wang, Xueping Zhang, Toshiyuki Sakamaki, Y. G. Yeung, Chawnsang Chang, et al. 2002. « Androgen Receptor Acetylation Governs trans Activation and MEKK1-Induced Apoptosis without Affecting In Vitro Sumoylation and trans-Repression Function ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (10): 3373-88. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.10.3373-3388.2002>.
- Gadaleta, Raffaella M., Karel J. van Erpecum, Bas Oldenburg, Ellen C. L. Willemsen, Willem Renooij, Stefania Murzilli, Leo W. J. Klomp, et al. 2011. « Farnesoid X Receptor Activation Inhibits Inflammation and Preserves the Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Disease ». *Gut* 60 (4): 463-72. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.212159>.
- Galdieri, M., L. Monaco, et M. Stefanini. 1984. « Secretion of Androgen Binding Protein by Sertoli Cells Is Influenced by Contact with Germ Cells ». *Journal of Andrology* 5 (6): 409-15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1984.tb00806.x>.
- Garcia, Manon, Laura Thirouard, Lauriane Sedès, Mélusine Monrose, Hélène Holota, Françoise Caira, David H. Volle, et Claude Beaudoin. 2018. « Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and

Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (11).
<https://doi.org/10.3390/ijms19113630>.

- Gardès, Christophe, Denise Blum, Konrad Bleicher, Evelyne Chaput, Martin Ebeling, Peter Hartman, Corinne Handschin, Hans Richter, et G. Martin Benson. 2011. « Studies in Mice, Hamsters, and Rats Demonstrate That Repression of Hepatic ApoA-I Expression by Taurocholic Acid in Mice Is Not Mediated by the Farnesoid-X-Receptor ». *Journal of Lipid Research* 52 (6): 1188-99. <https://doi.org/10.1194/jlr.M012542>.
- Garg, Abhimanyu, et Scott M. Grundy. 1994. « Cholestyramine Therapy for Dyslipidemia in Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus: A Short-Term, Double-Blind, Crossover Trial ». *Annals of Internal Medicine* 121 (6): 416-22. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-121-6-199409150-00004>.
- Gearhart, Micah D., Signe M. A. Holmbeck, Ronald M. Evans, H. Jane Dyson, et Peter E. Wright. 2003. « Monomeric Complex of Human Orphan Estrogen Related Receptor-2 with DNA: A Pseudo-Dimer Interface Mediates Extended Half-Site Recognition ». *Journal of Molecular Biology* 327 (4): 819-32. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00183-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00183-9).
- Geijn, Gert-Jan M. van de, Remko Hersmus, et Leendert H. J. Looijenga. 2009. « Recent Developments in Testicular Germ Cell Tumor Research ». *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 87 (1): 96-113. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20140>.
- Ghoneim, Ragia H., Emilienne T. Ngo Sock, Jean-Marc Lavoie, et Micheline Piquette-Miller. 2015. « Effect of a high-fat diet on the hepatic expression of nuclear receptors and their target genes: relevance to drug disposition ». *British Journal of Nutrition* 113 (3): 507-16. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003717>.
- Giaginis, C., D. Karandrea, P. Alexandrou, I. Giannopoulou, G. Tsourouflis, C. Troungos, E. Danas, et al. 2017. « High Farnesoid X Receptor (FXR) Expression Is a Strong and Independent Prognosticator in Invasive Breast Carcinoma ». *Neoplasma* 64 (4): 633-39. https://doi.org/10.4149/neo_2017_420.
- Giguère, V., L. D. McBroom, et G. Flock. 1995. « Determinants of Target Gene Specificity for ROR Alpha 1: Monomeric DNA Binding by an Orphan Nuclear Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (5): 2517-26. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.5.2517>.
- Gineste, Romain, Audrey Sirvent, Réjane Paumelle, Stéphane Helleboid, Alexis Aquilina, Raphaël Darteil, Dean W. Hum, Jean-Charles Fruchart, et Bart Staels. 2008. « Phosphorylation of Farnesoid X Receptor by Protein Kinase C Promotes Its Transcriptional Activity ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22 (11): 2433-47. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0092>.
- Gomez-Ospina, Natalia, Carol J. Potter, Rui Xiao, Kandamurugu Manickam, Mi-Sun Kim, Kang Ho Kim, Benjamin L. Shneider, et al. 2016. « Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis ». *Nature Communications* 7 (février). <https://doi.org/10.1038/ncomms10713>.
- Goodwin, Bryan, Stacey A. Jones, Roger R. Price, Michael A. Watson, David D. McKee, Linda B. Moore, Cristin Galardi, et al. 2000. « A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 Represses Bile Acid Biosynthesis ». *Molecular Cell* 6 (3): 517-26. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00051-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00051-4).

- Gottardi, Andrea De, Fethi Touri, Christoph A. Maurer, Anne Perez, Oliver Maurhofer, Giovanni Ventre, Craig L. Bentzen, Eric J. Bentzen, et Jean-Francois Dufour. 2004. « The Bile Acid Nuclear Receptor FXR and the Bile Acid Binding Protein IBABP Are Differently Expressed in Colon Cancer ». *Digestive Diseases and Sciences* 49 (6): 982-89. <https://doi.org/10.1023/B:DDAS.0000034558.78747.98>.
- Gray, Matthew A., et E. James Squires. 2013. « Effects of Nuclear Receptor Transactivation on Steroid Hormone Synthesis and Gene Expression in Porcine Leydig Cells ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 133 (janvier): 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.014>.
- Green, S., P. Walter, G. Greene, A. Krust, C. Goffin, E. Jensen, G. Scrace, M. Waterfield, et P. Chambon. 1986. « Cloning of the Human Oestrogen Receptor CDNA ». *Journal of Steroid Biochemistry* 24 (1): 77-83. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(86\)90035-x](https://doi.org/10.1016/0022-4731(86)90035-x).
- Greschik, Holger, et R. Schüle. 1998. « Germ Cell Nuclear Factor: An Orphan Receptor with Unexpected Properties ». *Journal of Molecular Medicine* 76 (12): 800-810. <https://doi.org/10.1007/s001090050284>.
- Griswold, S. L., et R. R. Behringer. 2009. « Fetal Leydig Cell Origin and Development ». *Sexual Development* 3 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1159/000200077>.
- Grober, J., I. Zaghini, H. Fujii, S. A. Jones, S. A. Kliewer, T. M. Willson, T. Ono, et P. Besnard. 1999. « Identification of a Bile Acid-Responsive Element in the Human Ileal Bile Acid-Binding Protein Gene. Involvement of the Farnesoid X Receptor/9-Cis-Retinoic Acid Receptor Heterodimer ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 29749-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29749>.
- Gronemeyer, Hinrich, Jan-Åke 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>.
- Guo, Grace L., Gilles Lambert, Masahiko Negishi, Jerrold M. Ward, H. Bryan Brewer, Steven A. Kliewer, Frank J. Gonzalez, et Christopher J. Sinal. 2003. « Complementary Roles of Farnesoid X Receptor, Pregnane X Receptor, and Constitutive Androstane Receptor in Protection against Bile Acid Toxicity* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (46): 45062-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307145200>.
- Guo, Jingtao, Edward J. Grow, Hana Mlcochova, Geoffrey J. Maher, Cecilia Lindskog, Xichen Nie, Yixuan Guo, et al. 2018. « The Adult Human Testis Transcriptional Cell Atlas ». *Cell Research* 28 (12): 1141-57. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>.
- Guo, Zhiyong, W. Peter M. Benten, Jürgen Krücken, et Frank Wunderlich. 2002. « Nongenomic Testosterone Calcium Signaling: GENOTROPIC ACTIONS IN ANDROGEN RECEPTOR-FREE MACROPHAGES* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (33): 29600-607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202997200>.
- Hacker, A., B. Capel, P. Goodfellow, et R. Lovell-Badge. 1995. « Expression of Sry, the mouse sex determining gene ». *Development* 121 (6): 1603-14. <https://doi.org/10.1242/dev.121.6.1603>.

- Haelens, Annemie, Tamzin Tanner, Sarah Denayer, Leen Callewaert, et Frank Claessens. 2007. « The Hinge Region Regulates DNA Binding, Nuclear Translocation, and Transactivation of the Androgen Receptor ». *Cancer Research* 67 (9): 4514-23. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1701>.
- Hammar, M., et F. Petersson. 1986. « Testosterone Production in Vitro in Human Testicular Tissue ». *Andrologia* 18 (2): 196-200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1986.tb01761.x>.
- Handschin, Christoph, et Urs A. Meyer. 2003. « Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors ». *Pharmacological Reviews* 55 (4): 649-73. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.2>.
- Hanniman, Elysha A., Gilles Lambert, Tanya C. McCarthy, et Christopher J. Sinal. 2005. « Loss of Functional Farnesoid X Receptor Increases Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Journal of Lipid Research* 46 (12): 2595-2604. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500390-JLR200>.
- Hardy, Timothy, Fiona Oakley, Quentin M. Anstee, et Christopher P. Day. 2016. « Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11 (1): 451-96. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>.
- Hartman, Helen B., Stephen J. Gardell, Chris J. Petucci, Shuguang Wang, Julie A. Krueger, et Mark J. Evans. 2009. « Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR^{-/-} and apoE^{-/-} mice ». *Journal of Lipid Research* 50 (6): 1090-1100. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800619-JLR200>.
- Hashiguchi, Takuyu, Shingo Arakawa, Shogo Takahashi, Frank J. Gonzalez, Tatsuya Sueyoshi, et Masahiko Negishi. 2016. « Phosphorylation of Farnesoid X Receptor at Serine 154 Links Ligand Activation With Degradation ». *Molecular Endocrinology* 30 (10): 1070-80. <https://doi.org/10.1210/me.2016-1105>.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare, et M. G. Parker. 1997. « A Signature Motif in Transcriptional Co-Activators Mediates Binding to Nuclear Receptors ». *Nature* 387 (6634): 733-36. <https://doi.org/10.1038/42750>.
- Heinzel, T., R. M. Lavinsky, T. M. Mullen, M. Söderstrom, C. D. Laherty, J. Torchia, W. M. Yang, et al. 1997. « A Complex Containing N-CoR, MSin3 and Histone Deacetylase Mediates Transcriptional Repression ». *Nature* 387 (6628): 43-48. <https://doi.org/10.1038/387043a0>.
- Helmberg, A., N. Auphan, C. Caelles, et M. Karin. 1995. « Glucocorticoid-Induced Apoptosis of Human Leukemic Cells Is Caused by the Repressive Function of the Glucocorticoid Receptor ». *The EMBO Journal* 14 (3): 452-60.
- Helsen, Christine, Stefanie Kerkhofs, Liesbeth Clinckemalie, Lien Spans, Michaël Laurent, Steven Boonen, Dirk Vanderschueren, et Frank Claessens. 2012. « Structural Basis for Nuclear Hormone Receptor DNA Binding ». *Molecular and Cellular Endocrinology, Nuclear Receptor Structure: Dynamics and Function*, 348 (2): 411-17. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.025>.

- Hermanson, Ola, Christopher K. Glass, et Michael G. Rosenfeld. 2002. « Nuclear Receptor Coregulators: Multiple Modes of Modification ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 13 (2): 55-60. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00527-6](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00527-6).
- Herraez, Elisa, Ester Gonzalez-Sanchez, Javier Vaquero, Marta R. Romero, Maria A. Serrano, Jose J. G. Marin, et Oscar Briz. 2012. « Cisplatin-Induced Chemoresistance in Colon Cancer Cells Involves FXR-Dependent and FXR-Independent Up-Regulation of ABC Proteins ». *Molecular Pharmaceutics* 9 (9): 2565-76. <https://doi.org/10.1021/mp300178a>.
- Hinoshita, Eiji, Takeshi Uchiyumi, Ken-ichi Taguchi, Naoko Kinukawa, Masazumi Tsuneyoshi, Yoshihiko Maehara, Keizo Sugimachi, et Michihiko Kuwano. 2000. « Increased Expression of an ATP-Binding Cassette Superfamily Transporter, Multidrug Resistance Protein 2, in Human Colorectal Carcinomas ». *Clinical Cancer Research* 6 (6): 2401-7.
- Hirokane, Hisako, Mayuko Nakahara, Shizuko Tachibana, Makoto Shimizu, et Ryuichiro Sato. 2004. « Bile Acid Reduces the Secretion of Very Low Density Lipoprotein by Repressing Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Expression Mediated by Hepatocyte Nuclear Factor-4* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (44): 45685-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404255200>.
- Hoekstra, Menno, Ronald J. van der Sluis, Zhaosha Li, Maaïke H. Oosterveer, Albert K. Groen, et Theo J. C. Van Berkel. 2012. « FXR Agonist GW4064 Increases Plasma Glucocorticoid Levels in C57BL/6 Mice ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 362 (1): 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.05.010>.
- Hofmann, A F, et A Roda. 1984. « Physicochemical Properties of Bile Acids and Their Relationship to Biological Properties: An Overview of the Problem ». *Journal of Lipid Research* 25 (13): 1477-89. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34421-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34421-7).
- Hol, T., M. B. Cox, H. U. Bryant, et M. W. Draper. 1997. « Selective Estrogen Receptor Modulators and Postmenopausal Women's Health ». *Journal of Women's Health* 6 (5): 523-31. <https://doi.org/10.1089/jwh.1997.6.523>.
- Hollenberg, Stanley M., Cary Weinberger, Estelita S. Ong, Gail Cerelli, Anthony Oro, Roger Lebo, E. Brad Thompson, Michael G. Rosenfeld, et Ronald M. Evans. 1985. « Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA ». *Nature* 318 (6047): 635-41.
- Holota, Hélène, Laura Thirouard, Manon Garcia, Mélusine Monroe, Angélique de Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin, et David H. Volle. 2019. « Fxralpha Gene Is a Target Gene of HCG Signaling Pathway and Represses HCG Induced Steroidogenesis ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 194 (novembre): 105460. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105460>.
- Holt, Jason A., Guizhen Luo, Andrew N. Billin, John Bisi, Y. Yvette McNeill, Karen F. Kozarsky, Mary Donahue, et al. 2003. « Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis ». *Genes & Development* 17 (13): 1581-91. <https://doi.org/10.1101/gad.1083503>.
- Hong, Suk-Hyun, et Martin L. Privalsky. 2000. « The SMRT Corepressor Is Regulated by a MEK-1 Kinase Pathway: Inhibition of Corepressor Function Is Associated with SMRT

- Phosphorylation and Nuclear Export ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (17): 6612-25.
- Honkakoski, Paavo, Igor Zelko, Tatsuya Sueyoshi, et Masahiko Negishi. 1998. « The Nuclear Orphan Receptor CAR-Retinoid X Receptor Heterodimer Activates the Phenobarbital-Responsive Enhancer Module of the CYP2B Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (10): 5652-58. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.10.5652>.
- Howard, William R., John A. Pospisil, Eugenia Njolito, et Daniel J. Noonan. 2000. « Catabolites of Cholesterol Synthesis Pathways and Forskolin as Activators of the Farnesoid X-Activated Nuclear Receptor ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 163 (2): 195-202. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8869>.
- Hsu, Chia-Wen, Jinghua Zhao, Ruili Huang, Jui-Hua Hsieh, Jon Hamm, Xiaoqing Chang, Keith Houck, et Menghang Xia. 2014. « Quantitative High-Throughput Profiling of Environmental Chemicals and Drugs That Modulate Farnesoid X Receptor ». *Scientific Reports* 4 (1): 6437. <https://doi.org/10.1038/srep06437>.
- Hu, Meng-Chun, Hwei-Jan Hsu, Ing-Cherng Guo, et Bon-chu Chung. 2004. « Function of Cyp11a1 in Animal Models ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, Proceedings of the Serono Foundation for the Advancement of Medical Science Workshop on Molecular Steroidogenesis, 215 (1): 95-100. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.024>.
- Hu, Miao, Sandra S. H. Lui, Lai-Shan Tam, Edmund K. Li, et Brian Tomlinson. 2012. « The Farnesoid X Receptor -1G>T Polymorphism Influences the Lipid Response to Rosuvastatin ». *Journal of Lipid Research* 53 (7): 1384-89. <https://doi.org/10.1194/jlr.M026054>.
- Hu, Xiao, et Mitchell A. Lazar. 1999. « The CoRNR Motif Controls the Recruitment of Corepressors by Nuclear Hormone Receptors ». *Nature* 402 (6757): 93-96. <https://doi.org/10.1038/47069>.
- Hua, Guoqiang, Krishna Priya Ganti, et Pierre Chambon. 2016. « Glucocorticoid-Induced Tethered Transrepression Requires SUMOylation of GR and Formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 Repressing Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (5): E635-643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522826113>.
- Huang, Li, Annie Zhao, Jane-L. Lew, Theresa Zhang, Yaroslav Hrywna, John R. Thompson, Nuria de Pedro, et al. 2003. « Farnesoid X Receptor Activates Transcription of the Phospholipid Pump MDR3* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51085-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308321200>.
- Huang, Pengxiang, Vikas Chandra, et Fraydoon Rastinejad. 2010. « Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics ». *Annual Review of Physiology* 72: 247-72. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135917>.
- Huang, Xiong-fei, Wei-yu Zhao, et Wen-dong Huang. 2015. « FXR and liver carcinogenesis ». *Acta Pharmacologica Sinica* 36 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.117>.

- Huber, Reid M, Kathleen Murphy, Bowman Miao, John R Link, Mark R Cunningham, Mark J Rugar, Paul L Gunyuzlu, et al. 2002. « Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters ». *Gene* 290 (1–2): 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00557-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00557-7).
- Hudson, William H., Christine Youn, et Eric A. Ortlund. 2013. « The Structural Basis of Direct Glucocorticoid-Mediated Transrepression ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (1): 53-58. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2456>.
- Ignar-Trowbridge, D M, K G Nelson, M C Bidwell, S W Curtis, T F Washburn, J A McLachlan, et K S Korach. 1992. « Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10): 4658-62.
- Ignar-Trowbridge, D M, C T Teng, K A Ross, M G Parker, K S Korach, et J A McLachlan. 1993. « Peptide Growth Factors Elicit Estrogen Receptor-Dependent Transcriptional Activation of an Estrogen-Responsive Element ». *Molecular Endocrinology* 7 (8): 992-98. <https://doi.org/10.1210/mend.7.8.8232319>.
- Inagaki, Takeshi, Mihwa Choi, Antonio Moschetta, Li Peng, Carolyn L. Cummins, Jeffrey G. McDonald, Guizhen Luo, et al. 2005. « Fibroblast Growth Factor 15 Functions as an Enterohepatic Signal to Regulate Bile Acid Homeostasis ». *Cell Metabolism* 2 (4): 217-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>.
- Iwamori, Naoki, Tokuko Iwamori, et Martin M. Matzuk. 2013. « H3K27 Demethylase, JMJD3, Regulates Fragmentation of Spermatogonial Cysts ». *PLOS ONE* 8 (8): e72689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072689>.
- Jacq, X., C. Brou, Y. Lutz, I. Davidson, P. Chambon, et L. Tora. 1994. « Human TAFII30 Is Present in a Distinct TFIID Complex and Is Required for Transcriptional Activation by the Estrogen Receptor ». *Cell* 79 (1): 107-17. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90404-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90404-9).
- Jansen, Peter L. M. 2007. « Endogenous Bile Acids as Carcinogens ». *Journal of Hepatology* 47 (3): 434-35. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.06.001>.
- Jong, Jeroen de, Hans Stoop, Ad J. M. Gillis, Remko Hersmus, Ruud J. H. L. M. van Gurp, Gert-Jan M. van de Geijn, Ellen van Drunen, et al. 2008. « Further Characterization of the First Seminoma Cell Line TCam-2 ». *Genes, Chromosomes and Cancer* 47 (3): 185-96. <https://doi.org/10.1002/gcc.20520>.
- Joshi, Suhasini, Eric Cruz, Satyanarayana Rachagani, Sushovan Guha, Randall E. Brand, Moorthy P. Ponnusamy, Sushil Kumar, et Surinder K. Batra. 2016. « Bile acids-mediated overexpression of MUC4 via FAK-dependent c-Jun activation in pancreatic cancer ». *Molecular Oncology* 10 (7): 1063-77. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.007>.
- Jung, Diana, Bruno Hagenbuch, Michael Fried, Peter J. Meier, et Gerd A. Kullak-Ublick. 2004. « Role of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors in regulating the human, mouse, and rat NTCP gene ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286 (5): G752-61. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00456.2003>.

- Jung, Diana, Michael Podvinec, Urs A. Meyer, David J. Mangelsdorf, Michael Fried, Peter J. Meier, et Gerd A. Kullak-Ublick. 2002. « Human Organic Anion Transporting Polypeptide 8 Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor ». *Gastroenterology* 122 (7): 1954-66. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.33583>.
- Kan, Horng-Yuan, Spiros Georgopoulos, et Vassilis Zannis. 2000. « A Hormone Response Element in the Human Apolipoprotein CIII (ApoCIII) Enhancer Is Essential for Intestinal Expression of the ApoA-I and ApoCIII Genes and Contributes to the Hepatic Expression of the Two Linked Genes in Transgenic Mice* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (39): 30423-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005641200>.
- Kaplan, Steven A., Alan G. Meehan, et Arvind Shah. 2006. « The Age Related Decrease in Testosterone Is Significantly Exacerbated in Obese Men with the Metabolic Syndrome. What Are the Implications for the Relatively High Incidence of Erectile Dysfunction Observed in These Men? » *The Journal of Urology* 176 (4 Pt 1): 1524-1527; discussion 1527-1528. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.06.003>.
- Kaprara, Athina, et Ilpo T. Huhtaniemi. 2018. « The Hypothalamus-Pituitary-Gonad Axis: Tales of Mice and Men ». *Metabolism - Clinical and Experimental* 86 (septembre): 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>.
- Karagiannis, Asterios, et Faidon Harsoulis. 2005. « Gonadal Dysfunction in Systemic Diseases ». *European Journal of Endocrinology* 152 (4): 501-13. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01886>.
- Kast, Heidi R., Bryan Goodwin, Paul T. Tarr, Stacey A. Jones, Andrew M. Anisfeld, Catherine M. Stoltz, Peter Tontonoz, Steve Kliewer, Timothy M. Willson, et Peter A. Edwards. 2002. « Regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-Activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (4): 2908-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109326200>.
- Kast, Heidi R., Catherine M. Nguyen, Christopher J. Sinal, Stacey A. Jones, Bryan A. Laffitte, Karen Reue, Frank J. Gonzalez, Timothy M. Willson, et Peter A. Edwards. 2001. « Farnesoid X-Activated Receptor Induces Apolipoprotein C-II Transcription: a Molecular Mechanism Linking Plasma Triglyceride Levels to Bile Acids ». *Molecular Endocrinology* 15 (10): 1720-28. <https://doi.org/10.1210/mend.15.10.0712>.
- Kasturi, Sanjay S., Justin Tannir, et Robert E. Brannigan. 2008. « The Metabolic Syndrome and Male Infertility ». *Journal of Andrology* 29 (3): 251-59. [https://doi.org/https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003731](https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003731).
- Kawamata, Yuji, Ryo Fujii, Masaki Hosoya, Masataka Harada, Hiromi Yoshida, Masanori Miwa, Shoji Fukusumi, et al. 2003. « A G Protein-Coupled Receptor Responsive to Bile Acids* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 9435-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209706200>.
- Kelly, Martin J., et Ellis R. Levin. 2001. « Rapid Actions of Plasma Membrane Estrogen Receptors ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12 (4): 152-56. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(01\)00377-0](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(01)00377-0).

- Kemper, Jongsook Kim, Zhen Xiao, Bhaskar Ponugoti, Ji Miao, Sungsoon Fang, Deepthi Kanamaluru, Stephanie Tsang, Shwu-Yuan Wu, Cheng-Ming Chiang, et Timothy D. Veenstra. 2009. « FXR Acetylation Is Normally Dynamically Regulated by P300 and SIRT1 but Constitutively Elevated in Metabolic Disease States ». *Cell Metabolism* 10 (5): 392-404. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.009>.
- Kepler, Dietrich, et Jör G. König. 2000. « Hepatic Secretion of Conjugated Drugs and Endogenous Substances ». *Seminars in Liver Disease* 20 (03): 265-72. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9391>.
- Khorasanizadeh, Sepideh. 2004. « The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation ». *Cell* 116 (2): 259-72. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00044-3).
- Kim, Dong-Hyun, Zhen Xiao, Sanghoon Kwon, Xiaoxiao Sun, Daniel Ryerson, David Tkac, Ping Ma, et al. 2015. « A dysregulated acetyl/SUMO switch of FXR promotes hepatic inflammation in obesity ». *The EMBO Journal* 34 (2): 184-99. <https://doi.org/10.15252/embj.201489527>.
- Kim, Insook, Sung-Hoon Ahn, Takeshi Inagaki, Mihwa Choi, Shinji Ito, Grace L. Guo, Steven A. Kliewer, et Frank J. Gonzalez. 2007. « Differential Regulation of Bile Acid Homeostasis by the Farnesoid X Receptor in Liver and Intestine ». *Journal of Lipid Research* 48 (12): 2664-72. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700330-JLR200>.
- Kim, Insook, Keiichirou Morimura, Yatrik Shah, Qian Yang, Jerrold M. Ward, et Frank J. Gonzalez. 2007. « Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice ». *Carcinogenesis* 28 (5): 940-46. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl249>.
- Kim, Min Sun, Judy Shigenaga, Art Moser, Kenneth Feingold, et Carl Grunfeld. 2003. « Repression of Farnesoid X Receptor during the Acute Phase Response* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 8988-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212633200>.
- Kleymenova, Elena, Cynthia Swanson, Kim Boekelheide, et Kevin W. Gaido. 2005. « Exposure In Utero to Di(n-Butyl) Phthalate Alters the Vimentin Cytoskeleton of Fetal Rat Sertoli Cells and Disrupts Sertoli Cell-Gonocyte Contact1 ». *Biology of Reproduction* 73 (3): 482-90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.037184>.
- Kluin, P. M., et D. G. de Rooij. 1981. « A Comparison between the Morphology and Cell Kinetics of Gonocytes and Adult Type Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse ». *International Journal of Andrology* 4 (4): 475-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1981.tb00732.x>.
- Knisely, A. S., Sandra S. Strautnieks, Yvonne Meier, Bruno Stieger, Jane A. Byrne, Bernard C. Portmann, Laura N. Bull, et al. 2006. « Hepatocellular Carcinoma in Ten Children under Five Years of Age with Bile Salt Export Pump Deficiency ». *Hepatology* 44 (2): 478-86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.21287>.
- Knutti, Darko, Dieter Kressler, et Anastasia Kralli. 2001. « Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9713-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.171184698>.

- Koike, Koji, Takeshi Kawabe, Toshiya Tanaka, Satoshi Toh, Takeshi Uchiumi, Morimasa Wada, Shin-ichi Akiyama, Mayumi Ono, et Michihiko Kuwano. 1997. « A Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (CMOAT) Antisense CDNA Enhances Drug Sensitivity in Human Hepatic Cancer Cells ». *Cancer Research* 57 (24): 5475-79.
- Kojetin, Douglas J., Thomas P. Burris, Elwood V. Jensen, et Sohaib A. Khan. 2008. « Implications of the Binding of Tamoxifen to the Coactivator Recognition Site of the Estrogen Receptor ». *Endocrine-Related Cancer* 15 (4): 851-70. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0281>.
- Kok, Tineke, Christian V. Hulzebos, Henk Wolters, Rick Havinga, Luis B. Agellon, Frans Stellaard, Bei Shan, Margrit Schwarz, et Folkert Kuipers. 2003. « Enterohepatic Circulation of Bile Salts in Farnesoid X Receptor-Deficient Mice: Efficient Intestinal Bile Salt Absorption in the Absence of Ileal Bile Acid-Binding Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 41930-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306309200>.
- Kong, Bo, Li Wang, John Y. L. Chiang, Youcai Zhang, Curtis D. Klaassen, et Grace L. Guo. 2012. « Mechanism of Tissue-specific Farnesoid X Receptor in Suppressing the Expression of Genes in Bile-acid Synthesis in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (3): 1034-43. <https://doi.org/10.1002/hep.25740>.
- Kool, Marcel, Marcel de Haas, George L. Scheffer, Rik J. Scheper, Michiel J. T. van Eijk, Jenneke A. Juijn, Frank Baas, et Piet Borst. 1997. « Analysis of Expression of CMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-Associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines ». *Cancer Research* 57 (16): 3537-47.
- Korkola, James E., Jane Houldsworth, George J. Bosl, et R. S. K. Chaganti. 2009. « Molecular Events in Germ Cell Tumours: Linking Chromosome-12 Gain, Acquisition of Pluripotency and Response to Cisplatin ». *BJU International* 104 (9b): 1334-38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2009.08855.x>.
- Koutsounas, Ioannis, Constantinos Giaginis, et Stamatios Theocharis. 2012. « Farnesoid X Receptor (FXR) from Normal to Malignant State ». *Histology and Histopathology* 27 (7): 835-53. <https://doi.org/10.14670/HH-27.835>.
- Kouzarides, T. 2000. « Acetylation: A Regulatory Modification to Rival Phosphorylation? » *The EMBO Journal* 19 (6): 1176-79. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1176>.
- Krylova, Irina N., Elena P. Sablin, Jamie Moore, Robert X. Xu, Gregory M. Waitt, J. Andrew MacKay, Dalia Juzumiene, et al. 2005. « Structural Analyses Reveal Phosphatidyl Inositols as Ligands for the NR5 Orphan Receptors SF-1 and LRH-1 ». *Cell* 120 (3): 343-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.024>.
- Kurokawa, R., V. C. Yu, A. Näär, S. Kyakumoto, Z. Han, S. Silverman, M. G. Rosenfeld, et C. K. Glass. 1993. « Differential Orientations of the DNA-Binding Domain and Carboxy-Terminal Dimerization Interface Regulate Binding Site Selection by Nuclear Receptor Heterodimers ». *Genes & Development* 7 (7B): 1423-35. <https://doi.org/10.1101/gad.7.7b.1423>.
- Kurosu, Hiroshi, Mihwa Choi, Yasushi Ogawa, Addie S. Dickson, Regina Goetz, Anna V. Eliseenkova, Moosa Mohammadi, Kevin P. Rosenblatt, Steven A. Kliewer, et Makoto Kuro-o. 2007. « Tissue-specific Expression of β Klotho and Fibroblast Growth Factor

- (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21 ». *The Journal of biological chemistry* 282 (37): 26687-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>.
- Laffitte, B. A., H. R. Kast, C. M. Nguyen, A. M. Zavacki, D. D. Moore, et P. A. Edwards. 2000. « Identification of the DNA Binding Specificity and Potential Target Genes for the Farnesoid X-Activated Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (14): 10638-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10638>.
- Lambert, Gilles, Marcelo J. A. Amar, Grace Guo, H. Bryan Brewer, Frank J. Gonzalez, et Christopher J. Sinal. 2003. « The Farnesoid X-Receptor Is an Essential Regulator of Cholesterol Homeostasis* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (4): 2563-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209525200>.
- Lambrot, R., et S. Kimmins. 2011. « Histone Methylation Is a Critical Regulator of the Abnormal Expression of POU5F1 and RASSF1A in Testis Cancer Cell Lines ». *International Journal of Andrology* 34 (2): 110-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2010.01063.x>.
- Lancellotti, Tania E. Saez, Paola V. Boarelli, Maria A. Monclus, Maria E. Cabrillana, Marisa A. Clementi, Leandro S. Espínola, Jose L. Cid Barría, Amanda E. Vincenti, Analia G. Santi, et Miguel W. Fornés. 2010. « Hypercholesterolemia Impaired Sperm Functionality in Rabbits ». *PLOS ONE* 5 (10): e13457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013457>.
- Langhi, Cédric, Cédric Le May, Sanae Kourimate, Sandrine Caron, Bart Staels, Michel Krempf, Philippe Costet, et Bertrand Cariou. 2008. « Activation of the Farnesoid X Receptor Represses PCSK9 Expression in Human Hepatocytes ». *FEBS Letters* 582 (6): 949-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.038>.
- Lazar, Mitchell A. 2003. « Nuclear receptor corepressors ». *Nuclear Receptor Signaling* 1 (juin). <https://doi.org/10.1621/nrs.01001>.
- Le Magueresse, BRIGITTE, et BERNARD Jégou. 1988. « In Vitro Effects of Germ Cells on the Secretory Activity of Sertoli Cells Recovered from Rats of Different Ages* ». *Endocrinology* 122 (4): 1672-80. <https://doi.org/10.1210/endo-122-4-1672>.
- Leblanc, B. P., et H. G. Stunnenberg. 1995. « 9-Cis Retinoic Acid Signaling: Changing Partners Causes Some Excitement ». *Genes & Development* 9 (15): 1811-16. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1811>.
- Lee, Jiyoung, Sunmi Seok, Pengfei Yu, Kyungsu Kim, Zachary Smith, Marcelo Rivas-Astroza, Sheng Zhong, et Jongsook Kim Kemper. 2012. « Genomic Analysis of Hepatic Farnesoid X Receptor Binding Sites Reveals Altered Binding in Obesity and Direct Gene Repression by Farnesoid X Receptor in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56 (1): 108-17. <https://doi.org/10.1002/hep.25609>.
- Lee, M. S., D. S. Sem, S. A. Kliewer, J. Provencal, R. M. Evans, et P. E. Wright. 1994. « NMR Assignments and Secondary Structure of the Retinoid X Receptor Alpha DNA-Binding Domain. Evidence for the Novel C-Terminal Helix ». *European Journal of Biochemistry* 224 (2): 639-50. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00639.x>.
- Lei, W., T. Hirose, L.-X. Zhang, H. Adachi, M. J. Spinella, E. Dmitrovsky, et A. M. Jetten. 1997. « Cloning of the Human Orphan Receptor Germ Cell Nuclear Factor/Retinoid Receptor-

- Related Testis-Associated Receptor and Its Differential Regulation during Embryonal Carcinoma Cell Differentiation ». *Journal of Molecular Endocrinology* 18 (2): 167-76. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0180167>.
- Li, Guodong, Wenwei Lin, Juan J. Araya, Taosheng Chen, Barbara N. Timmermann, et Grace L. Guo. 2012. « A Tea Catechin, Epigallocatechin-3-Gallate, Is a Unique Modulator of the Farnesoid X Receptor ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 258 (2): 268-74. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.006>.
- Li, Jiang, Annette Wilson, Ramalinga Kuruba, Qihong Zhang, Xiang Gao, Fengtian He, Li-Ming Zhang, Bruce R. Pitt, Wen Xie, et Song Li. 2008. « FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells ». *Cardiovascular Research* 77 (1): 169-77. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm016>.
- Li, Jianing, et Paul A. Dawson. 2019. « Animal Models to Study Bile Acid Metabolism ». *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1865 (5): 895-911. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.011>.
- Li Yoyo T.Y., Swales Karen E., Thomas Gareth J., Warner Timothy D., et Bishop-Bailey David. 2007. « Farnesoid X Receptor Ligands Inhibit Vascular Smooth Muscle Cell Inflammation and Migration ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (12): 2606-11. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.152694>.
- Lien, Fleur, Alexandre Berthier, Emmanuel Bouchaert, Céline Gheeraert, Jeremy Alexandre, Geoffrey Porez, Janne Prawitt, et al. 2014. « Metformin interferes with bile acid homeostasis through AMPK-FXR crosstalk ». *The Journal of Clinical Investigation* 124 (3): 1037-51. <https://doi.org/10.1172/JCI68815>.
- Liu, Xijun, Ruyi Xue, Lingling Ji, Xingwang Zhang, Jian Wu, Jianxin Gu, Meiling Zhou, et She Chen. 2014. « Activation of Farnesoid X Receptor (FXR) Protects against Fructose-Induced Liver Steatosis via Inflammatory Inhibition and ADRP Reduction ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450 (1): 117-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.072>.
- Liu, Yaping, Jane Binz, Mary Jo Numerick, Steve Dennis, Guizhen Luo, Bhasha Desai, Kathleen I. MacKenzie, et al. 2003. « Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis ». *Journal of Clinical Investigation* 112 (11): 1678-87. <https://doi.org/10.1172/JCI200318945>.
- Lopez, Gabriela N., Christoph W. Turck, Fred Schaufele, Michael R. Stallcup, et Peter J. Kushner. 2001. « Growth Factors Signal to Steroid Receptors through Mitogen-Activated Protein Kinase Regulation of P160 Coactivator Activity* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (25): 22177-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010718200>.
- Lösel, Ralf, et Martin Wehling. 2003. « Nongenomic Actions of Steroid Hormones ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (1): 46-55. <https://doi.org/10.1038/nrm1009>.
- Lu, Timothy T., Makoto Makishima, Joyce J. Repa, Kristina Schoonjans, Thomas A. Kerr, Johan Auwerx, et David J. Mangelsdorf. 2000. « Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptors ». *Molecular Cell* 6 (3): 507-15. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00050-2).

- Lu, Yan, Zhijian Zhang, Xuelian Xiong, Xiaolin Wang, Jin Li, Guojun Shi, Jian Yang, et al. 2012. « Glucocorticoids Promote Hepatic Cholestasis in Mice by Inhibiting the Transcriptional Activity of the Farnesoid X Receptor ». *Gastroenterology* 143 (6): 1630-1640.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.029>.
- Lu, Yuan, Jean-Marie Heydel, Xin Li, Stacie Bratton, Tim Lindblom, et Anna Radominska-Pandya. 2005. « Lithocholic Acid Decreases Expression of Ugt2b7 in Caco-2 Cells: A Potential Role for a Negative Farnesoid X Receptor Response Element ». *Drug Metabolism and Disposition* 33 (7): 937-46. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003061>.
- Luisi, B. F., W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto, et P. B. Sigler. 1991. « Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA ». *Nature* 352 (6335): 497-505. <https://doi.org/10.1038/352497a0>.
- Lutz, Philipp, Cordula Berger, Bettina Langhans, Frank Grünhage, Beate Appenrodt, Jacob Nattermann, Frank Lammert, et al. 2014. « A Farnesoid X Receptor Polymorphism Predisposes to Spontaneous Bacterial Peritonitis ». *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 46 (11): 1047-50. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.07.008>.
- Ma, Ke, Pradip K. Saha, Lawrence Chan, et David D. Moore. 2006. « Farnesoid X Receptor Is Essential for Normal Glucose Homeostasis ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (4): 1102-9. <https://doi.org/10.1172/JCI25604>.
- Maeda, Tomoji, Masaaki Miyata, Takafumi Yotsumoto, Daisuke Kobayashi, Takashi Nozawa, Keisuke Toyama, Frank J. Gonzalez, Yasushi Yamazoe, et Ikumi Tamai. 2004. « Regulation of Drug Transporters by the Farnesoid X Receptor in Mice ». *Molecular Pharmaceutics* 1 (4): 281-89. <https://doi.org/10.1021/mp0499656>.
- Mahakali Zama, Aparna, F. Parker Hudson, et Mary A. Bedell. 2005. « Analysis of Hypomorphic Kitlsl Mutants Suggests Different Requirements for KITL in Proliferation and Migration of Mouse Primordial Germ Cells ». *Biology of Reproduction* 73 (4): 639-47. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042846>.
- Makino, I., K. Shinozaki, K. Yoshino, et S. Nakagawa. 1975. « [Dissolution of cholesterol gallstones by long-term administration of ursodeoxycholic acid] ». *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi = The Japanese Journal of Gastro-Enterology* 72 (6): 690-702.
- Makishima, Makoto. 2005. « Nuclear Receptors as Targets for Drug Development: Regulation of Cholesterol and Bile Acid Metabolism by Nuclear Receptors ». *Journal of Pharmacological Sciences* 97 (2): 177-83. <https://doi.org/10.1254/jphs.fmj04008x4>.
- Makishima, Makoto, Timothy T. Lu, Wen Xie, G. Kerr Whitfield, Hideharu Domoto, Ronald M. Evans, Mark R. Haussler, et David J. Mangelsdorf. 2002. « Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor ». *Science* 296 (5571): 1313-16. <https://doi.org/10.1126/science.1070477>.
- Makishima, Makoto, Arthur Y. Okamoto, Joyce J. Repa, Hua Tu, R. Marc Learned, Alvin Luk, Mitchell V. Hull, Kevin D. Lustig, David J. Mangelsdorf, et Bei Shan. 1999. « Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids ». *Science* 284 (5418): 1362-65. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1362>.

- Malivindi, Rocco, Marta Santoro, Daniela De Rose, Salvatore Panza, Serena Gervasi, Vittoria Rago, et Saveria Aquila. 2018. « Activated-Farnesoid X Receptor (FXR) Expressed in Human Sperm Alters Its Fertilizing Ability ». *Reproduction (Cambridge, England)*, juin. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0203>.
- Maloney, P. R., D. J. Parks, C. D. Haffner, A. M. Fivush, G. Chandra, K. D. Plunket, K. L. Creech, et al. 2000. « Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR ». *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (16): 2971-74. <https://doi.org/10.1021/jm0002127>.
- Manova, K., K. Nocka, P. Besmer, et R. F. Bachvarova. 1990. « Gonadal Expression of C-Kit Encoded at the W Locus of the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 110 (4): 1057-69.
- Maran, Rengasamy R. M., Ann Thomas, Megan Roth, Zhonghua Sheng, Noriko Esterly, David Pinson, Xin Gao, et al. 2009. « Farnesoid X Receptor Deficiency in Mice Leads to Increased Intestinal Epithelial Cell Proliferation and Tumor Development ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328 (2): 469-77. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.145409>.
- Martinot, Emmanuelle, Marine Baptissart, Aurélie Véga, Lauriane Sèdes, Betty Rouaisnel, Fred Vaz, Jean-Paul Saru, et al. 2017. « Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXRalpha ». *Scientific Reports* 7 (février). <https://doi.org/10.1038/srep42182>.
- Martinot, Emmanuelle, Lauriane Sèdes, Marine Baptissart, Hélène Holota, Betty Rouaisnel, Christelle Damon-Soubeyrand, Angélique De Haze, et al. 2017a. « The Bile Acid Nuclear Receptor FXR α Is a Critical Regulator of Mouse Germ Cell Fate ». *Stem Cell Reports* 9 (1): 315-28. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.036>.
- . 2017b. « The Bile Acid Nuclear Receptor FXR α Is a Critical Regulator of Mouse Germ Cell Fate ». *Stem Cell Reports* 9 (1): 315-28. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.036>.
- Marzolini, Catia, Rommel G. Tirona, Guillermo Gervasini, Balasubramanian Poonkuzhali, Mahfoud Assem, Woon Lee, Brenda F. Leake, John D. Schuetz, Erin G. Schuetz, et Richard B. Kim. 2007. « A Common Polymorphism in the Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor Is Associated with Decreased Hepatic Target Gene Expression ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (8): 1769-80. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0025>.
- Masuyama, Hisashi, Stephen C. Jefcoat Jr., et Paul N. MacDonald. 1997. « The N-Terminal Domain of Transcription Factor IIB Is Required for Direct Interaction with the Vitamin D Receptor and Participates in Vitamin D-Mediated Transcription ». *Molecular Endocrinology* 11 (2): 218-28. <https://doi.org/10.1210/mend.11.2.9879>.
- Matsuzaki, Juntaro, Hidekazu Suzuki, Hitoshi Tsugawa, Mitsuhiro Watanabe, Sharif Hossain, Eri Arai, Yoshimasa Saito, et al. 2013. « Bile Acids Increase Levels of MicroRNAs 221 and 222, Leading to Degradation of CDX2 During Esophageal Carcinogenesis ». *Gastroenterology* 145 (6): 1300-1311. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.08.008>.
- Maxwell, Kara N., Edward A. Fisher, et Jan L. Breslow. 2005. « Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum

- compartment ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (6): 2069-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409736102>.
- Means, A. R., J. R. Dedman, J. S. Tash, D. J. Tindall, M. van Sickle, et M. J. Welsh. 1980. « Regulation of the testis sertoli cell by follicle stimulating hormone ». *Annual Review of Physiology* 42 (1): 59-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.42.030180.000423>.
- Mencarelli, Andrea, Barbara Renga, Eleonora Distrutti, et Stefano Fiorucci. 2009. « Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296 (2): H272-81. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01075.2008>.
- Mengus, G., M. May, L. Carré, P. Chambon, et I. Davidson. 1997. « Human TAF(II)135 Potentiates Transcriptional Activation by the AF-2s of the Retinoic Acid, Vitamin D3, and Thyroid Hormone Receptors in Mammalian Cells ». *Genes & Development* 11 (11): 1381-95. <https://doi.org/10.1101/gad.11.11.1381>.
- Merk, Daniel, Sridhar Sreeramulu, Denis Kudlinzki, Krishna Saxena, Verena Linhard, Santosh L. Gande, Fabian Hiller, et al. 2019. « Molecular Tuning of Farnesoid X Receptor Partial Agonism ». *Nature Communications* 10 (1): 2915. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10853-2>.
- Meyts, Ewa Rajpert-De, Niels Jørgensen, Karen Brøndum-Nielsen, Jørn Müller, et Niels E. Skakkebæk. 1998. « Developmental Arrest of Germ Cells in the Pathogenesis of Germ Cell Neoplasia ». *APMIS* 106 (1-6): 198-206. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1998.tb01336.x>.
- Mil, Saskia W. C. van, Alexandra Milona, Peter H. Dixon, Roman Mullenbach, Victoria L. Geenes, Jenny Chambers, Vasylyna Shevchuk, et al. 2007. « Functional Variants of the Central Bile Acid Sensor FXR Identified in Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy ». *Gastroenterology* 133 (2): 507-16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.015>.
- Mital, Payal, Barry T. Hinton, et Jannette M. Dufour. 2011. « The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions ». *Biology of Reproduction* 84 (5): 851-58. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>.
- Moch, Holger, Antonio L. Cubilla, Peter A. Humphrey, Victor E. Reuter, et Thomas M. Ulbricht. 2016. « The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours ». *European Urology* 70 (1): 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.029>.
- Modica, Salvatore, Marica Cariello, Annalisa Morgano, Isabelle Gross, Maria Carmela Vegliante, Stefania Murzilli, Lorena Salvatore, Jean-Noel Freund, Carlo Sabbà, et Antonio Moschetta. 2014. « Transcriptional Regulation of the Intestinal Nuclear Bile Acid Farnesoid X Receptor (FXR) by the caudal-related Homeobox 2 (CDX2) ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (41): 28421-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.571513>.
- Modica, Salvatore, Raffaella M. Gadaleta, et Antonio Moschetta. 2010. « Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm ». *Nuclear Receptor Signaling* 8 (novembre). <https://doi.org/10.1621/nrs.08005>.

- Modica, Salvatore, Michele Petruzzelli, Elena Bellafante, Stefania Murzilli, Lorena Salvatore, Nicola Celli, Giuseppe Di Tullio, et al. 2012. « Selective Activation of Nuclear Bile Acid Receptor FXR in the Intestine Protects Mice Against Cholestasis ». *Gastroenterology* 142 (2): 355-365.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.028>.
- Moraes, Leonardo A., Amanda J. Unsworth, Sakthivel Vaiyapuri, Marfoua S. Ali, Parvathy Sasikumar, Tanya Sage, Gagan D Flora, et al. 2016. « FXR and its ligands inhibit the function of platelets ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36 (12): 2324-33. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308093>.
- Moras, D., et H. Gronemeyer. 1998. « The Nuclear Receptor Ligand-Binding Domain: Structure and Function ». *Current Opinion in Cell Biology* 10 (3): 384-91. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(98\)80015-x](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(98)80015-x).
- Moris, Demetrios, Constantinos Giaginis, Gerasimos Tsourouflis, et Stamatios Theocharis. 2017. « Farnesoid-X Receptor (FXR) as a Promising Pharmaceutical Target in Atherosclerosis ». *Current Medicinal Chemistry* 24 (11): 1147-57. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170124151940>.
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048266>.
- Nagy, L., H. Y. Kao, D. Chakravarti, R. J. Lin, C. A. Hassig, D. E. Ayer, S. L. Schreiber, et R. M. Evans. 1997. « Nuclear Receptor Repression Mediated by a Complex Containing SMRT, MSin3A, and Histone Deacetylase ». *Cell* 89 (3): 373-80. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80218-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80218-4).
- Nakajima, Katsuyuki, et Akira Tanaka. 2017. « A Proposal of The New Mechanism on Remnant Lipoprotein Formation and Clearance after Food Intake ». *Journal of Aging Science* 05 (01). <https://doi.org/10.4172/2329-8847.1000173>.
- Neimark, Ezequiel, Frank Chen, Xiaoping Li, et Benjamin L. Shneider. 2004. « Bile Acid-Induced Negative Feedback Regulation of the Human Ileal Bile Acid Transporter ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 40 (1): 149-56. <https://doi.org/10.1002/hep.20295>.
- Nevens, Frederik, Pietro Andreone, Giuseppe Mazzella, Simone I. Strasser, Christopher Bowlus, Pietro Invernizzi, Joost P.H. Drenth, et al. 2016. « A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis ». *New England Journal of Medicine* 375 (7): 631-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1509840>.
- Nicholls, Peter K., Craig A. Harrison, Robert B. Gilchrist, Paul G. Farnworth, et Peter G. Stanton. 2009. « Growth Differentiation Factor 9 Is a Germ Cell Regulator of Sertoli Cell Function ». *Endocrinology* 150 (5): 2481-90. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1048>.
- Nistal, Manuel, Pilar Gonzalez-Peramato, et Maria P. De Miguel. 2013. « Sertoli Cell Dedifferentiation in Human Cryptorchidism and Gender Reassignment Shows Similarities between Fetal Environmental and Adult Medical Treatment Estrogen and Antiandrogen Exposure ». *Reproductive Toxicology* 42 (décembre): 172-79. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.009>.

- Oduwole, Olayiwola O., Hellevi Peltoketo, et Ilpo T. Huhtaniemi. 2018. « Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00763>.
- Orth, Joanne M., William F. Jester, Ling-Hong Li, et Andrew L. Laslett. 2000. « Gonocyte-Sertoli Cell Interactions during Development of the Neonatal Rodent Testis ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 50:103-24. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(00\)50006-4](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(00)50006-4).
- Orwig, Kyle E., Buom-Yong Ryu, Mary R. Avarbock, et Ralph L. Brinster. 2002. « Male Germ-Line Stem Cell Potential Is Predicted by Morphology of Cells in Neonatal Rat Testes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18): 11706-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.182412099>.
- Otte, Kerstin, Harald Kranz, Ingo Kober, Paul Thompson, Michael Hoefer, Bernhard Haubold, Bettina Remmel, et al. 2003. « Identification of Farnesoid X Receptor β as a Novel Mammalian Nuclear Receptor Sensing Lanosterol ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (3): 864-72. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.3.864-872.2003>.
- Padrón, R. S., J. Más, R. Zamora, F. Riverol, M. Licea, L. Mallea, et J. Rodríguez. 1989. « Lipids and Testicular Function ». *International Urology and Nephrology* 21 (5): 515-19. <https://doi.org/10.1007/BF02549590>.
- Palomino, Teresa, Aurora Sánchez-Pacheco, Pilar Peña, et Ana Aranda. 1998. « A Direct Protein-Protein Interaction Is Involved in the Cooperation between Thyroid Hormone and Retinoic Acid Receptors and the Transcription Factor GHF-1 ». *The FASEB Journal* 12 (12): 1201-9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fasebj.12.12.1201>.
- Papageorgiou, Efstathia, Nea Pitulis, Pavlos Msaouel, Peter Lembessis, et Michael Koutsilieris. 2007. « The non-genomic crosstalk between PPAR- γ ligands and ERK1/2 in cancer cell lines ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11 (8): 1071-85. <https://doi.org/10.1517/14728222.11.8.1071>.
- Parent, Amélie, et Martin Bisailon. 2006. « Synergie entre les complexes de transcription et de maturation des ARN messagers ». *M/S : médecine sciences* 22 (6-7): 626-32.
- Parks, Derek J., Steven G. Blanchard, Randy K. Bledsoe, Gyan Chandra, Thomas G. Consler, Steven A. Kliewer, Julie B. Stimmel, et al. 1999. « Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor ». *Science* 284 (5418): 1365-68. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1365>.
- Pellicciari, Roberto, Stefano Fiorucci, Emidio Camaioni, Carlo Clerici, Gabriele Costantino, Patrick R. Maloney, Antonio Morelli, Derek J. Parks, et Timothy M. Willson. 2002. « α -Ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDCA), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity ». *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (17): 3569-72. <https://doi.org/10.1021/jm025529g>.
- Perez, Maria J, et Oscar Briz. 2009. « Bile-acid-induced cell injury and protection ». *World Journal of Gastroenterology : WJG* 15 (14): 1677-89. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1677>.

- Perissi, Valentina, et Michael G. Rosenfeld. 2005. « Controlling Nuclear Receptors: The Circular Logic of Cofactor Cycles ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (7): 542-54. <https://doi.org/10.1038/nrm1680>.
- Perkins, Theodore J, Mike Hallett, et Leon Glass. 2004. « Inferring Models of Gene Expression Dynamics ». *Journal of Theoretical Biology* 230 (3): 289-99. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.05.022>.
- Peterziel, Heike, Sigrun Mink, Annette Schonert, Matthias Becker, Helmut Klocker, et Andrew CB Cato. 1999. « Rapid Signalling by Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells ». *Oncogene* 18 (46): 6322-29. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203032>.
- Pierucci-Alves, Fernando, Ann M. Clark, et Lonnie D. Russell. 2001. « A Developmental Study of the Desert Hedgehog-Null Mouse Testis1 ». *Biology of Reproduction* 65 (5): 1392-1402. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1392>.
- Pineda Torra, Inés, Thierry Claudel, Caroline Duval, Vladimir Kosykh, Jean-Charles Fruchart, et Bart Staels. 2003. « Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor ». *Molecular Endocrinology* 17 (2): 259-72. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0120>.
- Pircher, Parinaz C., Jennifer L. Kitto, Mary L. Petrowski, Rajendra K. Tangirala, Eric D. Bischoff, Ira G. Schulman, et Stefan K. Westin. 2003. « Farnesoid X Receptor Regulates Bile Acid-Amino Acid Conjugation* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (30): 27703-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302128200>.
- Pitteloud, Nelly, Megan Hardin, Andrew A. Dwyer, Elena Valassi, Maria Yialamas, Dariush Elahi, et Frances J. Hayes. 2005. « Increasing Insulin Resistance Is Associated with a Decrease in Leydig Cell Testosterone Secretion in Men ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90 (5): 2636-41. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2190>.
- Plass, Jacqueline R. M., Olaf Mol, Janette Heegsma, Mariska Geuken, Klaas Nico Faber, Peter L. M. Jansen, et Michael Müller. 2002. « Farnesoid X Receptor and Bile Salts Are Involved in Transcriptional Regulation of the Gene Encoding the Human Bile Salt Export Pump ». *Hepatology* 35 (3): 589-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/jhep.2002.31724>.
- Ploton, Maheul, Claire Mazuy, Céline Gheeraert, Vanessa Dubois, Alexandre Berthier, Julie Dubois-Chevalier, Xavier Maréchal, et al. 2018. « The Nuclear Bile Acid Receptor FXR Is a PKA- and FOXA2-Sensitive Activator of Fasting Hepatic Gluconeogenesis ». *Journal of Hepatology* 69 (5): 1099-1109. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.022>.
- Popescu, Iuliana Ristea, Audrey Helleboid-Chapman, Anthony Lucas, Brigitte Vandewalle, Julie Dumont, Emmanuel Bouchaert, Bruno Derudas, et al. 2010. « The Nuclear Receptor FXR Is Expressed in Pancreatic β -Cells and Protects Human Islets from Lipotoxicity ». *FEBS Letters* 584 (13): 2845-51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.068>.
- Potthoff, Matthew J., Jamie Boney-Montoya, Mihwa Choi, Tianteng He, Nishanth E. Sunny, Santhosh Satapati, Kelly Suino-Powell, et al. 2011. « FGF15/19 Regulates Hepatic Glucose Metabolism by Inhibiting the CREB-PGC-1 α Pathway ». *Cell Metabolism* 13 (6): 729-38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.019>.

- Pourcet, Benoit, Inés Pineda-Torra, Bruno Derudas, Bart Staels, et Corine Glineur. 2010. « SUMOylation of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Inhibits Its Trans-Activity through the Recruitment of the Nuclear Corepressor NCoR ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (9): 5983-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.078311>.
- Purushotham, Aparna, Qing Xu, Jing Lu, Julie F. Foley, Xingjian Yan, Dong-Hyun Kim, Jongsook Kim Kemper, et Xiaoling Li. 2012. « Hepatic Deletion of SIRT1 Decreases Hepatocyte Nuclear Factor 1 α /Farnesoid X Receptor Signaling and Induces Formation of Cholesterol Gallstones in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (7): 1226-36. <https://doi.org/10.1128/MCB.05988-11>.
- Raghuram, Srilatha, Keith R. Stayrook, Pengxiang Huang, Pamela M. Rogers, Amanda K. Nosie, Don B. McClure, Lorri L. Burris, Sepideh Khorasanizadeh, Thomas P. Burris, et Fraydoon Rastinejad. 2007. « Identification of Heme as the Ligand for the Orphan Nuclear Receptors REV-ERB α and REV-ERB β ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (12): 1207-13. <https://doi.org/10.1038/nsmb1344>.
- Rajpert-De Meyts, Ewa. 2006. « Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects ». *Human Reproduction Update* 12 (3): 303-23. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmk006>.
- Rastinejad, Fraydoon, Thomas Perlmann, Ronald M. Evans, et Paul B. Sigler. 1995. « Structural Determinants of Nuclear Receptor Assembly on DNA Direct Repeats ». *Nature* 375 (6528): 203-11. <https://doi.org/10.1038/375203a0>.
- Ray, A., et K. E. Prefontaine. 1994. « Physical Association and Functional Antagonism between the P65 Subunit of Transcription Factor NF-Kappa B and the Glucocorticoid Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (2): 752-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.2.752>.
- Reik, A, G Schütz, et A F Stewart. 1991. « Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. » *The EMBO Journal* 10 (9): 2569-76.
- Renga, Barbara, Andrea Mencarelli, Claudio D'Amore, Sabrina Cipriani, Maria Valeria D'Auria, Valentina Sepe, Maria Giovanna Chini, et al. 2012. « Discovery That Theonellasterol a Marine Sponge Sterol Is a Highly Selective FXR Antagonist That Protects against Liver Injury in Cholestasis ». *PLoS One* 7 (1): e30443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030443>.
- Ricketts, Marie-Louise, Mark V. Boekschoten, Arja J. Kreeft, Guido J. E. J. Hooiveld, Corina J. A. Moen, Michael Müller, Rune R. Frants, et al. 2007. « The Cholesterol-Raising Factor from Coffee Beans, Cafestol, as an Agonist Ligand for the Farnesoid and Pregnane X Receptors ». *Molecular Endocrinology* 21 (7): 1603-16. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0133>.
- Río-Moreno, Mercedes del, Emilia Alors-Pérez, Sandra González-Rubio, Gustavo Ferrín, Oscar Reyes, Manuel Rodríguez-Perálvarez, Marina E Sánchez-Frías, et al. 2019. « Dysregulation of the Splicing Machinery Is Associated to the Development of

- Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 104 (8): 3389-3402. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00021>.
- Rochette-Egly, C., M. Oulad-Abdelghani, A. Staub, V. Pfister, I. Scheuer, P. Chambon, et M. P. Gaub. 1995. « Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor-Alpha by Protein Kinase A ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 9 (7): 860-71. <https://doi.org/10.1210/mend.9.7.7476969>.
- Roeder, R. G. 1996. « The Role of General Initiation Factors in Transcription by RNA Polymerase II ». *Trends in Biochemical Sciences* 21 (9): 327-35.
- Roemer, Sarah C., Douglas C. Donham, Lori Sherman, Vickie H. Pon, Dean P. Edwards, et Mair E. A. Churchill. 2006. « Structure of the Progesterone Receptor-Deoxyribonucleic Acid Complex: Novel Interactions Required for Binding to Half-Site Response Elements ». *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 20 (12): 3042-52. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0511>.
- Roosen-Runge, Edward C., et Jean Leik. 1968. « Gonocyte Degeneration in the Postnatal Male Rat ». *American Journal of Anatomy* 122 (2): 275-99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aja.1001220208>.
- Rowan, Brian G., Nancy L. Weigel, et Bert W. O'Malley. 2000. « Phosphorylation of Steroid Receptor Coactivator-1: IDENTIFICATION OF THE PHOSPHORYLATION SITES AND PHOSPHORYLATION THROUGH THE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE PATHWAY* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (6): 4475-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4475>.
- Runyan, Christopher, Kyle Schaible, Kathleen Molyneaux, Zhuoqiao Wang, Linda Levin, et Christopher Wylie. 2006. « Steel Factor Controls Midline Cell Death of Primordial Germ Cells and Is Essential for Their Normal Proliferation and Migration ». *Development* 133 (24): 4861-69. <https://doi.org/10.1242/dev.02688>.
- Russell, Lonnie D. 1978. « The Blood-Testis Barrier and Its Formation Relative to Spermatocyte Maturation in the Adult Rat: A Lanthanum Tracer Study ». *The Anatomical Record* 190 (1): 99-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ar.1091900109>.
- Rust, Christian, Nadine Wild, Carina Bernt, Timo Vennegeerts, Ralf Wimmer, et Ulrich Beuers. 2009. « Bile Acid-Induced Apoptosis in Hepatocytes Is Caspase-6-Dependent * ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (5): 2908-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804585200>.
- Saad, Ramadan A., et Yomna I. Mahmoud. 2014. « Ursodeoxycholic Acid Alleviates Cholestasis-Induced Histophysiological Alterations in the Male Reproductive System of Bile Duct-Ligated Rats ». *Reproductive Toxicology* 50 (décembre): 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.10.011>.
- Sadovsky, Y, P Webb, G Lopez, J D Baxter, P M Fitzpatrick, E Gizang-Ginsberg, V Cavailles, M G Parker, et P J Kushner. 1995. « Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. » *Molecular and Cellular Biology* 15 (3): 1554-63.

- Safe, Stephen, Un-Ho Jin, Benjamin Morpurgo, Ala Abdayyeh, Mandip Singh, et Ronald B. Tjalkens. 2016. « Nuclear Receptor 4A (NR4A) Family – Orphans No More ». *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 157 (mars): 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.016>.
- Saini, Simrat P. S., Junichiro Sonoda, Li Xu, David Toma, Hirdesh Uppal, Ying Mu, Songrong Ren, David D. Moore, Ronald M. Evans, et Wen Xie. 2004. « A Novel Constitutive Androstane Receptor-Mediated and CYP3A-Independent Pathway of Bile Acid Detoxification ». *Molecular Pharmacology* 65 (2): 292-300. <https://doi.org/10.1124/mol.65.2.292>.
- Sap, J., A. Muñoz, J. Schmitt, H. Stunnenberg, et B. Vennström. 1989. « Repression of Transcription Mediated at a Thyroid Hormone Response Element by the V-Erb-A Oncogene Product ». *Nature* 340 (6230): 242-44. <https://doi.org/10.1038/340242a0>.
- Savkur, Rajesh S., Kelli S. Bramlett, Laura F. Michael, et Thomas P. Burris. 2005. « Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression by the Farnesoid X Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329 (1): 391-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.141>.
- Schoenmakers, E., P. Alen, G. Verrijdt, B. Peeters, G. Verhoeven, W. Rombauts, et F. Claessens. 1999. « Differential DNA Binding by the Androgen and Glucocorticoid Receptors Involves the Second Zn-Finger and a C-Terminal Extension of the DNA-Binding Domains ». *The Biochemical Journal* 341 (Pt 3) (août): 515-21.
- Schröder, M, A Wyss, L J Sturzenbecker, J F Grippo, P LeMotte, et C Carlberg. 1993. « RXR-dependent and RXR-independent transactivation by retinoic acid receptors. » *Nucleic Acids Research* 21 (5): 1231-37.
- Schüle, R., P. Rangarajan, N. Yang, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, I. M. Verma, et R. M. Evans. 1991. « Retinoic Acid Is a Negative Regulator of AP-1-Responsive Genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14): 6092-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.14.6092>.
- Sèdes, Lauriane, Christèle Desdoits-Lethimonier, Betty Rouaisnel, Hélène Holota, Laura Thirouard, Laurianne Lesne, Christelle Damon-Soubeyrand, et al. 2018. « Crosstalk between BPA and FXR α Signaling Pathways Lead to Alterations of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Male Fertility Disorders ». *Stem Cell Reports* 11 (4): 944. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.018>.
- Seol, W., H. S. Choi, et D. D. Moore. 1995. « Isolation of Proteins That Interact Specifically with the Retinoid X Receptor: Two Novel Orphan Receptors. » *Molecular Endocrinology* 9 (1): 72-85. <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7760852>.
- Seol, Wongi, Hueng-Sik Choi, et David D. Moore. 1996. « An Orphan Nuclear Hormone Receptor That Lacks a DNA Binding Domain and Heterodimerizes with Other Receptors ». *Science* 272 (5266): 1336-39. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1336>.
- Sepe, Valentina, Eleonora Distrutti, Stefano Fiorucci, et Angela Zampella. 2018. « Farnesoid X Receptor Modulators 2014-Present: A Patent Review ». *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 28 (5): 351-64. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1459569>.

- Shalaby, M. A, H. Y. El Zorba, et Gehan M Kamel. 2004. « Effect of α -Tocopherol and Simvastatin on Male Fertility in Hypercholesterolemic Rats ». *Pharmacological Research* 50 (2): 137-42. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2003.10.013>.
- Shang, Quan, Monica Saumoy, Jens Juul Holst, Gerald Salen, et Guorong Xu. 2009. « Colesevelam improves insulin resistance in a diet-induced obesity (F-DIO) rat model by increasing the release of GLP-1 ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298 (3): G419-24. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00362.2009>.
- Shang, Yongfeng, Xiao Hu, James DiRenzo, Mitchell A Lazar, et Myles Brown. 2000. « Cofactor Dynamics and Sufficiency in Estrogen Receptor–Regulated Transcription ». *Cell* 103 (6): 843-52. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00188-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00188-4).
- Shen, Hong, Yu Zhang, Hong Ding, Xu Wang, Lili Chen, Hualiang Jiang, et Xu Shen. 2008. « Farnesoid X Receptor Induces GLUT4 Expression Through FXR Response Element in the GLUT4 Promoter ». *Cellular Physiology and Biochemistry* 22 (1-4): 001-014. <https://doi.org/10.1159/000149779>.
- Shibata, Hirotaka, Zafar Nawaz, Sophia Y. Tsai, Bert W. O'Malley, et Ming-Jer Tsai. 1997. « Gene Silencing by Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I (COUP-TFI) Is Mediated by Transcriptional Corepressors, Nuclear Receptor-Corepressor (N-CoR) and Silencing Mediator for Retinoic Acid Receptor and Thyroid Hormone Receptor (SMRT) ». *Molecular Endocrinology* 11 (6): 714-24. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0002>.
- Shih, David Q., Markus Bussen, Ephraim Sehayek, Meenakshisundaram Ananthanarayanan, Benjamin L. Shneider, Frederick J. Suchy, Sarah Shefer, et al. 2001. « Hepatocyte Nuclear Factor-1 α Is an Essential Regulator of Bile Acid and Plasma Cholesterol Metabolism ». *Nature Genetics* 27 (4): 375-82. <https://doi.org/10.1038/86871>.
- Shima, Yuichi, Sawako Matsuzaki, Kanako Miyabayashi, Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Shigeaki Kato, Ilpo Huhtaniemi, et Ken-ichirou Morohashi. 2015. « Fetal Leydig Cells Persist as an Androgen-Independent Subpopulation in the Postnatal Testis ». *Molecular Endocrinology* 29 (11): 1581-93. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1200>.
- Shima, Yuichi, Kanako Miyabayashi, Shogo Haraguchi, Tatsuhiko Arakawa, Hiroyuki Otake, Takashi Baba, Sawako Matsuzaki, et al. 2013. « Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes ». *Molecular Endocrinology* 27 (1): 63-73. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1256>.
- Shizu, Ryota, Jungki Min, Mack Sobhany, Lars C. Pedersen, Shingo Mutoh, et Masahiko Negishi. 2018. « Interaction of the phosphorylated DNA-binding domain in nuclear receptor CAR with its ligand-binding domain regulates CAR activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (1): 333-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.806604>.
- Shulman, Andrew I., et David J. Mangelsdorf. 2005. « Retinoid x Receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome ». *The New England Journal of Medicine* 353 (6): 604-15. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043590>.
- Sinal, C. J., M. Tohkin, M. Miyata, J. M. Ward, G. Lambert, et F. J. Gonzalez. 2000. « Targeted Disruption of the Nuclear Receptor FXR/BAR Impairs Bile Acid and Lipid Homeostasis ». *Cell* 102 (6): 731-44. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00062-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00062-3).

- Skakkebæk, N. E., E. Rajpert-De Meyts, et K. M. Main. 2001. « Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion ». *Human Reproduction* 16 (5): 972-78. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>.
- Skotheim, Rolf I., Guro E. Lind, Outi Monni, Jahn M. Nesland, Vera M. Abeler, Sophie D. Fosså, Nur Duale, et al. 2005. « Differentiation of Human Embryonal Carcinomas In Vitro and In Vivo Reveals Expression Profiles Relevant to Normal Development ». *Cancer Research* 65 (13): 5588-98. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0153>.
- Solaas, Karianne, Anne Ulvestad, Odd Söreide, et Bengt Frode Kase. 2000. « Subcellular Organization of Bile Acid Amidation in Human Liver: A Key Issue in Regulating the Biosynthesis of Bile Salts ». *Journal of Lipid Research* 41 (7): 1154-62. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32022-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32022-8).
- Song, C. S., I. Echchgadda, B. S. Baek, S. C. Ahn, T. Oh, A. K. Roy, et B. Chatterjee. 2001. « Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase Gene Induction by Bile Acid Activated Farnesoid X Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42549-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107557200>.
- Sonne, Si Brask, Kristian Almstrup, Marlene Dalgaard, Agnieszka Sierakowska Juncker, Daniel Edsgard, Ludmila Ruban, Neil J Harrison, et al. 2009. « Analysis of Gene Expression Profiles of Microdissected Cell Populations Indicates that Testicular Carcinoma In Situ is an Arrested Gonocyte ». *Cancer research* 69 (12): 5241-50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4554>.
- Staels, Bart, et Folkert Kuipers. 2007. « Bile Acid Sequestrants and the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus ». *Drugs* 67 (10): 1383-92. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767100-00001>.
- Stanimirov, Bojan, Karmen Stankov, et Momir Mikov. 2015. « Bile Acid Signaling through Farnesoid X and TGR5 Receptors in Hepatobiliary and Intestinal Diseases ». *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 14 (1): 18-33. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60307-6](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60307-6).
- Staudinger, Jeff, Yaping Liu, Ajay Madan, Sultan Habeebu, et Curtis D. Klaassen. 2001. « Coordinate Regulation of Xenobiotic and Bile Acid Homeostasis by Pregnane X Receptor ». *Drug Metabolism and Disposition* 29 (11): 1467-72.
- Stein, Johannes, Michael Majores, Magdalena Rohde, Soyoung Lim, Simon Schneider, Eliana Krappe, Jörg Ellinger, et al. 2014. « KDM5C Is Overexpressed in Prostate Cancer and Is a Prognostic Marker for Prostate-Specific Antigen-Relapse Following Radical Prostatectomy ». *The American Journal of Pathology* 184 (9): 2430-37. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.022>.
- Strahl, Brian D., et C. David Allis. 2000. « The Language of Covalent Histone Modifications ». *Nature* 403 (6765): 41-45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Su, Hongying, Chuang Ma, Jingfeng Liu, Ningbo Li, Meiqin Gao, Aimin Huang, Xichun Wang, Wendong Huang, et Xiongfei Huang. 2012. « Downregulation of nuclear receptor FXR is associated with multiple malignant clinicopathological characteristics in human

- hepatocellular carcinoma ». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 303 (11): G1245-53. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00439.2011>.
- Suchy, Frederick J., et M. Ananthanarayanan. 2006. « Bile Salt Excretory Pump: Biology and Pathobiology ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 43 (1): S10. <https://doi.org/10.1097/01.mpg.0000226385.71859.5f>.
- Sugatani, Junko, Shinichi Nishitani, Kasumi Yamakawa, Kouichi Yoshinari, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, et Masao Miwa. 2005. « Transcriptional Regulation of Human UGT1A1 Gene Expression: Activated Glucocorticoid Receptor Enhances Constitutive Androstane Receptor/Pregnane X Receptor-Mediated UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Regulation with Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein 1 ». *Molecular Pharmacology* 67 (3): 845-55. <https://doi.org/10.1124/mol.104.007161>.
- Sun, Lulu, Jie Cai, et Frank J. Gonzalez. 2021. « The Role of Farnesoid X Receptor in Metabolic Diseases, and Gastrointestinal and Liver Cancer ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, février, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00404-2>.
- Surjit, Milan, Krishna Priya Ganti, Atish Mukherji, Tao Ye, Guoqiang Hua, Daniel Metzger, Mei Li, et Pierre Chambon. 2011. « Widespread Negative Response Elements Mediate Direct Repression by Agonist- Liganded Glucocorticoid Receptor ». *Cell* 145 (2): 224-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.027>.
- Susiarjo, Martha, Frances Xin, Martha Stefaniak, Clementina Mesaros, Rebecca A Simmons, et Marisa S Bartolomei. 2017. « Bile Acids and Tryptophan Metabolism Are Novel Pathways Involved in Metabolic Abnormalities in BPA-Exposed Pregnant Mice and Male Offspring ». *Endocrinology* 158 (8): 2533-42. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00046>.
- Swales, Karen E., Márta Korbonits, Robert Carpenter, Desmond T. Walsh, Timothy D. Warner, et David Bishop-Bailey. 2006. « The Farnesoid X Receptor Is Expressed in Breast Cancer and Regulates Apoptosis and Aromatase Expression ». *Cancer Research* 66 (20): 10120-26. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2399>.
- Tarulli, Gerard A., Peter G. Stanton, Kate L. Loveland, Ewa Rajpert-De Meyts, Robert I. McLachlan, et Sarah J. Meachem. 2013. « A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer ». *Spermatogenesis* 3 (1): e24014. <https://doi.org/10.4161/spmg.24014>.
- Tarulli, Gerard A., Peter G. Stanton, et Sarah J. Meachem. 2012. « Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated?1 ». *Biology of Reproduction* 87 (13, 1-11). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091>.
- Teshima, S, Y Shimosato, S Hirohashi, Y Tome, I Hayashi, H Kanasawa, et T Kakizoe. 1988. « Four New Human Germ Cell Tumor Cell Lines. » *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 59 (3): 328-36.
- Thomas, Ann M., Steven N. Hart, Bo Kong, Jianwen Fang, Xiao-Bo Zhong, et Grace L. Guo. 2010. « Genome-Wide Tissue-Specific Farnesoid X Receptor Binding in Mouse Liver and Intestine ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (4): 1410-19. <https://doi.org/10.1002/hep.23450>.

- Tolón, Rosa M., Ana I. Castillo, et Ana Aranda. 1998. « Activation of the Prolactin Gene by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Appears to Be DNA Binding-Independent* ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26652-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26652>.
- Trauner, Michael, et James L. Boyer. 2003. « Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation ». *Physiological Reviews* 83 (2): 633-71. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2002>.
- Trottier, Jocelyn, Mélanie Verreault, Susan Grepper, Didier Monté, Julie Bélanger, Jenny Kaeding, Patrick Caron, Ted T. Inaba, et Olivier Barbier. 2006. « Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT)1A3 Enzyme Conjugates Chenodeoxycholic Acid in the Liver ». *Hepatology* 44 (5): 1158-70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.21362>.
- Tsuchida, Takuma, et Scott L. Friedman. 2017. « Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14 (7): 397-411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>.
- Tung, Pierre S., Michael K. Skinner, et Irving B. Fritz. 1984. « Cooperativity between Sertoli Cells and Peritubular Myoid Cells in the Formation of the Basal Lamina in the Seminiferous Tubule ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 438 (1): 435-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb38304.x>.
- Uppenberg, Jonas, Carina Svensson, Maria Jaki, Göran Bertilsson, Lena Jendeberg, et Anders Berkenstam. 1998. « Crystal Structure of the Ligand Binding Domain of the Human Nuclear Receptor PPAR γ * ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (47): 31108-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31108>.
- Urizar, Nancy L., Amy B. Liverman, D'Nette T. Dodds, Frank Valentin Silva, Peter Ordentlich, Yingzhuo Yan, Frank J. Gonzalez, Richard A. Heyman, David J. Mangelsdorf, et David D. Moore. 2002. « A Natural Product That Lowers Cholesterol as an Antagonist Ligand for FXR ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5573): 1703-6. <https://doi.org/10.1126/science.1072891>.
- Van Thiel, D. H., J. S. Gavalier, A. B. Zajko, et C. F. Cobb. 1985. « Consequences of Complete Bile-Duct Ligation on the Pubertal Process in the Male Rat ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 4 (4): 616-21.
- Vaquero, Alejandro, Alejandra Loyola, et Danny Reinberg. 2003. « The Constantly Changing Face of Chromatin ». *Science of Aging Knowledge Environment* 2003 (14): re4. <https://doi.org/10.1126/sageke.2003.14.re4>.
- Vaquero, Javier, Oscar Briz, Elisa Herraéz, Jordi Muntané, et Jose J. G. Marin. 2013. « Activation of the nuclear receptor FXR enhances hepatocyte chemoprotection and liver tumor chemoresistance against genotoxic compounds ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (10): 2212-19. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.006>.
- Vaquero, Javier, Maria J. Monte, Mercedes Dominguez, Jordi Muntané, et Jose J. G. Marin. 2013. « Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the

- pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition ». *Biochemical Pharmacology* 86 (7): 926-39. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.022>.
- Vavassori, Piero, Andrea Mencarelli, Barbara Renga, Eleonora Distrutti, et Stefano Fiorucci. 2009. « The Bile Acid Receptor FXR Is a Modulator of Intestinal Innate Immunity ». *The Journal of Immunology* 183 (10): 6251-61. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803978>.
- Vega, Aurélie, Marine Baptissart, Emmanuelle Martinot, Jean-Paul Saru, Silvère Baron, Kristina Schoonjans, et David H. Volle. 2014. « Hepatotoxicity induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol is maintained throughout adulthood via the nuclear receptor SHP ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 18 (12): 1367-76. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.964209>.
- Vega, Aurélie, Emmanuelle Martinot, Marine Baptissart, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Silvère Baron, Françoise Caira, Kristina Schoonjans, Jean-Marc A. Lobaccaro, et David H. Volle. 2015. « Identification of the Link Between the Hypothalamo-Pituitary Axis and the Testicular Orphan Nuclear Receptor NR0B2 in Adult Male Mice ». *Endocrinology* 156 (2): 660-69. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1418>.
- Vignozzi, Linda, Annamaria Morelli, Sandra Filippi, Paolo Comeglio, Aravinda K. Chavalmane, Matilde Marchetta, Mariateresa Toce, et al. 2011. « Farnesoid X Receptor Activation Improves Erectile Function in Animal Models of Metabolic Syndrome and Diabetes ». *The Journal of Sexual Medicine* 8 (1): 57-77. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.02073.x>.
- Volle, David H., Rajesha Duggavathi, Benjamin C. Magnier, Sander M. Houten, Carolyn L. Cummins, Jean-Marc A. Lobaccaro, Guido Verhoeven, Kristina Schoonjans, et Johan Auwerx. 2007. « The Small Heterodimer Partner Is a Gonadal Gatekeeper of Sexual Maturation in Male Mice ». *Genes & Development* 21 (3): 303-15. <https://doi.org/10.1101/gad.409307>.
- Wagner, Martin, Peter Fickert, Gernot Zollner, Andrea Fuchsbichler, Dagmar Silbert, Oleksiy Tsybrovskyy, Kurt Zatloukal, et al. 2003. « Role of Farnesoid X Receptor in Determining Hepatic ABC Transporter Expression and Liver Injury in Bile Duct-Ligated Mice ». *Gastroenterology* 125 (3): 825-38. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01068-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01068-0).
- Wagner, Martin, Gernot Zollner, et Michael Trauner. 2010. « Nuclear Receptor Regulation of the Adaptive Response of Bile Acid Transporters in Cholestasis ». *Seminars in Liver Disease* 30 (02): 160-77. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253225>.
- Wang, C., M. Fu, R. H. Angeletti, L. Siconolfi-Baez, A. T. Reutens, C. Albanese, M. P. Lisanti, et al. 2001. « Direct Acetylation of the Estrogen Receptor Alpha Hinge Region by P300 Regulates Transactivation and Hormone Sensitivity ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (21): 18375-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100800200>.
- Wang, H., J. Chen, K. Hollister, L. C. Sowers, et B. M. Forman. 1999. « Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR ». *Molecular Cell* 3 (5): 543-53. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80348-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80348-2).

- Wang, Rui-An, Paul K. Nakane, et Takehiko Koji. 1998. « Autonomous Cell Death of Mouse Male Germ Cells during Fetal and Postnatal Period1 ». *Biology of Reproduction* 58 (5): 1250-56. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.5.1250>.
- Wang, Shuguang, KehDih Lai, Franklin J. Moy, Anitha Bhat, Helen B. Hartman, et Mark J. Evans. 2006. « The Nuclear Hormone Receptor Farnesoid X Receptor (FXR) Is Activated by Androsterone ». *Endocrinology* 147 (9): 4025-33. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1485>.
- Wang, Wei, Ming Zhan, Qi Li, Wei Chen, Huiling Chu, Qihong Huang, Zhaoyuan Hou, et al. 2016. « FXR agonists enhance the sensitivity of biliary tract cancer cells to cisplatin via SHP dependent inhibition of Bcl-xL expression ». *Oncotarget* 7 (23): 34617-29. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8964>.
- Wang, Xiaoxin X., Tao Jiang, Yan Shen, Yupanqui Caldas, Shinobu Miyazaki-Anzai, Hannah Santamaria, Cydney Urbanek, et al. 2010. « Diabetic Nephropathy Is Accelerated by Farnesoid X Receptor Deficiency and Inhibited by Farnesoid X Receptor Activation in a Type 1 Diabetes Model ». *Diabetes* 59 (11): 2916-27. <https://doi.org/10.2337/db10-0019>.
- Wang, Y., et R. J. Miksicek. 1991. « Identification of a Dominant Negative Form of the Human Estrogen Receptor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 5 (11): 1707-15. <https://doi.org/10.1210/mend-5-11-1707>.
- Wang, Yan-Dong, Wei-Dong Chen, Meihua Wang, Donna Yu, Barry M. Forman, et Wendong Huang. 2008. « Farnesoid X Receptor Antagonizes Nuclear Factor KB in Hepatic Inflammatory Response ». *Hepatology* 48 (5): 1632-43. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hep.22519>.
- Watanabe, Mitsuhiro, Sander M. Houten, Li Wang, Antonio Moschetta, David J. Mangelsdorf, Richard A. Heyman, David D. Moore, et Johan Auwerx. 2004. « Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c ». *Journal of Clinical Investigation* 113 (10): 1408-18. <https://doi.org/10.1172/JCI200421025>.
- Wehling, M. 1997. « Specific, Nongenomic Actions of Steroid Hormones ». *Annual Review of Physiology* 59: 365-93. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.59.1.365>.
- Weigel, N. L., et Y. Zhang. 1998. « Ligand-Independent Activation of Steroid Hormone Receptors ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 76 (7): 469-79. <https://doi.org/10.1007/s001090050241>.
- Wen, Qing, Yixun Liu, et Fei Gao. 2011. « Fate Determination of Fetal Leydig Cells ». *Frontiers in Biology* 6 (1): 12-18. <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1100-3>.
- Wen, Qing, Qiao-Song Zheng, Xi-Xia Li, Zhao-Yuan Hu, Fei Gao, C. Yan Cheng, et Yi-Xun Liu. 2014. « Wt1 dictates the fate of fetal and adult Leydig cells during development in the mouse testis ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 307 (12): E1131-43. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00425.2014>.
- West, Jason A., Srinivas R. Viswanathan, Akiko Yabuuchi, Kerianne Cunniff, Ayumu Takeuchi, In-Hyun Park, Julia E. Sero, et al. 2009. « A Role for Lin28 in Primordial Germ-Cell

- Development and Germ-Cell Malignancy ». *Nature* 460 (7257): 909-13. <https://doi.org/10.1038/nature08210>.
- Western, Patrick S., Denise C. Miles, Jocelyn A. van den Bergen, Matt Burton, et Andrew H. Sinclair. 2008. « Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells ». *STEM CELLS* 26 (2): 339-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622>.
- Whiting, Karen P, Colin J Restall, et Paul F Brain. 2000. « Steroid Hormone-Induced Effects on Membrane Fluidity and Their Potential Roles in Non-Genomic Mechanisms ». *Life Sciences*, 15.
- Willy, P. J., et D. J. Mangelsdorf. 1997. « Unique Requirements for Retinoid-Dependent Transcriptional Activation by the Orphan Receptor LXR ». *Genes & Development* 11 (3): 289-98. <https://doi.org/10.1101/gad.11.3.289>.
- Willy, P. J., K. Umesonon, 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. <https://doi.org/10.1101/gad.9.9.1033>.
- Wilson, C. J., D. M. Chao, A. N. Imbalzano, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston, et R. A. Young. 1996. « RNA Polymerase II Holoenzyme Contains SWI/SNF Regulators Involved in Chromatin Remodeling ». *Cell* 84 (2): 235-44. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80978-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80978-2).
- Wisely, G. Bruce, Ann B. Miller, Roderick G. Davis, Alan D. Thornquest, Robert Johnson, Tim Spitzer, Andrea Seifler, et al. 2002. « Hepatocyte Nuclear Factor 4 Is a Transcription Factor That Constitutively Binds Fatty Acids ». *Structure (London, England: 1993)* 10 (9): 1225-34. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(02\)00829-8](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(02)00829-8).
- Wolfe, Andy, Ann Thomas, Genea Edwards, Reshma Jaseja, Grace L. Guo, et Udayan Apte. 2011. « Increased Activation of the Wnt/ β -Catenin Pathway in Spontaneous Hepatocellular Carcinoma Observed in Farnesoid X Receptor Knockout Mice ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 338 (1): 12-21. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.179390>.
- Wu, Jun, Chunsheng Xia, Jannika Meier, Suzhen Li, Xiao Hu, et Deepak S. Lala. 2002. « The Hypolipidemic Natural Product Guggulsterone Acts as an Antagonist of the Bile Acid Receptor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (7): 1590-97. <https://doi.org/10.1210/mend.16.7.0894>.
- Xia, Yunlong, Fuyang Zhang, Shihao Zhao, Yueyang Li, Xiyao Chen, Erhe Gao, Xinyue Xu, et al. 2018. « Adiponectin Determines Farnesoid X Receptor Agonism-Mediated Cardioprotection against Post-Infarction Remodelling and Dysfunction ». *Cardiovascular Research* 114 (10): 1335-49. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy093>.
- Xiang, Yang, Ziqi Zhu, Gang Han, Xiaolei Ye, Bo Xu, Zhouchun Peng, Yuanjun Ma, et al. 2007. « JARID1B Is a Histone H3 Lysine 4 Demethylase Up-Regulated in Prostate Cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (49): 19226-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700735104>.
- Xu, Changjiang, Christina Yong-Tao Li, et Ah-Ng Tony Kong. 2005. « Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics ». *Archives of Pharmacal Research* 28 (3): 249. <https://doi.org/10.1007/BF02977789>.

- Yang, Fan, Xiongfei Huang, Tangsheng Yi, Yun Yen, David D. Moore, et Wendong Huang. 2007. « Spontaneous Development of Liver Tumors in the Absence of the Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor ». *Cancer Research* 67 (3): 863-67. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1078>.
- Yang, Zhao-Xia, Wei Shen, et Hang Sun. 2010. « Effects of nuclear receptor FXR on the regulation of liver lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease ». *Hepatology International* 4 (4): 741-48. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9202-6>.
- Yao, Humphrey Hung-Chang, Wendy Whoriskey, et Blanche Capel. 2002. « Desert Hedgehog/Patched 1 Signaling Specifies Fetal Leydig Cell Fate in Testis Organogenesis ». *Genes & Development* 16 (11): 1433-40. <https://doi.org/10.1101/gad.981202>.
- Yoshida, Shosei, Mamiko Sukeno, Toshinori Nakagawa, Kazuyuki Ohbo, Go Nagamatsu, Toshio Suda, et Yo-ichi Nabeshima. 2006. « The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage ». *Development* 133 (8): 1495-1505. <https://doi.org/10.1242/dev.02316>.
- Yuan, L. Wuchao, et Jay E. Gambee. 2000. « Phosphorylation of P300 at Serine 89 by Protein Kinase C* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (52): 40946-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007832200>.
- Zelcer, Noam, Koen van de Wetering, Rudi de Waart, George L. Scheffer, Hanns-Ulrich Marschall, Peter R. Wielinga, Annemieke Kuil, et al. 2006. « Mice Lacking Mrp3 (Abcc3) Have Normal Bile Salt Transport, but Altered Hepatic Transport of Endogenous Glucuronides ». *Journal of Hepatology* 44 (4): 768-75. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.022>.
- Zhang, Songwen, Juan Wang, Qiangyuan Liu, et Douglas C. Harnish. 2009. « Farnesoid X Receptor Agonist WAY-362450 Attenuates Liver Inflammation and Fibrosis in Murine Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Journal of Hepatology* 51 (2): 380-88. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.025>.
- Zhang, Weijian, Lina Zhou, Peiyuan Yin, Jinbing Wang, Xin Lu, Xiaomei Wang, Jianguo Chen, Xiaohui Lin, et Guowang Xu. 2015. « A weighted relative difference accumulation algorithm for dynamic metabolomics data: long-term elevated bile acids are risk factors for hepatocellular carcinoma ». *Scientific Reports* 5 (mars). <https://doi.org/10.1038/srep08984>.
- Zhang, Yanqiao, Lawrence W. Castellani, Christopher J. Sinal, Frank J. Gonzalez, et Peter A. Edwards. 2004. « Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR ». *Genes & Development* 18 (2): 157-69. <https://doi.org/10.1101/gad.1138104>.
- Zhang, Yanqiao, Heidi R. Kast-Woelbern, et Peter A. Edwards. 2003. « Natural Structural Variants of the Nuclear Receptor Farnesoid X Receptor Affect Transcriptional Activation ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (1): 104-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209505200>.
- Zhang, Yanqiao, Florence Ying Lee, Gabriel Barrera, Hans Lee, Charisse Vales, Frank J. Gonzalez, Timothy M. Willson, et Peter A. Edwards. 2006. « Activation of the Nuclear

- Receptor FXR Improves Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Diabetic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (4): 1006-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506982103>.
- Zhang Yanqiao, Wang Xuping, Vales Charisse, Lee Florence Ying, Lee Hans, Lusi Aldons J., et Edwards Peter A. 2006. « FXR Deficiency Causes Reduced Atherosclerosis in Ldlr^{-/-} Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (10): 2316-21. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000235697.35431.05>.
- Zhang, Ying, et Maria L. Dufau. 2004. « Gene Silencing by Nuclear Orphan Receptors ». *Vitamins and Hormones* 68: 1-48. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(04\)68001-0](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(04)68001-0).
- Zhao, Yanbin, Kun Zhang, John P. Giesy, et Jianying Hu. 2015. « Families of Nuclear Receptors in Vertebrate Models: Characteristic and Comparative Toxicological Perspective ». *Scientific Reports* 5 (1): 8554. <https://doi.org/10.1038/srep08554>.
- Zhou, J., J. Zhang, et W. Xie. 2005. « Xenobiotic Nuclear Receptor-Mediated Regulation of UDP-Glucuronosyl-Transferases ». *Current Drug Metabolism* 6 (4): 289-98. <https://doi.org/10.2174/1389200054633853>.
- Zhou, Jiyu, Shuang Cui, Qingxian He, Yitong Guo, Xiaojie Pan, Pengfei Zhang, Ningning Huang, et al. 2020. « SUMOylation inhibitors synergize with FXR agonists in combating liver fibrosis ». *Nature Communications* 11 (janvier). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14138-6>.
- Zhou, Yuanyue, William Gross, Suk-Hyun Hong, et Martin L. Privalsky. 2001. « The SMRT corepressor is a target of phosphorylation by protein kinase CK2 (casein kinase II) ». *Molecular and cellular biochemistry* 220 (1-2): 1-13.
- Zilliaccus, J., A. P. Wright, J. Carlstedt-Duke, L. Nilsson, et J. A. Gustafsson. 1995. « Modulation of DNA-Binding Specificity within the Nuclear Receptor Family by Substitutions at a Single Amino Acid Position ». *Proteins* 21 (1): 57-67. <https://doi.org/10.1002/prot.340210107>.
- Zollner, Gernot, Peter Fickert, Andrea Fuchsbichler, Dagmar Silbert, Martin Wagner, Silvia Arbeiter, Frank J Gonzalez, et al. 2003. « Role of Nuclear Bile Acid Receptor, FXR, in Adaptive ABC Transporter Regulation by Cholic and Ursodeoxycholic Acid in Mouse Liver, Kidney and Intestine ». *Journal of Hepatology* 39 (4): 480-88. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00228-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00228-9).
- Zollner, Gernot, Peter Fickert, Dagmar Silbert, Andrea Fuchsbichler, Conny Stumptner, Kurt Zatloukal, Helmut Denk, et Michael Trauner. 2002. « Induction of short heterodimer partner 1 precedes downregulation of Ntcp in bile duct-ligated mice ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282 (1): G184-91. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00215.2001>.
- Zollner, Gernot, Martin Wagner, Tarek Moustafa, Peter Fickert, Dagmar Silbert, Judith Gumhold, Andrea Fuchsbichler, et al. 2006. « Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter- α/β in the adaptive response to bile acids ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (5): G923-32. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00490.2005>.

Zollner, Gernot, Martin Wagner, et Michael Trauner. 2010. « Nuclear Receptors as Drug Targets in Cholestasis and Drug-Induced Hepatotoxicity ». *Pharmacology & Therapeutics* 126 (3): 228-43. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.03.005>.

Annexes



Farnesoid X receptor alpha (FXR α) is a critical actor of the development and pathologies of the male reproductive system

Manon Garcia¹ · Laura Thirouard¹ · Mélusine Monrose¹ · Hélène Holota¹ · Angélique De Haze¹ · Françoise Caira¹ · Claude Beaudoin¹ · David H. Volle¹

Received: 30 April 2019 / Revised: 19 July 2019 / Accepted: 23 July 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

The farnesoid-X-receptor α (FXR α ; NR1H4) is one of the main bile acid (BA) receptors. During the last decades, through the use of pharmacological approaches and transgenic mouse models, it has been demonstrated that the nuclear receptor FXR α controls numerous physiological functions such as glucose or energy metabolisms. It is also involved in the etiology or the development of several pathologies. Here, we will review the unexpected roles of FXR α on the male reproductive tract. FXR α has been demonstrated to play functions in the regulation of testicular and prostate homeostasis. Even though additional studies are needed to confirm these findings in humans, the reviewed reports open new field of research to better define the effects of bile acid-FXR α signaling pathways on fertility disorders and cancers.

Keywords Bile acid signaling · Fertility · Cancer

Introduction

Bile acids are synthesized from cholesterol in the liver and are components of bile salts. They have major involvement in digestion. Next to this, bile acids have been defined as signaling molecules controlling many physiological functions such as lipid homeostasis, glucose and energy metabolisms. Multiple signaling pathways mobilized by bile acids (BA) ensure these functions. BAs act as ligands for several receptors among which the Farnesoid-X-Receptor- α (FXR α , NR1H4) and the G-protein-coupled bile acid receptor-1 (GPBAR1; TGR5).

The nuclear receptor of bile acids: FXR α

FXR α belongs to the family of steroid hormone receptors and is present in many species and produced by the NR1H4 gene. Four isoforms of FXR α (α 1/4) have been identified resulting from alternative splicing and the use of two different promoters in the NR1H4 gene. The alternative promoters at exon 1 or exon 3 regulate the expression of FXR α 1 and FXR α 2 or FXR α 3 and FXR α 4 transcripts, respectively. The FXR α 3 and FXR α 4 isoforms possess longer N-terminal regions than do FXR α 1 and FXR α 2. The isoform differences could impact the efficiency of the “activation function 1 domain” (AF-1) for interacting with cofactors. In the FXR α 1 and 3 isoforms, exon 5 is differentially spliced compared to FXR α 2 and 4. This alternative splicing event results in the addition of four amino acids (MYTG) adjacent to the DNA-binding domain in the hinge domain. It has been demonstrated that these isoforms are expressed at different levels within the tissues. Levels of FXR α 1/2 are higher in the liver and adrenal glands and FXR α 3/4 forms are found in the gut and kidneys [1].

FXR α is a ligand-mediated transcription factor. It was first defined as the receptor of farnesol generated by mevalonate metabolism. It was then described as the receptor of BA [2]. The most efficient ligands of FXR α are chenodeoxycholic acid (CDCA) and its conjugated forms [3]. Other BAs

Manon Garcia and Laura Thirouard participates equally to this work.

✉ Claude Beaudoin
claude.beaudoin@uca.fr

✉ David H. Volle
david.volle@inserm.fr

¹ Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD, 28 Place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France

can activate FXR α with different degree of potency such as deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LCA) and then cholic acid (CA) [2].

Over the years, multiple studies have been able to discriminate natural ligands for FXR α . Among them some act as antagonists such as guggulsterone, which was isolated from an extract of the gum resin of *Commiphora mukul*, and stigmaterol, which was previously used in parenteral food [4, 5]. Other molecules were defined as FXR α agonist such as cafestol, a diterpene isolated from unfiltered coffee brew [6]. It is interesting to note that bile acids have been described for long to have endocrine activity. In that line, the levels of BAs acting as endogenous FXR α agonists in vivo are essential to modulate the physiology of several organs. In fasting conditions, serum bile acid are usually below 5 μ M, whereas in post-prandial the concentrations reach 15 μ M [7]. The use of reporter mice showed that in basal condition, the levels of BA are sufficient to induce the activity of the FXR α receptor in different organs such as in the intestine. It has been demonstrated that in short term condition following meal, higher activity of FXR α can be observed [8].

In parallel, efforts were also put in the identification of selective and specific synthetic modulators of FXR α . Among all the agonists produced, two of them are now actively used, namely GW4064 and INT747 [9].

At the structural level, FXR α shows all the typical domains of nuclear receptors, with the dimerization interface, the ligand-binding domain, the DNA-binding domain and the ligand-dependent activation function (AF-2) domain. FXR α mainly acts as heterodimer with the retinoic acid receptor RXR (Retinoid X Receptor). The FXR α /RXR heterodimer is a permissive one, as the ligands of both partners can synergize to regulate the transcription of target genes.

The heterodimer FXR α /RXR binds to specific FXR response elements (FXRE) located in the regulatory sequences of target genes. The classical FXRE sequences correspond to hexamers (AGGTCA) that are arranged as inverted repeat motifs (IR) separated by one base (IR-1) [2]; even if other FXREs with lower affinity have been defined such as IR0, IR8, ER8 (an everted repeat motif) or DR1 (a direct repeated motif). In few cases, it has been demonstrated that FXR α can act as a monomer and thus can repress transcription through negative FXREs [1].

The use of pharmacological approaches and of rodent transgenic models has defined the roles of FXR α receptor in the control of lipid, carbohydrate and bile acid metabolisms (for review see [10, 11]). Indeed, mouse deleted for the gene encoding FXR α have altered BA homeostasis associated with hyper-triglyceridemia and impaired glucose homeostasis. Moreover, the study of the FXR α knockout mouse models led to the identification of the involvement of FXR α signaling pathways in diseases such as diabetes, immune disorders as well as cancers. For these latter, FXR α ^{-/-} mice

developed spontaneously cancerous liver lesions at 1 year old [12, 13].

The importance of FXR α in the regulation of physiological functions and the association with diseases were recently highlighted with the studies on humans and the identification of polymorphisms. FXR α variant due to single nucleotide polymorphisms, leading to reduced transcriptional activity, was identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) [14]. More recently another study showed that cases of neonatal cholestasis were associated with mutations in the *Fxr α* gene [15].

Next to these descriptions, an additional function of FXR α was added in the last years, with the identification of the involvement of BAs in the regulation of the male reproductive system [16]. Here we will review most of the data highlighting the critical functions of FXR α within testis, prostate, seminal vesicles and spermatozoa.

The idea of a link between bile acid signaling and male genital tract emerged from the association between hepatic pathologies and infertility in human [17, 18]. Indeed, during liver disorders, bile acids concentrations reached high levels. In addition, cirrhosis can be associated with testicular atrophy, low testosterone levels, decreased libido, infertility and gynaecomastia [19, 20]. Moreover, a retrospective study has correlated hepatic steatosis with low testosterone levels [21].

In the last years, different BA signaling pathways through FXR α and TGR5 have been demonstrated to be involved in male genital tract disorders [16]. As far as reproductive tract is concerned, there is no obvious reported redundancy between FXR α and TGR5. Indeed, so far, the role of TGR5 has been studied only in adult male mice using a diet enriched in cholic acid (0.5% CA), which is a classical model to mimic cholestasis. This is translated in mice by a multi-component phenotype in adequacy with the known roles of bile acids. It induces weight loss and hepatic steatosis with a decrease in hepatic Igf1 (*Insulin-like growth factor-1*) transcripts and altered plasma testosterone concentrations. These effects are not sufficient to explain infertility induced in cholestatic conditions since they remain present in *Tgr5*^{-/-} males whose fertility and testicular physiology are preserved in response to CA-diet. In wild-type mice, CA-diet feeding leads to alteration of germ cell homeostasis relying on the control within germ cell lineage of genes involved in cell-cell interactions and thus associated with post-meiotic germ cell apoptosis [22]. This work draws attention to the major impacts of the hyper-activation of BA-signaling on the maintenance of reproductive functions in adult male mice in the context of liver disorders.

In addition, the links between BA signaling and male reproductive tract are sustained by new findings showing that testis express the genes encoding enzymes involved in BA synthesis [23]. As in the liver, FXR α controls this process. Indeed, *Fxr α* ^{-/-} mice showed altered BA homeostasis

in both liver and testis [23]. It has appeared in the last years that FXR α plays multiple roles in the urogenital tract that are described below.

FXR α and male genital tract

FXR α and testis

Several studies demonstrate that FXR α is expressed in the human testis since the first trimester of pregnancy [24], as well as in testis of many other species such as mouse [25]. In adult mouse, the expression of FXR α was described in the interstitial space, mainly in Leydig cells [26]. This expression was confirmed at pubertal age when Leydig cells start to produce adult levels of testosterone [27]. Interestingly, the use of mouse models defines the saptio-temporal expression of FXR α within the testis. In that line, it has been demonstrated that FXR α is also expressed during post-natal development within the germ cell lineage and more particularly in undifferentiated germ cells (UGC) [28]. In addition, a study on marbled newt also showed the expression of FXR α in primordial germ cells and primary spermatogonia [29]. These localizations suggest that FXR α must be involved in the control of both the endocrine and exocrine functions of the testis.

FXR α & testicular endocrine function

The first described role of FXR α within the testis relies on its involvement on the endocrine function (Fig. 1). Indeed, the combined use of *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice and of pharmacological approaches using the FXR α specific synthetic agonist GW4064 have demonstrated that the gene encoding the orphan nuclear receptor Small Heterodimer Partner (*Shp*; *Nr0b2*), a well-known FXR α target gene in the liver, is also a target gene within the Leydig cells. It was demonstrated that the increase of SHP is then associated with the repression of the expression and/or the transcriptional activity of Liver-Receptor-Homolog-1 (*Lrh1*; *Nr5a2*) and of Steroidogenic Factor-1 (*Sf1*; *Nr5a1*) receptors, two other members of the nuclear receptor superfamily, that are described to positively regulate the expression of genes involved in the steroidogenic pathways [30, 31]. These data were established using in vitro approaches such as Chromatin Immunoprecipitation. Following the exposure to GW4064, the subsequent regulations of SHP were associated with the down-regulation of the expression of the steroidogenesis genes such as *Star*, *Cyp11a1* and *3 β -Hsd* [26]. The involvement of SHP was sustained by the fact that GW4064 has no effect on testosterone levels in *Shp* $^{-/-}$ male mice. Consistently, *Shp* $^{-/-}$ mice showed higher plasma and testicular testosterone levels associated

with an early maturation of the male genital tract. Indeed, male sexual maturation is a key developmental period depending on the hormonal status. The identification of the involvement of FXR α on the regulation of the testicular endocrine function led to the question of its potential involvement in male sexual maturation at puberty. This was sustained by data associating experimental models of liver disorders and altered puberty [32]. These experimental models showed lower testosterone levels and smaller testes and seminal vesicles. Recently, study deciphered the involvement of BA and FXR α in the cholestasis-induced sexual maturational failure. For that purpose, 21-days old male mice were fed a diet supplemented with cholic acid or treated with GW4064 [27]. The pubertal exposures resulted in an alteration of spermatogenesis. Indeed, the BA-exposed testis showed a lower number of elongated spermatids suggesting that the sexual maturation was delayed, which was correlated to a lower sperm production and then reduced fertility. This default in spermatogenesis was due to an increase of the apoptotic rate of germ cells. This later was related to the alteration of the hormonal homeostasis as testosterone supplementation reversed the effect of BA treatment on germ cell apoptosis.

The putative impact on testosterone synthesis was dependent on FXR α as no deleterious effects of GW4064 were observed in *Fxr* $\alpha^{-/-}$ male mice. Unexpectedly, in contrast to adult male mice, this effect was not strictly dependent on SHP, as *Shp* $^{-/-}$ males exposed during puberty were still responsive to BA treatment [27]. It was then demonstrated that the nuclear receptor Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (*Dax1*; *Nr0b1*), a known repressor of steroidogenesis, was a direct target gene of FXR α . This suggests that DAX-1 might be in part responsible, in collaboration with SHP, of the negative impact of FXR α signaling pathways on steroidogenesis and thus on male sexual maturation at puberty [27].

In both adult and pubertal mice, the impacts of FXR α are local effects within the Leydig cells and independent of the hypothalamo-pituitary axis (HPA). However, some links might exist between FXR α and the hypothalamo-pituitary axis. Indeed, it was shown that FXR α also lowered testosterone synthesis through the repression of the expression of the LH receptor gene (*Lhcgr*). This leads to a lower sensitivity to the hypothalamo-pituitary axis, which is the major regulator of the endocrine function of the testis [27]. Moreover, it has been demonstrated that the expression of *Shp* and *Dax-1* are down-regulated by the LH signaling [33, 34]. This suggests that local signaling pathways might participate in the precise regulation of the endocrine function in interaction with the HPA.

The involvement of FXR α on the control of testicular steroid synthesis is supported by the conserved mechanism in other species. Indeed, in porcine Leydig cells, the

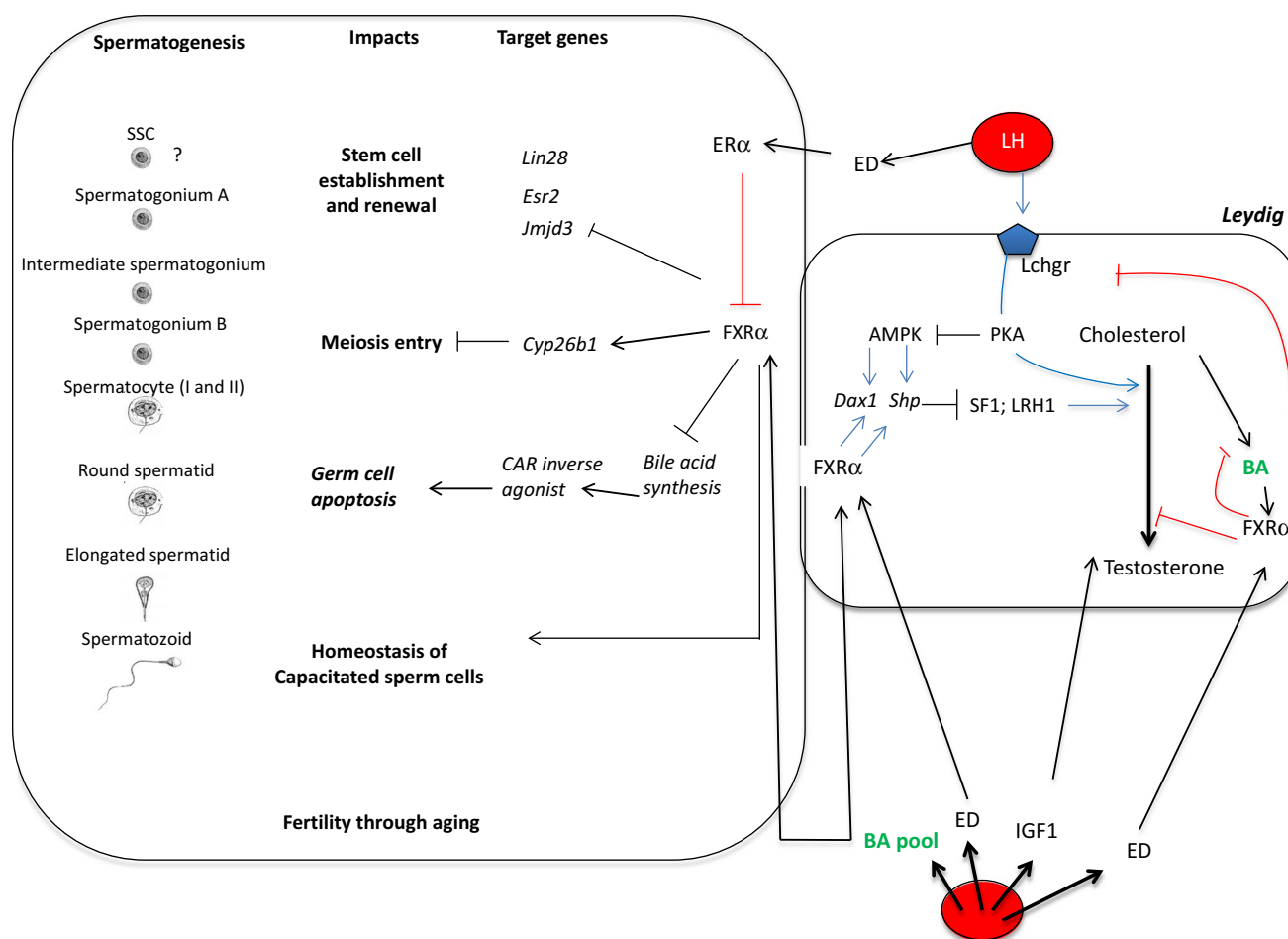


Fig. 1 Impacts of FXR α signaling pathways within the testis. The liver secretes the insulin growth factor-1 and is involved in the control of steroid catabolism; two factors that are known to be key for testicular homeostasis. In addition, DCA produced by the microbiota is an important mediator of BA-induced testicular toxicity. IGF1, BA and LH reach the testis through blood circulation. Testicular BA pool is composed of both circulating ones and those produced within the testis. There, BA will control the Leydig endocrine function by controlling the production of steroid directly or through the decrease of

the sensitivity to the LH signaling. In combination, through FXR α or TGR5, BA will control the exocrine function with impact on Sertoli cell homeostasis as well as alterations of processes involved in spermatogonial stem cell (SSC) self-renewal or germ cell survival. In addition, this later impact could also be associated with the increase of BA-precursors and the subsequent activation of CAR signaling pathways. This leads to lower sperm production and then male fertility disorders

treatment with the FXR α agonist chenodeoxycholic acid (CDCA) decreased sex steroid production [35].

Even if exogenous BAs have been demonstrated to repress testicular steroid synthesis; the question of the endogenous testicular FXR α ligand remains. Androsterone, a metabolite of testosterone was shown to be a FXR α activator [36]. This data suggests that a local feedback loop of androgen synthesis might exist.

Moreover, next to the regulation of the androgen synthesis, some studies have demonstrated a crosstalk between FXR α signaling and the estrogen synthesis in females and males [2]. In vitro studies have demonstrated that FXR α reduced the expression of the gene encoding the aromatase [37]. At the molecular level, it was shown that

FXR α competes with SF1 for binding sites on the regulatory sequences of the aromatase gene and thus its expression. However, these mechanisms still have to be elucidated in vivo.

Steroid plasma concentrations result from a balance between their synthesis and their catabolism. The liver essentially supports the inactivation and elimination of steroids. It has to be considered that the impacts of FXR α on the sexual hormones might involve steroid catabolism probably at the liver level. Indeed, in some studies it has been demonstrated that adult male mice fed a diet supplemented with 0.5% cholic acid for several months showed an altered plasma testosterone concentration with normal intra-testicular levels [22]. It was thus demonstrated that these animals

exhibited an increased hepatic expression of *Cyp3a11* and *Ugt2b34* suggesting hepatic catabolism of testosterone [22]. Bile acids are capable, *via* FXR α , to induce the expression of several catabolic enzymes such as *Ugt2b4* or *Cyp3a11*. It can be, therefore, hypothesized that these inductions may interfere with the homeostasis of circulating steroid levels and cause a decrease in plasma testosterone concentrations.

FXR α and etiology of pubertal defect in humans?

Surprisingly, when analyzing *Fxr α* knock-out mice there is a decrease of intratesticular testosterone levels. This is due to the increase of SHP, a known repressor of steroidogenesis, in Leydig cells. However, this effect is transiently seen up to 1 month of age in mice. This suggests that FXR α might be involved in the control of the timing of sexual maturation. This is associated with the repressive action of Shp and Dax-1 with respect to Leydigian steroidogenesis.

Interestingly, puberty delays in boys have increased steadily in recent years [38]. The clinical definition of pubertal delay is the absence of an increase in testicular volume beyond 14 years. It is accompanied by a lack of maturation of sexual characteristics and muscle development and a lack of acceleration of the growth rate normally associated with puberty.

The most frequent diagnosis of delayed puberty (80% of cases) is a so-called “simple” pubertal delay, spontaneously correcting with time. Its etiology is often misunderstood. At the molecular level, no data reported an association between SHP or FXR α and altered puberty. In contrast, in humans, some DAX-1 mutations result in a large phenotypic variability highlighting the complexity of its functions [39]. Most of these lead to adrenal insufficiency (AHC, adrenal hypoplasia congenita) and gonadotropin deficiency associated with delayed or no puberty [40, 41].

Moreover, due to the multiple actions of FXR α for the regulation of metabolisms of bile acids, cholesterol or triglycerides, several synthetic bile acids, agonists or antagonists of FXR α , have been developed to fight against the development of pathologies such as hypertriglyceridemia [42], [43]. In this context, our study raises the question of the consequences of exposure to such molecules during puberty (pubertal delay).

FXR α and Leydig tumor?

A potential association between FXR α and Leydig tumor has also been evoked [44]. Using the R2C Leydig tumor cell line, it was demonstrated *in vitro* that the use of a FXR α agonist decreases the Leydig tumor growth through the inhibition of proliferation and the induction of apoptosis processes. At the molecular level, it was established that a FXR α -nuclear factor- κ B (NF- κ B) complex binds to the

p53 promoter, inducing the expression of P53; which in turn induced its effector p21 (WAF1/Cip1).

Leydig cell tumors represent 3% of the testicular cancers and are benign in most of the cases. The above data suggest that FXR α ligands could represent a therapeutic strategy for the rare malignant Leydig tumor for which so far no treatment is available.

FXR α in male germ cells

The exocrine function of the testis corresponds to the production of spermatozoa to ensure male fertility (Fig. 1). Undifferentiated spermatogonia undergo multiple steps of transformation. Part of the spermatogonial stem cells (SSCs) self-renew and others enter in the differentiation process leading to spermatocytes. Then following the meiotic process germ cell lineage gives rise to the haploid round spermatids, which will, through spermiogenesis, become elongated spermatids and then spermatozoa.

Recent studies in mice have shown an abnormal accumulation of undifferentiated germ cells in the testes of *Fxr α ^{-/-}* mice [28]. It was hypothesized that FXR α helps to establish and to maintain the pool of undifferentiated germ cells and thus male fertility throughout aging. Consistently, *Fxr α ^{-/-}* males showed a higher production of spermatozoa compared to their wild-type littermates. This is associated with the maintenance of *Fxr α ^{-/-}* male fertility throughout aging at a time when wild-type fertility decline is normally observed. These data sustained the idea that FXR α participates to the homeostasis of spermatogonial stem cells (SSC), which are the only cell population to present regenerative capacity. In that line, it has been demonstrated that FXR α controls the expression of multiple genes known to be involved in the establishment of the SSC population such as *Jmjd3*, whose deficiency, like for *Fxr α* , was associated to heavier testes and maintained reproductive capacities for longer time than wild-type littermates [45]. Similarly, a closed phenotype to *Fxr α ^{-/-}* males was observed in the *Er β* (*Ers2*) deficient mice with an increase in the number of UGC at postnatal age [46].

In addition, the higher expression of Lin28 following the modulation of the FXR α signaling pathways was associated with altered expression of pluripotency genes such as *Oct3/4* and *Nanog* highlighting the critical role of Lin28 for the development of UGC in mice [47]. Even though these data suggest that Lin28 could be a mediator of FXR α in the establishment of SSC pool, the mechanisms by which FXR α controls the expression of *Lin28* remain to be identified.

This impact of FXR α on the establishment of UGC was also supported by the use of the synthetic agonist, GW4064, as it leads to a lower number of PLZF-positive seminiferous tubules [48].

Next to the impact of FXR α on the UGC pool, it also seems to participate in germ cell differentiation process. Indeed, a precocious entry in meiosis was observed in the *Fxr α ^{-/-}* males [28]. The crosstalk with the retinoid pathway, a major signal for germ cells to enter into meiosis, was demonstrated by the lower expression of the retinoid-degrading enzyme *Cyp26b1* in *Fxr α ^{-/-}* male mice and the fact that a RAR (retinoic acid receptor) antagonist blocked germ cell differentiation even in *Fxr α ^{-/-}* males.

Combined these data suggest that FXR α might control some pathways within the germ cell lineage that permit efficient spermatogenesis in autonomous manner. Indeed, it has been demonstrated that FXR α controls germ cell survival in an androgen-independent manner in postnatal period, through the regulation of the expression of *caspase-6*, a known target of bile acid signaling pathways in the liver [49].

In addition, some data showed that the impacts of the lack of *Fxr α* gene on the sustained spermatogenesis (higher sperm cell production) were observed concomitantly to a decreased number of Sertoli cells [28], which are essential structural and nutritive support for spermatogenesis. In addition, it has been demonstrated that FXR α signaling pathways might alter the maturation of Sertoli cells during early post-natal development as a precocious alignment of Sertoli cells at the basal membrane of the seminiferous tubules was observed following the exposure to GW4064 during the 10 first days of life [48]. Even though the mechanisms were not studied, this might help to better elucidate the complex interaction between somatic Sertoli cells and germ cells differentiation.

The links between FXR α and the control of male fertility and testicular homeostasis were sustained by recent data. It has been demonstrated that mice invalidated for the gene encoding FXR α were more sensitive to BA exposure and that a short-term exposure (15 days) led to altered fertility correlated with lower sperm production due to an increased meiotic germ cell apoptosis independently of the androgen status [23]. At the molecular level, the mechanisms were in part defined and highlighted for the first time with the unexpected role of the constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3) within the testis. Indeed, the authors have demonstrated that *Fxr α ^{-/-}* males fed a BA-diet showed altered testicular BA homeostasis associated with the accumulation of BA intermediate metabolites defined as negative CAR modulators. The crosstalk with CAR signaling pathways within the *Fxr α ^{-/-}* mice was supported by data showing that the administration of CAR agonist counteracted the impact of BA-diet [23].

Moreover, FXR α is expressed in human sperm cells mainly in the middle piece. The activation of FXR α by BA alters the sperm parameters, whereas an inhibition through the use of antagonist (Guggulsterone) or immuno-blockage

inhibits these impacts. It has been demonstrated that the increased levels of BA modulate metabolic parameters (triglyceride) in sperm cells. It was thus suggested that BA could impact the homeostasis of capacitated sperm and could thus participate in infertility with idiopathic origin [50].

Fxr α , testicular spermatogenesis and environment

It has been demonstrated in liver and testis that FXR α controls the expression of many genes encoding drug transporters [51]. These data suggest that FXR α could have a major role in testicular detoxification of exogenous drugs (for review see [1]). These data led to the hypothesis that a link might exist between exogenous molecules, their deleterious impacts on male fertility and FXR α .

In that line, the increased incidence of pathologies of the male urogenital tract has been associated with the exposure to environmental molecules (EM). The list of EMs grows regularly (pollutants, pesticides, drugs) and their activity can be mediated by number of effectors. Most of these EMs, altering male reproductive functions, have been demonstrated to have anti-androgenic or estrogen-like activities [52].

Several reports have highlighted the impacts of EM exposures on bile acid metabolism [53], and several EMs have also been described to be potential FXR α modulators. Recently, additional work showed that the FXR α signaling pathway might be a critical mediator of the impacts of EMs. Indeed, it has been demonstrated that the combined exposure during fetal/neonatal periods to bisphenol-A (BPA, a well-known endocrine disruptor) and Stigmasterol (S) (natural FXR α antagonist) led to an enhanced decreased fertility compared with the exposure to single EMs [48]. This was correlated with decreased number of undifferentiated spermatogonia, of spermatids and of sperm cells, and then associated with abnormalities of the male reproductive function. The involvement of FXR α was supported by the fact that *Fxr α ^{-/-}* male mice were almost unaffected. It is interesting to note that BPA alone had lesser effect on the *Fxr α ^{-/-}* males suggesting crosstalk between FXR α and BPA signaling pathways. This was consistent with the lower accumulation of *Esr2* in *Fxr α ^{-/-}* testis [28]. However, another explanation was given with the control of *Fxr α* expression by BPA signaling pathway within germ cells, similarly to what was reported in liver [54].

All these data demonstrate that FXR α acts as a major mediator of some EMs such as BPA to mediate their detrimental impacts on testicular homeostasis and thus fertility. It is important to note that these effects must be extrapolated to humans as adverse effects of the co-exposure to BPA + S were observed on the human testis in *ex vivo* experiments [48].

Interestingly, Hsu's work demonstrated the antagonistic action of insecticidal xenobiotic molecules such as cyfluthrin or bifenthrin on Fxr α [55], opening a more widespread possibility of the role of FXR α in the development of environmental diseases and particularly male reproductive disorders.

Prostate/vesicle seminals: from fertility to cancer

So far the impact of the FXR α signaling pathways on the male reproductive tract were mainly studied in regards with the testicular homeostasis. However, some recent data also suggest putative impacts on seminal vesicles or prostate, two organs involved in the production of seminal plasma, which is essential to ensure the quality and integrity of sperm cells for fecundation. However, to our knowledge no data are available on the epididymis.

Recent data using proteomic analysis have identified that some proteins of the turkey seminal plasma may be involved in the regulation of lipid metabolism through FXR α activation pathways. It could thus be hypothesized that FXR α pathways must be important for sperm after ejaculation [56]. This could be consistent with the expression of FXR α in spermatozoa as demonstrated in human [50].

Within the prostate, the role of FXR α was mainly studied in the context of tumor cells (Fig. 2). It has been demonstrated that the mRNA and protein accumulation of FXR α are decreased in prostate cancer biopsies [57]. In vitro approaches have demonstrated that FXR α activation increased the expression of the tumor suppressor PTEN and thus suppressed prostate cancer cell proliferation [57]. This later effect on cell growth was only observed in tumoral [58]. In addition, it has been demonstrated, consistently with known roles of FXR α in other organs, that its activation in prostate lowered lipid accumulation through the regulation of sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1).

Interestingly, it was shown that FXR α activation represses the expression of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 and UGT2B17 within prostate cancer LNCaP cells. As glucuronidation inactivated androgens it must be hypothesized

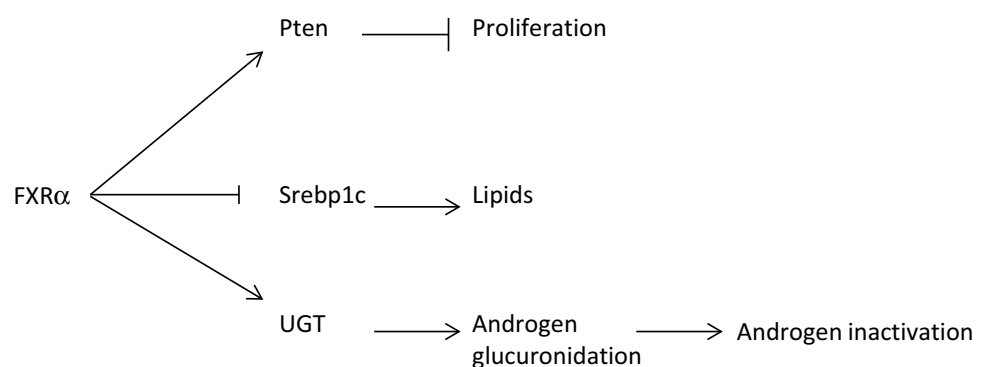
that FXR α signaling pathways will control androgen metabolism in prostate cancer cells. This must be critical since androgens are major regulators of prostate cell growth and physiology [59].

Bile acid signaling, metabolic syndrome and male reproductive tract

It is now well established that the metabolic syndrome (MetS) is associated with defects of male reproductive tract and functions. Indeed, obesity has been demonstrated to increase the risk of reproductive disorders with lower number of motile spermatozoa [60, 61]. In addition, the prevalence of infertility in diabetic men is higher than in normal population [62]. Patients show a lower percentage of motile sperm cells, a higher number of sperm cells with altered mitochondrial function [63] and an increase of DNA fragmentation in spermatozoa [64, 65]. Metabolic syndrome (MetS) is also associated with an increased risk of benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms (LUTS). It has been demonstrated that worse oncologic issues of prostate cancer were associated to MetS. A recently established rabbit model of high-fat diet (HFD)-induced MetS showed hypogonadism and the presence of prostate gland alterations, including inflammation [66].

The possibility to target BA pathways for the cure of metabolic diseases is promising. Indeed, it is associated in experimental models to the improvement of metabolic syndrome parameters (cholesterol, triglycerides and glucose levels). Moreover, in the model of HFD-induced MetS in rabbit, it has been demonstrated that treatment with the FXR α agonist (INT747) counteracted the impact on bladder suggesting that it might be a consequence of MetS improvement [50]. However, INT-747 did not revert the MetS-induced hypogonadal state [67]. Consistently, the data suggest that during treatment of MetS through the use of BA-enriched diet, male mice fertility was additively affected by HFD and BA-die whereas parameters such as cholesterol, triglycerides and glucose levels were improved [68]. Further studies are thus needed to overcome the negative impacts

Fig. 2 Impacts of FXR α signaling pathways on prostate



of BA-signaling pathways before using them safely for the treatment of chronic diseases related to MetS.

Conclusions and perspectives

The reported data highlight the emerging roles of the BA-FXR α signaling pathways in the control of the reproductive tract physiology.

Adult mice fed a diet supplemented with cholic acid showed increases in both plasma and intra-testicular bile acid concentrations associated with subfertility of 25% of the exposed males. It could be expected that this might rely on complex integrated signaling through the whole male physiology. As several organs have been demonstrated to control the physiology of the testis (see Figs. 1 and 3), this raises the question of the origin of the multiple alterations,

which could be either direct impacts on the gonads or indirect effects resulting from systemic disorders.

The liver has been demonstrated to secrete the insulin growth factor-1 and to be involved in the control of testosterone catabolism; two factors that are known to be key for testicular homeostasis. However, recent data suggest that in the context of cholestasis induced by supplementation of bile acids, these parameters do not seem to be essential to drive the deleterious impacts on testicular physiopathology.

It is interesting to note that both plasma and intra-testicular levels of DCA correlate with fertility disorder suggesting that the intestinal microbiota plays a major role in the testicular pathophysiology.

Even if it cannot be excluded that systemic factors are involved in BA-induced testicular disorders in wild mice, they might create a favorable context leading to the increase of bile acid levels and their deleterious impacts within the testis; as sustained by in vitro data on an

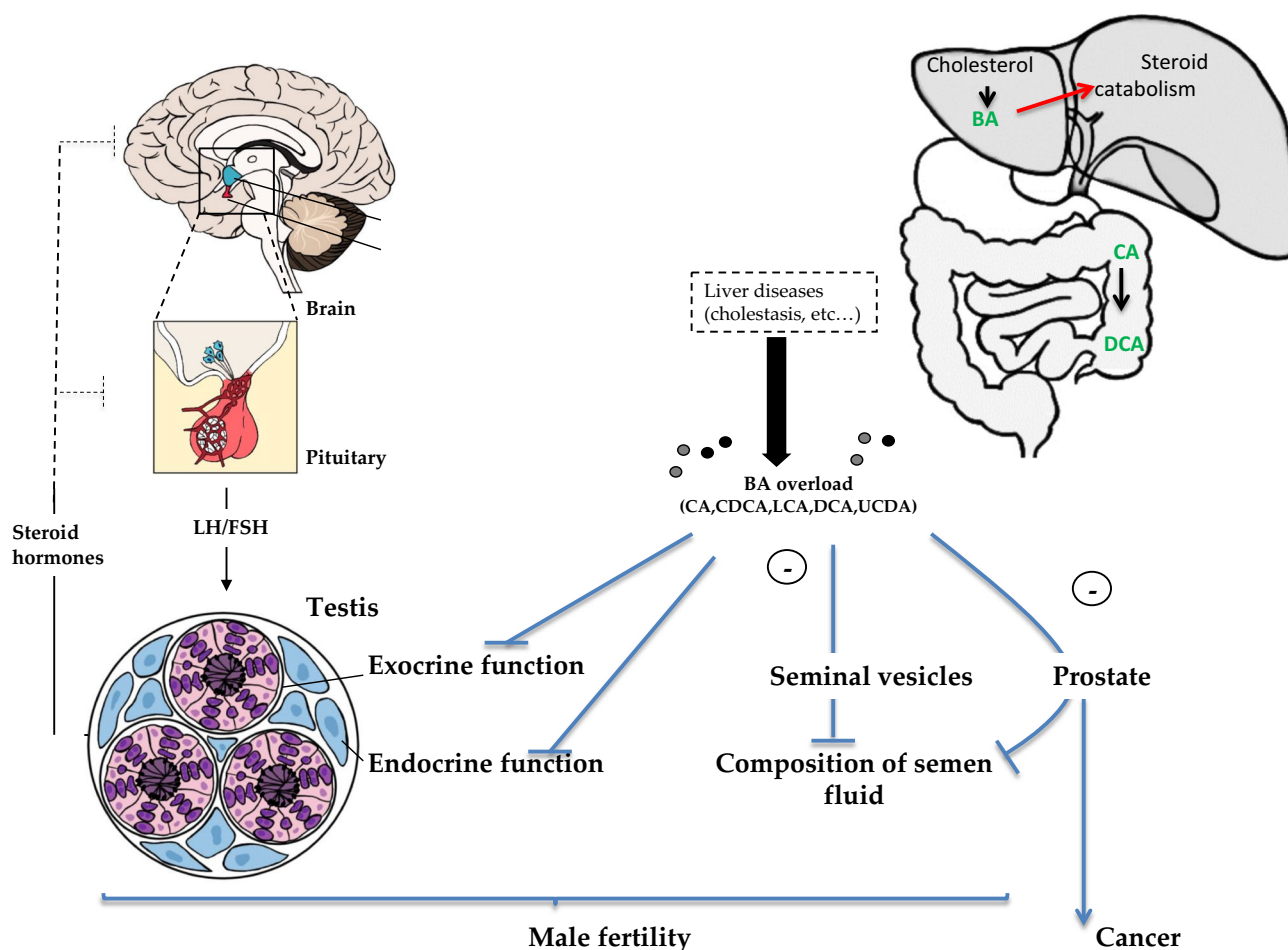


Fig. 3 Integrative model. The impact of liver disorders leading to male fertility disorders and particularly testicular physiology alterations rely on complex integrated signaling through the whole male physiology. The BA will alter the physiology of testis, seminal vesicle

and prostate. Combined these effects might participate in the altered fertility observed during liver disorders. BA increase could also be involved in the etiology of prostate cancer

isolated germ cell line (GC1spg) or Leydig cell line (primary culture and MA10 cell line).

The direct role within the testis is also supported by data showing that in the context of cholestasis, there is a decrease in testosterone synthesis associated with an increase of LH concentrations. It thus demonstrated that it is a primary hypogonadism that must find its origin in testis cells.

In addition, the testicular phenotype of *Fxr α* knockout on testis might not be a secondary effect induced by a disturbed liver function (e.g. via endocrine disruptors or altered hepatic clearance rates). Indeed, if endocrine disruptors or liver disorders are deleterious for male reproductive function, recent works demonstrate that *Fxr α ^{-/-}* males have an efficient reproductive function with the maintenance of fertility through aging compared to wild-type males.

A remaining question is to characterize the physiological ligand(s) of FXR α within the male genital tract. Data showed detectable levels and production of BA within the testis. The question remains whether BA comes from a local synthesis or that they come from the peripheral synthesis (liver and intestine). The Leydig cells, in particular, are the source of a testicular synthesis of bile acids, which is logical since, as steroidogenic cells, they have a large reserve of cholesterol. Within the testis, it could be of interest to measure local BA concentrations in specific cell types to ensure in which kind of cell types, BA could activate their signaling pathways.

In addition, previous reports demonstrate that steroids such as androsterone could be physiological ligands of FXR α and be active at least in vitro to control prostate cell homeostasis.

Moreover, BA receptors could also be modulated by other kinds of molecules. In that line, among the presented data, some of them highlight a new link between FXR α and the increasing question of the environmental origin of diseases. Indeed it must be of interest to better define if FXR α could interfere with the signaling pathways of EMs exhibiting estrogenic properties. Moreover, it will be of interest to screen EMs to define if some of them can act as exogenous ligands of FXR α , and thus define, depending on the age at exposure, whether it will impact the exocrine and/or the exocrine functions of the testis, as well as the development of prostate cancer.

The overall data presented here highlight the necessity to decipher the roles of FXR α in urogenital tract in normal and pathological conditions to define novel approaches to improve male fertility capacities, in particular in the context of environmental exposures. One of the remaining questions is to decipher the precise activity of the BA receptor in the etiology of the urogenital disorders such as puberty delay, as presented above. Extended work on FXR α will also help to define whether it could be defined as targetable pathway

for the treatments of pathologies such as fertility disorders and/or cancers.

Funding The study was funded by Inserm, CNRS, Université Clermont Auvergne, Région Auvergne (#R12087CC to DHV), Plan cancer (C14012CS), Ligue contre le cancer (comité Puy de Dôme), ARC (R16142CC). Volle's team received support from the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare to have no conflict of interests.

References

- Garcia M, Thirouard L, Sedès L et al (2018) Nuclear receptor metabolism of bile acids and xenobiotics: a coordinated detoxification system with impact on health and diseases. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms19113630>
- Baptissart M, Vega A, Martinot E et al (2013) Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell Mol Life Sci CMLS* 70:4511–4526. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1387-0>
- Baptissart M, Vega A, Maqdasy S et al (2012) Bile acids: from digestion to cancers. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.022>
- Carter BA, Taylor OA, Prendergast DR et al (2007) Stigmasterol, a soy lipid-derived phytosterol, is an antagonist of the bile acid nuclear receptor FXR. *Pediatr Res* 62:301–306. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181256492>
- Owsley E, Chiang JYL (2003) Guggulsterone antagonizes farnesoid X receptor induction of bile salt export pump but activates pregnane X receptor to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 304:191–195
- Ricketts M-L, Boekschoten MV, Kreeft AJ et al (2007) The cholesterol-raising factor from coffee beans, cafestol, as an agonist ligand for the farnesoid and pregnane X receptors. *Mol Endocrinol* 21:1603–1616. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0133>
- Everson GT (1987) Steady-state kinetics of serum bile acids in healthy human subjects: single and dual isotope techniques using stable isotopes and mass spectrometry. *J Lipid Res* 28:238–252
- Houten SM, Volle DH, Cummins CL et al (2007) In vivo imaging of farnesoid X receptor activity reveals the ileum as the primary bile acid signaling tissue. *Mol Endocrinol* 21:1312–1323. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0113>
- Maloney PR, Parks DJ, Haffner CD et al (2000) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem* 43:2971–2974
- Teodoro JS, Rolo AP, Palmeira CM (2011) Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 22:458–466. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.07.002>
- Wang H, He Q, Wang G et al (2018) FXR modulators for enterohepatic and metabolic diseases. *Expert Opin Ther Pat* 28:765–782. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1527906>
- Kim I, Morimura K, Shah Y et al (2007) Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28:940–946. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl249>
- Yang F, Huang X, Yi T et al (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 67:863–867. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1078>

14. Van Mil SWC, Milona A, Dixon PH et al (2007) Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* 133:507–516. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.015>
15. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R et al (2016) Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Commun* 7:10713. <https://doi.org/10.1038/ncomms10713>
16. Sèdes L, Martinot E, Baptissart M et al (2017) Bile acids and male fertility: from mouse to human? *Mol Aspects Med*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.05.004>
17. Durazzo M, Premoli A, Di Bisceglie C et al (2006) Alterations of seminal and hormonal parameters: an extrahepatic manifestation of HCV infection? *World J Gastroenterol* 12:3073–3076
18. Mooradian AD, Shamma'a M, Salti I, Cortas N (1985) Hypophysal-gonadal dysfunction in men with non-alcoholic liver cirrhosis. *Andrologia* 17:72–79
19. Burra P (2013) Liver abnormalities and endocrine diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27:553–563. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.06.014>
20. Karagiannis A, Harsoulis F (2005) Gonadal dysfunction in systemic diseases. *Eur J Endocrinol* 152:501–513. <https://doi.org/10.1530/eje.1.01886>
21. Völzke H, Aumann N, Krebs A et al (2010) Hepatic steatosis is associated with low serum testosterone and high serum DHEAS levels in men. *Int J Androl* 33:45–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00953.x>
22. Baptissart M, Vega A, Martinot E et al (2014) Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology* 60:1054–1065. <https://doi.org/10.1002/hep.27204>
23. Martinot E, Baptissart M, Vega A et al (2017) Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXR α . *Sci Rep* 7:42182. <https://doi.org/10.1038/srep42182>
24. Muczynski V, Lecureuil C, Messiaen S et al (2012) Cellular and molecular effect of MEHP involving LXR α in human fetal testis and ovary. *PLoS One* 7:e48266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048266>
25. Maqdasy S, Baptissart M, Vega A et al (2012) Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.011>
26. Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC et al (2007) The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21:303–315. <https://doi.org/10.1101/gad.409307>
27. Baptissart M, Martinot E, Vega A et al (2016) Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153>
28. Martinot E, Sèdes L, Baptissart M et al (2017) The bile acid nuclear receptor FXR α is a critical regulator of mouse germ cell fate. *Stem Cell Rep* 9:315–328. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.036>
29. Alfaro JM, Ricote M, Lobo MVT et al (2002) Immunohistochemical detection of the retinoid acid receptors (RXR- α , - β , - γ) and Farnesoid X-activated receptor (FXR) in the marbled newt along the annual cycle. *Mol Reprod Dev* 62:216–222. <https://doi.org/10.1002/mrd.10104>
30. Bakke M, Zhao L, Hanley NA, Parker KL (2001) SF-1: a critical mediator of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 171:5–7
31. Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K (2004) LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 14:250–260. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.008>
32. Van Thiel DH, Gavaler JS, Zajko AB, Cobb CF (1985) Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4:616–621
33. Vega A, Martinot E, Baptissart M, De Haze A, Saru JP, Baron S, Caira F, Schoonjans K, Lobaccaro JM, Volle DH (2014) Identification of the link between the hypothalamo-pituitary axis and the testicular orphan nuclear receptor NR0B2 in adult male mice. *Endocrinology* 156(2):660–669. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1418>
34. Ahn SW, Gang G-T, Kim YD et al (2013) Insulin directly regulates steroidogenesis via induction of the orphan nuclear receptor DAX-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem* 288:15937–15946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451773>
35. Gray MA, Squires EJ (2013) Effects of nuclear receptor transactivation on steroid hormone synthesis and gene expression in porcine Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 133:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.014>
36. Wang S, Lai K, Moy FJ et al (2006) The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* 147:4025–4033. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1485>
37. Catalano S, Malivindi R, Giordano C et al (2010) Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor leydig cells. *J Biol Chem* 285:5581–5593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052670>
38. Schoeters G, Den Hond E, Dhooge W et al (2008) Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:168–175. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00180.x>
39. Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL (2001) Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Mol Cell Endocrinol* 185:17–25
40. Seminara SB, Achermann JC, Genel M et al (1999) X-linked adrenal hypoplasia congenita: a mutation in DAX1 expands the phenotypic spectrum in males and females. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4501–4509. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.12.6172>
41. Tabarin A, Achermann JC, Recan D et al (2000) A novel mutation in DAX1 causes delayed-onset adrenal insufficiency and incomplete hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 105:321–328. <https://doi.org/10.1172/JCI7212>
42. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M et al (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7:678–693. <https://doi.org/10.1038/nrd2619>
43. Manti S, Romano C, Chirico V et al (2014) Nonalcoholic Fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis in childhood: endocrine-metabolic “mal-programming”. *Hepat Mon* 14:e17641. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.17641>
44. Catalano S, Panza S, Malivindi R et al (2013) Inhibition of Leydig tumor growth by farnesoid X receptor activation: the in vitro and in vivo basis for a novel therapeutic strategy. *Int J Cancer* 132:2237–2247. <https://doi.org/10.1002/ijc.27915>
45. Iwamori N, Iwamori T, Matzuk MM (2013) H3K27 demethylase, JMJD3, regulates fragmentation of spermatogonial cysts. *PLoS One* 8:e72689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072689>
46. Delbès G, Levacher C, Pairault C et al (2004) Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. *Endocrinology* 145:3395–3403. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1479>
47. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A et al (2009) A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature* 460:909–913. <https://doi.org/10.1038/nature08210>
48. Sèdes L, Desdoits-Lethimonier C, Rouaisnel B et al (2018) Crosstalk between BPA and FXR α signaling pathways lead to alterations of undifferentiated germ cell homeostasis and male fertility disorders. *Stem Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.018>
49. Rust C, Wild N, Bernt C et al (2009) Bile acid-induced apoptosis in hepatocytes is caspase-6-dependent. *J Biol Chem* 284:2908–2916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804585200>

50. Malivindi R, Santoro M, De Rose D et al (2018) Activated-farnesoid X receptor (FXR) expressed in human sperm alters its fertilising ability. *Reprod Camb Engl* 156:249–259. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0203>
51. Maeda T, Miyata M, Yotsumoto T et al (2004) Regulation of drug transporters by the farnesoid X receptor in mice. *Mol Pharm* 1:281–289
52. Casals-Casas C, Desvergne B (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73:135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
53. Vega A, Baptissart M, Martinot E et al (2014) Hepatotoxicity induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol is maintained throughout adulthood via the nuclear receptor SHP. *Expert Opin Ther Targets* 18:1367–1376. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.964209>
54. Susiarjo M, Xin F, Stefaniak M et al (2017) Bile acids and tryptophan metabolism are novel pathways involved in metabolic abnormalities in BPA-exposed pregnant mice and male offspring. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00046>
55. Hsu C-W, Zhao J, Huang R et al (2014) Quantitative high-throughput profiling of environmental chemicals and drugs that modulate farnesoid X receptor. *Sci Rep* 4:6437. <https://doi.org/10.1038/srep06437>
56. Slowinska M, Nynca J, Arnold GJ et al (2017) Proteomic identification of turkey (*Meleagris gallopavo*) seminal plasma proteins. *Poult Sci* 96:3422–3435. <https://doi.org/10.3382/ps/pex132>
57. Liu J, Tong S-J, Wang X, Qu L-X (2014) Farnesoid X receptor inhibits LNCaP cell proliferation via the upregulation of PTEN. *Exp Ther Med* 8:1209–1212. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1894>
58. Liu N, Zhao J, Wang J et al (2016) Farnesoid X receptor ligand CDCA suppresses human prostate cancer cells growth by inhibiting lipid metabolism via targeting sterol response element binding protein 1. *Am J Transl Res* 8:5118–5124
59. Kaeding J, Bouchaert E, Bélanger J et al (2008) Activators of the farnesoid X receptor negatively regulate androgen glucuronidation in human prostate cancer LNCAP cells. *Biochem J* 410:245–253. <https://doi.org/10.1042/BJ20071136>
60. Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM et al (2008) Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril* 90:897–904. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.026>
61. Hofny ERM, Ali ME, Abdel-Hafez HZ et al (2010) Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril* 94:581–584. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.085>
62. Wiebe JC, Santana A, Medina-Rodríguez N et al (2014) Fertility is reduced in women and in men with type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium (T1DGC). *Diabetologia* 57:2501–2504. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3376-8>
63. La Vignera S, Condorelli RA, Di Mauro M et al (2015) Reproductive function in male patients with type 1 diabetes mellitus. *Andrology* 3:1082–1087. <https://doi.org/10.1111/andr.12097>
64. Agbaje IM, McVicar CM, Schock BC et al (2008) Increased concentrations of the oxidative DNA adduct 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the germ-line of men with type 1 diabetes. *Reprod Biomed Online* 16:401–409
65. Barták V, Josífko M, Horácková M (1975) Juvenile diabetes and human sperm quality. *Int J Fertil* 20:30–32
66. Morelli A, Comeglio P, Filippi S et al (2012) Testosterone and farnesoid X receptor agonist INT-747 counteract high fat diet-induced bladder alterations in a rabbit model of metabolic syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* 132:80–92. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.02.007>
67. Maneschi E, Morelli A, Filippi S et al (2012) Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements. *J Endocrinol* 215:347–362. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0333>
68. Vega A, Martinot E, Baptissart M et al (2015) Bile acid alters male mouse fertility in metabolic syndrome context. *PLoS One* 10:e0139946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139946>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Review

Nuclear Receptor Metabolism of Bile Acids and Xenobiotics: A Coordinated Detoxification System with Impact on Health and Diseases

Manon Garcia ¹, Laura Thirouard ¹, Lauriane Sedès ¹, Mélusine Monroe ¹, Hélène Holota ¹, Françoise Caira ¹, David H. Volle ^{1,*} and Claude Beaudoin ^{1,2,*} 

¹ Université Clermont Auvergne, GReD, CNRS UMR6293, INSERM U1103, 28, Place Henri Dunant, BP38, F63001 Clermont-Ferrand, France; manon.garcia@uca.fr (M.G.); laura.thirouard@uca.fr (L.T.); lauriansedes@hotmail.fr (L.S.); melusine.monrose@uca.fr (M.M.); helene.holota@uca.fr (H.H.); francoise.caira@uca.fr (F.C.)

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

* Correspondence: david.volle@inserm.fr (D.H.V.); claude.beaudoin@uca.fr (C.B.); Tel.: +33-473-407-415 (D.H.V.); +33-473-405-340 (C.B.); Fax: +33-473-276-132 (D.H.V. & C.B.)

Received: 30 October 2018; Accepted: 14 November 2018; Published: 17 November 2018



Abstract: Structural and functional studies have provided numerous insights over the past years on how members of the nuclear hormone receptor superfamily tightly regulate the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters. Besides the role of the farnesoid X receptor (FXR) in the transcriptional control of bile acid transport and metabolism, this review provides an overview on how this metabolic sensor prevents the accumulation of toxic byproducts derived from endogenous metabolites, as well as of exogenous chemicals, in coordination with the pregnane X receptor (PXR) and the constitutive androstane receptor (CAR). Decrypting this network should provide cues to better understand how these metabolic nuclear receptors participate in physiologic and pathologic processes with potential validation as therapeutic targets in human disabilities and cancers.

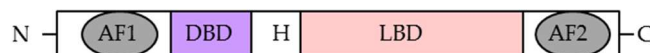
Keywords: FXR; PXR; CAR; bile acids; xenobiotics; metabolism and transport; cancer; drug resistance

1. Introduction

Nuclear receptors (NRs) are ligand-dependent transcription factors that regulate a variety of physiological processes by inducing the transcription of target genes. Among the members of this large NRs superfamily, the metabolic receptors farnesoid X receptor α (FXR α , also known as NR1H4), pregnane X receptor (PXR, called steroid X receptor SXR or NR1I2), and constitutive androstane receptor (CAR, also named NR1I3) have been intensively studied for their ability to regulate energy metabolism by affecting fatty acid, lipid, and glucose homeostasis (for recent reviews, see [1–3]). As sensors of endogenous and exogenous chemicals, these three NRs have also been largely explored for their capacity to regulate the expression of transporters and drug-metabolizing enzymes as adaptive responses to prevent the accumulation of toxic chemicals in the body. Like most others NRs, these receptors have a characteristic modular structure which includes a C-terminal ligand-binding domain (LBD) and a N-terminal highly conserved DNA-binding domain (DBD) that allows them to bind to specific nucleotide consensus sequences, hereafter referred to as *DNA response elements* (Figure 1A). As common (non)permissive heterodomeric partners, retinoid X receptors (RXR $\alpha/\beta/\gamma$, also known as NR2B1/NR2B2/NR2B3) are required for high affinity binding to DNA, and despite the fact that RXR α remains the predominant isotype in many tissues, all three RXR subtypes generally make these NRs

competent for chromatin binding and transcriptional regulation of target gene expression in concert with corepressor complexes or recruited co-activator proteins (Figure 1B and [4,5]).

(A) NR-Schematic domain structure.



(B) Bile acid-mediated NRs gene regulation.

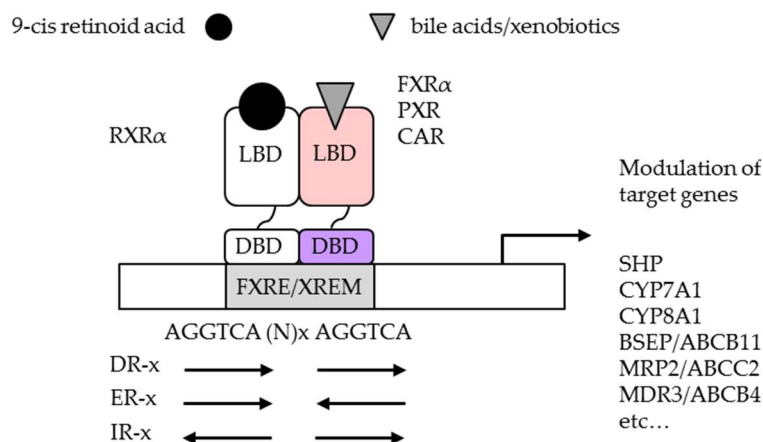


Figure 1. Structural organization and mechanism of action of nuclear receptors. (A) Structural organization of hormone nuclear receptors. AF-1, activation function 1; DBD, DNA binding domain; H, hinge region; LBD, ligand binding domain; AF-2, transactivation function 2. (B) A current model of NR-mediated gene regulation. Bile acid-activated NRs (FXR α , PXR, CAR) act mainly as heterodimers with retinoid X receptor α (RXR α) to regulate gene transcription. FXRE, FXR α response element; XREM, xenobiotic response element; DR, direct repeat; ER, everted repeat; IR, inverted repeat.

The discovery of bile acids, bilirubin, and xenobiotics, including pharmaceutical drugs and environmental pollutants, as specific ligands for these NRs and the assignment of their regulatory function to hepatobiliary transporter genes have given the way to an extensive area of research over recent decades. Subsequently, a rapidly growing number of publications have dealt with the regulatory mechanisms of enterohepatic bile acids (BAs) circulation in health and diseases with a clear emphasize on therapeutical strategies for metabolic disabilities and cancers. The aim of the present review is to describe the most relevant functions of FXR α , PXR, and CAR, with a focus on convergence points of crosstalks that orchestrate detoxification pathways of endogenous and exogenous chemicals that may also adversely affect male reproductive function and increase the risk of developing a testis tumorigenic phenotype accompanied by drug resistance.

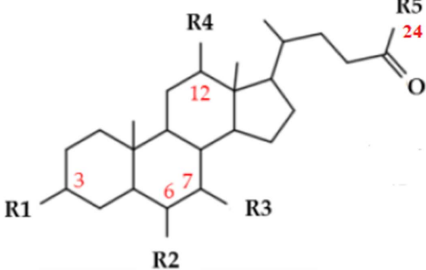
2. Structure-Activity Relationship of Bile Acids and Bile Acid Derivatives in Regards to Sensing Nuclear Receptors

2.1. Bile Acids as Endogenous Ligands for Metabolic Nuclear Receptors

Actively synthesized from cholesterol in the liver, bile acids (BAs) are amphipathic molecules with detergent-like properties that are essential for hepatic bile formation, cholesterol elimination, and the absorption of dietary lipids from the small intestine. In humans, the majority of BA synthesis in the hepatocytes occurs through a classical pathway that is initiated by the rate-limiting enzyme cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1). This major classical (neutral) pathway forms the primary BAs, referred to as cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), following a multistep enzymatic process involving the key sterol 12 α -hydroxylase (CYP8B1) and sterol-27 hydroxylase (CYP27A1) enzymes

respectively. In complement, CYP27A1 initiates an alternative (acidic) pathway of BA synthesis by hydroxylation and oxidation of cholesterol that is further hydroxylated by oxysterol 7 α -hydroxylase (CYP7B1) to CDCA. Shortly after their synthesis, BAs are conjugated to amino acids glycine and taurine to form sodium salts (bile salts), and excreted into the gallbladder, before being released into the intestinal tract where microbial transformations in the gut convert the primary BAs CA and CDCA to corresponding secondary BAs deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA). Most BAs listed in Table 1, including the CDCA-derived α -muricholic acid (α MCA) and β -muricholic acid (β MCA) in mice, are reabsorbed in the ileum and transported back to the liver via the portal vein (recently reviewed in [6]).

Table 1. Chemical structures of the most common bile acids (BAs) and their conjugated forms (with taurine or glycine). The positions of hydroxyl groups, which are responsible for major physicochemical differences among the BA species, are indicated. Cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) are primary BAs. Deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA) are secondary BAs. The hydrophobicity increases as follows: MCA, UDCA, CA, CDCA, DCA, LCA.

Chemical Structures of the Most Common Bile Acids (BAs)	R1 (3-pos)	R2 (6-pos)	R3 (7-pos)	R4 (12-pos)	Bile Acids and BAs Derivatives
	OH	H	OH	OH	Cholic Acid (CA)
	OH	H	OH	H	Chenodeoxycholic Acid (CDCA)
	OH	H	H	OH	Deoxycholic Acid (DCA)
	OH	H	H	H	Lithocholic Acid (LCA)
	OH	OH	OH	H	Muricholic Acid (MCA)
	OH	H	OH	H	Ursodeoxycholic Acid (UDCA)
	C=O	H	H	H	3-Keto LCA
	OH	C=O	H	H	6-Keto LCA
OH	C ₂ H ₅	OH	H	6 α -Ethyl CDCA (6-ECDCA)	
Glyco-conjugated BAs: R5 = NHCH ₂ CO ₂ H	OH	C ₂ H ₅	OH	H	

Adequate concentrations of BAs in the intestinal lumen for digestion and their efficient reabsorption in the terminal ileum ensure the maintenance of circulating BA pools within the enterohepatic circulation. Indeed, BAs undergo enterohepatic circulation, with about 95% being reabsorbed by active transport in the ileal enterocytes and recycled back to the liver through the portal vein for further secretion into the biliary system and gallbladder. In each enterohepatic cycle, hepatocytes must synthesize de novo BAs through a tightly regulated process to replace those that are eliminated in the feces after escaping the ileum. In addition to the well described physicochemical characteristics of these natural detergents in the maintenance of cholesterol homeostasis, biliary excretion of hydrophobic compounds, and intestinal fat absorption, clear evidence also indicates that high or abnormal BA concentrations may become cytotoxic to cells. This is particularly the case for both hepatocytes and enterocytes, as well as for cholangiocytes (biliary epithelial cells), with an increased risk of digestive system diseases including cholestasis and gastrointestinal carcinogenesis (reviewed in [7–9]). Obviously, it turns out that cells exposed to BAs protect themselves too by tightly regulating metabolic integrators and biological processes in order to control BA biosynthesis, metabolism, and transport through ligand activation of NRs including FXR α , and the promiscuous xenobiotic receptors PXR and CAR that respond to a larger variety of structurally-unrelated exogenous compounds [10–13]. In short, CDCA is the most efficacious ligand of FXR α , followed by LCA, DCA, and CA, whereas the secondary BA LCA and its oxidized 3-keto form is the main, if not the only, potent activator of PXR. As with its closest relative PXR, CAR binds a broad variety of structurally diverse molecules counting CA and 6-keto-LCA [14]. In complement to the vitamin D receptor (VDR

also known as NR1I1) and the cell-surface receptor TGR5 (also known as GPBAR1; G-protein coupled bile acid receptor 1), which are outside of the scope of this review [15,16], these three NRs exert their functions as sensors of BA levels, and elicit transcriptional alterations in order to regulate BA homeostasis, as discussed below.

2.2. Molecular Biology of Bile Acid/Xenobiotic Nuclear Receptors

FXR α was the first identified BA-activated nuclear receptor and the most dedicated NR to BA signaling [10]. Two distinct FXR genes (FXR α , NR1H4; FXR β , NR1H5) are evolutionarily conserved between human and rodent; but in contrast to the mouse, FXR β constitutes a pseudogene in human [17,18]. Using alternative promoters and splicing, four functional variants have been described for FXR α (α 1–4), with differences in both tissue- and species-specific expression as well as in ligand-dependent transcriptional activities [19,20]. Largely expressed in tissues engaged in the human enterohepatic circulation, FXR α variants are all present in the small intestine, in contrast to the liver and adrenals, which express mainly FXR α 1 and α 2, while FXR α 3 and α 4 are predominant in the colon and kidney. The situation is slightly different in mouse because liver and small intestine express all variants, whereas kidney and stomach express only FXR α 3 and α 4 [21]. Yet, all forms of FXR α , hereafter referred to as FXR α , function as homeostrophic sensors of BAs and regulate the activity of numerous genes encoding for proteins involved in BA synthesis, transport, conjugation, and excretion. To do so, FXR α binds to a FXR response element (FXRE) as a heterodimer with RXR α , or as a monomer to regulate gene expression. As for the other NRs, two zinc finger motifs allow FXR α to interact with its response element which contains two copies of a consensus AGGTCA-like DNA sequence reiterated directly (DR), inverted (IR), or everted (ER) with various inter half-site spacing (Figure 1B). Even though the FXR α /RXR α heterodimer binds to the consensus IR-1 (IR spaced by 1 base pair) sequence with the highest affinity, this complex also binds to and activates a variety of other FXREs in conjunction with transcriptional co-activators or co-repressors that coordinate either gene activation or repression following post-translational modifications of histones and non-histone proteins. Overviews of FXR α structure, activation, interaction with RXR α , and dynamically-controlled target gene regulation have been published previously [22–25].

In complement, PXR and CAR xenosensors also play important roles in the regulation of BA metabolism and detoxication by inducing genes involved in BA conjugation and transport in order to enhance their elimination [26]. Both NRs, best known for their role in phase I (hydroxylation), phase II (conjugation) and phase III (transport) xenobiotic elimination, are mainly expressed in liver and intestine, where they likely regulate gene expression of ATP-binding cassette (ABC) transporters and of drug-metabolizing enzymes within transcriptionally-permissive RXR α heterodimers [27,28]. In human and mouse, several spliced and polymorphic variants have been described for PXR and CAR, resulting in protein isoforms that could vary in structure-function properties, as well as in either constitutive or ligand-inducible transcriptional capacities (for a complete review, see [27]). Even if these xenobiotic receptors are closely related, their moderately conserved LBD allow them to recognize a wide range of structurally-unrelated endogenous and exogenous ligands [29,30]. This may also reflect the different species ligand-binding properties of PXR and CAR described so far, although it is known that both receptors share ligands that act as dual modulators for the expression of a common set of genes [31–33]. Nevertheless, obligate associations of PXR and CAR with the heterodimeric partner RXR α activate specific DNA sequences that differ from one another by the number of base pairs separating the direct or everted DNA repeats. The best described CAR response elements are the phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM) and the xenobiotic responsive enhancer module (XREM), which are found in the promoter regions of CAR target genes. Because these binding sites are shared with PXR, both NRs co-regulate a subset of their target genes despite the fact that they also separately regulate other specific genes. Inspections of these response elements indicate that both DR-3 and ER-6 type AGGTCA-like binding motifs are typically bound by PXR/RXR heterodimers, in contrast to CAR/RXR, that binds DR-4, DR-5 or ER-8 repeat elements [34]. Despite a lower affinity

for the DNA consensus sequences, monomeric CAR is also described to be competent for docking onto octameric AGAGTTCA DNA motifs and for the interaction with co-activators [35–38]. Owing to their ligand-binding pocket that accommodates molecules of various shapes and sizes, it is not surprising that PXR and CAR regulate an overlapping set of target genes in BA metabolism and elimination following agonistic and antagonistic recruitment of co-activators and co-repressors at XREM regulatory regions of target genes.

2.3. Bile Acid/Xenobiotic Nuclear Receptors Regulation of Bile Acid Synthesis and Transport

One of the key functions of FXR α is to critically regulate BA synthesis and BA enterohepatic circulation. Mice lacking *Fxr* (*Fxr*^{-/-}) were phenotypically normal but showed elevated expression of *Cyp7a1* mRNA and enlarged BA pool sizes [39,40]. By inducing the small heterodimer partner (SHP also known as NR0B2) in liver, FXR α slows down the classical biosynthetic pathway of BAs by reducing expression of *CYP7A1/Cyp7a1* and *CYP8B1/Cyp8b1* gene-encoding enzymes in humans and mice (Figure 2). This occurs in part through dimerization of SHP with liver receptor homolog-1 (LRH-1) and hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) transcription factors, and repression of their binding capacities to *CYP7A1* and *CYP8B1* gene promoters, with an additional inhibitory feedback loop on *SHP* itself [41–44]. In addition, FXR α activation in the intestine stimulates expression and secretion of the fibroblast growth factor 19 (FGF19, FGF15 in rodent models) which binds FGFR4/ β -Klotho receptor complexes on the cell membrane of hepatocytes after trafficking into the enterohepatic circulation [45–47]. This functional gut-liver signaling pathway inhibits expression of *CYP7A1* and *CYP8B1* gene products through extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinase 1/2 (JNK1/2) activation. In complement, experiments with liver- and ileum-specific *Fxr* α -deficient mice (*Fxr* α ^{-/-}) showed that this inhibitory metabolism of BAs dominates over the hepatic negative feedback pathway [48,49].

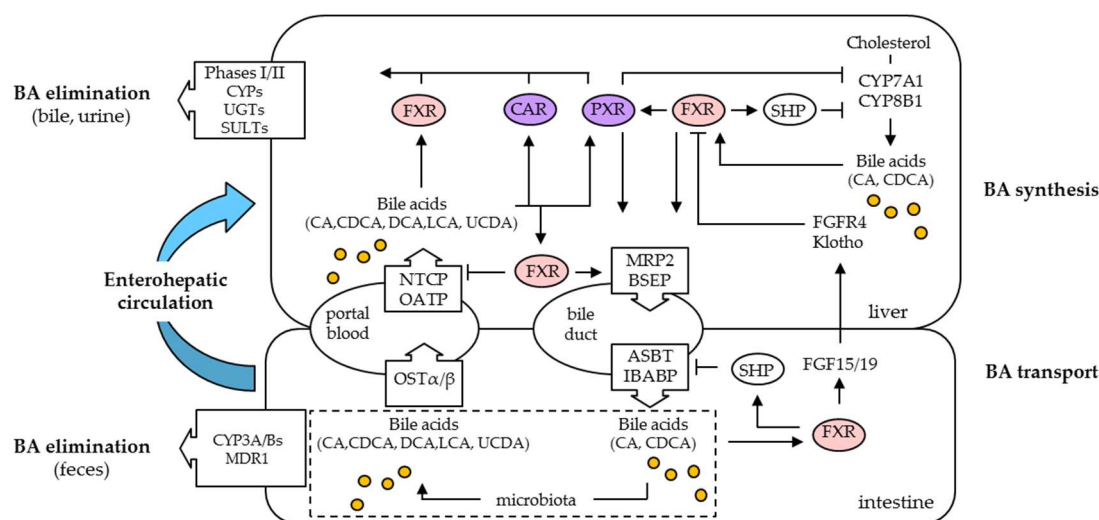


Figure 2. Model of effects of FXR α on bile acid (BA) metabolism. Primary BAs, CA, and CDCA, are generated from cholesterol by liver enzymes, including CYP7A1 and CYP8B1. CA and CDCA are metabolized to DCA and LCA secondary BAs in the intestine. BSEP and MRP2 are localized in the canalicular membrane of hepatocytes and transport BAs into bile. Most BAs are reabsorbed in the intestine and recirculate to the liver through the portal vein in a mechanism called the enterohepatic circulation. BAs that escape reabsorption are excreted in the feces. A portion of secondary BAs enters the enterohepatic circulation from the colon. The transporters ASBT and OST α/β are involved in BA absorption in the intestine. At the basolateral membrane of hepatocytes, NTCP and OATPs uptake BAs from the portal blood. Activated FXR α , PXR, and CAR induce the expression of phases I and II metabolizing enzymes to stimulate urinary and biliary excretion of BAs.

It has also been suggested that PXR and CAR play a role in the regulation of BA synthesis, since PXR has been described as a FXR α target gene, and its ligand activation directly regulates *SHP* expression in the HepG2 human liver cancer cell line and indirectly reduces the expression of *Cyp7a1* in mice [36,50,51]. Moreover, deletion of *CAR* results in a less severe repression of *Cyp7a1* and *Cyp8b1* after bile duct ligation in mice, indicating that *CAR* is partly responsible for this down-regulation when BAs accumulate in high concentrations in the liver [52]. Despite the fact that the protective effect of PXR and *CAR* can be explained to a certain extent by their capacity to regulate BA synthesis genes including *CYP27A1* [53], the most likely protective effects of these xenobiotic sensing NRs seem to come from their crosstalks in the management of a large set of genes that coordinately regulate BA metabolism and transport, as depicted in Figure 2.

Following their synthesis, BAs are secreted into bile, which flows through the bile duct to the intestine. Then, BAs are efficiently absorbed from the intestine, returned to the liver, and resecreted into the bile and the gallbladder in many species. In this enterohepatic circulation, BAs can promote their own biliary elimination by stimulating the hepatic apical bile salt efflux pump (BSEP; ABCB11) and the multidrug resistant-associated protein 2 (MRP2; ABCC2) expression. These two ABC transporters are rate limiting in canalicular excretion of BAs and non BA organic ions. In human and rodent, *BSEP* gene promoters are transcriptionally activated by FXR α [54,55], and mouse *Bsep* baseline-expression largely depends on the presence of this BA-activated NR, since its abundance is reduced in *Fxr α* knockout mice [40,56,57]. In contrast to BSEP, transcriptional regulation of MRP2 involves several overlapping sets of NRs, reflecting the diverse substrate spectrum of MRP2. As a matter of fact, MRP2 can mediate the excretion of a broad range of conjugated BAs and non-BA organics anions, mostly with glucuronidate and sulfate formed by phase II conjugation enzymes in hepatocytes [58]. FXR α binds with high affinity to response elements in the human and rodent *MRP2/Mrp2* promoters that are also shared with *CAR* and *PXR* [59]. Furthermore, FXR α increases the expression of multidrug resistance protein 3 (MDR3; ABCB4), which secretes phospholipids into the bile canaliculi, thereby promoting the formation of mixed micelles and decreasing toxicity of BAs [60]. While BAs are excreted into canalicular bile under normal conditions, most conjugated BAs are actively reabsorbed in the ileum by an apical, sodium-dependent bile salt transporter (ASBT, SLC10A2, IBAT) located on the apical side of enterocytes. In the small intestine, FXR α increases ASBT, which is important for the reabsorption of BAs from the intestinal lumen, as well as ileal bile acid binding-protein (IBABP) and organic solute transporter α/β (OST α/β), which are both important for the transcellular transport of BAs [61–63]. Absorbed BAs are then transported back into portal blood by the sodium-dependent bile acid transporter (NTCP; SLC10A1) and a family of multi-specific organic anion transporters (OATPs; SLC21A) that mediate sodium-independent uptake of conjugated or unconjugated BAs, as well as bilirubin in the liver [64,65]. Regulation of *NTCP* by BAs is complex, and differs considerably among human and rodent [66]. Negative feedback inhibition of mouse and rat *Ntcp* is mediated by both FXR α /SHP-dependent and -independent mechanisms and limits hepatocellular BA uptake [67]. Similar to *NTCP*, FXR α represses *OATP1B1* through *SHP* and *HNF4 α* and inhibits the predominant sodium-independent BA uptake system in human [68]. In contrast, *OATP1B3*, a multi-specific uptake system for organic anions, xenobiotics, and potentially BAs, is positively trans-activated by FXR α [69]. An alternative low level efflux of BAs into the systemic blood through the sinusoidal membrane also takes place, and is mediated by several transporters including OST α/β , MRP3/ABCC3 and MRP4/ABCC4 [70,71]. Induction of both rodent *Mrp3* and *Mrp4* seems to be independent of FXR α , while both *PXR* and *CAR* are able to induce either *MRP3/Mrp3* or *MRP4/Mrp4* expression in human and rodent [56,72–74]. Collectively, a complex picture emerges where FXR α , *PXR*, and *CAR* are required to coordinate synthesis and enterohepatic cycling of BAs.

2.4. Regulation of Bile Acid Metabolism and Elimination by Bile Acid/Xenobiotic Nuclear Receptors

The formation of BA-conjugated metabolites was recognized early as a mechanism of BA deposition in human and other species. Shortly after their synthesis, BAs are conjugated to amino acids

glycine and taurine to increase their solubility in water and to reduce their cytotoxicity [75]. Over the years, FXR α was shown not only as an essential regulator of BA conjugation enzymes such as bile acid CoA synthase (BACS) and bile acid CoA amino acid *N*-acetyltransferase (BAAT) [76,77], but also as an important factor of BA detoxification processes, since BA-activated FXR α induces *cytochrome P4503A4* (*CYP3A4*) expression and phase I hydroxylation reactions [78]. Other NRs, including PXR and CAR, have been demonstrated to activate *CYP3A4* [79–82]; besides this most characterized mechanism of gene regulation, these xenobiotic sensors are further involved in the regulation of phase II enzymes including uridine diphospho-glucuronosyltransferases (UGT), sulfotransferases (SULT) and glutathione-S-transferases (GST) [83,84]. By conjugating hydrophilic groups, UGTs, SULTs, and GSTs increase the water solubility of BAs. In human, positive regulation of *SULT2A1* gene expression by FXR α and PXR appears to play a central role in regulating BA sulfation in conjunction with CAR that is proposed to orchestrate BA sulfation and their ensuing export by the CAR-induced MRP4 basolateral export pump [56,85–87]. In addition to sulfation, BAs can also be detoxified through glucuronidation by the UDP-glucuronosyltransferases UGT2B4, UGT2B7, and UGT1A3, that renders BAs more water soluble and facilitates their renal elimination [88–90]. This combined hydroxylation/glucuronidation detoxification pathway can also be stimulated by PXR and CAR in human after UGT1A1 transcriptional activation, while BAs can modulate both UGT2B4 and UGT2B7 expression through FXR α [88,89,91]. Together with both PXR- and CAR-mediated BA metabolism, the FXR α -induced repression of basolateral uptake by NTCP and OATP, in combination with the increased expression of gene encoding proteins involved in BA detoxification (*CYP3A4*, UGT2Bs, *SULT2A1*) and in membrane transport (BSEP, MRP2/3, MRD3, OST α/β), help to promote excretion and elimination of conjugated BAs [92,93]. It is now becoming apparent that xenobiotic receptors crosstalk with FXR α to move the metabolized and conjugated BAs and their potentially toxic metabolites into the body's excretory pathways via the kidney or the bile, with impact, in some disease states, that emphasizes drug targeting of BA and xenobiotic-sensing NRs in precision medicine.

3. Modulation of Bile Acid/Xenobiotic Receptors for Therapeutic Applications

3.1. Modulators of Bile Acid and Xenobiotic-Sensing Nuclear Receptors

Research in the past decades has established that FXR α , along with PXR and CAR, have a crucial role in regulating all aspects of BA metabolism, and the availability of natural and non-steroidal synthetic ligands has provided important insights into the mechanisms by which NRs for BAs and xenobiotics control many diverse metabolic pathways, including glucose homeostasis and lipid metabolism. Due to broad spectrum activity and synergistic effects of these three NRs, identification of small molecules selectively targeting these receptors still represents a prolific area of research, with a large number of ligands being published in the last years and highlighted in recent comprehensive literature summaries [14,94–97]. Despite the large variety of ligands reported, so far, based on evidence from cell lines and mouse models, only the most widely-used natural and synthetic BA/xenobiotic NR ligands will be mentioned here.

Farnesol, which is a metabolite intermediate of the mevalonate biosynthetic pathway, was the first common natural FXR α ligand identified, but its weak agonist activity impedes its use [98]. Oxysterol-22(*R*)-hydroxy cholesterol, androsterone as well as 26- or 25-hydroxylated BA metabolites and poly-unsaturated fatty acids (arachidonic acid and docosahexaenoic acid) were also reported to act as weak FXR α ligands [24]. As mentioned previously, BAs exhibit distinct potencies to activate FXR α , with CDCA being the most active natural human FXR α activator, followed by DCA and LCA, but the poor selectivity of these endogenous BAs encourages the development of new synthetic and non-synthetic ligands with improved selectivity for FXR α in order to dissociate FXR α -dependent and -independent pathways. To do so, the CDCA high-affinity FXR α ligand has been subjected to intense medicinal chemistry modifications, producing several steroidal derivatives in order to generate more specific FXR α modulators which are devoid off-target effects [99,100]. Among them, the semi-synthetic

BA analogue 6-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDA, also known as INT-747, obeticholic acid, or Ocaliva/OCA) was shown to be a very potent and selective agonist in an FXR α transactivating assay, and it has become an alternative agonist to the most widely-used GW4064 FXR α ligand due to the cell-toxic effect and poor intestinal absorption of this latest non-steroidal synthetic agonist [101–103]. Although GW4064 has been extensively used as a molecular tool to study FXR α functions in vitro and in vivo, it was not developed further because of its liabilities, that included poor pharmacokinetic properties and the presence of the potentially toxic stilbene moiety. Many attempts to overcome these problems in combination with crystallographic studies and virtual screening campaigns have given rise to several series of derivatives, and recent progress has been made with high-affinity binding and agonist activity of structurally-diverse, natural (epigallocatechin-3-gallate, cafestol) or (semi)synthetic (GSK2324; WAY-36245; AGN29; PX20606) molecules toward FXR α . In contrast, only a limited number of FXR α antagonists (guggulsterone, stigmaterol, AGN31, AGN34) have been described in the literature [104,105]. While these latter compounds may be useful pharmacological tools to extend the understanding of FXR α functions, complementary studies are required to further validate the potency of these agents as clinic therapeutic modulators of FXR α in human disabilities.

Besides LCA, that is one of a few described natural ligands for PXR, a wide range of structurally-unrelated, endogenous and exogenous ligands were shown to selectively bind to the PXR of different species. In fact, the most well-known PXR agonists include the pharmaceutical drug rifampicin (RIF), which strongly binds to human PXR but not to mouse PXR, and the synthetic anti-glucocorticoid pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN), that activates PXR in rodent (mouse and rat) but has no effect on human PXR [32]. These species' selectivity in ligand-induced activation rely on clear differences into the LBD amino acid sequences of human and mouse PXR, and authorize a commensurate number of foreign compounds to occupy the large binding pocket of this receptor. This allows PXR orthologs to be activated not only by a plethora of prescription drugs (rifampicin, ketoconazole, dexametasone, acetaminophen), chemotherapeutics (cyclophosphamide, paclitaxel, taxol), steroids (progesterone, ethinylestradiol), and nutritional compounds (flavonoids), but also by a variety of environmental contaminants such as bisphenol analogs (BPA), polychlorinated biphenyls (PCBs), diethylhexyl phthalates (DHEP), and organochloride pesticides (trans-nonachlor, chlordane). Comprehensive lists of compounds affecting the biological activity of human and rodent PXR have already been presented in references [14,27,95], with an overlap in the endogenous and exogenous compounds that bind to CAR variants and orthologs.

In contrast to FXR α and PXR, CAR has been initially described as a constitutively-active NR in the absence of any activating ligand, but it has since been reported to be regulated by many endobiotics, including steroids (androstanes, estrogens, and progestins) and BA metabolites. Also, clinical drugs, pesticides, food-derived flavonoids, and alcohol-derived polyphenols are efficient CAR modulators (reviewed in [106]), establishing CAR as a critical effector of xenobiotic function and cellular toxicity. Multiple compounds with direct or indirect effects on CAR-dependent gene regulation have been discovered, but few are selective for CAR specifically, as most also bind to PXR [27,95]. Still, phenobarbital (PB) is the most potent known indirect activator of CAR that causes the receptor to undergo nuclear translocation, and exerts transcriptional activity after binding PBREM without interacting with the ligand binding domain of CAR [107]. This results from inhibition of the epidermal growth factor (EGF) receptor signaling pathway by PB, and later, CAR dephosphorylation, that activates nuclear translocation and transcriptional activity of the receptor, as reported for more recently-investigated diet flavonoids [108]. In addition, CAR activation can also be mediated by direct activators according to its remarkable species selectivity for ligand binding and activation profile. The potent ligand activators TCPOBOP (1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)])benzene and CITCO (6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime) behave as direct and specific agonists for the mouse and human CAR receptors respectively [109,110]. In both cases, direct ligand-dependent activation of CAR seems to rely on the nuclear translocation step, whereby once inside the nucleus, ligand-bound CAR adopts a conformation similar to that of

the constitutively-active CAR, and maintains transcriptional activity. Interestingly, the constitutive activity of CAR can be reversed, likely by a class of compounds known as inverse agonists which derive from androstane metabolites. By promoting association of weak corepressor complexes following displacement of coactivator proteins, androstanol (5α -androst- 3α -ol) and androstenol (5α -androst- 16 -en- 3α -ol) reverse constitutive ligand-independent activity of mouse CAR [111–113]. A panel of structurally-diverse small molecules has been reported as being human CAR inverse agonists [114], providing novel insights into the nature of CAR regulation and function under specific physiologic or pathologic conditions, as briefly addressed in the following section.

3.2. Potential Clinical Use of Bile Acid and Xenobiotic Nuclear Receptor Modulators

Initial studies performed more than fifty years ago revealed that BAs act as key agents for cholesterol solubilization and removal out of the body, and for maintaining the driving force for bile flow. On the basis of these observations, oral administration of CDCA was thus used to dissolve cholesterol-gallstones in disease patients, but was replaced later by its more hydrophilic 7-epimer derivative, ursodeoxycholic acid (UDCA or Ursodiol), in order to reduce biliary cirrhosis and hepatotoxicity [115–117]. In contrast to CDCA, which is the most active natural human FXR α activator, UDCA, which is a naturally-occurring secondary BA in human, is devoid of any activity on FXR α in transactivating assay, even if it is reported to act as a weak PXR agonist [14,118]. Yet, UDCA and its 24-nor-UDCA synthetic analog are used to enhance impaired bile flow and excretion of BAs or others potentially toxic biliary constituents in patients with cholestatic liver diseases, due to mechanical obstruction of bile ducts attributable to tumors and gallstones, or even to metabolic disorders in BA formation and transport consecutive to hereditary genetic defects, pregnancy, or medication [103]. Repression of *Cyp7a1* and modification of the BA export pumps *Bsep* (*Abcb11*) and *Mrp2* (*Abcc2*) have been reported in animal models treated with UDCA, and likely explain its choleric effect that relies on complex signaling networks (reviewed in [119,120]). Indeed, UDCA was not only demonstrated to improve cholestasis by reducing BA uptake and synthesis, but also by stimulating hepatocellular and biliary ductular export and elimination, making it attractive as a first-line treatment for a multitude of other cholestatic injuries, including primary biliary cirrhosis (PBC), primary sclerosing cholangitis (PSC), intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP), and progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC). However, the limited efficacy of UDCA in these cholestatic conditions has given rise to demand for the development of novel therapeutic approaches, including BA derivatives and other FXR α agonists. Indeed, experimental studies using animal models mimicking cholestatic liver injuries (bile duct ligation, genetic engineering, BA feeding) have strongly contributed to highlighting the complex interplay of BA and bilirubin-activated NRs (mainly FXR α , PXR and CAR) that orchestrates an adaptive response when intrahepatic and systemic BA levels rise (for reviews, see references [121,122]).

Due to its role in repressing BA uptake transporters (i.e., NTCP and ASBT) and inducing BA export pumps (i.e., BSEP, MRP2, and OST α/β) along with suppression of BA synthesis (i.e., CYP7A1), FXR α activation represents another line of developed anticholestatic strategies, with (semi)synthetic steroidal (6-ECDCA) and non-steroidal FXR α agonists (fexaramine, GW4064, PX20606) being actually investigated in (pre)clinical trials. Moreover, induction of CYP3A4, SULT2A1, and UGT2Bs, along with stimulation of biliary excretion through MDR3 (ABCB4), may also enhance BA detoxification and counteract cholesterol-gallstone after FXR α activation. Therefore, it has come as no surprise that the high affinity 6-ECDCA FXR α ligand was able to restore reduced bile flow and improve cholestasis in several preclinical animal models of cholestasis [102,123], as well as in patients with PBC [124]. According to both animal studies and clinical trials, it was noted that besides cholestasis, the FXR α agonist 6-ECDCA has also shown promise in treating metabolic disorders such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and type 2 diabetes mellitus (T2DM), which is in agreement with earlier described functions of FXR α in the regulation of lipid metabolism and glucose homeostasis [125–127].

Additionally, PXR and CAR activators have also been broadly studied, and some of them (e.g., RIF, PB) are actually tested clinically in liver diseases to activate BA transporters and detoxification systems [128–130]. The importance of these two NR xenosensors in the adaptive response to toxic BAs and other compounds that accumulate in the liver has been demonstrated in numerous knockout rodent models. For example, Pxr knockout mice are more susceptible to liver injuries caused by LCA treatment or bile duct ligation than wild-type mice and the activation of Pxr by PCN reduced toxic BA-induced liver injuries in wild-type mice, but not in Pxr knockout mice [51,52,131]. Moreover, data from studies on *Fxr*^{-/-}*Pxr*^{-/-} double knockout mice showed enhanced toxicity in response to BAs. Of note, CAR activation by PB or TCPOBOP when both *Fxr* α and Pxr are lost protected mice from BA-induced cytotoxicity by increasing expression of hepatic genes involved in BA metabolism and transport [132]. This beneficial role of CAR in the protection against hepatotoxic LCA is likely attributed to the induction of phase I and II enzymes (Cyp3a4, Ugt1a1), as well as efflux transporters (Mrp2), in these cholestatic animal models [52,132,133]. Although PXR and CAR were first identified as xenobiotic receptors, a body of evidence is now surfacing which indicates equally important roles for these receptors in endobiotic homeostasis [74]. As a whole, PXR and CAR appear to cooperate with FXR α for protection against endobiotic and xenobiotic toxicity, making these NRs interesting targets for therapeutical approaches in the treatment of metabolic disorders, although their role beyond being BA/xenobiotic NRs need to be expanded to include their effects on health and diseases, while minimizing adverse diet-drug or drug-drug interactions (DDIs) in patients with chronic diseases.

The occurrence of these unwanted DDIs further complicates the modulation of FXR α , PXR, and CAR in patients affected with cancers, because these NRs are major transcriptional regulators of drug-metabolizing enzymes with clinical consequences that generally decrease therapeutic efficacy, and occasionally increase drug toxicity. Early work of De Gottari et al. suggested that FXR α loss would contribute to tumorigenesis of colorectal cancer in human, and supports the view that BAs are likely carcinogens in human and rodent [134,135]. In this view, mice lacking *Fxr* α with impaired BA homeostasis spontaneously develop hepatocellular carcinomas, and treatment with the bile salts sequestrant cholestyramine reduces tumor incidence [136]. In addition, target disruption of the *Fxr* α in the intestine enhances tumor formation rate in mice, and further supports the existence of a causative link between high BA concentrations and gastrointestinal cancer [137]. Therefore, activation of *Fxr* α by non BA ligands was proposed as an attractive strategy to protect against liver and intestinal carcinogenesis, but the mechanism by which FXR α suppresses carcinogenesis remains to be investigated, since FXR α agonists have also been reported to enhance chemoresistance in colon and liver cells [138,139]. This mechanism possibly involves increased expression of gene implicated in drug metabolism and transport to inactivate and export the anticancer drug out of expressing cells with an impact on chemotherapy outcome. A similar theme plays out for PXR and CAR, and their crosstalks not only gained increased attention for the treatment of metabolic diseases, but they have also revealed context-specific effects of PXR and CAR activation in treating cancers [94,95,140–142]. Owing to the roles of PXR in promoting cell growth, chemoresistance, and malignancy, PXR antagonists are of potential therapeutic interest for malignant diseases [143,144]. Indeed, developing selective natural (ET-743, sulforaphane, coumestrol) and synthetic (ketoconazole and its derivatives) PXR antagonists appears to be a reasonable approach for managing PXR-related adverse DDIs and cancer drug resistance [94]. Regarding CAR, its function is less clear in the maintenance and the development of chemoresistance. On the one hand, PB and TCPOBOP promote the development of hepatocellular carcinoma in rodent models, and it is thus accepted that CAR activators may act as cancer promoters in mice, but not in human, although some reports suggest that chemotherapeutic efficacy may be increased upon CAR activation [145,146]. On the other hand, CAR regulates the expression of efflux pump transporters for eliminating anticancer agents, and is thus suspected to play a major role in the development of chemoresistance [147]. Indeed, before considering human CAR as a therapeutic target for cancer, extensive investigation into the functioning of the receptor in human needs to be performed. In light of these studies, the differential effects of these NRs in different cancer tissues might in part

due to different variants that exhibit differential expression, ligand binding affinity, and transcriptional activity. It is also possible that polymorphisms and post-translational modifications contribute to the differential roles of these BA/xenobiotic-activated NRs in human cancers. Therefore, the development of effective and selective compounds for each receptor, based on the signaling pathway and disease they are involved in, is crucial for validating FXR α , PXR, or CAR as clinically-relevant, disease-related therapeutic targets, in order to minimize side-effects and improve efficacy.

4. Bile Acid/Xenobiotic Nuclear Receptors in Testis: Protection from Toxicity or Obstacle to Chemotherapy?

Pharmacological modulations of BA transporters and their regulatory NRs have significantly contributed to the development of novel treatment strategies for several hepatobiliary disorders, including cholestasis, gallstones, and fatty liver diseases. In addition, clinical and experimental data indicate that enhanced bile flow by the secondary BA UCDA might produce other beneficial effects by preventing hypogonadism in patients with long-standing cholestasis and alleviating reproductive system alterations, as shown in male rat with chronic cholestasis induced by permanent common bile duct ligation [148,149]. These positive effects of UCDA suggest that unbalanced BA levels might be deleterious to both endocrine and exocrine functions of the testes, and have warranted numerous studies that have highlighted a significant link between BA metabolism and male fertility disorders. Firstly, feeding CA during pubertal age reduces testosterone concentrations and increases germ cell apoptosis, impairing fertility in adult mice [150,151]. Prevention of germinal cell apoptosis by testosterone indicates that the steroidogenic function of Leydig cells is likely impaired in these mice, in agreement with previous studies which reported that agonist activation of Fxr α reduces testicular steroid metabolism through down-regulation of steroidogenic genes including *Star*, *Cyp11a1*, and *3 β -Hsd* [152]. Secondly, BA-sensing NRs including FXR α , PXR, and CAR are expressed in both human and mouse testis [153,154], and a specific panel of conjugated and unconjugated BAs including the BA intermediates dihydroxycholestanoic acid (DHCA) and trihydroxycholestanoic acid (THCA) have been reported in this tissue in mice [155]. The physiological relevance of these BA/xenobiotic, NRs-dependent signaling pathways in the gonadal function and its regulation remain elusive, but the increased number of undifferentiated germinal cells found in conjunction with the extended reproductive longevity in male mice lacking Fxr α underscores the need to address the mechanisms underlying these effects [156]. One would expect that FXR α might also crosstalk with other NRs such as CAR, since impaired spermatogenesis due to the higher germ cell apoptosis observed in Fxr α ^{-/-} male mice fed CA-supplemented diet is reversed by co-administration of the CAR agonist TCPOBOP, while the CAR inverse agonist androstanol can reproduce these defects in wild-type mice after two weeks of treatment [155]. Moreover, the recent demonstration that the FXR α antagonist stigmaterol can modulate the adverse events of the common environmental chemical bisphenol A (BPA) on testis development and spermatogenesis is questionable, since natural ligands of FXR α with antagonist properties might dramatically accelerate germ cell loss by external factors, including environmental toxicants, leading to reduced fertility (Figure 3 and [157]).

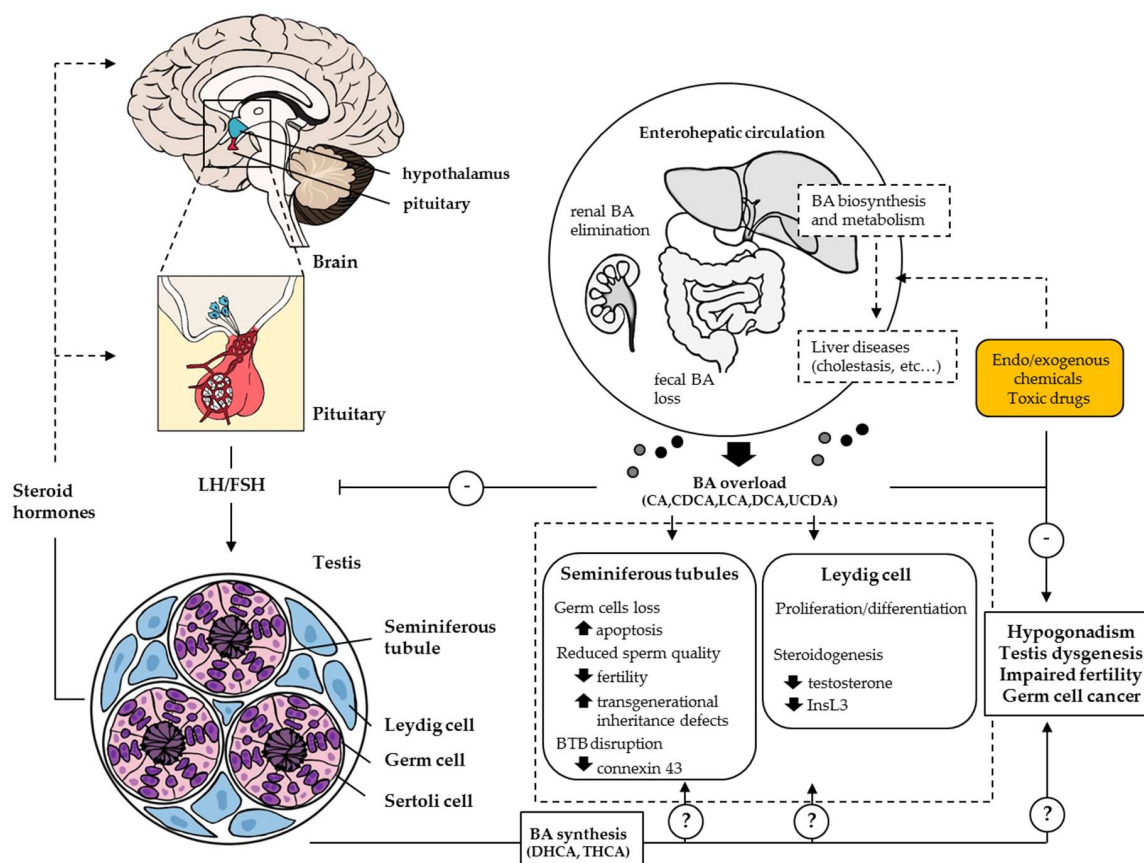


Figure 3. Overview of reproductive disorders linked to disturbance in BA homeostasis. Disturbance in BA homeostasis within the enterohepatic cycle results in hypogonadism with reduced androgens synthesis in the testis. Under normal conditions, BAs that escape the enterohepatic circulation are excreted in urine and feces, but BA overload due to impaired bile flow or xenobiotic/drug-induced liver cytotoxicity can cause a variety of fertility disorders. High BA levels reduce steroidogenesis in Leydig cells and disrupt the BTB, leading to enhanced germ cell degeneration with an impact on reproductive functions. In mouse, BA synthesis also takes place in the testis where germ cells develop from the tubule wall toward the central lumen (modified from [158,159]).

Additional aspects should also be considered when evaluating the roles of BA and xenobiotic-regulated signaling networks in male fertility outcomes because numerous drug transporters in the testis have been described [160]. Although these protein transporters are best studied in cancer cells, the cellular distribution of efflux and influx pumps in Sertoli and germ cells confers an exclusive microenvironment at the apical compartment near the blood-testis barrier (BTB) for meiosis and postmeiotic spermatid development upon spermiogenesis, with the renewal of undifferentiated spermatogonial stem cells and their mitotic proliferation taking place outside of the BTB at the basal compartment. By regulating the expression of drug transporters, all three NRs (FXR α , PXR, and CAR) can moderate the passage of BAs and BA-derived metabolites, as well as of environmental chemicals across the seminiferous epithelium to safeguard meiosis and spermiogenesis that occur in the apical compartment [160,161]. Therefore, FXR α , PXR, or CAR-specific ligands might potentially modulate the expression of drug transporters, suggesting the direct involvement of these NRs in controlling the entry of endogenous and exogenous molecules (into intratubular Sertoli and germ cells) through uptake transporters, or their elimination throughout efflux pumps. Moreover, BA-induced down-regulation of adhesion proteins like N-cadherin and connexin 43 (CX43) was shown to alter the BTB, leading to its disruption [162], making way for more BAs to access the apical compartment and to induce male reproductive dysfunctions by amplifying germ cell degeneration. As observed for male rat fed high-fat diets [163], it cannot be excluded that BA overload causes

persistent alteration in the male germ cell epigenome with an impact on offspring, in accordance with recent studies that have reported generational inheritance of metabolic defects in the offspring of CA-fed fathers [164,165]. Unbiased whole-genome approaches should help to address how BAs code transgenerationally-inherited traits, and complementary studies are still needed to tease out the complex relationship between BAs, their receptors, and male germ cell-derived epigenetic inheritance. This is a main issue to tackle since it would contribute to determining the mechanisms of germline-dependent transmission for epigenetic information, as already noted for other environmental contaminants (bisphenol analogs, phthalates, and organochloride pesticides) that recapitulate some BA-induced injuries by acting as endocrine-disrupting compounds (EDC) and demonstrate a trend of increasing testicular germ cell cancer (TGCC) [166].

In this context, the normal function of the BTB is to protect germinal cells against the infiltration of harmful toxicants that can disrupt spermatogenesis. Also, it can act as an obstacle to chemotherapy by impeding the delivery of chemotherapeutic drugs to the testis by pumping unwanted drugs out to avoid harmful effects. From an oncological view, the regulation of ABC transporters (MDR1, BCRP and MRP1) and OATP membrane transport proteins by BA/xenobiotic-activated NRs at the human BTB might interfere with the ability of systemic chemotherapy to successfully treat germ cell cancers within the testis [160,167,168]. The concentration of BAs and their metabolites should thus be carefully assessed as well in patients undergoing cytotoxic chemotherapy with cholestasis, since accumulation of BAs resulting from impaired bile flow may activate mechanisms of tumor cell resistance to chemotherapy through the regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters. Although the increasing incidence of testicular germ cell cancers (TGCC) is, for the most part, still unexplained, exposure to endogenous toxicants and environmental contaminants has been suggested as one possibility, albeit with only limited evidence. In addition, other disorders of male reproductive development such as impaired testosterone production, low spermatozoa count, and infertility in adulthood are also associated with increased risk of TGCC [169,170]. It is thus tempting to speculate about the different forms of clinical presentations of drug-induced liver injury in malignant transformation by prolonged exposure to BAs in the testis with an impact on reproductive functions and chemotherapy outcome.

5. Conclusions

The studies described herein depict a comprehensive overview that focuses on the organized actions of BA and xenobiotic sensing NRs in regulating various physiological processes in addition to drug metabolism and disposition. In this context, examples of crosstalks reveal that signaling pathways controlling xenobiotic/drug metabolism are closely embedded within regulatory networks governing BA homeostasis. Understanding the mechanisms that modulate BA synthesis and transport under (patho)physiologic conditions thus represents a very challenging issue for the improvement of therapeutic approaches for liver diseases with imbalanced bile flow. Within enterohepatic circulation, BAs exert numerous functions, like facilitating intestinal lipid absorption, clearance of potentially toxic molecules, and control of energy metabolism. Moreover, the differential roles of FXR α , PXR, and CAR in cancers suggest that several mechanisms may be involved in BA/xenobiotic NRs-mediated tumor growth or chemotherapeutic response. Mechanistic studies will be critical to thoroughly understanding the role of these NRs in tumor progression or suppression, as well as in chemoresistance or chemosensitivity. A comprehensive investigation of these BA and xenobiotic NRs is also needed to establish how these three sensing NRs might contribute, in different isoforms and alternative spliced variants, to the regulation of male germ cell proliferation and differentiation with an impact on fertility and TGCC incidence. As a first step, a specific pool of BA intermediates has been characterized in the testis, indicating the possibility that BAs might affect testis development and spermatogenesis, as supported in mice treated with Fxr α agonists which display testis alterations, increased spermatogonial germ cells degeneration, and reduced fertility. In addition, an increasing number of reports indicate that FXR α and both xenosensors PXR and CAR have an extensive presence

in testes, suggesting a possible role of these receptors in the protection of germ cells against the adverse effects of toxic BA byproducts or environmental contaminants such as bisphenol analogs, phthalates, and organochloride pesticides. Discriminating the participation of FXR α , PXR, and CAR in reproduction requires consideration of their interactions with specific ligands, as well as their crosstalks in the coordination of endobiotic- and xenobiotic-detoxification systems. Decrypting the contribution of BA and xenobiotic NRs, and their interactions in health and diseases, will advance the development and expand the utilization of targeted small molecules to cure human metabolic disabilities. Still, there are too few studies of this nature on the testis, and more research is needed to better understand how BAs and xenobiotics can impact their development and function.

Author Contributions: All the authors listed made substantial, direct, and intellectual contributions to the work and approve it for publication.

Funding: This work was granted by the French National Center for Scientific Research (CNRS), the Clermont Auvergne University (UCA), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the French League Against Cancer (Puy-de-Dôme committee), the ARC Foundation (R16142CC), the Auvergne Young Investigator program (R12087CC), the InCa/INSERM Cancer-Environment research program (C14012CS) and the French Government IDEX-ISITE initiative CAP 20-25 (16-IDEX-0001). M.G. is holder of a studentship from the French Foundation for Medical Research (FRM). L.T. and M.M. are fellows of the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (MESRI).

Acknowledgments: We would like to thank previous lab members who have contributed to the cited works. The authors are very grateful to Simon Beaudoin for helping with graphical arts.

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

Abbreviations

6-ECDCA	6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (obeticholic acid)
ABC	ATP-binding cassette transporter
ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
BA	bile acid
BAAT	bile acid CoA amino acid <i>N</i> -acetyltransferase
BACS	bile acid CoA synthase
BPA	bisphenol A
BSEP	bile salt export pump
BTB	blood-testis barrier
CA	cholic acid
CAR	constitutive androstane receptor
CDCA	chenodeoxycholic acid
CITCO	6-(4-chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3]thiazole-5-carbaldehyde-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxime
Cx43	connexin 43
CYP	cytochrome P450
DBD	DNA-binding domain
DCA	deoxycholic acid
DDI	drug-drug interaction
DHCA	dihydroxycholestanic acid
DHEP	diethylhexylphthalate
DNA	desoxyribonucleic acid
DR	direct repeat
ER	everted repeat
EGF	epidermal growth factor
ERK1/2	extracellular signal-regulated protein kinase 1/2
FGF	fibroblast growth factor
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4
FXR	farnesoid X receptor

FXRE	FXR response element
GPBAR1	G-protein coupled bile acid receptor 1
GST	glutathione S transferase
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α
IBABP	ileal bile acid binding-protein
IBAT	ileal bile acid transporter
ICP	intrahepatic cholestasis of pregnancy
IR	inverted repeat
JNK1/2	c-Jun N-terminal kinase 1/2
LBD	ligand-binding domain
LCA	lithocholic acid
LRH-1	liver receptor homolog-1
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NR	nuclear receptor
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	organic anion transporting polypeptide
OST α/β	organic solute transporter α/β
PB	phenobarbital
PBC	primary biliary cirrhosis
PBREM	phenobarbital-responsive enhancer module
PCN	pregnenolone 16 α -carbonitrile
PFIC	progressive familial intrahepatic cholestasis
PLB	polychlorinated biphenyls
PXR	pregnane X receptor
RIF	rifampicine
RXR	retinoid X receptor
SHP	small heterodimer partner
SULT2A1	sulfotransferase 2A1
TCPOBOP	1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene
THCA	trihydroxycholestanic acid
TGCC	testicular germ cell cancer
UDCA	ursodeoxycholic acid
UGT2	uridine diphospho-glucuronosyltransferase family2
XREM	xenobiotic responsive enhancer module

References

1. Lefebvre, P.; Cariou, B.; Lien, F.; Kuipers, F.; Staels, B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 147–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Li, T.; Chiang, J.Y. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 948–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Wada, T.; Gao, J.; Xie, W. PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 273–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. De Cosmo, S.; Mazzocchi, G. Retinoid X Receptors Intersect the Molecular Clockwork in the Regulation of Liver Metabolism. *Front. Endocrinol.* **2017**, *8*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lefebvre, P.; Benomar, Y.; Staels, B. Retinoid X receptors: Common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 676–683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chiang, J.Y.L. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res.* **2017**, *1*, 3–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bernstein, H.; Bernstein, C.; Payne, C.M.; Dvorakova, K.; Garewal, H. Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat. Res.* **2005**, *589*, 47–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Claudel, T.; Zollner, G.; Wagner, M.; Trauner, M. Role of nuclear receptors for bile acid metabolism, bile secretion, cholestasis, and gallstone disease. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 867–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Wang, X.; Fu, X.; Van Ness, C.; Meng, Z.; Ma, X.; Huang, W. Bile Acid Receptors and Liver Cancer. *Curr. Pathobiol. Rep.* **2013**, *1*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Makishima, M.; Okamoto, A.Y.; Repa, J.J.; Tu, H.; Learned, R.M.; Luk, A.; Hull, M.V.; Lustig, K.D.; Mangelsdorf, D.J.; Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **1999**, *284*, 1362–1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Parks, D.J.; Blanchard, S.G.; Bledsoe, R.K.; Chandra, G.; Consler, T.G.; Kliewer, S.A.; Stimmel, J.B.; Willson, T.M.; Zavacki, A.M.; Moore, D.D.; et al. Bile acids: Natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **1999**, *284*, 1365–1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wang, H.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L.C.; Forman, B.M. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* **1999**, *3*, 543–553. [[CrossRef](#)]
13. Willson, T.M.; Kliewer, S.A. PXR, CAR and drug metabolism. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 259–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Schaap, F.G.; Trauner, M.; Jansen, P.L. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 55–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kawamata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Harada, M.; Yoshida, H.; Miwa, M.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Itoh, T.; Shintani, Y.; et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9435–9440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Makishima, M.; Lu, T.T.; Xie, W.; Whitfield, G.K.; Domoto, H.; Evans, R.M.; Haussler, M.R.; Mangelsdorf, D.J. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* **2002**, *296*, 1313–1316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cai, S.Y.; Xiong, L.; Wray, C.G.; Ballatori, N.; Boyer, J.L. The farnesoid X receptor FXRalpha/NR1H4 acquired ligand specificity for bile salts late in vertebrate evolution. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *293*, R1400–R1409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Otte, K.; Kranz, H.; Kober, I.; Thompson, P.; Hofer, M.; Haubold, B.; Rimmel, B.; Voss, H.; Kaiser, C.; Albers, M.; et al. Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 864–872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Vaquero, J.; Monte, M.J.; Dominguez, M.; Muntane, J.; Marin, J.J. Differential activation of the human farnesoid X receptor depends on the pattern of expressed isoforms and the bile acid pool composition. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 926–939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Zhang, Y.; Kast-Woelbern, H.R.; Edwards, P.A. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 104–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Huber, R.M.; Murphy, K.; Miao, B.; Link, J.R.; Cunningham, M.R.; Rugar, M.J.; Gunyuzlu, P.L.; Haws, T.F.; Kassam, A.; Powell, F.; et al. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* **2002**, *290*, 35–43. [[CrossRef](#)]
22. Hollman, D.A.; Milona, A.; van Erpecum, K.J.; van Mil, S.W. Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: Insights into molecular mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 1443–1452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kemper, J.K. Regulation of FXR transcriptional activity in health and disease: Emerging roles of FXR cofactors and post-translational modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1812*, 842–850. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shaik, F.B.; Prasad, D.V.; Narala, V.R. Role of farnesoid X receptor in inflammation and resolution. *Inflamm. Res.* **2015**, *64*, 9–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zheng, W.; Lu, Y.; Tian, S.; Ma, F.; Wei, Y.; Xu, S.; Li, Y. Structural insights into the heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 12535–12541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Li, T.; Chiang, J.Y. Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab. Rev.* **2013**, *45*, 145–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Di Masi, A.; De Marinis, E.; Ascenzi, P.; Marino, M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol. Aspects Med.* **2009**, *30*, 297–343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Evans, R.M.; Mangelsdorf, D.J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157*, 255–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ekins, S.; Mirny, L.; Schuetz, E.G. A ligand-based approach to understanding selectivity of nuclear hormone receptors PXR, CAR, FXR, LXRA, and LXRB. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1788–1800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Wallace, B.D.; Redinbo, M.R. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: A structural perspective. *Drug Metab. Rev.* **2013**, *45*, 79–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Maglich, J.M.; Stoltz, C.M.; Goodwin, B.; Hawkins-Brown, D.; Moore, J.T.; Kliewer, S.A. Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 638–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Moore, L.B.; Parks, D.J.; Jones, S.A.; Bledsoe, R.K.; Consler, T.G.; Stimmel, J.B.; Goodwin, B.; Liddle, C.; Blanchard, S.G.; Willson, T.M.; et al. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15122–15127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Timsit, Y.E.; Negishi, M. CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **2007**, *72*, 231–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Omiecinski, C.J.; Vanden Heuvel, J.P.; Perdew, G.H.; Peters, J.M. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120* (Suppl. 1), S49–S75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Frank, C.; Gonzalez, M.M.; Oinonen, C.; Dunlop, T.W.; Carlberg, C. Characterization of DNA complexes formed by the nuclear receptor constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 43299–43310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Frank, C.; Makkonen, H.; Dunlop, T.W.; Matilainen, M.; Vaisanen, S.; Carlberg, C. Identification of pregnane X receptor binding sites in the regulatory regions of genes involved in bile acid homeostasis. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 505–519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Suino, K.; Peng, L.; Reynolds, R.; Li, Y.; Cha, J.Y.; Repa, J.J.; Kliewer, S.A.; Xu, H.E. The nuclear xenobiotic receptor CAR: Structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 893–905. [[PubMed](#)]
38. Watkins, R.E.; Wisely, G.B.; Moore, L.B.; Collins, J.L.; Lambert, M.H.; Williams, S.P.; Willson, T.M.; Kliewer, S.A.; Redinbo, M.R. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: Structural determinants of directed promiscuity. *Science* **2001**, *292*, 2329–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kok, T.; Hulzebos, C.V.; Wolters, H.; Havinga, R.; Agellon, L.B.; Stellaard, F.; Shan, B.; Schwarz, M.; Kuipers, F. Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: Efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41930–41937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sinal, C.J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J.M.; Lambert, G.; Gonzalez, F.J. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* **2000**, *102*, 731–744. [[CrossRef](#)]
41. Del Castillo-Olivares, A.; Campos, J.A.; Pandak, W.M.; Gil, G. The role of alpha1-fetoprotein transcription factor/LRH-1 in bile acid biosynthesis: A known nuclear receptor activator that can act as a suppressor of bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16813–16821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Goodwin, B.; Jones, S.A.; Price, R.R.; Watson, M.A.; McKee, D.D.; Moore, L.B.; Galardi, C.; Wilson, J.G.; Lewis, M.C.; Roth, M.E.; et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 517–526. [[CrossRef](#)]
43. Lu, T.T.; Makishima, M.; Repa, J.J.; Schoonjans, K.; Kerr, T.A.; Auwerx, J.; Mangelsdorf, D.J. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 507–515. [[CrossRef](#)]
44. Zhang, M.; Chiang, J.Y. Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): Roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41690–41699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Holt, J.A.; Luo, G.; Billin, A.N.; Bisi, J.; McNeill, Y.Y.; Kozarsky, K.F.; Donahee, M.; Wang, D.Y.; Mansfield, T.A.; Kliewer, S.A.; et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1581–1591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kong, B.; Wang, L.; Chiang, J.Y.; Zhang, Y.; Klaassen, C.D.; Guo, G.L. Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology* **2012**, *56*, 1034–1043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Song, K.H.; Li, T.; Owsley, E.; Strom, S.; Chiang, J.Y. Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7alpha-hydroxylase gene expression. *Hepatology* **2009**, *49*, 297–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Inagaki, T.; Choi, M.; Moschetta, A.; Peng, L.; Cummins, C.L.; McDonald, J.G.; Luo, G.; Jones, S.A.; Goodwin, B.; Richardson, J.A.; et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2005**, *2*, 217–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Kim, I.; Ahn, S.H.; Inagaki, T.; Choi, M.; Ito, S.; Guo, G.L.; Kliewer, S.A.; Gonzalez, F.J. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 2664–2672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Jung, D.; Mangelsdorf, D.J.; Meyer, U.A. Pregnane X receptor is a target of farnesoid X. receptor. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 19081–19091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Staudinger, J.L.; Goodwin, B.; Jones, S.A.; Hawkins-Brown, D.; MacKenzie, K.I.; LaTour, A.; Liu, Y.; Klaassen, C.D.; Brown, K.K.; Reinhard, J.; et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3369–3374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Stedman, C.A.; Liddle, C.; Coulter, S.A.; Sonoda, J.; Alvarez, J.G.; Moore, D.D.; Evans, R.M.; Downes, M. Nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor ameliorate cholestatic liver injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 2063–2068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Li, T.; Chen, W.; Chiang, J.Y. PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine. *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 373–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ananthanarayanan, M.; Balasubramanian, N.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D.J.; Suchy, F.J. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28857–28865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Plass, J.R.; Mol, O.; Heegsma, J.; Geuken, M.; Faber, K.N.; Jansen, P.L.; Muller, M. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* **2002**, *35*, 589–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wagner, M.; Fickert, P.; Zollner, G.; Fuchsbichler, A.; Silbert, D.; Tsybrovskyy, O.; Zatloukal, K.; Guo, G.L.; Schuetz, J.D.; Gonzalez, F.J.; et al. Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* **2003**, *125*, 825–838. [[CrossRef](#)]
57. Zollner, G.; Fickert, P.; Fuchsbichler, A.; Silbert, D.; Wagner, M.; Arbeiter, S.; Gonzalez, F.J.; Marschall, H.U.; Zatloukal, K.; Denk, H.; et al. Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J. Hepatol.* **2003**, *39*, 480–488. [[CrossRef](#)]
58. Keppler, D.; Konig, J. Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Semin. Liver Dis.* **2000**, *20*, 265–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Kast, H.R.; Goodwin, B.; Tarr, P.T.; Jones, S.A.; Anisfeld, A.M.; Stoltz, C.M.; Tontonoz, P.; Kliewer, S.; Willson, T.M.; Edwards, P.A. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X. receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 2908–2915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Huang, L.; Zhao, A.; Lew, J.L.; Zhang, T.; Hrywna, Y.; Thompson, J.R.; de Pedro, N.; Royo, I.; Blevins, R.A.; Pelaez, F.; et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 51085–51090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Calkin, A.C.; Tontonoz, P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 213–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Neimark, E.; Chen, F.; Li, X.; Shneider, B.L. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* **2004**, *40*, 149–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Zollner, G.; Wagner, M.; Moustafa, T.; Fickert, P.; Silbert, D.; Gumhold, J.; Fuchsbichler, A.; Halilbasic, E.; Denk, H.; Marschall, H.U.; et al. Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: Role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *290*, G923–G932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Suchy, F.J.; Ananthanarayanan, M. Bile salt excretory pump: Biology and pathobiology. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2006**, *43* (Suppl. 1), S10–S16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Trauner, M.; Boyer, J.L. Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 633–671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Jung, D.; Hagenbuch, B.; Fried, M.; Meier, P.J.; Kullak-Ublick, G.A. Role of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors in regulating the human, mouse, and rat NTCP gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2004**, *286*, G752–G761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Zollner, G.; Fickert, P.; Silbert, D.; Fuchsbichler, A.; Stumptner, C.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. Induction of short heterodimer partner 1 precedes downregulation of Ntcp in bile duct-ligated mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2002**, *282*, G184–G191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Zollner, G.; Marschall, H.U.; Wagner, M.; Trauner, M. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: Pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol. Pharm.* **2006**, *3*, 231–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jung, D.; Podvinec, M.; Meyer, U.A.; Mangelsdorf, D.J.; Fried, M.; Meier, P.J.; Kullak-Ublick, G.A. Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* **2002**, *122*, 1954–1966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ballatori, N.; Christian, W.V.; Lee, J.Y.; Dawson, P.A.; Soroka, C.J.; Boyer, J.L.; Madejczyk, M.S.; Li, N. OSTalpha-OSTbeta: A major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* **2005**, *42*, 1270–1279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Zelcer, N.; van de Wetering, K.; de Waart, R.; Scheffer, G.L.; Marschall, H.U.; Wielinga, P.R.; Kuil, A.; Kunne, C.; Smith, A.; van der Valk, M.; et al. Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *J. Hepatol.* **2006**, *44*, 768–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Maher, J.M.; Cheng, X.; Slitt, A.L.; Dieter, M.Z.; Klaassen, C.D. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 956–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Teng, S.; Jekerle, V.; Piquette-Miller, M. Induction of ABCC3 (MRP3) by pregnane X receptor activators. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 1296–1299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhang, J.; Huang, W.; Qatanani, M.; Evans, R.M.; Moore, D.D. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49517–49522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Falany, C.N.; Johnson, M.R.; Barnes, S.; Diasio, R.B. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19375–19379. [[PubMed](#)]
76. Pircher, P.C.; Kitto, J.L.; Petrowski, M.L.; Tangirala, R.K.; Bischoff, E.D.; Schulman, I.G.; Westin, S.K. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27703–27711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Solaas, K.; Ulvestad, A.; Soreide, O.; Kase, B.F. Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: A key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1154–1162. [[PubMed](#)]
78. Handschin, C.; Meyer, U.A. Induction of drug metabolism: The role of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 649–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Chen, J.; Zhao, K.N.; Chen, C. The role of CYP3A4 in the biotransformation of bile acids and therapeutic implication for cholestasis. *Ann. Transl. Med.* **2014**, *2*, 7. [[PubMed](#)]
80. Gnerre, C.; Blattler, S.; Kaufmann, M.R.; Looser, R.; Meyer, U.A. Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: Evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* **2004**, *14*, 635–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Goodwin, B.; Hodgson, E.; D’Costa, D.J.; Robertson, G.R.; Liddle, C. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 359–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Xie, W.; Radominska-Pandya, A.; Shi, Y.; Simon, C.M.; Nelson, M.C.; Ong, E.S.; Waxman, D.J.; Evans, R.M. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3375–3380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Xu, C.; Li, C.Y.; Kong, A.N. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 249–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zhou, J.; Zhang, J.; Xie, W. Xenobiotic nuclear receptor-mediated regulation of UDP-glucuronosyltransferases. *Curr. Drug Metab.* **2005**, *6*, 289–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Assem, M.; Schuetz, E.G.; Leggas, M.; Sun, D.; Yasuda, K.; Reid, G.; Zelcer, N.; Adachi, M.; Strom, S.; Evans, R.M.; et al. Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 22250–22257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Makishima, M. Nuclear receptors as targets for drug development: Regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, *97*, 177–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Sonoda, J.; Xie, W.; Rosenfeld, J.M.; Barwick, J.L.; Guzelian, P.S.; Evans, R.M. Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13801–13816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

88. Barbier, O.; Torra, I.P.; Sirvent, A.; Claudel, T.; Blanquart, C.; Duran-Sandoval, D.; Kuipers, F.; Kosykh, V.; Fruchart, J.C.; Staels, B. FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: A potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* **2003**, *124*, 1926–1940. [[CrossRef](#)]
89. Lu, Y.; Heydel, J.M.; Li, X.; Bratton, S.; Lindblom, T.; Radominska-Pandya, A. Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: A potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 937–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Trottier, J.; Verreault, M.; Grepper, S.; Monte, D.; Belanger, J.; Kaeding, J.; Caron, P.; Inaba, T.T.; Barbier, O. Human UDP-glucuronosyltransferase (UGT)1A3 enzyme conjugates chenodeoxycholic acid in the liver. *Hepatology* **2006**, *44*, 1158–1170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Sugatani, J.; Nishitani, S.; Yamakawa, K.; Yoshinari, K.; Sueyoshi, T.; Negishi, M.; Miwa, M. Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression: Activated glucocorticoid receptor enhances constitutive androstane receptor/pregnane X receptor-mediated UDP-glucuronosyltransferase 1A1 regulation with glucocorticoid receptor-interacting protein 1. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 845–855. [[PubMed](#)]
92. Staudinger, J.L.; Madan, A.; Carol, K.M.; Parkinson, A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 523–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Wagner, M.; Halilbasic, E.; Marschall, H.U.; Zollner, G.; Fickert, P.; Langner, C.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology* **2005**, *42*, 420–430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Chai, S.C.; Cherian, M.T.; Wang, Y.M.; Chen, T. Small-molecule modulators of PXR and CAR. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1859*, 1141–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Cherian, M.T.; Chai, S.C.; Chen, T. Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2015**, *11*, 1099–1114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Diao, Y.; Jiang, J.; Zhang, S.; Li, S.; Shan, L.; Huang, J.; Zhang, W.; Li, H. Discovery of Natural Products as Novel and Potent FXR Antagonists by Virtual Screening. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Hiebl, V.; Ladurner, A.; Latkolik, S.; Dirsch, V.M. Natural products as modulators of the nuclear receptors and metabolic sensors LXR, FXR and RXR. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 1657–1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Forman, B.M.; Goode, E.; Chen, J.; Oro, A.E.; Bradley, D.J.; Perlmann, T.; Noonan, D.J.; Burka, L.T.; McMorris, T.; Lamph, W.W.; et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **1995**, *81*, 687–693. [[CrossRef](#)]
99. Carotti, A.; Marinozzi, M.; Custodi, C.; Cerra, B.; Pellicciari, R.; Gioiello, A.; Macchiarulo, A. Beyond bile acids: Targeting Farnesoid X Receptor (FXR) with natural and synthetic ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2129–2142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Sepe, V.; Festa, C.; Renga, B.; Carino, A.; Cipriani, S.; Finamore, C.; Masullo, D.; Del Gaudio, F.; Monti, M.C.; Fiorucci, S.; et al. Insights on FXR selective modulation. Speculation on bile acid chemical space in the discovery of potent and selective agonists. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19008. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Maloney, P.R.; Parks, D.J.; Haffner, C.D.; Fivush, A.M.; Chandra, G.; Plunket, K.D.; Creech, K.L.; Moore, L.B.; Wilson, J.G.; Lewis, M.C.; et al. Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2971–2974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P.R.; Morelli, A.; Parks, D.J.; Willson, T.M. 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3569–3572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Sepe, V.; Distrutti, E.; Fiorucci, S.; Zampella, A. Farnesoid X receptor modulators 2014-present: A patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2018**, *28*, 351–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Massafra, V.; Pellicciari, R.; Gioiello, A.; van Mil, S.W.C. Progress and challenges of selective Farnesoid X Receptor modulation. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *191*, 162–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Matsubara, T.; Li, F.; Gonzalez, F.J. FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2013**, *368*, 17–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Molnar, F.; Kublbeck, J.; Jyrkkarinne, J.; Prantner, V.; Honkakoski, P. An update on the constitutive androstane receptor (CAR). *Drug Metabol. Drug Interact.* **2015**, *28*, 79–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Mutoh, S.; Sobhany, M.; Moore, R.; Perera, L.; Pedersen, L.; Sueyoshi, T.; Negishi, M. Phenobarbital indirectly activates the constitutive active androstane receptor (CAR) by inhibition of epidermal growth factor receptor signaling. *Sci. Signal* **2013**, *6*, ra31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

108. Carazo Fernandez, A.; Smutny, T.; Hyrsova, L.; Berka, K.; Pavek, P. Chrysin, baicalein and galangin are indirect activators of the human constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicol. Lett.* **2015**, *233*, 68–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Maglich, J.M.; Parks, D.J.; Moore, L.B.; Collins, J.L.; Goodwin, B.; Billin, A.N.; Stoltz, C.A.; Kliewer, S.A.; Lambert, M.H.; Willson, T.M.; et al. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17277–17283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Tzamelis, I.; Pissios, P.; Schuetz, E.G.; Moore, D.D. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 2951–2958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Dussault, I.; Lin, M.; Hollister, K.; Fan, M.; Termini, J.; Sherman, M.A.; Forman, B.M. A structural model of the constitutive androstane receptor defines novel interactions that mediate ligand-independent activity. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 5270–5280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Forman, B.M.; Tzamelis, I.; Choi, H.S.; Chen, J.; Simha, D.; Seol, W.; Evans, R.M.; Moore, D.D. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* **1998**, *395*, 612–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Shan, L.; Vincent, J.; Brunzelle, J.S.; Dussault, I.; Lin, M.; Ianculescu, I.; Sherman, M.A.; Forman, B.M.; Fernandez, E.J. Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androstenol: A molecular basis for inverse agonism. *Mol. Cell* **2004**, *16*, 907–917. [[PubMed](#)]
114. Lin, W.; Yang, L.; Chai, S.C.; Lu, Y.; Chen, T. Development of CINPA1 analogs as novel and potent inverse agonists of constitutive androstane receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 505–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Hofmann, A.F.; Roda, A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: An overview of the problem. *J. Lipid Res.* **1984**, *25*, 1477–1489. [[PubMed](#)]
116. Lioudaki, E.; Ganotakis, E.S.; Mikhailidis, D.P. Lipid lowering drugs and gallstones: A therapeutic option? *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3622–3631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Makino, I.; Shinozaki, K.; Yoshino, K.; Nakagawa, S. [Dissolution of cholesterol gallstones by long-term administration of ursodeoxycholic acid]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **1975**, *72*, 690–702. [[PubMed](#)]
118. Sepe, V.; Renga, B.; Festa, C.; D'Amore, C.; Masullo, D.; Cipriani, S.; Di Leva, F.S.; Monti, M.C.; Novellino, E.; Limongelli, V.; et al. Modification on ursodeoxycholic acid (UDCA) scaffold. discovery of bile acid derivatives as selective agonists of cell-surface G-protein coupled bile acid receptor 1 (GP-BAR1). *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7687–7701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Beuers, U.; Trauner, M.; Jansen, P.; Poupon, R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: From UDCA to FXR, PXR and beyond. *J. Hepatol.* **2015**, *62* (Suppl. 1), S25–S37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Reardon, J.; Hussaini, T.; Alshafi, M.; Azalgarra, V.M.; Erb, S.R.; Partovi, N.; Yoshida, E.M. Ursodeoxycholic Acid in Treatment of Non-cholestatic Liver Diseases: A Systematic Review. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2016**, *4*, 192–205. [[PubMed](#)]
121. Wagner, M.; Zollner, G.; Trauner, M. Nuclear receptor regulation of the adaptive response of bile acid transporters in cholestasis. *Semin. Liver Dis.* **2010**, *30*, 160–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Zollner, G.; Wagner, M.; Trauner, M. Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *126*, 228–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Fiorucci, S.; Clerici, C.; Antonelli, E.; Orlandi, S.; Goodwin, B.; Sadeghpour, B.M.; Sabatino, G.; Russo, G.; Castellani, D.; Willson, T.M.; et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 604–612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Nevens, F.; Andreone, P.; Mazzella, G.; Strasser, S.I.; Bowlus, C.; Invernizzi, P.; Drenth, J.P.; Pockros, P.J.; Regula, J.; Beuers, U.; et al. A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 631–643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Mudaliar, S.; Henry, R.R.; Sanyal, A.J.; Morrow, L.; Marschall, H.U.; Kipnes, M.; Adorini, L.; Sciacca, C.I.; Clopton, P.; Castelloe, E.; et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 574–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

126. Neuschwander-Tetri, B.A.; Loomba, R.; Sanyal, A.J.; Lavine, J.E.; Van Natta, M.L.; Abdelmalek, M.F.; Chalasani, N.; Dasarathy, S.; Diehl, A.M.; Hameed, B.; et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): A multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **2015**, *385*, 956–965. [[CrossRef](#)]
127. Gadaleta, R.M.; Cariello, M.; Sabba, C.; Moschetta, A. Tissue-specific actions of FXR in metabolism and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 30–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Yang, K.; Kock, K.; Sedykh, A.; Tropsha, A.; Brouwer, K.L. An updated review on drug-induced cholestasis: Mechanisms and investigation of physicochemical properties and pharmacokinetic parameters. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *102*, 3037–3057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Gonzalez, R.; Cruz, A.; Ferrin, G.; Lopez-Cillero, P.; Briceno, J.; Gomez, M.A.; Rufian, S.; Padillo, J.; De la Mata, M.; Marin, J.J.; et al. Cytoprotective properties of rifampicin are related to the regulation of detoxification system and bile acid transporter expression during hepatocellular injury induced by hydrophobic bile acids. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* **2011**, *18*, 740–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Lewis, T.; Kuye, S.; Sherman, A. Ursodeoxycholic acid versus phenobarbital for cholestasis in the Neonatal Intensive Care Unit. *BMC Pediatr.* **2018**, *18*, 197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Teng, S.; Piquette-Miller, M. Hepatoprotective role of PXR activation and MRP3 in cholic acid-induced cholestasis. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 367–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Guo, G.L.; Lambert, G.; Negishi, M.; Ward, J.M.; Brewer, H.B., Jr.; Kliewer, S.A.; Gonzalez, F.J.; Sinal, C.J. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45062–45071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Beilke, L.D.; Aleksunes, L.M.; Holland, R.D.; Besselsen, D.G.; Beger, R.D.; Klaassen, C.D.; Cherrington, N.J. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 1035–1045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. De Gottardi, A.; Touri, F.; Maurer, C.A.; Perez, A.; Maurhofer, O.; Ventre, G.; Bentzen, C.L.; Niesor, E.J.; Dufour, J.F. The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer. *Dig. Dis. Sci.* **2004**, *49*, 982–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Jansen, P.L. Endogenous bile acids as carcinogens. *J. Hepatol.* **2007**, *47*, 434–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Yang, F.; Huang, X.; Yi, T.; Yen, Y.; Moore, D.D.; Huang, W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 863–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Maran, R.R.; Thomas, A.; Roth, M.; Sheng, Z.; Esterly, N.; Pinson, D.; Gao, X.; Zhang, Y.; Ganapathy, V.; Gonzalez, F.J.; et al. Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 469–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Herraes, E.; Gonzalez-Sanchez, E.; Vaquero, J.; Romero, M.R.; Serrano, M.A.; Marin, J.J.; Briz, O. Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR-dependent and FXR-independent up-regulation of ABC proteins. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2565–2576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Vaquero, J.; Briz, O.; Herraes, E.; Muntane, J.; Marin, J.J. Activation of the nuclear receptor FXR enhances hepatocyte chemoprotection and liver tumor chemoresistance against genotoxic compounds. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 2212–2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Banerjee, M.; Robbins, D.; Chen, T. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR in human diseases. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 618–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Tolson, A.H.; Wang, H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 1238–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Gao, J.; Xie, W. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 552–558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Chen, Y.; Tang, Y.; Guo, C.; Wang, J.; Boral, D.; Nie, D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1112–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Mani, S.; Dou, W.; Redinbo, M.R. PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* **2013**, *45*, 60–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

145. Elcombe, C.R.; Peffer, R.C.; Wolf, D.C.; Bailey, J.; Bars, R.; Bell, D.; Cattley, R.C.; Ferguson, S.S.; Geter, D.; Goetz, A.; et al. Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: A case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator. *Crit. Rev. Toxicol.* **2014**, *44*, 64–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Wang, D.; Li, L.; Yang, H.; Ferguson, S.S.; Baer, M.R.; Gartenhaus, R.B.; Wang, H. The constitutive androstane receptor is a novel therapeutic target facilitating cyclophosphamide-based treatment of hematopoietic malignancies. *Blood* **2013**, *121*, 329–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Fukumasu, H.; Rochetti, A.L.; Pires, P.R.; Silva, E.R.; Mesquita, L.G.; Strefezzi, R.F.; De Carvalho, D.D.; Dagli, M.L. Constitutive androstane receptor ligands modulate the anti-tumor efficacy of paclitaxel in non-small cell lung cancer cells. *PLoS ONE* **2012**, *9*, e99484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Karagiannis, A.; Harsoulis, F. Gonadal dysfunction in systemic diseases. *Eur. J. Endocrinol.* **2005**, *152*, 501–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Saad, R.A.; Mahmoud, Y.I. Ursodeoxycholic acid alleviates cholestasis-induced histophysiological alterations in the male reproductive system of bile duct-ligated rats. *Reprod. Toxicol.* **2014**, *50*, 87–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Baptissart, M.; Martinot, E.; Vega, A.; Sedes, L.; Rouaisnel, B.; de Haze, A.; Baron, S.; Schoonjans, K.; Caira, F.; Volle, D.H. Bile acid-FXRalpha pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget* **2016**, *7*, 19468–19482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Vega, A.; Martinot, E.; Baptissart, M.; De Haze, A.; Vaz, F.; Kulik, W.; Damon-Soubeyrand, C.; Baron, S.; Caira, F.; Volle, D.H. Bile Acid Alters Male Mouse Fertility in Metabolic Syndrome Context. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Volle, D.H.; Mouzat, K.; Duggavathi, R.; Siddeek, B.; Dechelotte, P.; Sion, B.; Veyssiere, G.; Benahmed, M.; Lobaccaro, J.M. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 1014–1027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Martinot, E.; Sedes, L.; Baptissart, M.; Lobaccaro, J.M.; Caira, F.; Beaudoin, C.; Volle, D.H. Bile acids and their receptors. *Mol. Aspects Med.* **2017**, *56*, 2–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Whyte-Allman, S.K.; Hoque, M.T.; Jenabian, M.A.; Routy, J.P.; Bendayan, R. Xenobiotic Nuclear Receptors Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Antiretroviral Drug Efflux Transporters at the Blood-Testis Barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2017**, *363*, 324–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Martinot, E.; Baptissart, M.; Vega, A.; Sedes, L.; Rouaisnel, B.; Vaz, F.; Saru, J.P.; de Haze, A.; Baron, S.; Caira, F.; et al. Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXRalpha. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Martinot, E.; Sedes, L.; Baptissart, M.; Holota, H.; Rouaisnel, B.; Damon-Soubeyrand, C.; De Haze, A.; Saru, J.P.; Thibault-Carpentier, C.; Keime, C.; et al. The Bile Acid Nuclear Receptor FXRalpha Is a Critical Regulator of Mouse Germ Cell Fate. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 315–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Sedes, L.; Desdoits-Lethimonier, C.; Rouaisnel, B.; Holota, H.; Thirouard, L.; Lesne, L.; Damon-Soubeyrand, C.; Martinot, E.; Saru, J.P.; Mazaud-Guittot, S.; et al. Crosstalk between BPA and FXRalpha Signaling Pathways Lead to Alterations of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Male Fertility Disorders. *Stem Cell Rep.* **2018**, *11*, 944–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Maruska, K.P.; Fernald, R.D. Social regulation of gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Physiology* **2011**, *26*, 412–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Halilbasic, E.; Claudel, T.; Trauner, M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J. Hepatol.* **2013**, 155–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Cheng, C.Y.; Mruk, D.D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 16–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Svoboda, M.; Riha, J.; Wlcek, K.; Jaeger, W.; Thalhammer, T. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): Regulation of expression and function. *Curr. Drug Metab.* **2011**, *12*, 139–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Baptissart, M.; Vega, A.; Martinot, E.; Pommier, A.J.; Houten, S.M.; Marceau, G.; de Haze, A.; Baron, S.; Schoonjans, K.; Lobaccaro, J.M.; et al. Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology* **2014**, *60*, 1054–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. De Castro Barbosa, T.; Ingerslev, L.R.; Alm, P.S.; Verstehe, S.; Massart, J.; Rasmussen, M.; Donkin, I.; Sjogren, R.; Mudry, J.M.; Vetterli, L.; et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 184–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

164. Baptissart, M.; Sèdes, L.; Holota, H.; Thirouard, L.; Martinot, E.; De Haze, A.; Rouaisnel, B.; Caira, F.; Beaudoin, C.; Volle, D.H. Multigenerational impacts of bile acid exposure are mediated by TGR5 signaling pathways. *Sci. Rep.* **2018**. [[CrossRef](#)]
165. Pataia, V.; Papacleovoulou, G.; Nikolova, V.; Samuelsson, A.M.; Chambers, S.; Jansen, E.; Taylor, P.D.; Poston, L.; Williamson, C. Paternal cholestasis exacerbates obesity-associated hypertension in male offspring but is prevented by paternal ursodeoxycholic acid treatment. *Int. J. Obes.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Rissman, E.F.; Adli, M. Minireview: Transgenerational epigenetic inheritance: Focus on endocrine disrupting compounds. *Endocrinology* **2014**, *155*, 2770–2780. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Bart, J.; Groen, H.J.; van der Graaf, W.T.; Hollema, H.; Hendrikse, N.H.; Vaalburg, W.; Sleijfer, D.T.; de Vries, E.G. An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 357–363. [[CrossRef](#)]
168. Su, L.; Cheng, C.Y.; Mruk, D.D. Drug transporter, P-glycoprotein (MDR1), is an integrated component of the mammalian blood-testis barrier. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 2578–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Sharpe, R.M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *20*, 91–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Skakkebaek, N.E.; Rajpert-De Meyts, E.; Main, K.M. Testicular dysgenesis syndrome: An increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod* **2001**, *16*, 972–978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Short communication

Fxr α gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis

Hélène Holota, Laura Thirouard, Manon Garcia, Mélusine Monrose, Angélique de Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin*, David H. Volle*

Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD, F-63001 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Leydig
Testis
hCG signaling
FXR α
Steroidogenesis

ABSTRACT

The bile acid receptor Farnesoid-X-Receptor alpha (FXR α), a member of the nuclear receptor superfamily, is well known for its roles in the enterohepatic tract. In addition, FXR α regulates testicular physiology through the control of both endocrine and exocrine functions. The endocrine function of the Leydig cells is mainly controlled by the hypothalamo-pituitary axis via LH/chorionic gonadotropin (CG). If FXR α was demonstrated to control the expression of the *Lhcgr* gene, encoding the LH receptor; the impact of the LH/CG signaling on the *Fxr α* expression has not been defined so far. Here, we demonstrate that hCG increases the *Fxr α* gene expression through the protein kinase-A signaling pathway. *Fxr α* is then involved in a negative feedback of steroid synthesis. These data improve our knowledge of the local control of the testicular steroidogenesis with the identification of the link between the hypothalamo-pituitary axis and the FXR α signaling pathway.

1. Introduction

In the last years, it has been demonstrated that the nuclear receptor Farnesoid-X-Receptor- α (FXR α ; NR1H4) is expressed in testis from birth to adulthood [1]. In early postnatal age, it has been described that FXR α controls the establishment and the maintenance of the mouse spermatogonial stem cell pool [2]. It was also described that FXR α is a regulator of the endocrine function of the testis in pubertal and adult male mice [3,4]. Indeed, it has been demonstrated that the activation of the FXR α signaling pathways in Leydig cells, by administration of the specific synthetic agonist GW4064, represses testosterone synthesis [5]. This repression of steroidogenesis results from the induction of the expression of two nuclear receptors *Shp* (*Small heterodimer partner*; *NROB2*) and *Dax-1* (*dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene-1*; *NROB1*), two repressors of steroidogenesis [6]. This critical role of FXR α signaling pathway on the control of the testicular endocrine function is supported by the observed phenotype induced by the exposure to bile acids (BA) at pubertal period, a critical developmental window relying on testosterone levels [6]. Indeed, pubertal bile acid exposure of male mice leads to altered fertility associated with default in germ cell differentiation, which is correlated with an increased rate of spermatocytes apoptosis. This later is associated with a default in testosterone synthesis as demonstrated by the rescue of the phenotype by exogenous testosterone administration

[6]. Recently, several studies highlight links between steroid homeostasis and FXR α , which was sustained by the combined impacts of FXR α antagonist (namely stigmaterol) and estrogenic endocrine disruptors (such as bisphenol-A) on testicular physiology [7].

The control of the Leydig cell functions, including steroidogenesis, is mainly mediated by the hypothalamo-pituitary-gonadal axis via LH/chorionic gonadotropin (CG) [8]. Interestingly, it has been demonstrated that part of the action of FXR α is through the control of the expression of the *Lhcgr* gene, encoding the LH receptor [6]. Steroidogenesis is a complex process where cholesterol serves as the initial substrate. The conversion of cholesterol to pregnenolone takes place within mitochondria. The transport of cholesterol to the mitochondria is ensured by the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) [9] or peripheral benzodiazepine receptor (translocator protein, TSPO) [10,11]. Then, multiple enzymatic steps involving the cytochrome P450-11A1 (Cytochrome P450, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1, CYP11A1) [11], the 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase (3 β HSD) [12] and the cytochrome P450-17A1 (Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1, CYP17A1) lead to the production of testosterone [13].

The present study is focused on the analysis of how *Fxr α* expression is regulated by the hypothalamo-pituitary (HP) axis and more particularly by hCG signaling pathway within the Leydig cells. *In vivo* treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) results in the

* Corresponding authors at: INSERM U1103, CNRS UMR-6293, UCA, GReD, 28 place Henri Dunant, 63001 Clermont-Ferrand, France.

E-mail addresses: claud.beaudoin@uca.fr (C. Beaudoin), david.volle@inserm.fr (D.H. Volle).

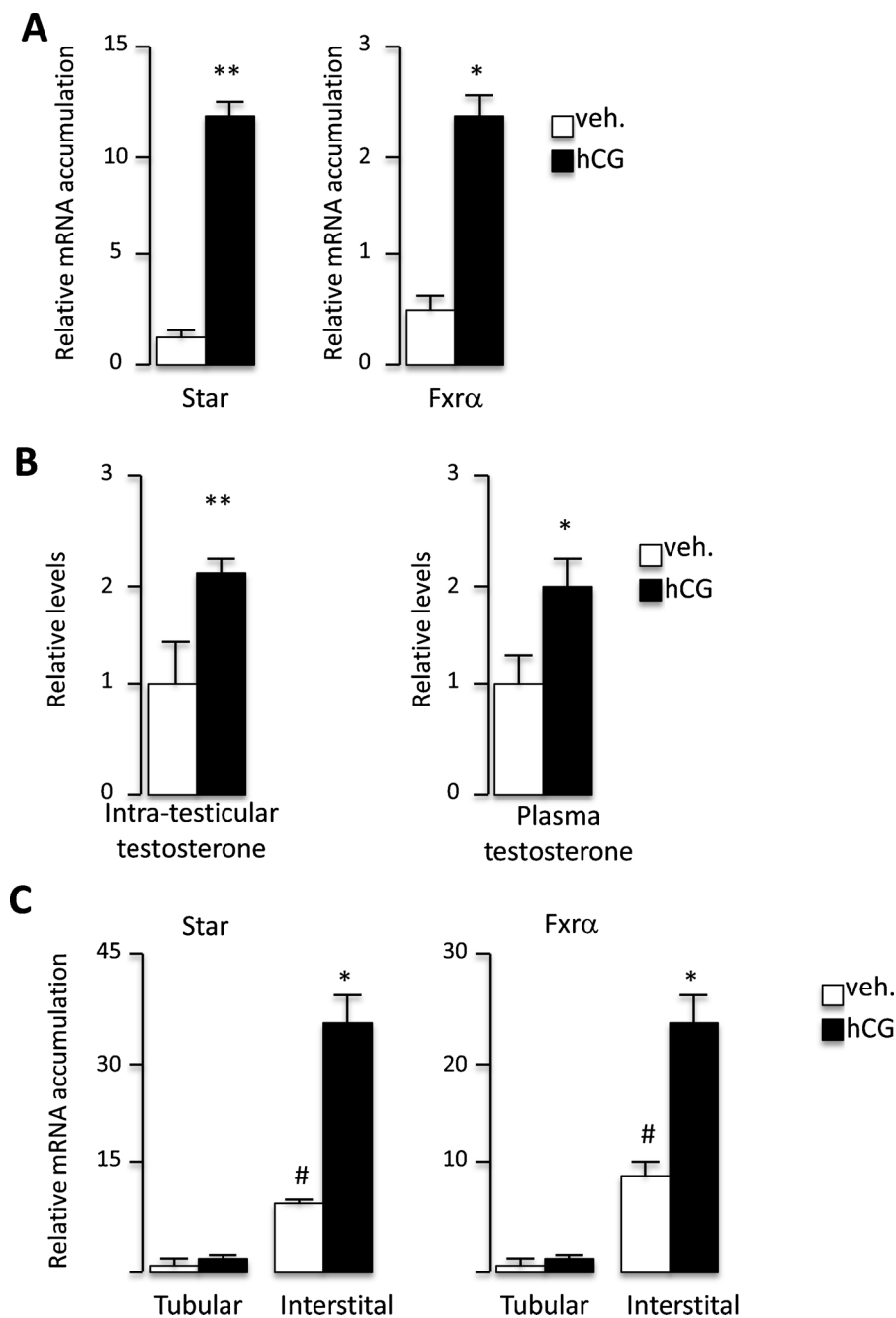


Fig. 1. hCG increases *Fxrα* expression in testis.

A, Testicular mRNA accumulation of *Fxrα* and *Star* normalized to *Actin* mRNA levels in whole testes of adult C57BL/6J treated with vehicle or 5-IU hCG for 12 h.

B, Intratesticular and plasma testosterone levels measured in adult C57BL/6J treated with vehicle or 5-IU hCG for 12 h.

C, mRNA accumulation of *Fxrα* and *Star* normalized to *Actin* mRNA levels in testicular tubular and interstitial compartments of adult C57BL/6J treated with vehicle or 5-IU hCG for 12 h.

In all panels, n = 12 per group and data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: #, p < .05; *, P < .01.

increase of testicular *Fxrα* mRNA accumulation. *In vitro* approaches, using the mouse Leydig MA10 cell line, demonstrate the involvement of protein kinase A (PKA) signaling pathways. This highlights the fact that *Fxrα* is a critical regulator of Leydig homeostasis and thus of the testicular endocrine function.

2. Materials and methods

2.1. Animals

C57BL/6J (Charles River, France) mice were housed in controlled

temperature rooms with 12-h light, 12-h dark cycles and had *ad libitum* access to food and water.

Mice were injected intraperitoneally with hCG (5 IU, equivalent to 1.42 mM; Sigma-Aldrich) diluted in NaCl 0.09%.

This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee.

2.2. Endocrine investigations

Progesterone was measured in the medium of MA10 cell culture,

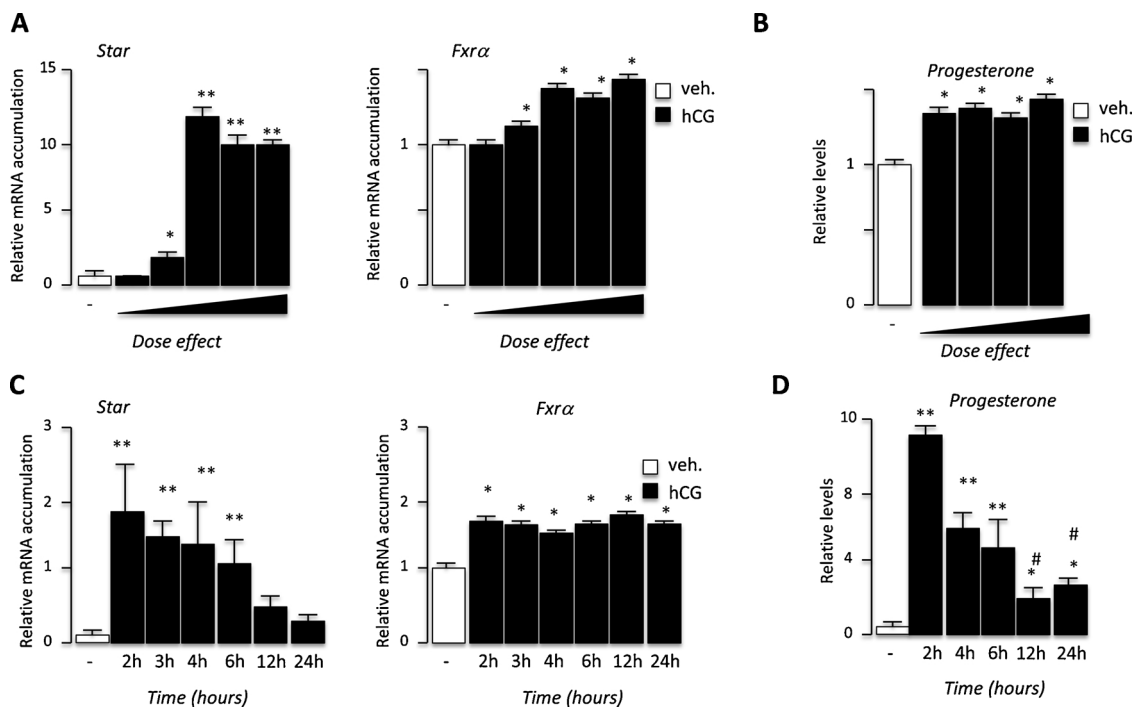


Fig. 2. hCG increases *Fxrα* expression in Leydig cells.

A, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cell line exposed to vehicle or hCG (from 0.0025 nM to 25 nM) over 24 h; n = 12 per group.

B, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells exposed to vehicle or hCG (from 0.0025 nM to 25 nM) over 24 h; n = 12 per group.

C, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed to vehicle or hCG (0.25 nM) for 2, 4, 6, 10 or 24 h.

D, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells exposed to vehicle or hCG (0.25 nM) for 2, 4, 6, 10 or 24 h.

In all of the panels, n = 12 per group (3–4 Independent experiments) data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis: *, $P < .05$; **, $P < .01$. #: compared to vehicle treated group; #: compared to 2 h hCG treated group.

and plasma and intratesticular testosterone was measured as previously described using a commercial kit (ADI-900-011 & ADI-900-065- Enzo Life Sciences) for the assays [14].

2.3. Real-time RT-PCR

RNAs from testis samples were isolated using TRIzol (Invitrogen Corp). cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript II First-Strand Synthesis System (Life Technologies) and random hexamer primers. Real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex system. Sequences of the primers were given in previous studies: *Actin*, *Fxrα*, *Star*, *Hsd3b1*, *Shp* and *Dax-1* [2,14,15]. Standard curves were generated with pools of testis or MA10 cDNA from different treatments. Results were analyzed using the delta-delta-cycle threshold values method.

2.3.1. Interstitial cell enrichment

For the generation of data on enriched interstitial cells compared to tubular preparations or whole testis samples, the methodology used relies on mechanical and enzymatic processes for dissociating the fractions. The interstitial enriched cells and tubular compartments were generated as described in previous study [2]. Briefly, testes from 90-day-old male mice were decapsulated and incubated for 20 min at 33 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F12 (1:1), transferrin (5 μ g/ml), insulin (4 μ g/ml) and vitamin E (0.2 μ g/ml) medium containing collagenase (0.8 mg/ml) (Life Technologies, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Extracts were collected by centrifugation for 10 min at 200 g and the pellet was resuspended in fresh medium. Following two successive sedimentations, the supernatant containing the interstitial cells was centrifuged and the pellet was

suspended in fresh medium at a final concentration of 107 cells/ml.

The enrichment was established through the analysis of specific markers. The mRNA expression pattern was characterized by low mRNA accumulations of Fsh receptor (*fshr*: a Sertoli cell marker), and of *Plzf* or *Stra8* (markers of germ cell lineage); and high expression of Leydig gene such as Lh receptor (*lhcr*) in the interstitial cells; whereas tubular compartment showed an opposite pattern, supporting the interstitial enrichment of the samples (Figure Supplemental 1C).

2.4. Cell culture experiments

MA10 cells were previously used [14] and were maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ with Waymouth (Life Technologies) containing 100-U/mL penicillin and 100- μ g/mL streptomycin supplemented with 10% horse serum. On day 0, MA10 cells were seeded at 400 \times 10³ cells per well in 6-well plates and allowed to adhere overnight MA10 cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) using Jet Prime (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) in six-well plates (400,000 cells per well). The siRNA directed against *Fxrα* [2], as well as control siRNA (siGfp) [16], was transfected at 5 ng per well. When 48 h after the transfection had passed, cells were washed twice with 1 \times PBS, and medium without serum was applied with various ligands or vehicles. For hCG experiments, vehicle was NaCl 0.09%, for forskolin (Fsk) (Sigma-Aldrich), 8-BromocAMP (8BrcAMP) (Sigma-Aldrich), protein kinase A inhibitor H89 (H89) (Sigma-Aldrich), flutamide (Sigma-Aldrich), R1881 (Sigma-Aldrich), Casodex or vehicle was dimethylsulfoxide (1:1000; Sigma-Aldrich).

Time after the hCG exposures, cells were washed twice with 1 \times PBS, and medium without serum was applied with (DMSO, 1/1,000) or GW4064. Then, cells were harvested 4 h later, and mRNA extractions were performed.

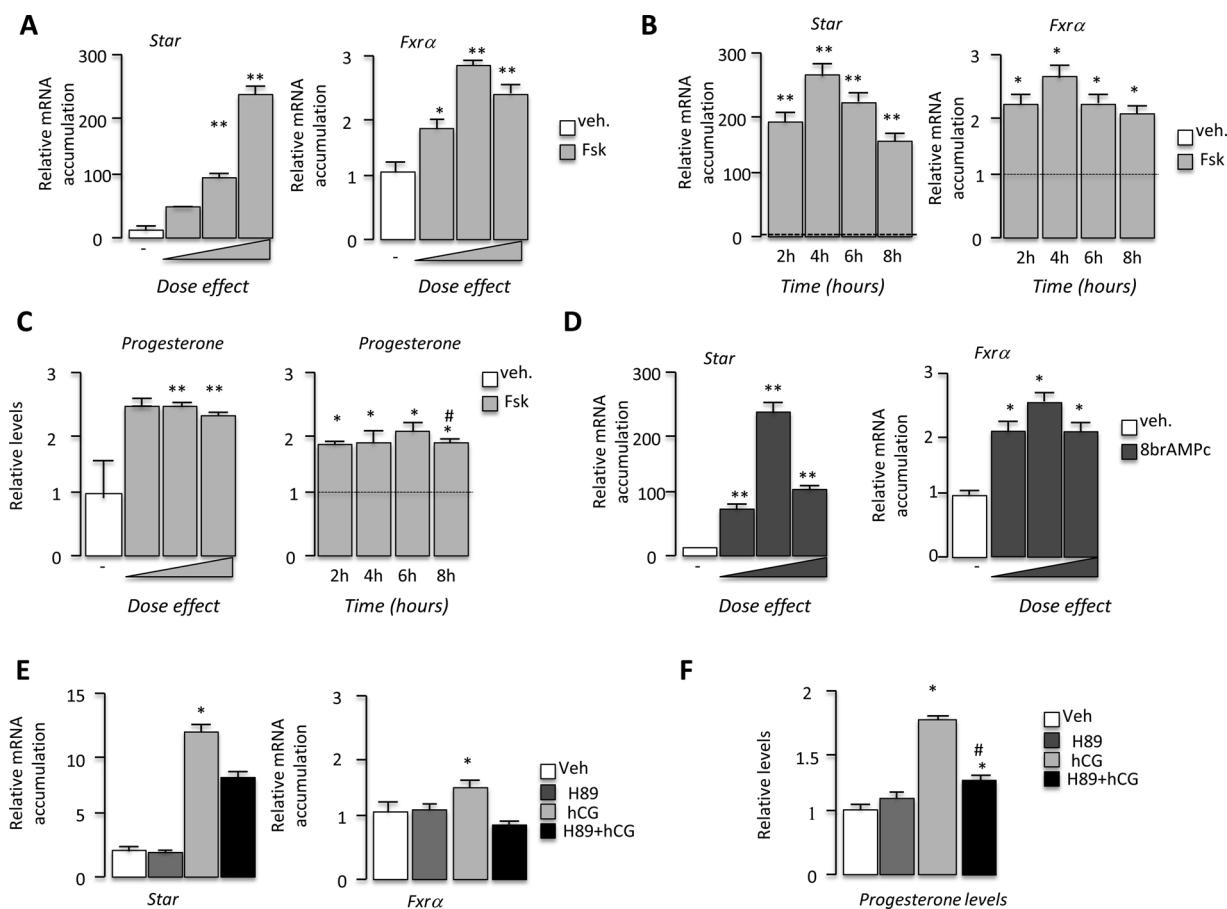


Fig. 3. *Fxrα* regulation by hCG involves cAMP-PKA signaling pathway.

A, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed to vehicle or Fsk (from 2.5 μM to 10 μM) over 4 h.

B, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cell line exposed to vehicle or Fsk (5 μM) for 2, 4, 6, or 8 h.

C, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells exposed to vehicle or Fsk (from 2.5 μM to 10 μM) over 4 h or in medium of MA10 cells exposed to vehicle or Fsk (5 μM) for 2, 4, 6 or 8 h. *: compared to vehicle treated group; #: compared to 6 h Fsk treated group.

D, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cell line exposed to vehicle or 8BrAMPc (50, 100 or 200 μM) over 4 h.

E, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells pretreated with H89 for 2 h and then treated with vehicle or hCG (0.25 nM) for 4 h.

F, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells exposed pretreated with H89 for 2 h and then treated with vehicle or hCG (0.25 nM) for 4 h.

In all panels, n = 12 per group and data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: *, p < .05; **, P < .01.

3. Results and discussion

3.1. hCG increases *Fxrα* expression in vivo

To better define *in vivo* the potential links between FXRα and the hCG signaling pathways, we first analyzed the impact of hCG treatment on *Fxrα* mRNA expression. Twelve hours of treatment with 5 IU of hCG resulted in a significant increase in *Fxrα* mRNA accumulation in 3 months old adult mouse testis (Fig. 1A). Moreover, we show that the increase of the *Fxrα* mRNA accumulation by hCG exposure was also observed at pubertal age (20-days old male mice), a critical developmental window regarding the establishment of the Leydig cell homeostasis (Supplemental Fig. 1A). Note that at both ages, as expected, *Star* mRNA accumulation (Fig. 1A & Supplemental Fig. 1A) and both intra-testicular and plasma testosterone levels (Fig. 1B & Supplemental Fig. 1B) were increased following treatment with hCG.

In addition as expected, both plasma and intra-testicular testosterone were higher in adult mice than in pubertal animals. In that line the respective means of plasma levels were of 20 ng/ml in adult and 1 ng/ml in pubertal mice. Regarding intra-testicular testosterone mean of concentrations were of 3000 ng/mg in adult and 24 ng/mg in pubertal mice.

If FXRα signaling alters Leydig, Sertoli and germ cell physiologies [2,14,15], in adult mice FXRα is mainly expressed in Leydig cells and to a lesser extent in spermatogonia [2,6]. To ensure that hCG signaling alters the *Fxrα* mRNA accumulation within Leydig cells, we have performed the analysis of the *Fxrα* mRNA accumulation in enriched interstitial and tubular populations isolated from vehicle or hCG exposed adult male mice. As expected [5], data confirmed that *Fxrα* mRNA is mainly accumulated in interstitial compartment (Fig. 1C), where its expression is significantly up-regulated by the hCG signaling pathway.

If previous studies [6] have identified the impact of FXRα signaling on the expression of *Lhcgr* gene, the present data support the hypothesis of a crosstalk in the other way round.

3.2. hCG increases *Fxrα* expression in Leydig cells

To confirm the above-mentioned data of the regulation of the *Fxrα* expression by hCG, the main regulator of Leydig cell function, we used the well-characterized mouse MA10 Leydig cell line. *Fxrα* mRNA accumulation was increased after hCG exposure since the dose of 0.25 ng (Fig. 2A). Interestingly, the progesterone levels were increased since this same dose of 0.25 ng (Fig. 2B). The effect of hCG on *Fxrα* accumulation was observed since 2 h and up to 24 h after treatment

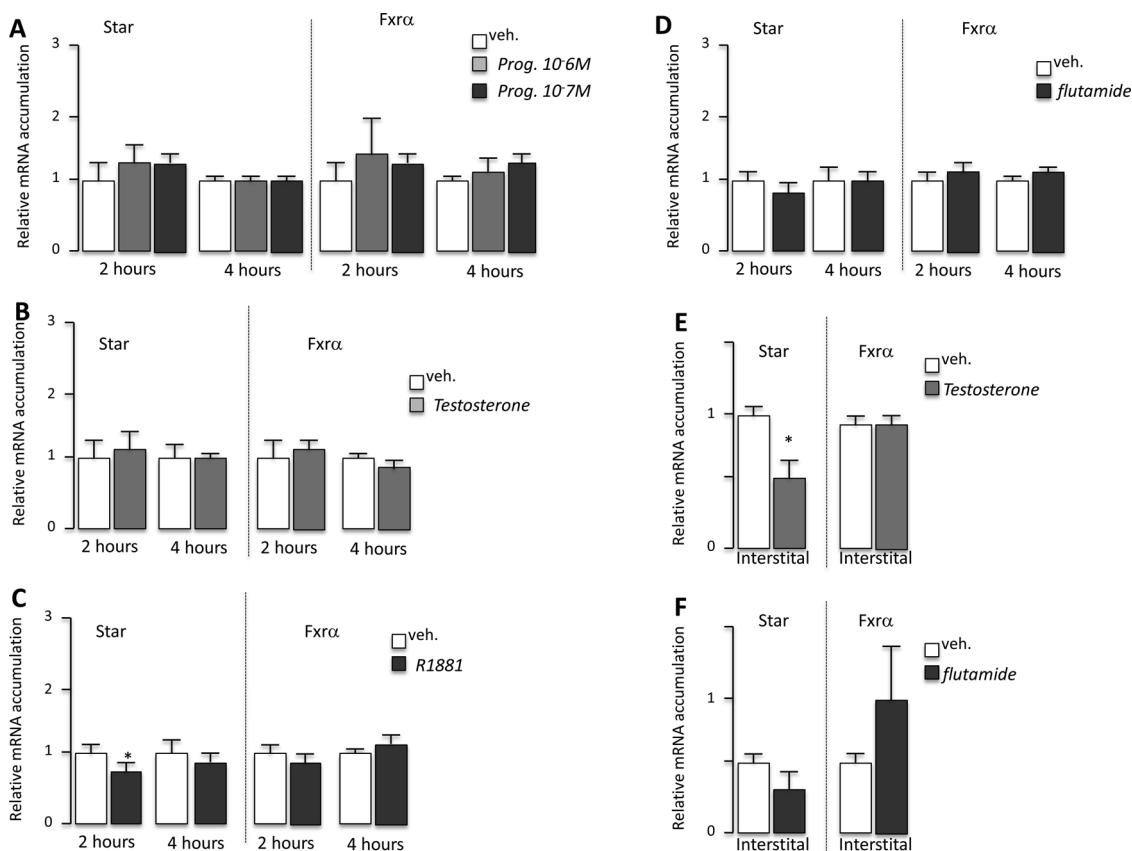


Fig. 4. *Fxrα* expression is not affected by testosterone or progesterone signaling.

A, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed 2 or 4 h to vehicle or progesterone (at 10⁻⁶ or 10⁻⁷M).

B, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed 2 or 4 h to vehicle or testosterone (at 10⁻⁸ or 10⁻⁹M).

C, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed 2 or 4 h to vehicle or R1881 (at 10⁻⁶M).

D, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed 2 or 4 h to vehicle or flutamide (at 10⁻⁷M).

E, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in interstitial cells of testis of mice exposed for 12 h to vehicle or testosterone (200μg/mice).

F, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in interstitial cells of testis of mice exposed for 12 h to vehicle or flutamide (40 mg/kg/mice).

For experiments on MA10 cells, n = 12 per group and data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: *, p < .05; **, P < .01.

For experiments on mice, n = 5–6 per group and data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: *, p < .05; **, P < .01.

(Fig. 2C). As expected, *Star* mRNA accumulation was positively regulated by hCG (Fig. 2A & C). Interestingly, the progesterone levels were increased since 2 h and then significantly decreased significantly after 12 h (Fig. 2D).

3.3. *Fxrα* regulation by hCG involves cAMP-PKA signaling pathway

In order to decipher the downstream signaling pathways induced by the LH/CG receptor, we used the adenylate cyclase activator, Forskolin (Fsk) in *in vitro* experiment using MA10 Leydig cell line through dose and time experimental approaches. Results show that Fsk induced the *Fxrα* mRNA accumulation at 2.5 μM since 2 h of treatment (Fig. 3A and B). As expected, *Star* mRNA accumulation was increased after exposure to Fsk (Fig. 3A and B). As expected the progesterone level was increased since the lowest dose used. The increased was seen after 2 h of treatment and then slightly decreased at 8 h after exposure (Fig. 3C).

The involvement of cAMP pathway was confirmed using 8BrcAMP (Fig. 3D). Treatment for 4 h with 8BrcAMP resulted in induction of *Fxrα* and of *Star* mRNA accumulations (Fig. 3D). In Leydig cells, PKA pathway plays an important role in the control of steroidogenesis. To define whether PKA was involved in *Fxrα* regulation by cAMP, we used a pharmacological inhibitor of PKA, namely H89. Pretreatment with H89 abolished the effect of hCG on *Fxrα* mRNA accumulation (Fig. 3E). As expected the treatment with H89 limits the impact of hCG on progesterone synthesis (Fig. 3F). If previous data [14] suggest that the

FXRα signaling pathway might be a regulator of the hCG stimulated testicular steroidogenesis; the present data validate the interaction in the opposite way. This highlights new molecular mechanisms of the interactions between FXRα signaling pathway and the hypothalamo-pituitary axis. This is of importance as the Leydig cell functions, including steroidogenesis, control the initiation of sexual maturation and germ cell survival at adulthood [17].

3.4. hCG regulation of FXRα expression is not mediated through testosterone or progesterone

Consistently with the increase of progesterone levels since 2-hs after hCG exposure *in vitro* and the increase of testosterone *in vivo* following hCG administration, one might have think that the effect of hCG on *Fxrα* mRNA levels could be due to the progesterone or testosterone respectively synthesized in MA-10 cells or in Leydig cells (*in vivo*). To answer this question, we performed experiments using progesterone or testosterone exposures (Fig. 4). Data showed that in MA10 cell line, the expression of *Fxrα* was not regulated following administration of progesterone or testosterone (Fig. 4A & B). These data were confirmed using the androgen receptor (AR) synthetic agonist R1881. Indeed, no impact on *Fxrα* mRNA accumulation was observed following 2 or 4 h of R1881 administration (Fig. 4C). In addition, the inhibition of AR through the use of AR antagonist, namely flutamide, did not impact the *Fxrα* expression *in vitro* (Fig. 4D).

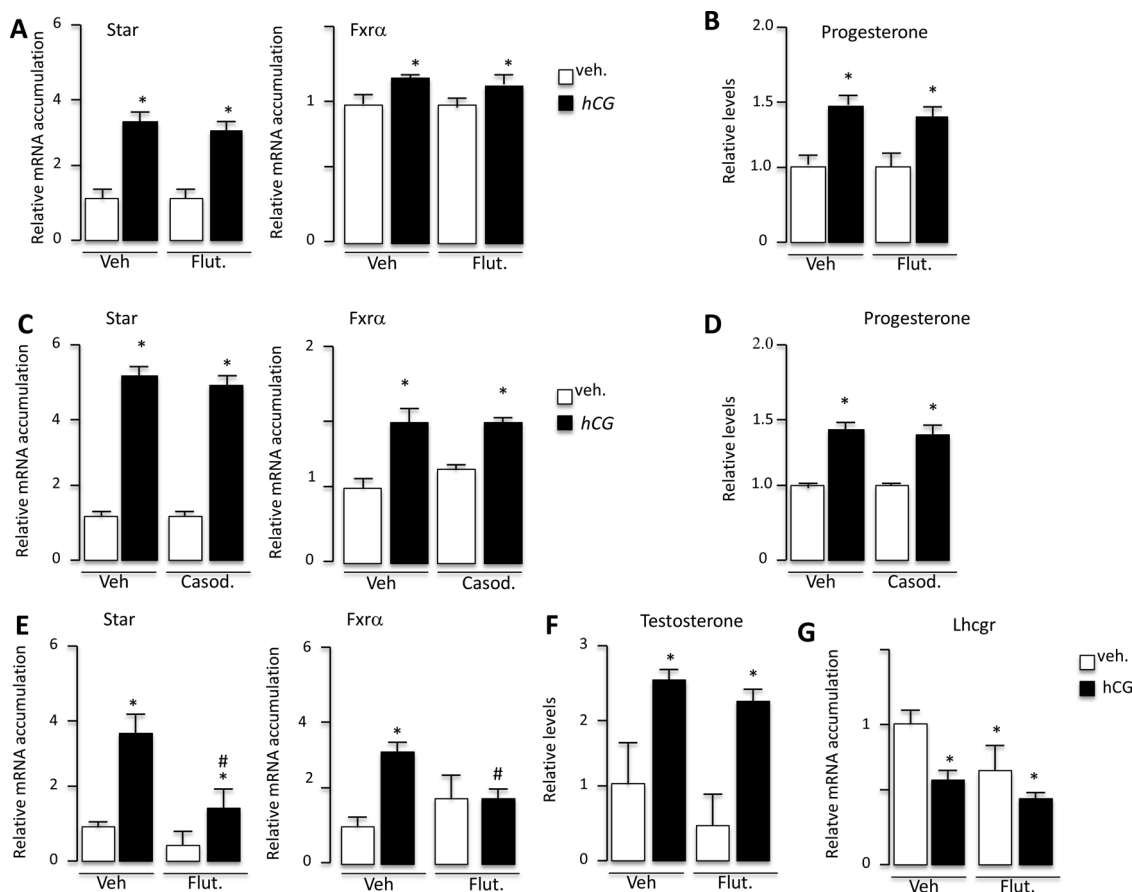


Fig. 5. hCG regulation of *Fxrα* expression is not mediated through androgen signaling *in vitro*.

A, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed 12 h with veh or hCG and then 4 h to vehicle or flutamide.

B, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells exposed 12 h with veh or hCG and then 4 h to vehicle or flutamide.

C, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in MA10 Leydig cells exposed 12 h with veh or hCG and then 4 h to vehicle or Casodex.

D, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells exposed 12 h with veh or hCG and then 4 h to vehicle or Casodex.

E, mRNA expression of *Fxrα* and *Star* normalized to *36b4* levels in interstitial cells of testis of mice exposed for 12 h with vehicle, hCG, flutamide or hCG + flutamide.

F, Relative intratesticular levels of testosterone in mice exposed for 12 h with vehicle, hCG, flutamide or hCG + flutamide.

G, mRNA expression of *Lhcgr* normalized to *36b4* levels in interstitial cells of testis of mice exposed for 12 h with vehicle, hCG, flutamide or hCG + flutamide.

For experiments on MA10 cells, n = 12 per group and data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: *, p < .05; **, P < .01.

For experiments on mice, n = 5–6 per group and data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: *, p < .05; **, P < .01. *: compared to vehicle treated group; #: compared to hCG treated group.

We next performed *in vivo* experiments using exposure to testosterone or flutamide. If testosterone led to a decrease of *Star* mRNA accumulation, no effect was observed on *Fxrα* expression (Fig. 4E). Consistent with the lack of impact of androgen pathway on *Fxrα* expression, no effect of flutamide was observed on *Star* or *Fxrα* expression (Fig. 4F).

To decipher more precisely the potential links between the hCG-induced steroid production and the following regulation of the *Fxrα* expression; we next have tested the potential impact of the inhibition of the androgen pathway on the response to hCG both *in vitro* (MA10 cells) and *in vivo*. Data showed that *in vitro* inhibition of the androgen receptor by flutamide did not interact with the impact of hCG on *Fxrα* expression (Fig. 5A). These data were consistent with those obtained for *Star* mRNA accumulation and progesterone levels (Fig. 5A & B). These observations were confirmed using Casodex another AR antagonist (Fig. 5C & D).

However, surprising data showed that *in vivo*, flutamide counteracted in part the effect of hCG on *Star* and *Fxrα* mRNA accumulations (Fig. 5E). These data were supported by the results obtained for intratesticular testosterone levels (Fig. 5F). These data suggest that the impacts of flutamide exposure through AR inhibition might somehow impact the hCG signaling pathway. This hypothesis was supported by

the fact that flutamide led to a decrease of the mRNA accumulation of *Lhcgr* (Fig. 5G). Interestingly, it could be explained that flutamide counteracted the impact of hCG as both molecules synergistically impact the mRNA accumulation of the *Lhcgr* gene (Fig. 5G).

3.5. hCG stimulation sensitizes MA10 cells to FXRα agonist exposure

So far there is only few data supporting the role of the “backward” of hCG signaling on FXRα receptor. We have hypothesized that the activation of FXRα might participate to a negative control of the induction of hCG-induced steroidogenesis in order to avoid a sustained hyper-steroidogenesis. This is a possible hypothesis as steroid production will decrease at a certain time following hCG induction as seen *in vitro* in MA10 cells where the levels of progesterone will significantly decrease 12 h after hCG exposure (Fig. 2C). To analyze such hypothesis, we have performed on MA-10 cells a kind of time dependent experiment that supports the idea of a feedback control. We first have analyzed the consequences of the exposure to FXRα agonist namely GW4064. This later has been described to be an inhibitor of testicular steroidogenesis [5]. We have validated this in the MA10 Leydig cell line where the impact of 12-hs exposure to GW4064 was mediated by FXRα as supported by the fact that the use of a siRNA directed against *Fxrα*

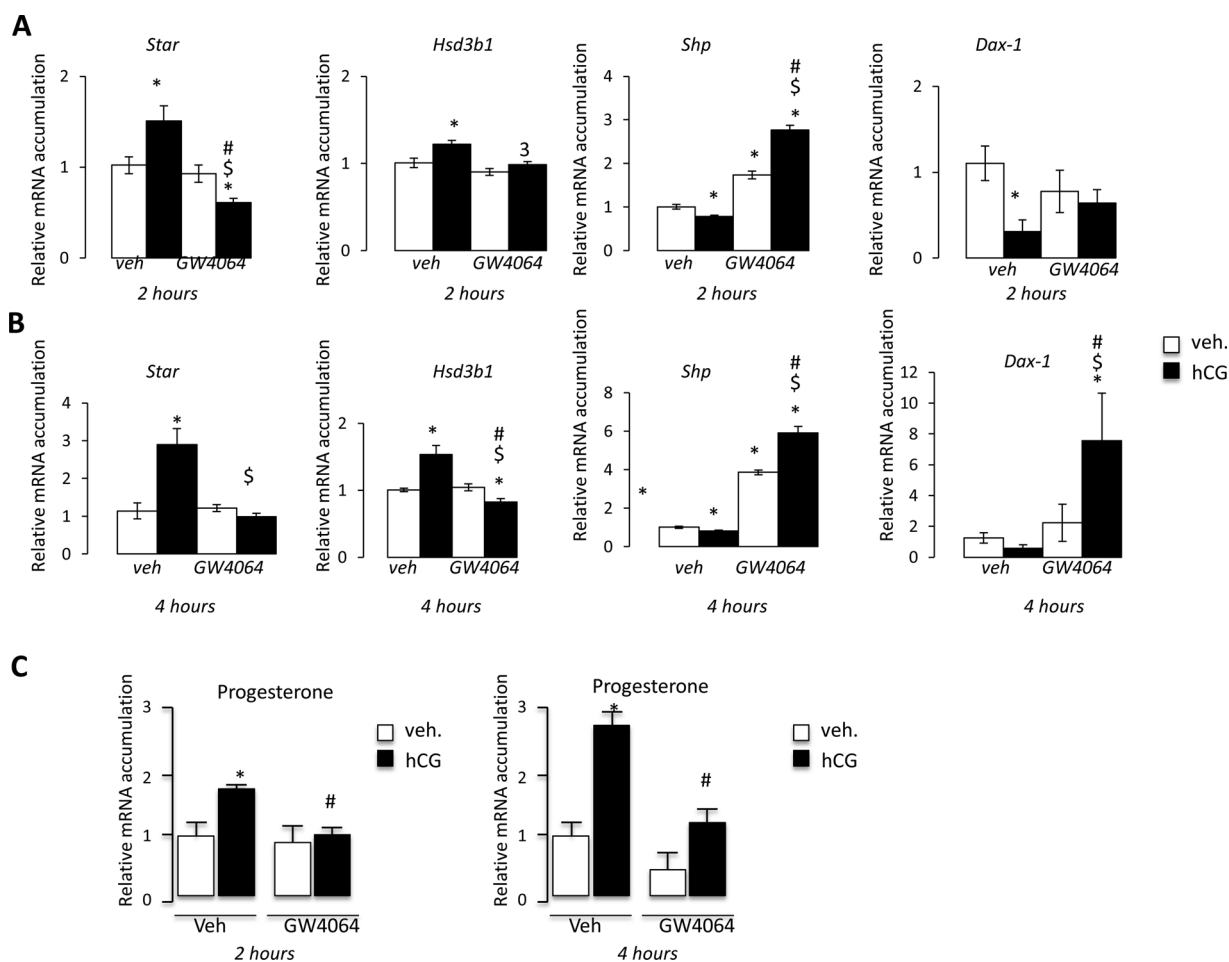


Fig. 6. hCG stimulation sensitizes MA10 cells to FXR α agonist exposure.

A, mRNA expression of *Star*, *Hsd3b1*, *Shp* and *Dax-1* normalized to β -actin levels in MA10 cells pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 2 h with vehicle or GW4064.

B, mRNA expression of *Star*, *Hsd3b1*, *Shp* and *Dax-1* normalized to β -actin levels in MA10 cells pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 4 h with vehicle or GW4064.

C, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 2 or 4 h with vehicle or GW4064.

In all panels, $n = 12$ per group and data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analysis: * and #, $p < .05$. *: compared to vehicle group; #: compared to hCG group.

abolished the effect of GW4064 on *Star*, *Hsd3b1*, *Shp* and *Dax-1* mRNA accumulations (Supplemental Fig. 2). To define the impact of hCG on FXR α activity, the MA10 cells were pre-treated with hCG for 6 or 12 h in order to induce the FXR α expression and then cells were exposed to GW4064 for 2 or 4 h. Data demonstrated that no combined effect of GW4064 and hCG was observed after 6 h of hCG on *Star* and *Shp* mRNA accumulation (Supplemental Fig. 3). In contrast, after 12 h of hCG treatment exposure to GW4064 acted in a most potent manner than when administrated alone on many gene expressions (Fig. 6). This might reflect the necessity to have a production of FXR α protein. Data showed that the pre-treatment to hCG led to an enhanced response to GW4064 since 2 h of treatment (Fig. 6A). Indeed, after 2 or 4 h of treatment with GW4064, the fold induction of *Shp* and *Dax-1* in the hCG-GW4064 treated cells were greater compared to GW4064. In that line, a significant decrease of *Star* and *Hsd3b1* mRNA was observed in the hCG/GW4064 treated group compared to GW4064 alone (Fig. 6A & B). Consistent with the above results, following the 12-hs treatment of hCG, exposures to GW4064 (2 or 4 h) hours led to a complete abrogation of the elevated progesterone levels compared to hCG treated cells returning to levels comparable to the vehicle treated cells (Fig. 6C). These data are of interest as it has been demonstrated that 12 h after hCG exposure the level of steroids are decreasing (Fig. 2C). This kinetic

is of interest as it is consistent with the fact that cells will be sensitive to FXR α agonist in the same timeframe. Interestingly, these effects on the mRNA accumulations of *Star*, *Hsd3b1* and *Shp* as well as on steroid production were abolished by a siRNA directed against *Fxr α* (Fig. 7A–D). Surprisingly, the cells transfected with the siRNA directed against *Fxr α* did not show increased of progesterone levels in response to hCG. Combined these data reinforce the links between FXR α signaling pathways and steroid metabolism [18]. We demonstrate that FXR α acts in a negative feedback of steroid synthesis following hCG exposure. This is crucial as endocrine homeostasis is a critical physiological process, as alteration could lead to various diseases.

4. Conclusion

The present data show that hCG through the PKA signaling pathway regulates the expression of the *Fxr α* gene. The effect is not due to the subsequent steroid production induced by LH as demonstrated by the experiments using testosterone, R1881, flutamide or casodex. It has to be noticed that experiments were performed with low dose of hCG (0.25 nM). In addition, experiments were performed in condition of serum starvation, to avoid interference of serum with BA signaling pathways, and measurement of steroid synthesis was performed at least

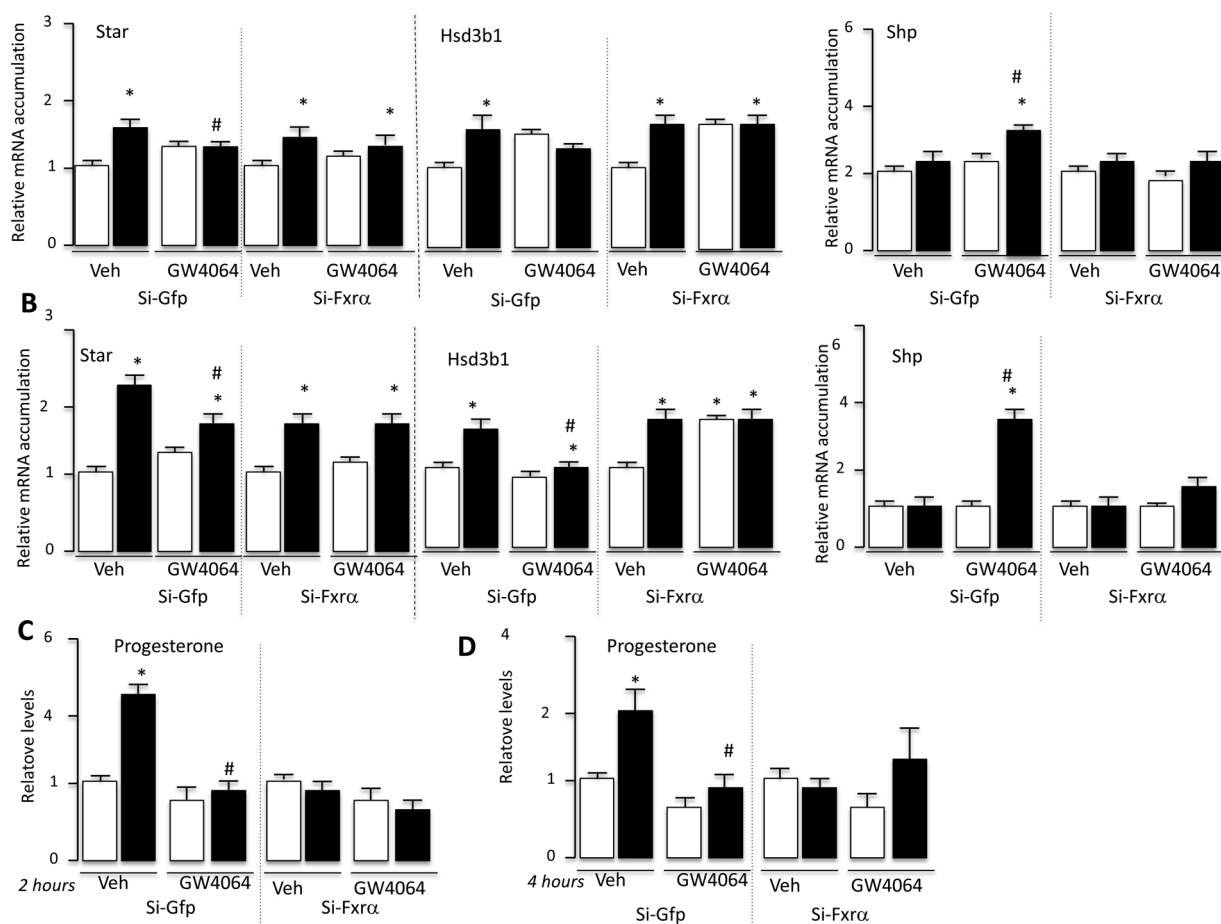


Fig. 7. hCG stimulation sensitizes MA10 cells to FXR α agonist exposure.

A, mRNA expression of *Star*, *Hsd3b1* and *Shp* normalized to β -actin levels in MA10 cells transfected with a siGfp or a siRNA directed against Fxr α pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 2 h with veh or GW4064.

B, mRNA expression of *Star*, *Hsd3b1* and *Shp* normalized to β -actin levels in MA10 cells transfected with a siGfp or a siRNA directed against Fxr α pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 4 h with veh or GW4064.

C, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells transfected with a siGfp or a siRNA directed against Fxr α pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 2 h with veh or GW4064.

D, Relative progesterone levels in medium of MA10 cells transfected with a siGfp or a siRNA directed against Fxr α pre-treated 12 h with vehicle or hCG and then 4 h with veh or GW4064.

In all panels, n = 12 from 3 independent experiments. Data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: #; *, p < 0.05; **, p < 0.01, ***, p < 0.005 vs. respective control group.

*Compared to vehicle group; #: compared to hCG group.

18–25 h following hCG exposure, combined this might explain in part the low basal levels of progesterone and the slight increase following hCG exposure.

In conclusion, the present work confirms the links between FXR α and the efficiency of the testicular endocrine function. This point has been sustained in the last decades with the large impact of endocrine disrupters on animal and human health [19]. It is interesting to note that critical collaborative links have been made between FXR α signaling pathways and exposure to estrogenic endocrine disrupters such as bisphenol-A [7].

In conclusion, this work support the idea of a complex crosstalk between FXR α and the LH/CG signaling pathways in order to strictly regulate the Leydig cell homeostasis and particularly the steroid synthesis. Our work allowed us to define molecular interactions. We previously showed [14] that LH signaling, through the regulation of the steroidogenic factor one (SF-1; NR5A1), the liver receptor homolog-1 (LRH-1; NR5A2) and CREB activities and in the meantime the lower expression of *Shp* and *Dax-1* resulting in the expected regulation of steroidogenesis. Here our data demonstrate that LH/CG induces the expression of FXR α in a sustained time frame (from 2 to 24 h). This

impact sensitizes the Leydig cells to FXR α agonist, that counteract the increase of steroid synthesis due to hCG exposure. This thus conducts to a subsequent decrease of the synthesis of steroids. These data suggest that this regulation of FXR α by LH might reflect a negative feedback to regulate Leydig endocrine function.

So far, there is only few data supporting the role of the back-word of LH on FXR α receptor. The time course experiments performed on MA10 cells show that the initial effect of hCG is first seen on steroidogenic genes, and the regulation of the *Fxr* α mRNA accumulation is associated to the impact FXR α signaling 12 h after hCG induction. These data support the idea of a feedback control to avoid a sustained hyper-steroidogenesis.

The present paper is mainly focused on the regulation of the *Fxr* α gene by LH signaling pathways within the Leydig cells. The data clearly highlight the crosstalk between both pathways. Even though it was not analyzed in the present paper, it has been demonstrated that in the context of some liver diseases, BA could have impact on the hypothalamus and thus on LH and FSH production by the pituitary. Thus further data using transgenic mouse models will be needed to better define the complete crosstalk mechanisms at the hypothalamus/pituitary levels

that could lead to an alteration of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and in turn the alteration of testicular physiology and particularly steroid synthesis.

Combined with previous data on the links between the FXR α signaling and the estrogenic endocrine disrupters; the present data define FXR α as a critical actor to explore in more details in order to increase our knowledge of pathologies associated with altered testicular endocrine function such as fertility disorders.

Grant supports

The study was funded by Inserm, CNRS, Université Clermont Auvergne, Région Auvergne < GN4 > (#R12087CC < /GN4 > to DHV), Plan cancer (< GN5 > C14012CS) < /GN5 > . Ligue contre le cancer (comité Puy de Dôme), ARC (< GN7 > R16142CC) < /GN7 > . Volle's team received support by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

Declaration of Competing Interest

The authors declare to have no conflict of interests.

Acknowledgments

We thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen and Philippe Mazuel for their help at the animal facility. Casodex was kindly provided by Dr. Baron S.

References

- [1] L. Sèdes, et al., Bile acids and male fertility: from mouse to human? *Mol. Aspects Med.* 56 (2017) 101–109.
- [2] E. Martinot, et al., The bile acid nuclear receptor FXR α is a critical regulator of mouse germ cell fate, *Stem Cell Rep.* 9 (2017) 315–328.
- [3] S. Catalano, et al., Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor leydig cells, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 5581–5593.
- [4] M. Baptissart, et al., Bile acids: from digestion to cancers, *Biochimie* 95 (2013) 504–517.
- [5] D.H. Volle, et al., The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice, *Genes Dev.* 21 (2007) 303–315.
- [6] M. Baptissart, et al., Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice, *Oncotarget* 7 (2016) 19468–19482.
- [7] L. Sèdes, et al., Crosstalk between BPA and FXR α signaling pathways lead to alterations of undifferentiated germ cell homeostasis and male fertility disorders, *Stem Cell Rep.* 11 (2018) 944–958.
- [8] A.M. Attia, A.M. Abou-Setta, H.G. Al-Inany, Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility, *Cochrane Database Syst. Rev.* 8 (2013) CD005071.
- [9] P.R. Manna, S.P. Chandrala, Y. Jo, D.M. Stocco, cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of STAR phosphorylation, *J. Mol. Endocrinol.* 37 (2006) 81–95.
- [10] L. Sèdes, et al., Cholesterol: a gatekeeper of male fertility? *Front. Endocrinol.* 9 (2018) 369.
- [11] M.-C. Hu, H.-J. Hsu, I.-C. Guo, B.-C. Chung, Function of Cyp11a1 in animal models, *Mol. Cell. Endocrinol.* 215 (2004) 95–100.
- [12] D.S. Keeney, J.I. Mason, Regulation of expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is mediated by cAMP in rat Leydig cells and H540 rat Leydig tumor cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43 (1992) 915–922.
- [13] H.R. Fevold, et al., Rat P450(17 α) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4-and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 3 (1989) 968–975.
- [14] M. Baptissart, et al., Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice, *Oncotarget* (2016), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153>.
- [15] L. Sèdes, et al., Crosstalk between BPA and FXR α signaling pathways lead to alterations of undifferentiated germ cell homeostasis and male fertility disorders, *Stem Cell Rep.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.018>.
- [16] M. Baptissart, et al., Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice, *Hepatology. Baltim. Md* 60 (2014) 1054–1065.
- [17] S. Maqdasy, et al., Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol. Cell. Endocrinol.* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.011>.
- [18] M. Baptissart, et al., Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* (2013), <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1387-0>.
- [19] O. Albert, B. Jégou, A critical assessment of the endocrine susceptibility of the human testis to phthalates from fetal life to adulthood, *Hum. Reprod. Update* 20 (2014) 231–249.



FXR α modulates leydig cell endocrine function in mouse

Hélène Holota, Laura Thirouard, Mélusine Monrose, Manon Garcia, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Françoise Caira, Claude Beaudoin^{**}, David H. Volle^{*}

Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD, F-63001, Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Leydig cell
Testis
hCG signaling
Nuclear receptors
Steroidogenesis

ABSTRACT

The hypothalamic-pituitary axis exert a major control over endocrine and exocrine testicular functions. The hypothalamic-pituitary axis corresponds to a cascade with the Gonadotropin Releasing Hormone secreted by the hypothalamus, which stimulates the synthesis and the release of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone by the gonadotropic cells of the anterior pituitary. The LH signaling pathway controls the steroidogenic activity of the Leydig cells *via* the activation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor. In order to avoid a runaway system, sex steroids exert a negative feedback within hypothalamus and pituitary. Testicular steroidogenesis is locally controlled within Leydig cells. The present work reviews some local regulations of steroidogenesis within the Leydig cells focusing mainly on the roles of the Farnesoid-X-Receptor-alpha and its interactions with several orphan members of the nuclear receptor superfamily. Further studies are required to reinforce our knowledge of the regulation of testicular endocrine function, which is necessary to ensure a better understanding of fertility disorders and then proposed an adequate treatment of the diseases.

1. Introduction

1.1. The hypothalamo-pituitary-gonad axis

The hypothalamic-pituitary axis has major role on the control of testicular steroidogenesis. The hypothalamo-pituitary-testicular axis (HPT axis) is a neuro-endocrine regulatory circuit, with feedback loops (Kaprara and Huhtaniemi, 2018; Plant, 2015). Specific hypothalamic nuclei synthesize the Gonadotropin releasing hormone (GnRH). This later *via* the activation of a G-protein-coupled receptor stimulates the synthesis and release of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) by gonadotropic cells of the anterior pituitary gland.

Within the hypothalamus, the release of GnRH is pulsatile or by surge. It regulates the pulsatile secretion of the gonadotrophins; which are secreted in a pulsatile manner by the anterior pituitary (Kaprara and Huhtaniemi, 2018; Plant, 2015). In obese men, probably through excess of estrogen or the increased insulin resistance, LH pulse amplitude is diminished, explaining the central origin of hypogonadism (Gurung et al., 2020; Sen and Hoffmann, 2020; Vermeulen, 1996).

LH acts directly on Leydig cells to control their steroidogenic activity

via the activation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, LHCGR. In return, sex steroids exert central negative feedback on their own synthesis.

In adult, the Leydig cells constitute only 5% of somatic cells of testis (Kerr, 1991). These cells support part of the endocrine function of the testis through the production of androgens, mainly testosterone (Jin and Yang, 2014). Testis also produces other hormones such as estrogen and progesterone. Maintenance of an adequate concentration of intra-testicular testosterone is essential for testicular function, especially for spermatogenesis (Woolveridge et al., 1998).

LH/hCG signaling pathway is the main regulator of Leydig cells functions. Through its receptor *Lhcgr*, the LH/CG activates the adenylate cyclase, which will stimulate cAMP pathway. This results in the phosphorylation of the C-AMP Response Element-binding protein (CREB). The phospho-CREB binds to CRE elements in the promoter regions of steroidogenic genes and activation of cholesterol ester hydroxylase (Stocco et al., 2005). Numerous factors have also been identified to be involved in this response to LH such as Ca²⁺ dependent kinase system MAPK pathways, glucocorticoids, inflammatory cytokines, prolactin, transforming growth factors β (TGF β), Insulin growth factor-1 (IGF-1), Epidermal growth factor (EGF), factors, as well as sex steroids (Dufau

* Corresponding author. INSERM U1103, CNRS UMR-6293, UCA, GReD, 28 place Henri Dunant, 63001, Clermont-Ferrand, France.

** Corresponding author.

E-mail address: david.volle@inserm.fr (D.H. Volle).

and Catt, 1978; Manna et al., 2006; Tajima et al., 2005). LH also modulates the cholesterol homeostasis. Free cholesterol, the substrate for steroidogenesis, is transferred to the inner membrane of mitochondria. In addition, chronic LH stimulation controls expression of other enzymes involved in steroid synthesis (Payne and Youngblood, 1995; Wang et al., 2009).

Sex steroid hormones share a common biosynthesis pathway. The synthesis of steroids by the Leydig cells is a complex and multi-step process. The steroids are produced from cholesterol. Leydig cells are able to *de novo* produce cholesterol or can also use stored cholesterol ester to ensure steroidogenesis function. A recent study shows that the plasma membrane is one of the richest source of free cholesterol available for acute steroidogenesis (Venugopal et al., 2016). To ensure the production of steroids, Leydig cells also import cholesterol from circulating HDL (Hou et al., 1990). In that line, the homeostasis of Leydig cells involved factors of cholesterol homeostasis such as HMG-CoA reductase, HSL, and ACAT (Kabbaj et al., 2003, 2001).

The initiation of steroidogenesis, requires the transport of cholesterol from the outer mitochondrial membrane to the inner membrane. This limiting step is mainly ensured by the Steroidogenic Acute Regulatory protein (STAR) (D M Stocco, 2000). Mice lacking *Star* present gonadal insufficiencies due to steroidogenesis defects associated with lipid accumulation in the interstitial compartment (Caron et al., 1997). Recently, using a mitochondrial reconstitution assay system, it has been shown that SNARE proteins (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) are vital components contributing to cholesterol transport within the mitochondria (Lin et al., 2016). The mitochondrial transport of cholesterol could also be made by the peripheral-type benzodiazepine receptor (Pbr) (Papadopoulos et al., 2006). Then, the steroid biosynthesis involves the oxidative cleavage of the side-chain of cholesterol by cholesterol side-chain cleavage enzyme (cytochrome P450_{scc}, CYP11A1), a mitochondrial cytochrome P450 oxidase, to give pregnenolone (Hu et al., 2004). Pregnenolone is converted to testosterone through two pathways called Delta 4 ($\Delta 4$) and Delta 5 ($\Delta 5$) (Conley and Bird, 1997). The Delta 4 ($\Delta 4$) pathway involves conversion of pregnenolone to progesterone by the 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β HSD). The cytochrome P450_{17 α} -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17A1) converts the progesterone in androstenedione, which is the substrate of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme (17 β HSD) giving rise to testosterone. The Delta 5 ($\Delta 5$) pathway is initiated by the CYP17A1 enzyme, that allows the conversion of pregnenolone to dehydroepiandrosterone (DHEA). Then, 17 β HSD and 3 β HSD enzymes ensure its conversion into androstenediol or androstenedione, and testosterone. The 3 β HSD enzyme is responsible for the switch from $\Delta 5$ to $\Delta 4$ pathway. In primates including humans, the $\Delta 5$ pathway predominates because CYP17A1 enzyme has a low activity 17, 20 lyase for the conversion of 17 α -hydroxyprogesterone to androstenedione (Hammam and Petersson, 1986; Rey et al., 1995). Then multiple enzymatic reactions allow the production of testosterone, which will then be transformed into dihydrotestosterone (DHT) by the 5 α -reductase, or into estradiol (E2) by the aromatase.

Sexual steroids are involved in the maintenance of fertility and the development of secondary sexual characters (for review (Haider, 2004):) through the regulation of multiple functions within the testis. The critical role of the steroid synthesis pathway has been demonstrated using transgenic mouse models and through the identification of mutations in humans. For examples, mice lacking *Star* gene exhibit defective steroidogenesis, which is associated gonadal insufficiencies (Caron et al., 1997; Clark and Cochrum, 2007; D. M. Stocco, 2000). Mutations are described in human and are associated lipid congenital adrenal hyperplasia (Bose et al., 1997; Ishii et al., 2019).

The sexual steroids control many functions that all converge, within the testis, to the regulation spermatzoa production. Spermatogenesis is strictly controlled and depends on a succession of signals provided by the local environment (Jégou, 1993; Mäkelä and Hobbs, 2019; O'Donnell, 2014; Skinner et al., 1991; Zhou et al., 2019). The review of the

roles of sexual steroids within the testis and mainly on Leydig cells are not the aim of this review and for a complete overview, please read the following references (Edelstein and Rey, 2019; Guercio et al., 2020; Gurung et al., 2020; Hess and Cooke, 2018; O'Hara and Smith, 2015). In addition, in the recent decades, numerous data have demonstrated the deleterious effects of endocrine disruptors with estrogenic or anti-androgenic activities on steroid homeostasis and thus on abnormal sperm leading to fertility disorders via the modulation of the steroid receptors (Ben Maamar et al., 2015; Casati et al., 2015; Sharma et al., 2017).

1.2. A Farnesoid-X-Receptor alpha associated regulatory network in leydig cells

The nuclear receptor superfamily corresponds to transcriptional factors. In animal, nuclear receptors (NR) represent one of the most abundant classes of transcription factors. In response to ligand, NRs bind specific DNA sequences within the 5'-regulatory sequences of target genes and the recruit diverse transcriptional co-regulators. The activities of this protein complex modulate the structure of the chromatin and then lead to the transactivation or trans-repression of target genes. It is well defined that nuclear receptors, through the control of networks of target genes, control numerous physiological processes such as metabolism, inflammation and reproduction. In that line, abnormal functions of these NR signaling pathways can lead to the development of diverse diseases such as metabolic disorders, cancers or fertility disorders.

In the paragraphs below, we focus on the Farnesol-X-Receptor and its interactions with some other orphan members of the NR superfamily that have been defined over the last decades to control Leydig cell endocrine function. Here, the aim of this review is to highlight the roles of FXR α dependent network involved, within the Leydig cells, in a local regulation of steroid synthesis.

Farnesoid-X-Receptor alpha (FXR α ; NR1H4) is expressed in many tissues and have been associated with the regulation of many physiological functions. Within the adult testis, FXR α is expressed in the interstitial space and mainly in Leydig cells (Volle et al., 2007a) suggesting its participation in the control of testicular steroids synthesis. It has been demonstrated that FXR α activation by a synthetic agonist (GW4064) results in a decrease of androgen production, independently of the hypothalamo-pituitary axis. This was associated with a decreased expression of steroidogenic genes encoding the steroidogenic acute regulatory protein (*Star*), the cytochrome *Cyp11a1* or the 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5-4 isomerase (*3 β -Hsd*) (Volle et al., 2007a). The role FXR α in the inhibition of the steroidogenesis was also observed in boar trait (Gray and Squires, 2013).

At the molecular level, it has been demonstrated that FXR α acts in an indirect manner. Indeed, activation of FXR α in Leydig cells leads to the transcription of the gene encoding the orphan nuclear receptor Small Heterodimer Partner (SHP; NR0B2); which acts as a trans-repressor of transcription. SHP lacks the classical DNA-binding domain (DBD) (Seol et al., 1996). SHP is known to act as a negative regulator of transcription through the interactions to other nuclear receptors and the recruitment of co-repressors or histone methyltransferases (Bävner et al., 2005).

Within Leydig cells, SHP represses the expression of the steroidogenic genes such as *Star*, *Cyp11a1* and 3 β hsd since puberty and in adult mice (Volle et al., 2007a). It has been clearly shown that SHP acts as a local regulator of testicular steroidogenesis as no modulation of LH concentrations are observed in SHP KO male mice. It has been demonstrated that in Leydig cells, SHP acts through the inhibition of the expression of two positive regulators of steroidogenesis, which are members of the nuclear receptor superfamily; the Steroidogenic Factor-1 (SF-1, NR5A1) and the Liver Receptor Homolog -1 (LRH-1; NR5A2) (Volle et al., 2007a). In addition, SHP was also demonstrated, at the molecular level, to inhibit the activity of LRH-1 on the promoter of steroidogenic genes such as *Star* (Volle et al., 2007a). The impacts of SHP on the expressions/activities of these two nuclear receptors are

important to understand its roles in the control of steroidogenesis.

In testis, SF-1 is highly expressed in many cells among which mature Leydig cells; where it directly controls the expression of steroidogenic genes in collaboration with many transcription factor such as phospho-CREB, NR4A1, GATA4, SP1, cJUN and C/EBP β , (Abdou et al., 2016; Martin and Tremblay, 2010). In addition, SF1 is involved in the control of steroidogenesis through the regulation of other cellular processed. In Leydig cells, SF-1 controls many aspects of cholesterol homeostasis. It regulates the expression of the scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), which is critical for the uptake of plasma cholesterol (Cao et al., 1999). SF-1 seems to control *de novo* synthesis of cholesterol through the regulation of the HMGCoA synthase (Mascaró et al., 2000). Moreover, a recent study using genome-wide analysis identified Ferredoxin reductase (FDXR, also known as adrenodoxin reductase) as a SF-1 target gene (Imamichi et al., 2014). FDXR is a mitochondrial flavoprotein responsible for the transfers electrons from NADPH to mitochondrial cytochrome P450 enzymes, mediating the function of an iron-sulfur cluster protein, ferredoxin. This is critical for many processes including steroidogenesis. In addition, it has been hypothesized that stem cell transplantation could be method for the treatment of Leydig cell dysfunction-related diseases (Shima et al., 2018). At least *in vitro*, the expression of the aromatase gene and in turn of estrogen levels is controlled by FXR α (Catalano et al., 2010). The mechanism proposed is direct as it has been demonstrated that FXR α competes SF1 for the accessibility to DNA regulatory sequences.

Next to SF1, with the Leyddig cells, the FXR α target SHP controls the expression and the activity of LRH-1. LRH-1 shows a high degree of sequence conservation with SF1, and thus binds to the same hexameric response elements of the regulatory sequences of their direct target genes. Thus they regulate similar functions. In the adult testis, LRH-1 was found to be expressed in germ cells as well as in Leydig cells (Sirrianni et al., 2002; Volle et al., 2007a). LRH-1 is thought to modulate steroidogenesis, as next to SF-1, most of steroidogenic genes are up regulated by LRH-1 (Sirrianni et al., 2002; Wang et al., 2001b). *In vitro* data demonstrate that LRH-1 controls the expression of the aromatase gene (Sierens et al., 2010). *In vivo*, the *Lrh-1*^{+/-} males show altered testicular steroidogenesis (Volle et al., 2007a).

In addition, SHP has been previously described to interact and inhibit the Liver X Receptor alpha (LXR α ; NR1H3), a receptor of oxysterols (Macchiarulo et al., 2006). LXR play critical roles in testis (Jarvis et al., 2019; Maqdasy et al., 2016). LXR α was defined to regulate testosterone production within Leydig cells (Volle et al., 2007b). The *lxra*; β ^{-/-} mice are infertile by 5 months of age. It has been demonstrated that LXR α -deficient mice had lower levels of testicular testosterone that is correlated with a higher apoptotic rate of the germ cells. If LXR β is in the Sertoli cells, it participates to regulate steroid synthesis, probably by the control of the expression of gene involved in the production of yet unidentified paracrine factors. Many enzymes implicated in steroidogenesis are targets for LXRs. Indeed, the absence or pharmacological stimulation of LXR in mice modulate the expression of *Star*, *3 β hsd*, and *17 β hsd* and alter intra-testicular testosterone concentrations (Maqdasy et al., 2016). However, the published data do not support a potential interaction between LXR α and SHP in the Leydig cells (Volle et al., 2007b, 2007a).

Related to its roles in the control of steroid synthesis, FXR α signaling pathway must be of high importance in the context of endocrine disruption. Indeed, estrogen-signaling pathway regulates the expression of *Fxr* α with the testis, and it was recently highlighted that FXR α play a major role in the deleterious effects of endocrine disruptors with estrogenic activity such as bisphenol-A (BPA) (Sedes et al., 2018). It is interesting to note that the expression of *Shp*, a known FXR α target gene, was also found to be control by estrogen (Lai et al., 2003). This regulation was also demonstrated to be essential within the Leydig cells as exposures of male mice to estradiol or endocrine disruptors with estrogenic activity lead to decrease of steroidogenesis in a SHP dependent manner (Volle et al., 2009). Consistently, *in vitro* analyses using the

Ma-10 Leydig cell line showed that estradiol increased *Shp* mRNA accumulation at 12 and 24 h after treatment, and is then followed by a decreased mRNA accumulation of steroidogenic genes such as *Star* after 24 h (Volle et al., 2009). These data highlighted the crosstalk between ER α and SHP. This was further validated through the use of the ER agonist (estradiol), or the antagonist ICI (Volle et al., 2009). Data suggest a significant contribution of SHP in the estrogenic effects of endocrine disruptors such as diethylstilbestrol. Indeed, estrogen exposure resulted in a decrease of the intra-testicular concentration of testosterone in *Shp*^{+/+} mice (Volle et al., 2009). The involvement of ER α was sustained by the fact that ICI exposure reversed the effect of DES on testosterone in *Shp*^{+/+} males, whereas no effect on testosterone level in *Shp*^{-/-} males (Volle et al., 2009). These effects of the ER α -SHP signaling pathways occur at the testicular level as no impact of DES on LH or FSH level was observed. At the molecular level, it was demonstrated that SHP was involved in the estrogenic signaling pathways as the mRNA accumulations ER target genes such as insulin-like-3 (*Insl3*) were impacted only on wild-type males. In addition, unlike wild-type males, *Shp*^{-/-} males are protected from the deleterious effects of diethylstilbestrol, as testosterone concentrations as well as *Star*, *Cyp11a1*, and *Cyp17a1* mRNA levels were not affected (Volle et al., 2009). This decrease in testosterone was also correlated with reduced mRNA abundance of the androgen-dependent genes *Pem* and *Osp* in *Shp*^{+/+} males (Volle et al., 2009). In this context of DES exposure, SHP decreased *Lrh-1* expression (Volle et al., 2009); suggesting that the regulation of *Lrh-1* and *Sf-1* by SHP must involve specific co-factors that must be gene specific within the Leydig cells.

From the above data, the regulation of SHP expression seems to be important to regulate testicular steroidogenesis following the modulation of FXR α expression and/or activity. But so far, in the Leydig cells the level of post-translational modifications of SHP has not been studied. This could be an important point to cover as recent findings have shown that through the ERK pathway SHP can be phosphorylated resulting in an increased stability of SHP protein (Miao et al., 2009). Indeed, this phosphorylation was associated with an inhibition of the ubiquitination-coupled degradation. This stabilization leads to an accumulation of inhibitor complexes. In addition, studies have identified site of ubiquitination within SHP protein and it was suggested that these sites must be involved in transcriptional repression (Miao et al., 2009). It has also been shown that RanBP2 co-localizes with SHP at the nuclear envelope region and mediates SUMO2 modification SHP at Lysine K68 (Kim et al., 2016). This facilitates its nuclear transport and increases its interaction with repressive histone-modifying enzymes LSD1 and HDAC1, which results in the inhibition of bile acid synthetic genes (Talamillo et al., 2020). It could thus be hypothesized that such mechanisms exist in Leydig cells might control the process of steroidogenesis inhibition by SHP.

All the above data sustain the idea of the importance of the FXR α -SHP-SF1/LRH-1 network in the control of the Leydig cell endocrine function.

Next to its roles in adult Leydig cells, the potential role of FXR α in testis was studied during pubertal period, which is highly dependent of steroids. For that purpose, many experimental models of liver injury were used to modulate the concentrations of bile acids, FXR α natural ligands. In that line, bile-duct ligation in pre-pubertal males, which leads to an increase of bile acid concentrations (Houten et al., 2007), is associated with lower testosterone levels. Experimental models of liver injury show an altered puberty phenotypes (Van Thiel et al., 1985) with smaller testes and seminal vesicles. This suggests that cholestasis contributes, at least in part, in pubertal and maturational failure due to an alteration of the testicular endocrine function. Thus, the roles of bile acid signaling on puberty onset and male sexual maturation were defined (Baptissart et al., 2016). Pubertal mice (21-days old) exposures to bile acid supplemented diet lead to an increased percentage of sterile males at adulthood. This decrease of fertility was associated with a lower production of spermatozoa that is related to an alteration of germ cell

survival rate. The increased apoptotic rate is a consequence of a decreased testosterone synthesis as sustained by the fact that supplementation with exogenous testosterone restores the germ cell survival. The role of FXR α was supported by the fact that no effect of its agonist (GW4064) was observed in *Fxr α* deficient mice. Regarding what was published in adult mice on the regulation testosterone synthesis (Volle et al., 2007a), it was expected that a FXR α -SHP cascade might be involved in this alteration of sexual maturation by bile acids. However, the use of *Shp*^{-/-} male mice showed that the lack of SHP was not sufficient to counteracts the deleterious effects of BA on testosterone production (Baptissart et al., 2016). This suggested that other mechanisms might exist.

During puberty, the effects of the bile acids-FXR α pathways are, at least in part, mediated DAX1 (Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1), which has been described as a FXR α target gene (Baptissart et al., 2016). As SHP, DAX1 is an unusual orphan nuclear receptor that lacks the C-terminal portion of a ligand-binding domain (Zanaria et al., 1994). DAX1 interacts with other nuclear receptors to inhibit their activities and thus act as a negative regulator of transcription (McCabe, 2007). In that line, DAX1 interacts with SF1, LRH-1 and NGFIB three positive regulators of steroidogenesis (Martin and Tremblay, 2010).

The major role of DAX-1 in the testis is sustained by the fact that *Dax-1* knock-out (*Dax-1*-KO) mice show hypogonadism (Yu et al., 1998). These mice show with reduced testis mass with altered spermatogenesis and Leydig cell hyperplasia (Meeks et al., 2003). Interestingly, the re-expression of *Dax-1* specifically in Leydig cell knock-out improved their fertility. *In vitro*, DAX-1 has been demonstrated to control the expression of most of the steroidogenic genes. However, *in vivo*, only the expression of *Cyp19* mRNA was modulated in mice with a specific deletion within Leydig cells (Wang et al., 2001a). Consistently, the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen partly rescues fertility of *Dax-1*-KO males. Although testicular size was not restored, *Cyp19* expression was back to normal levels, and sperm production was increased (Meeks et al., 2003). However, more data will be necessary to define whether *in vivo* DAX-1 is the main mediator of the effect of bile acids on testosterone during pubertal period, or to define if SHP and DAX-1 can compensate each other. It also appears that DAX-1 must play a critical role in multiple pathophysiological contexts such as exposures to endocrine disruptors (ED) or metabolic diseases. Interestingly, it has been demonstrated that androgens up-regulates *Dax-1* expression; which in turn represses the activity of SF1 on the aromatase proximal promoter (Maris et al., 2015). In the context of the relation between DAX-1 and the androgen signaling pathways, it has been demonstrated that Triclosan, an ED that has anti-androgenic effects suppressed testicular steroidogenesis (Duan et al., 2020). The authors have demonstrated a new signaling cascade were Triclosan exposure induced the accumulation of the miR-142-5p, which in turn modulates a Sp1; DNMT1; DAX1 cascade leading to the inhibition of P450c17 and the decrease in testosterone levels (Duan et al., 2020).

In addition, DAX-1 was suggested to play a critical role in the repression of testosterone production observed in obese or diabetic patients (Ahn et al., 2013). Indeed, the authors have demonstrated that insulin induces the expression of DAX-1 in Leydig both *in vivo* and *in vitro*. Using multiple molecular approaches, it was shown that insulin-induced DAX-1, which in turn inhibited LRH-1-mediated regulation of *Star*, *Cyp17a1* and *3 β hsd* at the promoter level (Ahn et al., 2013). These data were supported by additional report on mouse showing studying the impact of exposure to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). BDE-47 is associated with increased diabetes prevalence; and co-exposure to high-fat diet can aggravates BDE47-inhibited testosterone production through hyperinsulinemia. This was associated with an increase of *Dax-1* expression and a down-regulation of steroidogenic proteins such as STAR and 3 β -HSD in Leydig cells (Zhang et al., 2017). These data must be of interest in the context of FXR α modulation of *Dax-1*, as FXR α is a known regulator of

lipid metabolism.

It must also be highlighted that pro-inflammatory cytokine such as the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) have an inhibitory impact in the steroidogenesis of Leydig cells (Syriou et al., 2018). This could be of interest in the case of pathologies, metabolic disorders or exposure to endocrine disruptors (Bini et al., 2015; Pivonello et al., 2019; Zheng et al., 2010). It has been demonstrated that, within the Leydig cells, TNF- α treatment leads to an increase of *Dax-1* mRNA and protein accumulations via a JNK/ERK MAP kinase pathway; which then results in a repression of the steroidogenic enzyme genes in Leydig cells (Sadasiyam et al., 2015). In contrast to SHP, little is known about post-translation modifications of DAX-1 and the potential impacts on its activity. It was shown that the E3 Ubiquitin Ligase RNF31 and DAX-1 act as co-repressor complex on the promoter of steroidogenic genes such as *Star* and *Cyp19* (Ehrlund et al., 2009, p. 31). This leads to a mono-ubiquitination of DAX-1 that stabilizes the protein. This seems to be required for the repressive effect of DAX-1 on steroidogenic gene expression. These above data sustain the idea that DAX-1 must be key in the impact of FXR α signaling pathway in prepubertal testis.

As mentioned above, within the Leydig cells, the FXR α -SHP or FXR α -DAX1 pathways must play some roles in normal physiology or in multiple pathophysiological conditions. As highlighted in the above sections most of the effects of FXR α on Leydig cells are driven by two downstream targets, that are two other nuclear receptors, namely SF1 and LRH1. Their expression and/or the activity levels must be critical. Their expressions are modulated by a wide range of transcriptional regulatory processes, involving transcription factors, intron enhancers, and epigenetic elements (Meinsohn et al., 2019). These multiple regulations contribute to explain the specific, developmental, tissue and/or species expression of LRH-1 and SF-1 and their impacts on steroidogenesis. An exhaustive review of these processes is outside the purpose of this review as it has been extensively covered (Meinsohn et al., 2019). However, recently, important informations have been reported showing that post-translational modifications of SF1 and LRH-1 are key to control the endocrine function of the Leydig cells. Within the adult Leydig cells; data showed that transforming growth factor beta 1 (TGFB1) down-regulates the expression levels of SF1 and LRH1, through the canonical signaling pathway involving ALK5. This is associated with the down-regulations of estrogen production (Yang et al., 2017, p. 1). The protein accumulation (stability) and/or activities of SF-1 and LRH-1 are controlled by multiple post-translational modifications. For example, it has been demonstrated that SF1 can be acetylated by P300 following activation of the intracellular second messenger cAMP and protein kinase-A pathway. This post-translational change was associated with an increase binding of SF1 to DNA and its interaction with regulatory cofactors. PKA pathway promotes the dissociation SF1 and DAX1, leading to an increased transcriptional activity of SF1 (Chen et al., 2005, p. 1; Fan et al., 2004). In addition, both LRH-1 and SF-1 have phosphorylation sites modulated by activation of the protein kinase C and the MAPK/ERK pathways. Phosphorylations of these receptors are associated with an increase in the transcriptional activity of these receptors (Krylova et al., 2005; Lee et al., 2006). SF-1 and LRH-1 can be sumoylated reducing their binding to DNA sequences or their translocation from the chromatin to inactive nuclear bodies. Moreover, E3 ligase RNF31 and stabilize DAX1 and by the way induces SF-1 inactivation on promoter of target genes (Ehrlund et al., 2009). Interestingly, the permanent elimination *in vivo* of SF-1 SUMOylation in mice resulted in abnormal endocrine tissue development (Lee et al., 2011, p. 1). Interestingly, LRH-1 SUMOylation controls cholesterol metabolism (Stein et al., 2014) (Stein et al., 2017). This effect could be critical and must be studied in the context of steroidogenesis regulation. Another post-translational regulation process that affects SF1 and LRH-1 is ubiquitination (Lai and Hu, 2019; Lee et al., 2016). It leads to the inhibitory of their activity. SF-1 ubiquitination plays an important role in the reproductive and endocrine pathology, which then reduces steroidogenesis at least in adrenal tumor cells (Chen et al., 2007).

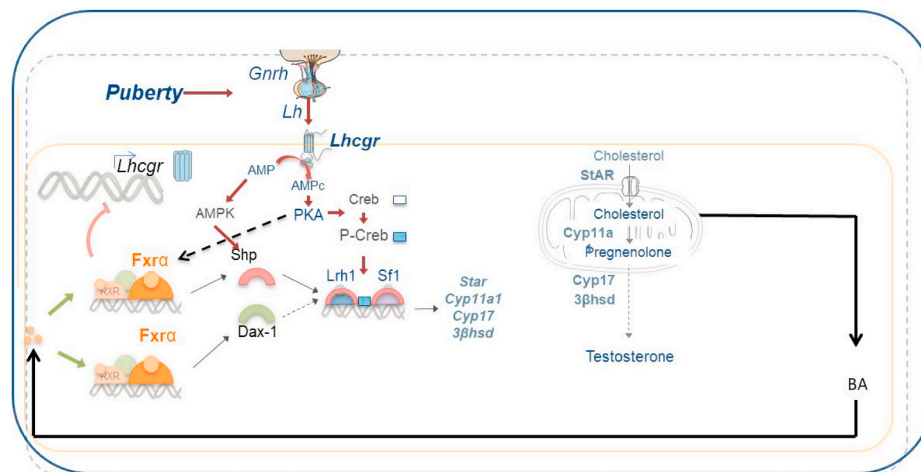


Fig. 1. Proposed model (see discussion section).

1.3. Crosstalk with the LH/CG signaling and FXR α signaling pathway within the Leydig cells

If FXR α was shown to control testicular steroidogenesis the link with the hypothalamo-pituitary axis have been studied only very recently. A recent paper has demonstrated that the activation of FXR α by its agonist leads to the repression of the expression of the LH/CG receptor, namely *Lhcgr* (Baptissart et al., 2016). This FXR α signaling pathway alters LH/CG sensitivity of Leydig cells both *in vitro* and *in vivo* in pubertal males.

However, little is known about the regulation of the Fxr α gene. Within Leydig cells, a recent report shows that hCG, at low dose, regulates the expression of the Fxr α gene *via* PKA signaling. It was demonstrated that this regulation is not mediated by subsequent steroid production induced by LH as sustained by the experiments using testosterone, R1881, flutamide or casodex (Holota et al., 2019). This suggests that FXR α could also participate in a local feedback of androgen synthesis.

This potential role of FXR α in a negative local feedback of sex steroid synthesis was sustained by additional data showing that a metabolite of testosterone, androsterone, has been defined as FXR α agonist (Wang et al., 2006). In addition, recent data have demonstrated that Leydig cells must be able to produce bile acids that are endogenous FXR α ligands (Martinot et al., 2017). As bile acids and sex steroids have the same precursor, namely cholesterol, these data sustain the idea that the regulation of FXR α expression and/or activity could define a molecular pathway to regulate sex steroid synthesis. Next to the regulation of the expression of *Fxr α* , its activity is critical to control testicular steroidogenesis. Recently, FXR α activity has been demonstrated to be regulated by post-translational modifications such as sumoylation or phosphorylation (Hu et al., 2017). Further studies will be necessary to define whether such mechanisms could be involved in the regulation of steroidogenesis by FXR α .

So far, no clear data show that, within testis, DAX-1 and/or SHP regulates the expression of the *Lhcgr* and the sensitivity to LH/CG. It could be hypothesized that there are either not involved or that they could be both redundantly involved and in that case a double DAX-1/SHP knock-out mouse model must be necessary to prove such idea. However, it has been demonstrated that the two FXR α target genes *Shp* and *Dax1* are also modulated by the LH/CG signaling pathway. Regarding the association between Leydig cell activity and the hypothalamo-pituitary axis, it has been demonstrated that LH/CG represses the expressions of both *Shp* and *Dax-1*. Within the Leydig cells, the activation of the 5'-AMP activated protein kinase (AMPK) pathway, which might be activated following the decrease of ATP, led to a

decrease of steroid synthesis which is correlated with an increased expression of *Dax-1* (Abdou et al., 2014) and *Shp* (Vega et al., 2014). In addition, SHP seems to be involved in the repression of testosterone synthesis following anti-GnRH compound exposure (Vega et al., 2014). These data have highlighted a link between hypothalamo-pituitary axis, DAX-1 and SHP in testicular androgen metabolism and thus testicular physiology.

1.4. Integration of data and conclusions

These data suggest that local mediators are involved in a negative feedback of steroid synthesis. Combined all the above data improve our knowledge of the local control of the testicular steroidogenesis with the identification of the molecular links between the hypothalamo-pituitary axis and the FXR α /SHP and FXR α /DAX1 signaling pathways. These are important findings as the control of the Leydig cell functions is predominantly mediated by the hypothalamo-pituitary-gonadal axis *via* LH/CG. It highlights that FXR α might act as an important actor of the regulation of testicular physiology during puberty. This is of interest in order to identify the etiology of primary hypogonadism.

Infertility is defined as the failure of a couple to conceive after 12 months of unprotected sexual intercourse. It affects approximately 10–15% of all couples worldwide (Callister, 2010). Male factors contribute nearly 30–55% of all cases of infertility. The high rates of male infertility are governed by a variety of causative factors, including genetic defects, environmental pollutants, physiological and endocrine failures, and testis pathologies (Hauser and Sokol, 2008).

The present review highlights the links between nuclear receptors and the efficiency of the Leydig cell endocrine function (Figure- 1). As reviewed here, several nuclear receptors, adopted or orphans, have been demonstrated to be key regulators of lipid homeostasis. Indeed, cholesterol plays an important role in maintenance of reproductive functions and can be responsible of fertility disorders. We thus propose here a model combining the reviewed data.

After the activation of the hypothalamo-pituitary axis, the LH will stimulate its receptor in the Leydig cells (Fig. 1). There, in combination with the nuclear receptors such as NGFIB, SF-1 and LRH-1, Phospho-Creb induces the expression of steroidogenic genes. In the meantime, it has been demonstrated that the LH/CG, in part through AMPK signaling pathway, will repress the expression of *Shp* and *Dax-1* two repressors of the steroid synthesis. These later act mainly through the inhibition LRH-1 and SF-1. Surprisingly, it has been demonstrated that the LH/CG signaling pathway induces the expression FXR α . This might prepare a kind of negative feedback. Indeed, it has been proposed FXR α first regulated the expression of *Shp* and *Dax-1* for the repression of steroid

synthesis. In addition, FXR α was also demonstrated to repress the expression of the *Lhcgr* gene that must also participate to reduce the response of Leydig cells to the hypothalamus-pituitary axis.

However, it has not been clearly studied whether the nuclear receptors, highlighted in this review; could impact of the hypothalamus and LH and FSH production by the pituitary. Thus further data using transgenic mouse models (knock-out mice) will be needed to better define the complete crosstalk mechanisms at the hypothalamus/pituitary levels that could lead to an alteration of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and in turn the alteration of testicular physiology and particularly steroid synthesis.

New perspectives of research are now open. But several questions need to be answered. Studies must be conducted to analyze in human the alteration of the expression of all these nuclear receptors as well as to define if mutations (polymorphisms) of these NRs could be associated with male fertility disorders. In the future, these NRs may help to better understand, at the molecular level, the association between Metabolic Syndrome and infertility or the links between exposure to estrogenic endocrine disrupters and male fertility disorders associated with alteration of the hypothalamus-pituitary axis.

It will remain to define if some of these nuclear receptors could be used as therapeutical targets? Such ideas have been reported for the orphan nuclear receptors in different diseases. However, the difficulty remains to target specific nuclear receptors in a particular developmental window in a specific cell type.

Regarding the complexity of the interactions throughout the hypothalamo-pituitary-gonadal axis, there still lot of efforts to put on this research area to improve the treatment of human fertility disorders.

Grant supports

The study was funded by Inserm, CNRS, Université Clermont Auvergne. Volle's team received support by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP20–25).

Declaration of competing interest

Authors declare to have no conflict of interests.

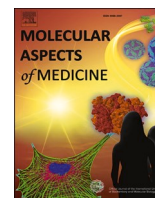
References

- Abdou, H.S., Robert, N.M., Tremblay, J.J., 2016. Calcium-dependent Nr4a1 expression in mouse Leydig cells requires distinct AP1/CRE and MEF2 elements. *J. Mol. Endocrinol.* 56, 151–161. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0202>.
- Ahn, S.W., Gang, G.-T., Kim, Y.D., Ahn, R.-S., Harris, R.A., Lee, C.-H., Choi, H.-S., 2013. Insulin directly regulates steroidogenesis via induction of the orphan nuclear receptor DAX-1 in testicular Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 288, 15937–15946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451773>.
- Baptistart, M., Martinot, E., Vega, A., Sédes, L., Rouaisnel, B., de Haze, A., Baron, S., Schoonjans, K., Caira, F., Volle, D.H., 2016. Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153>.
- Båvner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.-A., Treuter, E., 2005. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 16, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.10.005>.
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Lassurgère, J., Lavoué, V., Deceuninck, Y., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Pineau, C., Chevrier, C., Dejujuc-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2015. An investigation of the endocrine-disruptive effects of bisphenol a in human and rat fetal testes. *PLoS One* 10, e0117226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117226>.
- Bini, E.I., D'Attilio, L., Marquina-Castillo, B., Mata-Espinosa, D., Díaz, A., Marquez-Velasco, R., Ramos-Espinosa, O., Gamboa-Domínguez, A., Bay, M.L., Hernández-Pando, R., Bottasso, O., 2015. The implication of pro-inflammatory cytokines in the impaired production of gonadal androgens by patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 95, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.06.002>.
- Bose, H.S., Pescovitz, O.H., Miller, W.L., 1997. Spontaneous feminization in a 46,XX female patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia due to a homozygous frameshift mutation in the steroidogenic acute regulatory protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1511–1515. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3962>.
- Callister, L.C., 2010. Global infertility: are we caring yet? *MCN Am. J. Matern./Child Nurs.* 35, 174. <https://doi.org/10.1097/NMC.0b013e3181d760be>.
- Cao, G., Zhao, L., Stangl, H., Hasegawa, T., Richardson, J.A., Parker, K.L., Hobbs, H.H., 1999. Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class

- B, type 1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 13, 1460–1473. <https://doi.org/10.1210/mend.13.9.0346>.
- Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., Parker, K.L., 1997. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11540–11545.
- Casati, L., Sendra, R., Sibilia, V., Celotti, F., 2015. Endocrine disrupters: the new players able to affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 37. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00037>.
- Catalano, S., Malivindi, R., Giordano, C., Gu, G., Panza, S., Bonofiglio, D., Lanzino, M., Sisci, D., Panno, M.L., Andò, S., 2010. Farnesoid X Receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 285, 5581–5593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052670>.
- Chen, W.-Y., Juan, L.-J., Chung, B.-C., 2005. SF-1 (nuclear receptor 5A1) activity is activated by cyclic AMP via p300-mediated recruitment to active foci, acetylation, and increased DNA binding. *Mol. Cell Biol.* 25, 10442–10453. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10442-10453.2005>.
- Chen, W.-Y., Weng, J.-H., Huang, C.-C., Chung, B.-C., 2007. Histone deacetylase inhibitors reduce steroidogenesis through SCF-mediated ubiquitination and degradation of steroidogenic factor 1 (NR5A1). *Mol. Cell Biol.* 27, 7284–7290. <https://doi.org/10.1128/MCB.00476-07>.
- Clark, B.J., Cochrum, R.K., 2007. The steroidogenic acute regulatory protein as a target of endocrine disruption in male reproduction. *Drug Metab. Rev.* 39, 353–370. <https://doi.org/10.1080/03602530701519151>.
- Conley, A.J., Bird, I.M., 1997. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol. Reprod.* 56, 789–799.
- Duan, P., Huang, X., Ha, M., Li, L., Liu, C., 2020. miR-142-5p/DAX1-dependent regulation of P450c17 contributes to triclozan-mediated testosterone suppression. *Sci. Total Environ.* 717, 137280. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137280>.
- Dufau, M.L., Catt, K.J., 1978. Gonadotropin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. *Vitam. Horm.* 36, 461–592.
- Edelstein, N.Y., Rey, R.A., 2019. Importance of the androgen receptor signaling in gene transactivation and transrepression for pubertal maturation of the testis. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8080861>.
- Ehrlund, A., Anthonisen, E.H., Gustafsson, N., Venticlef, N., Robertson Remen, K., Dandimopoulos, A.E., Galeeva, A., Pelto-Huikko, M., Lalli, E., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.-A., Treuter, E., 2009. E3 ubiquitin ligase RNF31 cooperates with DAX-1 in transcriptional repression of steroidogenesis. *Mol. Cell Biol.* 29, 2230–2242. <https://doi.org/10.1128/MCB.00743-08>.
- Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H., 2004. Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nondepressed-5/transformation/transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 127–141. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0110>.
- Gray, M.A., Squires, E.J., 2013. Effects of nuclear receptor transactivation on steroid hormone synthesis and gene expression in porcine Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 133, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.014>.
- Guercio, G., Saraco, N., Costanzo, M., Marino, R., Ramirez, P., Berenshtein, E., Rivarola, M.A., Belgorosky, A., 2020. Estrogens in human male Gonadotropin secretion and testicular physiology from infancy to late puberty. *Front. Endocrinol.* 11, 72. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00072>.
- Gurung, P., Yetiskul, E., Jialal, I., 2020. Physiology, male reproductive system. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Haider, S.G., 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.* 233, 181–241. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)33005-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)33005-6).
- Hammar, M., Petersson, F., 1986. Testosterone production in vitro in human testicular tissue. *Andrologia* 18, 196–200.
- Hauser, R., Sokol, R., 2008. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil. Steril.* 89, e59–65. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.033>.
- Hess, R.A., Cooke, P.S., 2018. Estrogen in the male: a historical perspective. *Biol. Reprod.* 99, 27–44. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy043>.
- Holota, H., Thirouard, L., Garcia, M., Monrose, M., de Haze, A., Saru, J.-P., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, D.H., 2019. Fxr α gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105460. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105460>.
- Hou, J.W., Collins, D.C., Schleicher, R.L., 1990. Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology* 127, 2047–2055. <https://doi.org/10.1210/endo-127-5-2047>.
- Houten, S.M., Volle, D.H., Cummins, C.L., Mangelsdorf, D.J., Auwerx, J., 2007. In vivo imaging of farnesoid X receptor activity reveals the ileum as the primary bile acid signaling tissue. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 1312–1323. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0113>.
- Hu, M.-C., Hsu, H.-J., Guo, I.-C., Chung, B.-C., 2004. Function of Cyp11a1 in animal models. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.024>.
- Hu, X., Zhang, Q., Zheng, J., Kong, W., Zhang, H.-H., Zeng, T.-S., Zhang, J.-Y., Min, J., Wu, C., Chen, L.-L., 2017. Alteration of FXR phosphorylation and sumoylation in liver in the development of adult catch-up growth. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 242, 297–304. <https://doi.org/10.1177/1535370216641788>.

- Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K., 2014. Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.11.005>.
- Ishii, T., Hori, N., Amano, N., Aya, M., Shibata, H., Katsumata, N., Hasegawa, T., 2019. Pubertal and adult testicular functions in nonclassical lipoid congenital adrenal hyperplasia: a case series and review. *J. Endocr. Soc.* 3, 1367–1374. <https://doi.org/10.1210/je.2019-00086>.
- Jarvis, S., Williamson, C., Bevan, C.L., 2019. Liver X receptors and male (In)fertility. *Int. J. Mol. Sci.* 20 <https://doi.org/10.3390/ijms20215379>.
- Jégou, B., 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 147, 25–96.
- Jin, J.-M., Yang, W.-X., 2014. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene* 551, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.048>.
- Kabbaj, O., Holm, C., Vitale, M.L., Pelletier, R.M., 2001. Expression, activity, and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase during postnatal development in the Guinea pig. *Biol. Reprod.* 65, 601–612.
- Kabbaj, O., Yoon, S.R., Holm, C., Rose, J., Vitale, M.L., Pelletier, R.-M., 2003. Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol. Reprod.* 68, 722–734.
- Kaprrara, A., Huhtaniemi, I.T., 2018. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: tales of mice and men. *Metabolism* 86, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>.
- Kerr, J.B., 1991. Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19, 215–240. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060190208>.
- Kim, D.-H., Kwon, S., Byun, S., Xiao, Z., Park, S., Wu, S.-Y., Chiang, C.-M., Kemper, B., Kemper, J.K., 2016. Critical role of RanBP2-mediated SUMOylation of Small Heterodimer Partner in maintaining bile acid homeostasis. *Nat. Commun.* 7 <https://doi.org/10.1038/ncomms12179>.
- Krylova, I.N., Sablin, E.P., Moore, J., Xu, R.X., Waitt, G.M., MacKay, J.A., Juzumiene, D., Bynum, J.M., Madauss, K., Montana, V., Lebedeva, L., Suzawa, M., Williams, J.D., Williams, S.P., Guy, R.K., Thornton, J.W., Fletterick, R.J., Willson, T.M., Ingraham, H.A., 2005. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120, 343–355. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.024>.
- Lai, K., Harnish, D.C., Evans, M.J., 2003. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *J. Biol. Chem.* 278, 36418–36429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303913200>.
- Lai, T.-C., Hu, M.-C., 2019. Regulation of liver receptor homologue-1 by DDB2 E3 ligase activity is critical for hepatic glucose metabolism. *Sci. Rep.* 9, 5304. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41411-x>.
- Lee, F.Y., Faivre, E.J., Suzawa, M., Lontok, E., Ebert, D., Cai, F., Belsham, D.D., Ingraham, H.A., 2011. Eliminating SF-1 (NR5A1) sumoylation in vivo results in ectopic hedgehog signaling and disruption of endocrine development. *Dev. Cell* 21, 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.028>.
- Lee, J., Yang, D.J., Lee, S., Hammer, G.D., Kim, K.W., Elmquist, J.K., 2016. Nutritional conditions regulate transcriptional activity of SF-1 by controlling sumoylation and ubiquitination. *Sci. Rep.* 6, 19143. <https://doi.org/10.1038/srep19143>.
- Lee, Y.-K., Choi, Y.-H., Chua, S., Park, Y.J., Moore, D.D., 2006. Phosphorylation of the hinge domain of the nuclear hormone receptor LRH-1 stimulates transactivation. *J. Biol. Chem.* 281, 7850–7855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509115200>.
- Lin, Y., Hou, X., Shen, W.-J., Hanssen, R., Khor, V.K., Cortez, Y., Roseman, A.N., Azhar, S., Kraemer, F.B., 2016. SNARE-mediated cholesterol movement to mitochondria supports steroidogenesis in rodent cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 30, 234–247. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1281>.
- Macchiarulo, A., Rizzo, G., Costantino, G., Fiorucci, S., Pellicciari, R., 2006. Unveiling hidden features of orphan nuclear receptors: the case of the small heterodimer partner (SHP). *J. Mol. Graph. Model.* 24, 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.09.016>.
- Mäkelä, J.-A., Hobbs, R.M., 2019. Molecular regulation of spermatogonial stem cell renewal and differentiation. *Reprod. Camb. Engl.* 158, R169–R187. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0476>.
- Manna, P.R., Chandrala, S.P., Jo, Y., Stocco, D.M., 2006. cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 81–95. <https://doi.org/10.1677/jme.1.02065>.
- Maqdashy, S., Trousson, A., Tauveron, I., Volle, H., David, Baron, S., Lobaccaro, A., Jean-Marc, 2016. Once and for all, LXRalpha and LXRBeta are gatekeepers of the endocrine system. *Mol. Aspect. Med.* 49, 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.001>.
- Maris, P., Campana, A., Barone, I., Giordano, C., Morelli, C., Malivindi, R., Sisci, D., Aquila, S., Rago, V., Bonfiglio, D., Catalano, S., Lanzino, M., Andò, S., 2015. Androgens inhibit aromatase expression through DAX-1: insights into the molecular link between hormone balance and Leydig cancer development. *Endocrinology* 156, 1251–1262. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1654>.
- Martin, L.J., Tremblay, J.J., 2010. Nuclear receptors in Leydig cell gene expression and function. *Biol. Reprod.* 83, 3–14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.083824>.
- Martinet, E., Baptissart, M., Véga, A., Sèdes, L., Rouaisnel, B., Vaz, F., Saru, J.-P., de Haze, A., Baron, S., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, D.H., 2017. Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXRalpha. *Sci. Rep.* 7, 42182. <https://doi.org/10.1038/srep42182>.
- Mascaró, C., Nadal, A., Hegardt, F.G., Marrero, P.F., Haro, D., 2000. Contribution of steroidogenic factor 1 to the regulation of cholesterol synthesis. *Biochem. J.* 350 Pt 3, 785–790.
- McCabe, E.R.B., 2007. DAX1: increasing complexity in the roles of this novel nuclear receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.017>.
- Meeks, J.J., Russell, T.A., Jeffs, B., Huhtaniemi, I., Weiss, J., Jameson, J.L., 2003. Leydig cell-specific expression of DAX1 improves fertility of the Dax1-deficient mouse. *Biol. Reprod.* 69, 154–160. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011429>.
- Meinsohn, M.-C., Smith, O.E., Bertolin, K., Murphy, B.D., 2019. The orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 and liver receptor homologue-1: structure, regulation, and essential roles in mammalian reproduction. *Physiol. Rev.* 99, 1249–1279. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2018>.
- Miao, J., Xiao, Z., Kanamaluru, D., Min, G., Yau, P.M., Veenstra, T.D., Ellis, E., Strom, S., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Kemper, J.K., 2009. Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation. *Genes Dev.* 23, 986–996. <https://doi.org/10.1101/gad.1773909>.
- O'Donnell, L., 2014. Mechanisms of spermiogenesis and spermatogenesis and how they are disturbed. *Spermatogenesis* 4, e979623. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979623>.
- O'Hara, L., Smith, L.B., 2015. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metabol.* 29, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.006>.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapère, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., Gavish, M., 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.005>.
- Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol. Reprod.* 52, 217–225.
- Pivonello, R., Menafra, D., Riccio, E., Garifalos, F., Mazzella, M., de Angelis, C., Colao, A., 2019. Metabolic disorders and male hypogonadotropic hypogonadism. *Front. Endocrinol.* 10, 345. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00345>.
- Plant, T.M., 2015. 60 years of neuroendocrinology: the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J. Endocrinol.* 226, T41–T54. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0113>.
- Rey, R., Campo, S., Ayuso, S., Nagle, C., Chemes, H., 1995. Testicular steroidogenesis in the Cebus monkey throughout postnatal development. *Biol. Reprod.* 52, 997–1002.
- Sadasivam, M., Ramachandiran, B., Balakrishnan, S., Pralathathan, C., 2015. TNF- α -mediated suppression of Leydig cell steroidogenesis involves DAX-1. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* Al 64, 549–556. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0835-8>.
- Sedes, L., Desdoits-Lethimonier, C., Rouaisnel, B., Holota, H., Thirouard, L., Lesne, L., Damon-Soubeyrand, C., Martinot, E., Saru, J.-P., Mazaud-Guittot, S., Caira, F., Beaudoin, C., Jegou, B., Volle, H., David, 2018. Crosstalk between BPA and FXRalpha signaling pathways lead to alterations of undifferentiated germ cell homeostasis and male fertility disorders. *Stem Cell Rep* 11, 944–958. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.018>.
- Sen, A., Hoffmann, H.M., 2020. Role of core circadian clock genes in hormone release and target tissue sensitivity in the reproductive axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 501, 110655. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110655>.
- Seol, W., Choi, H.S., Moore, D.D., 1996. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272, 1336–1339.
- Sharma, R.P., Schuhmacher, M., Kumar, V., 2017. Review on crosstalk and common mechanisms of endocrine disruptors: scaffolding to improve PBPK/PD model of EDC mixture. *Environ. Int.* 99, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.016>.
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Sato, T., Suyama, M., Ohkawa, Y., Doi, M., Okamura, H., Suzuki, K., 2018. Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells. *Dev. Camb. Engl.* 145 <https://doi.org/10.1242/dev.169136>.
- Sierens, J., Jakody, I., Poobalan, Y., Meachem, S.J., Knowler, K., Young, M.J., Sirianni, R., Pezzi, V., Clyne, C.D., 2010. Localization and regulation of aromatase liver receptor homologue-1 in the developing rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.03.001>.
- Sirianni, R., Seely, J.B., Attia, G., Stocco, D.M., Carr, B.R., Pezzi, V., Rainey, W.E., 2002. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* 174, R13–R17.
- Skinner, M.K., Norton, J.N., Mullaney, B.P., Rosselli, M., Whaley, P.D., Anthony, C.T., 1991. Cell-cell interactions and the regulation of testis function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637, 354–363.
- Stein, S., Lemos, V., Xu, P., Demaghy, H., Wang, X., Ryu, D., Jimenez, V., Bosch, F., Lüscher, T.F., Oosterveer, M.H., Schoonjans, K., 2017. Impaired SUMOylation of nuclear receptor LRH-1 promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 127, 583–592. <https://doi.org/10.1172/JCI85499>.
- Stein, S., Oosterveer, M.H., Matak, C., Xu, P., Lemos, V., Havinga, R., Dittner, C., Ryu, D., Menzies, K.J., Wang, X., Perino, A., Houten, S.M., Melchior, F., Schoonjans, K., 2014. SUMOylation-dependent LRH-1/PROX1 interaction promotes atherosclerosis by decreasing hepatic reverse cholesterol transport. *Cell Metabol.* 20, 603–613. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.023>.
- Stocco, D.M., 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J. Endocrinol.* 164, 247–253.
- Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* 19, 2647–2659. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0532>.

- Syriou, V., Papanikolaou, D., Kozyraki, A., Goulis, D.G., 2018. Cytokines and male infertility. *Eur. Cytokine Netw.* 29, 73–82. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0412>.
- Tajima, K., Yoshii, K., Fukuda, S., Orisaka, M., Miyamoto, K., Amsterdam, A., Kotsuji, F., 2005. Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology* 146, 2903–2910. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0093>.
- Talamillo, A., Ajuria, L., Grillo, M., Barroso-Gomila, O., Mayor, U., Barrio, R., 2020. SUMOylation in the control of cholesterol homeostasis. *Open Biol* 10. <https://doi.org/10.1098/rsob.200054>.
- Van Thiel, D.H., Gavaler, J.S., Zajko, A.B., Cobb, C.F., 1985. Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4, 616–621.
- Vega, A., Martinot, E., Baptissart, M., de Haze, A., Saru, J.-P., Baron, S., Caira, F., Schoonjans, K., Lobaccaro, J.-M.A., Volle, D.H., 2014. Identification of the link between the hypothalamo-pituitary axis and the testicular orphan nuclear receptor NROB2 in adult male mice. *Endocrinology*, en20141418. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1418>.
- Venugopal, S., Martinez-Arguelles, D.B., Chebbi, S., Hullin-Matsuda, F., Kobayashi, T., Papadopoulos, V., 2016. Plasma membrane origin of the steroidogenic pool of cholesterol used in hormone-induced acute steroid formation in Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 291, 26109–26125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.740928>.
- Vermeulen, A., 1996. Decreased androgen levels and obesity in men. *Ann. Med.* 28, 13–15. <https://doi.org/10.3109/07853899608999068>.
- Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.-M.A., Verhoeven, G., Schoonjans, K., Auwerx, J., 2007a. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* 21, 303–315. <https://doi.org/10.1101/gad.409307>.
- Volle, D.H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Déchelotte, P., Sion, B., Veyssi re, G., Benahmed, M., Lobaccaro, J.-M.A., 2007b. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 1014–1027. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0277>.
- Volle, H., David Decourteix, M., Garo, E., McNeilly, J., Fenichel, P., Auwerx, J., McNeilly, S., Alan, Schoonjans, K., Benahmed, M., 2009. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3752–3764. <https://doi.org/10.1172/JCI38521>.
- Wang, R.-S., Yeh, S., Tzeng, C.-R., Chang, C., 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 30, 119–132. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0025>.
- Wang, S., Lai, K., Moy, F.J., Bhat, A., Hartman, H.B., Evans, M.J., 2006. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* 147, 4025–4033. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1485>.
- Wang, Z.J., Jeffs, B., Ito, M., Achermann, J.C., Yu, R.N., Hales, D.B., Jameson, J.L., 2001a. Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7988–7993. <https://doi.org/10.1073/pnas.141543298>.
- Wang, Z.N., Bassett, M., Rainey, W.E., 2001b. Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 beta-hydroxylase. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 255–258.
- Woolveridge, I., Bryden, A.A., Taylor, M.F., George, N.J., Wu, F.C., Morris, I.D., 1998. Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 701–707.
- Yang, Q., Ma, B., Qiao, H., Ma, H., Dong, Y., Cao, L., Ma, J., Li, Z., 2017. TGFβ1 represses the expression of SF1 and LRH1 to inhibit E2 production in rat LCs. *Reprod. Camb. Engl.* 153, 621–629. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0044>.
- Yu, R.N., Achermann, J.C., Ito, M., Jameson, J.L., 1998. The role of DAX-1 in reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 9, 169–175. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(98\)00048-4](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(98)00048-4).
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R., 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635–641. <https://doi.org/10.1038/372635a0>.
- Zhang, Z., Yu, Y., Xu, H., Wang, C., Ji, M., Gu, J., Yang, L., Zhu, J., Dong, H., Wang, S.-L., 2017. High-fat diet aggravates 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether-inhibited testosterone production via DAX-1 in Leydig cells in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 323, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.03.010>.
- Zheng, S.-J., Tian, H.-J., Cao, J., Gao, Y.-Q., 2010. Exposure to di(n-butyl)phthalate and benzo(a)pyrene alters IL-1β secretion and subset expression of testicular macrophages, resulting in decreased testosterone production in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 248, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.008>.
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., He, Z., 2019. The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* CMLS 76, 2681–2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>.



New perspectives on PPAR, VDR and FXR α as new actors in testicular pathophysiology

M. Monrose, L. Thirouard, M. Garcia, H. Holota, A. De Haze, F. Caira, C. Beaudoin, D.H. Volle^{*}

Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, CNRS UMR-6293, GReD, F-63001, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT

The incidence of reproductive disorders is constantly increasing and affects 15% of couples, with male's abnormalities diagnosed in almost half of the cases. The male gonads exert two major functions of the testis with the productions of gametes (exocrine function) and of sexual hormones (endocrine function). In the last decades, next to steroid receptors such as estrogen and androgen receptors, the involvement of other members of the nuclear receptor superfamily have been described such as Steroidogenic factor-1 (SF-1), Nerve growth factor IB (NGFIB), Liver-X-Receptor α (LXR α) and Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (DAX-1). The purpose of this review is to highlight the emerging roles of some members of the nuclear receptor superfamily among which the vitamin-D Receptor (VDR), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR), Farnesoid-X-Receptor- α (FXR α). We discuss how these receptors could participate to explain male fertility disorders; and their potential to be used as biomarkers or therapeutic targets for management of fertility disorders.

1. Introduction

People's health depends on integrated physiology which itself relies on the proper function of organs. The organ's integrity depends on cellular homeostasis; which results from the coordinated expressions of genes that are involved in vital cellular functions (metabolism, proliferation, cell death program). The expressions of these genes are modulated by multiple transcription factors. Among them, the superfamily of nuclear receptors (NR) has been defined to be involved in the regulation of physiological functions and has been associated with the appearance and the development of several pathologies. The NR superfamily represents one of the largest groups of transcription factors in eukaryotes.

In this review, we focus on the emerging roles of some members of the nuclear receptor superfamily on male reproductive function. This is of importance as the incidence of reproductive disorders is constantly increasing and affects 15% of couples. Among the NRs, the present review highlights data on the vitamin-D Receptor (VDR), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) and Farnesoid-X-receptor- α (FXR α). We discuss how these receptors could be involved in male fertility disorders; and their potential to be used as biomarkers or as therapeutic targets for management of fertility disorders.

2. The nuclear receptor superfamily

Nuclear receptors are transcription factors that are ligand activated. They regulate a variety of physiological processes by inducing the

transcription of target genes. Among the receptors, the nuclear receptors appear in the last decades to play major roles in both physiology and pathologies. The NRs have been defined several decades ago with the identification of the steroid receptors. Extensive studies have been made by then and several members of the superfamily have been identified. These researches allowed identifying 48 members in human. Since the beginning, scientists have made analyses in order to characterize the structure and the functions of the NRs.

2.1. Structure of the NRs

Almost all the NRs have the overall same structure. The NR's structure is divided into key functional areas (Giguère, 1999). The most variable part regarding size and protein sequence is the N-terminal part (also called domain A/B). It contains the activating function-1 (AF-1), which is responsible for the interactions of the NRs with co-activators and co-repressors. These interactions are independent of the binding of the ligand. However, this association with the co-factors is involved in the optimal transcriptional activity of the NRs.

The second domain corresponds to the internal central domain. It is highly conserved in the group. This domain contains two zinc fingers, which are involved in part to the DNA binding. This is an essential element as NRs act as transcription factors *via* the binding to specific promoter sequences called hormone response elements (HRE). Depending whether the NRs act as monomer or dimer, these motifs are half-sites of six bases or two half-sites separated by 0–5 bases. The HRE

^{*} Corresponding author. INSERM U1103, CNRS UMR-6293, UCA, GReD, 28 place Henri Dunant, 63037, TSA, 50400, Clermont-Ferrand, France.
E-mail addresses: david.volle@inserm.fr, david.volle@uca.fr (D.H. Volle).

are organized in direct (DR, direct), inverted (IR, inverted), or mirrored (ER, everted) repeats.

A hinge region connects the DNA binding domain (DBD) to the ligand-binding domain (LBD). This causes the rotation of the LBD to allow the binding of the dimer on the HREs. In addition, this region contains the nuclear localization signal (NLS), which transfers the receptor to the nucleus.

Finally the last domain corresponds to LBD. This confers the specificity and selectivity of the ligand response. This C-terminal domain has second transcription activation domain (AF-2). The AF-2 acts in a ligand-dependent manner for the attachment of co-activators.

NRs activate or repress gene transcription. Transcriptional activation is dependent of the ligand binding. NRs recruit co-activator proteins leading to the recruitment of a larger complex with histone modifying enzymes such as histone acetyltransferases or histone methyltransferases and then of transcriptional machinery.

The inhibition of transcription by the NRs relies on the interaction with co-repressors that recruit histone deacetylases (HDACs).

2.2. Classification of the NR superfamily

Among the different classifications of nuclear receptors that have been proposed, here we highlight the one relying on functional point of view. In that case, there are three main categories of nuclear receptors: the endocrine receptors, the "adopted" orphan nuclear receptors with low-affinity ligand, and the nuclear orphan receptors.

* **The endocrine receptors.** These receptors respond to steroid hormones as ligands, and they have a high affinity for their ligands. Among these NRs, there are the androgen, estrogen, progesterone, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptors. These NRs are associated with heat-shock proteins within the cytoplasm. The arrival and the binding of the ligand lead to the departure of heat-shock proteins. Then, the NR could act through cytoplasmic signaling pathways in interaction with MAPK, PI3K or ERK pathways. In another way, the NRs can translocate to the nucleus and dimerize. The endocrine receptors bind as homodimer to HRE, consisting of two inverted repeats, in the 5'-regulatory sequences of their target genes. They regulate gene expressions through the recruitment of transcriptional co-activators.

* **The adopted receptors.** It has been suggested several years ago that these NRs are permanently located on their response elements. This point could be now amended as some of these NRs could have cytoplasmic activity. When bind to the DNA, in absence of ligand, NRs are associated transcriptional co-repressors in order to repress the transcription. The arrival of the ligand leads to modulation of the NR conformation, which is associated with the release of co-repressors and recruitment of co-activators. This class of nuclear receptors includes members, such as LXR α , β (liver X receptor α , β) and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), which act as heterodimer with the retinoid X receptor (RXR). Others, such as VDR, act as homodimers. However, there is evidence that most of these NRs are also capable of acting as homodimers or monomers.

* **The orphan receptors.** This corresponds to NRs for which no natural ligands have been identified such as estrogen-related receptors (ERR, NR3B), steroidogenic factor 1 (SF1; Nr5A1).

This category also contains DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1; NR0B1) and SHP (Small Heterodimer Partner; NR0B2), which are quite closed. Both NRs lacks the classical DNA-binding domain (DBD) (Seol et al., 1996). They act as a negative regulators of transcription via the interactions to other nuclear receptors and the recruitment of co-repressors or histone methyl transferases (Båvner et al., 2005).

3. The testicular physiology

The testis, the male gonad, is composed of different types of cells in order to ensure the synthesis of hormones (endocrine function) and the

production of spermatozoa (exocrine function). As the NRs highlighted in this review are expressed in different cell types of the testis and could thus participate to control testicular functions, we report here a short overview of testis physiology.

3.1. Testicular physiology

The Leydig cells ensure part of the endocrine function of the testis with the synthesis of the male sexual hormone, namely testosterone. The testes also produce estrogen and progesterone. Testes produce the major quantity of androgens in mammals. Steroid hormones are produced from cholesterol during steroidogenesis via a multi-enzymatic process (Hu et al., 2004, p. 20) (Midzak and Papadopoulos, 2015). The testicular endocrine function is under the control of the hypothalamo-pituitary axis (Shacham et al., 2001). It is well-known that sex steroids exert a negative feedback on the hypothalamo-pituitary axis to avoid over production of steroids.

Steroids are critical for many physiological functions related to urogenital tract or development of muscles or bones for examples. During the embryonic development, the fetal Leydig cells secrete a first peak of testosterone that is associated the urogenital tract masculinization. Then later on at puberty, the increase of testosterone production is responsible of the establishment of secondary sexual characteristics and the beginning of spermatogenesis. This is in part supported by maturation of Sertoli cells in response to androgen signaling. Finally, at adulthood, testosterone concentrations are critical to ensure the efficiency of spermatogenesis (survival and differentiation of germ cell lineage) and the maintenance of the normal genital tract (prostate, epididymis, seminal vesicle). The critical functions of steroids like androgens have been highlighted by human diseases such as androgen resistance due mutations within the androgen receptor gene (AR; NR3C4) (Oakes et al., 2008) and the analysis of rodent transgenic models. Next to the androgens, estrogens act through the nuclear receptors Er-alpha (ER α ; Esr1; NR3a1), ER-beta (ER β ; Esr2, NR3A2) and via the G-protein-coupled receptor (GPCR; GPR30) (Carreau et al., 2011) (Hess and Cooke, 2018). In that line, over the last decades, many reports in both human and rodent models have highlighted that exposure to exogenous molecules, so called endocrine disrupters, are associated with testicular abnormalities and male fertility disorders (Palanza et al., 2016; Sedes et al., 2018).

The exocrine function of the testis relies on the interactions between almost all the cell types of the male gonad. It is ensured within the seminiferous tubules, where Sertoli cells and germ cells cooperate to achieve the spermatogenesis.

Sertoli cells are key component of the seminiferous tubules. They are involved in the nutritional and structural support of the germ cell lineage to maintain the integrity of the epithelium. One main function of Sertoli cells is to generate the blood-testicular-barrier (BTB). It is established at puberty following the response to diverse signaling pathways such as androgens, retinoids and thyroid hormones (Tarulli et al., 2012). The structural function of the BTB is ensured by tight junctions (occludin, zonula occludens), adherens junctions (cadherins, catenins, nectines, laminins, integrins) and gap junctions (connexin) (Cheng and Mruk, 2012). The BTB is also involved in the nutritional function of Sertoli, as sugars, amino acids, hormones and electrolytes could be transferred to neighboring cells. The BTB also confer an immune context to protect post-meiotic cells that have been generated after the establishment of the immune system. The dynamic of cell-cell interactions between Sertoli and germ cells are critical for germ cells progress within epithelium and then their release at spermiation. This process relies on the synthesis of proteases and protease inhibitors by Sertoli cells (Lui et al., 2003).

The Sertoli cells support the complex coordinated process of spermatogenesis that gives spermatozoa. The length of a spermatogenesis wave is different between species with 35 days in the mouse and 74 days in humans.

The activity of spermatogenesis throughout life relies on the well-established balance between self-renewal of spermatogonial stem cells and differentiation. Under the control of multiple stimuli, germ cells enter a differentiation path. Spermatogonia undergo mitosis to produce primary spermatocytes (Spermatocyte I). Then meiosis is initiated at puberty giving rise to round spermatids, which then undergo new biochemical and morphological reshuffles giving rise to spermatozoa. Among these changes, the replacement of most histones by protamines (Cho et al., 2001) allow the compaction of chromatin (Dadoue, 2003) that is essential for the germ cell DNA protection and for the establishment of sperm head morphology. In addition, the flagellum and axonema are set up; both structures are essential for the movement of spermatozoa. Final maturation of the spermatozoa occurs during the epididymal transit and in the female genital tract (Bedford, 1970).

The incidence of reproductive disorders is constantly increasing and affects 15% of couples. Male's abnormalities are diagnosed in half of the cases. The increased incidence of pathologies of the male urogenital tract has been associated with exposures to environmental molecules. In addition, lifestyle is also involved in fertility issues such as smoking or diet. In that line, metabolic syndrome (MetS) has been linked with several abnormalities including overweight, dyslipidemia, hypertension and impaired glucose metabolism. The complexity of the interactions between metabolism and male fertility has been described in the last decades. Among all the consequences of MetS, male reproductive function is altered in some obese and diabetic patients. The relation between MetS and male reproductive function is still being studied to be fully deciphered. It has appeared that metabolism plays a major role in the regulation of testicular physiology and associated pathologies. In that line, male reproductive capacities depend on testicular glucose homeostasis. Altered glucose levels cause adverse effects on male fertility via the alterations of testicular cells types, sperm motility, and seminal plasma. Diabetes is associated with the increase of oxidative stress that lead to sperm DNA damages (Shi et al., 2017).

In all these case, regardless the origin of testicular disorders, the alterations of testicular physiology can participate to multiple pathologies such as alterations of male sexual maturation during puberty and fertility disorders. In addition, it has been demonstrated that alterations of germ cell quality could be associated with transmission of abnormalities to progenies even over several generations. These transmissions are supposed to be driven by altered epigenetic patterns of sperm cells. It could be associated with multigenerational programming of pathologies such as fertility disorders or metabolic diseases (Aiken et al., 2016; Anway et al., 2005; Baptissart et al., 2018).

Next to fertility disorders, alterations of germ cells could be associated with testicular germ cell cancers (TGCT). TGCT is a rare solid tumor that accounts for 1% of all cancers in men. Testicular germ cell tumors are the most frequently diagnosed cancer in young men (15–39 years old) (Batoool et al., 2019; Rajpert-De Meyts, 2019). The development of TGCT might be influenced by the exposures to chemicals with endocrine disrupting properties. Of the major influences described, ethnicity and familial history of TGCT are known to be associated with increased TGCT risk. It is estimated that 40% of TGCT are of genetic origin (Litchfield et al., 2015).

3.2. Peroxisome proliferator-activated receptors & testis

The Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are members of the nuclear receptor superfamily and have been demonstrated to regulate lipid homeostasis and tumorigenesis for examples. There are three isotypes of PPARs named PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ . Within the testis, all PPARs are expressed in both somatic and germ cells (Froment et al., 2006). PPAR β/δ are expressed in Leydig, Sertoli and germ cells. In the testis, PPAR γ protein is detected at high level in Sertoli cells and a weak expression is noticed in spermatocytes. Ppar γ mRNA was highly expressed in late spermatids, while Ppar β mRNA was highly expressed in round spermatids. Consistently, FACS cell sorting experiments have

shown that PPAR γ mRNA is found in M2A positive germ cells within first trimester human fetal testes (Muczynski et al., 2012).

The most defined expression pattern is the one of PPAR α . In the developing rat testis, PPAR α is detected since the first days after birth in tubular and interstitial cells. In addition, PPAR α is expressed in interstitial Leydig cells and in tubular cells mainly in meiotic spermatocytes, spermatids as well as in the peritubular cells within adult human testis.

These patterns of expression suggest that PPARs might play some roles in testicular physiology. This is sustained by the phenotypes observed in mice deficient for these receptors or in experiments using stimulation of wild-type males by specific modulators. PPAR α - and PPAR β/δ -null mice are viable and fertile. However, some data have suggested their roles in gamete maturation.

3.2.1. PPARs in leydig cells

PPAR γ acts as an important molecule for regulating energy homeostasis. It modulates the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, and is reciprocally regulated by the HPG.

Inflammation alters testicular steroidogenesis and spermatogenesis, and in turn male infertility. It has been suggested that PPAR transcriptional activity disturbs the expression of both estrogen and androgen receptors and impair testicular steroidogenesis and ROS metabolism in the context of LPS-induced inflammation (Wang et al., 2020).

Using a combination of pharmacological approaches, it has been demonstrated that in Leydig cells, PPAR α and PPAR γ , in interaction with the signaling pathway of the G-protein coupled estrogen receptor (GPER), regulate steroidogenesis through the control of lipid homeostasis. These collaborative pathways also regulate morphology, migration competences and cytoskeleton structure of Leydig cells (Gorowska-Wojtowicz et al., 2018).

Over the last decades, it has been widely defined that endocrine disrupters, through the alterations of hormonal homeostasis, impact testicular physiology and male fertility. Some of these endocrine disrupters have been identified as PPAR ligands. In that line, it has been demonstrated that 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), a commonly used herbicide and a possible endocrine disruptor is a modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- α . Recent data have demonstrated that the deleterious impacts of 2,4-D are in part mediated by PPAR α . Indeed, exposure to 2,4-D leads to a decrease of testicular testosterone concentration, which in turn results in Sertoli and germ cells alterations and fertility disorders. Consistent with the data from Gorowska-Wojtowicz, PPAR α mainly acts through the downregulation of the expressions of genes involved in lipid homeostasis. These effects of the 2,4-D are mediated by PPAR α as no effect is observed in Ppara-null males (Harada et al., 2016).

Regarding fetal testis development, interaction of xenobiotics such as diisobutyl phthalate (DiBP) with PPARs leads to reduced anogenital distance, testosterone production and testicular expression of Insl-3 and of genes related to steroidogenesis. Moreover, PPAR α expression is lowered by Diisobutyl phthalate (DiBP) (Boberg et al., 2008).

Interestingly, it has also been proposed that PPARs expressions are altered in samples of Leydig cell tumors. In human, there is a down-regulation of PPAR in Leydig cell tumors (Kotula-Balak et al., 2020a, 2020b).

3.2.2. PPAR and sertoli cells

Within Sertoli cells, multiple signaling pathways control PPAR expressions. For example, an up-regulation of PPAR α mRNA could be observed after stimulation with Follicle-Stimulating Hormone (FSH), and PPAR γ is up-regulated after lipopolysaccharide (LPS)-treatment. Moreover, some data demonstrate that exposures to xenobiotic ligands of PPAR γ and PPAR α induce their translocation to the nucleus.

Sertoli cells play a central role in spermatogenesis. They maintain the blood-testis barrier, an essential feature of seminiferous tubules, which creates the proper environment for the occurrence of the spermatogenesis. However, this confinement renders germ cells almost

exclusively dependent on Sertoli cells nursing function and support. In that line, the control of lipid metabolism and energetic metabolism in Sertoli cells plays a critical role for germ cell homeostasis. Sertoli cells oxidize fatty acids to fulfill their own energy requirements. Sertoli cells phagocytose and degrade apoptotic germ cells resulting in increasing lipid content. Fatty acids are stored as triacylglycerides within lipid droplets. Thus Sertoli cells provide nutritional support for germ cell development as they actively metabolize glucose and convert it to lactate.

One of the main functions of PPARs in Sertoli cells is to control fatty acid metabolism. Pharmacological approaches have shown that of PPAR α and PPAR β/δ regulate fatty acids (FA) metabolism through the expression of CD36, carnitine palmitoyltransferase 1, long- and medium-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases. In the same line of evidence, it has been demonstrated that PPAR γ increased triacylglycerides levels and lipid droplet content accompanied by a rise in the expression of genes for proteins involved in fatty acid storage, such as the fatty acid transporter Cd36, glycerol-3-phosphate-acyltransferases 1 and 3, diacylglycerol acyltransferase 1 and perilipins 1, 2 and 3, all proteins that participate in lipid droplet formation and stabilization. In addition, data have defined that PPAR γ significantly elevated the expression of carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1A, a key enzyme involved in fatty acid oxidation. The results indicated that PPAR γ reduced palmitoyl-induced lipid accumulation by promoting fatty acid oxidation mediated by CPT1A. PPAR γ activation leads to cytoprotection of Sertoli cells caused by dyslipidemia.

In addition, PPAR β/δ activation increases lactate energetic metabolism of Sertoli cells and germ cells. In addition, PPAR γ activation increases lactate production, accompanied by an increase in glucose uptake and Glut2 expression. These results suggest that PPAR γ activation in Sertoli cells participates to the regulation of lipid storage and lactate production thereby ensuring simultaneously the energetic metabolism for the Sertoli and germ cells.

One of the main roles of PPAR δ is sustained by the fact that Ppar δ deficient mice (Ppar δ -/-) show smaller litter size compared to wild-type littermates. PPAR δ controls several genes such as claudin-11, p27, cyclin D1, and cyclin D2 leading to alterations of Sertoli cells proliferation, maturation and formation of tight junctions. It is thus suggested that Ppar δ regulates spermatogenesis in part through the modulation of Sertoli cell functions.

In the context of exposures to endocrine disruptors, such as phthalates, lead to testicular degeneration. It has been suggested that part of the effects of phthalates could be mediated by PPARs within the Sertoli cells.

3.2.3. PPARs and germ cells

In human, PPAR γ protein is highly expressed in ejaculated spermatozoa, implying a possible role of PPAR γ signaling in regulating sperm energy dissipation. Its activation can be induced during capacitation and the acrosome reaction. PPAR γ , increases the viability of spermatozoa (Liu et al., 2015). In addition, PPAR α regulates the beta-oxidation of lipids. This is critical for the control of fatty acid and phospholipid metabolisms in germ cells. This is essential as lipid composition is key to modulate for sperm cell mobility and its viability (Douard et al., 2003).

3.2.4. PPARs & endocrine disruptors

Many xenobiotics molecules such as herbicides, plasticizers, or components of personal care products have been defined as potential activators of PPARs. This abnormal activation of the receptors must lead to altered testicular functions that are driven by PPARs. However, not that much is known regarding the impacts of the exogenous activation of PPARs on reproduction. Environmental and dietary exposure to bisphenol-A (BPA) and its toxicological consequences are extensively reported. BPA has multiple cellular targets. Thus it suggests that the role of PPARs in BPA-induced effects on male reproductive functions must be better defined.

3.2.5. PPARs and therapeutics

The identifications of the involvements of PPAR signaling pathways in pathologies led to the development of specific drugs to target these receptors in order to cure several diseases such as cardiovascular function, neurodegeneration, inflammation, cancer and reproduction, and it is well established for managing dyslipidemia, diabetes, insulin resistance, and metabolic syndrome. Many PPAR synthetic ligands are used in current clinical drug applications. However, the effects of natural and synthetic PPAR ligands need to be better defined regarding reproductive toxicology and assisted reproductive technology.

Not that much is known about PPARs in testicular germ cell cancer. Dogs are models of spontaneous testicular cancers and it has been demonstrated that PPAR- α , - β and - γ levels are higher in TGCT than in normal testicular tissue. In human, PPAR γ is also more strongly expressed in human testicular cancer cells than in normal testicular tissues. Moreover, the use of PPAR γ ligands has anti-proliferative effects on testicular cancer cells (Hase et al., 2002).

3.3. Vitamin-D receptor and testis

Vitamin D is a key regulator of calcium and phosphate homeostasis and bone physiology. In addition, other targets have been identified such as reproductive organs. Vitamin-D deficiency impairs testicular development and spermatogenesis in mice (Cito et al., 2020; Fu et al., 2017).

Vitamin D is synthesized in the skin as a result of UV-B radiation. It then binds to its nuclear receptor VDR, which has been identified many years ago. More recently, it has been established that vitamin D initiates rapid cellular responses through a putative plasma membrane-associated receptor (VDRmem).

The metabolism of Vitamin-D relies also on the expression of the vitamin D metabolizing enzymes such as the cytochrome CYP2R1, CYP27B1, and CYP24A1. The expression of the vitamin-D metabolizing enzymes is important as their presence and activity regulate the intracellular concentration of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and then VDR activation. These enzymes and VDR are expressed in the organs of the male reproductive system. In adult testis, they are mainly expressed in the germ cells. This suggests the potential roles of Vitamin-D on spermatogenesis. The expression of VDR has been observed in immature Sertoli cells including fetal Sertoli cells. In addition VDR and the vitamin-D metabolizing enzymes are also expressed in the hormone producing Leydig cells, which suggests a direct link between vitamin D and sex steroid production.

The role of Vitamin-D signaling pathways on male fertility has been highlighted by the study of vitamin-D deficient rats as well as the use of rodent models of VDR null males. Indeed, these models show altered spermatogenesis and decreased sperm count and motility. It has also been demonstrated that the decrease of Vit-D during aging might be associated with testicular aging, which leads to a decrease in spermatogenesis and steroidogenesis. Vitamin-D signaling pathways have been identified to regulate key functions in different testicular cell types such as Leydig, Sertoli and germ cells.

3.3.1. VDR & leydig cells

Vitamin-D plays an important role in reproduction by modulating testicular steroidogenesis. Vitamin-D treatment of aged rats resulted in significant improvement in sperm parameters, testicular histology, serum testosterone, and estrogen levels (Jeremy et al., 2019a, 2019b). In aged rat models, it has been defined; using *in vivo* and *in vitro* experiments, that vitamin-D directly regulates testicular steroidogenic function. Vitamin-D controls the expression of the aromatase encoding gene *Cyp19a1* as well as the expression of the androgen receptor gene. These data highlight that Vit-D signaling pathways control the activities of sex steroids, which ensure spermatogenesis during aging. Consistent with these data, Vitamin-D seems to impact steroid production in human (Holt et al., 2020).

3.3.2. VDR & sertoli cells

Vit-D homeostasis and signaling have been demonstrated to play some roles in Sertoli cells. Vit-D acts through its conventional nuclear receptor and through non-genomic effects (Menegaz et al., 2011). It has been suggested that Vit-D signaling pathways might regulate Sertoli cell secretory activities, and in turn play some roles in the control of spermatogenesis. However, further studies will be necessary to decipher the roles of VDR receptors in Sertoli cells through the use of specific inactivation of the *Vdr* gene using the recombinase Cre under the control of the AMH promoter sequences.

3.3.3. VDR and germ cells

It has been demonstrated that in an aging rat model, Vit-D increases cell proliferation and decreases apoptosis. This is associated with a lower level of oxidative stress and modulation of the advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor (AGER). Thus during aging, the altered lower levels of Vit-D impacts testicular physiology through the control of balance between the proliferation and apoptosis processes (Jeremy et al., 2019a, 2019b).

Interestingly, it has been recently demonstrated that vitamin-D induces modulation of DNA methylation within sperm cells (Xue et al., 2018), which could thus be hypothesized to impact male fertility.

This impact of Vit-D/VDR signaling pathways in germ cell has also been demonstrated in human as both VDR and Vit-D-metabolizing enzymes are expressed in human testis and spermatozoa. In addition, the expression of the cytochrome CYP24A1, an enzyme involved in the inactivation of Vit-D, has been reported in human spermatozoa. Moreover, the level of CYP24A1 has been suggested to be a marker to distinguish normal and infertile men. It has been defined that Vit-D leads to an increase of Calcium (Ca²⁺), which seems to be associated with the improvement of sperm motility and of the acrosome reaction *in vitro*. In that line, some epidemiological studies highlight the positive association between serum 25-hydroxy-vitamin D (25(OH)Vit-D) concentrations and sperm motility in both fertile and infertile men. However, there are still some divergences regarding the association between Vit-D levels and reproduction parameters such as androgen concentrations, as some studies report linear correlation and other suggest a potential inverse U-shaped association. Indeed, men with both low and high 25(OH)Vit-D concentrations demonstrate poorer gonadal function compared with those with intermediate concentrations. This is essential to better define the type of association regarding putative treatment of patients with Vit-D supplementation (Karras et al., 2016).

3.3.4. VDR & germ cell cancer

Testicular germ cell tumors are the most common malignancy in young men aged 18–35 years. They are clinically and histologically subdivided into seminomas and non-seminomas. Altered levels of VDR expression have been reported over the last years in several cancers. In the same line, VDR is found at both mRNA and protein levels in testicular germ cell cancers. In addition, it has been established, using cell lines of testicular germ-cell cancers, that treatment with Vit-D inhibits proliferation of TGCT cell-lines. These data have open research perspectives to define whether targeting VDR signaling pathways could be used in the treatment of germ cell cancers (Bremmer et al., 2012).

3.4. Farnesoid-X-receptor and testis

Bile acids and their signaling pathways have emerged in the last decade as regulators of male reproductive function. Bile acids act through the modulation of specific receptors. BA acts mainly through FXR-alpha (Farnesoid-X-Receptor-alpha; NR1H4) and the G-protein coupled membrane receptor (GPBAR-1; TGR5). In the context of this review article on nuclear receptors, this part focuses on the roles of FXR α within testicular physiology.

FXR α is expressed in testis from *in utero* to adult life in both mouse and human. The use of mouse models helped to decipher that in

neonatal life, FXR α is expressed in germ cell (Martinot et al., 2017a) and that in the adult testis, it is expressed in the interstitial space and mainly in Leydig cells (Volle et al., 2007). Combined these data suggest that FXR α participate to the control of the endocrine and exocrine functions of the testis.

3.4.1. FXR α and leydig

Few years ago, androsterone, a metabolite of testosterone, was characterized as an agonistic modulator of FXR α reinforcing the idea that FXR α could control testicular androgen synthesis (Wang et al., 2006).

In adult mice, FXR α activation by a synthetic agonist (GW4064) results in a decrease of androgen production. This leads to a lower expression of steroidogenic genes as *Star*, *Cyp11a1* or *3 β -Hsd* (Volle et al., 2007). Within the Leydig cells, FXR α induces the transcription of the gene encoding the small heterodimer partner (SHP; NROB2); which then inhibits the expression and the activity of LRH-1 and SF-1, two known regulators of the steroidogenesis. Such negative effects of FXR α signaling on steroidogenesis was reported in boar taint (Gray and Squires, 2013).

Interestingly, it has been demonstrated that in experimental models where bile acid levels are dramatically increased such as bile-duct ligation lower testosterone levels are observed as well as altered puberty phenotypes (Van Thiel et al., 1985). The roles of bile acid signaling on puberty onset and male sexual maturation were defined (Baptissart et al., 2016). Pubertal exposures to bile acids increase the percentage of sterile males at adulthood. This decrease of fertility was correlated with a lower production of spermatozoa; which results from a loss of germ cell *via* apoptosis. This later is a consequence of a decreased testosterone synthesis. Indeed, it was observed that testosterone supplementation restores spermatogenesis. The use of *Fxr α* deficient mice validate the main role of FXR α in these processes. At the molecular level, it has been demonstrated that during puberty, FXR α controls the expression of Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1; NROB1), a known repressor of steroidogenesis (Baptissart et al., 2016). These *in vivo* data clearly demonstrate the impacts of FXR α on androgen steroids. In addition it has been shown that, at least *in vitro*, expression of the aromatase gene as well as estrogen levels are both controlled by FXR α (Catalano et al., 2010).

These data suggest that FXR α exerts a local control of the testicular steroidogenesis. Recently, FXR α activation was shown to repress the expression of the LH/CG receptor, namely *Lhcgr* (Baptissart et al., 2016). The FXR α signaling pathway alters LH/CG sensitivity of Leydig cells both *in vitro* and *in vivo* suggesting that FXR α might interfere with the hypothalamo-pituitary axis (HPA), which is the main regulator of testicular physiology. This crosstalk between HPA and FXR α must be quite complex as LH/CG, through protein kinase-A signaling, increases the expression of the *Fxr α* (Holota et al., 2019).

All the above data suggest a complex negative feedback of steroid synthesis involving the hypothalamo-pituitary-gonadal axis and FXR α . These are important findings as the control of the Leydig cell functions is predominantly mediated by the hypothalamo-pituitary-gonadal axis *via* LH/CG. It highlights that FXR α might act as an important actor of the regulation of testicular physiology during puberty. This is of interest in order to identify the etiology of primary hypogonadism.

In addition, within the Leydig cells, it has been demonstrated using R2C Leydig tumor cell line that FXR α signaling controls the proliferation and the apoptotic processes of Leydig cells. At the molecular level, FXR α regulates the expression of the proliferation marker Ki-67 and the expression of Tp53 (Catalano et al., 2010).

3.4.2. FXR α and Sertoli cells

So far, FXR α has not been detected within the Sertoli cells. However, recent data show that Sertoli cells functions are altered in *Fxr α ^{-/-}* males (Martinot et al., 2017b). Indeed, during early neonatal life in mice, the number of Sertoli cells was higher in *Fxr α ^{-/-}* males than in wild-type

controls. This was also observed in older mice (up to 12 months). However, no difference was observed in the establishment of a functional blood-testis barrier (BTB).

3.4.3. FXR α and germ cells

FXR α has been demonstrated to be expressed in spermatogonia (Martinot et al., 2017b) where it seems to play critical role in the establishment and the maintenance of spermatogonial stem cell pool. This ensures reproductive capacity.

Recently, using Fxr $\alpha^{-/-}$ mice, unexpected involvement of FXR α on germ cell physiology independent of its effects on somatic cells have been defined. The data reveal that Fxr $\alpha^{-/-}$ males maintain efficient reproductive capacities during aging compared to wild-type control mice. This was associated with a greater production of spermatozoa by the Fxr $\alpha^{-/-}$ mice. This maintenance of fertility capacities results from a higher number of undifferentiated germ cells during aging that ensures a better efficiency of spermatogenesis. It was then deciphered that FXR α is involved in the establishment and maintenance of an undifferentiated germ cell pool during the neonatal life, and in turn influences male fertility. FXR α regulates the expression of several pluripotency factors. Among these, *in vitro* approaches show that FXR α controls the expression of the pluripotency marker Lin28 in the germ cells.

The Fxr $\alpha^{-/-}$ males show an early entry into meiosis compared to wild-type males. It might be correlated to the modulation of the retinoid metabolism suggested by the lower expression of retinoid-degrading enzyme Cyp26b1.

It has also been demonstrated that FXR α is expressed in human sperm cells (Malivindi et al., 2018). Immunofluorescence approaches show that FXR is located in the middle piece of spermatozoa. Data showed that increasing concentrations of CDCA negatively impact sperm parameters. The use of FXR α agonist is associated with increased triglyceride levels. This leads to an alteration of metabolic reprogramming of the capacitated sperm. In human sperm cells, FXR α signaling has a negative impact of fertilizing activity. It might be hypothesized that bile acid levels could be involved in infertility related to cholestatic pathologies either in males or females. Combined data in mouse and human showed that the lack or inhibition of FXR α in germ cells, either spermatogonia or sperm cells must be a way to improve germ cell homeostasis. Thus FXR α status and the bile acid levels could be good diagnosis or prognosis markers of fertility and it could be proposed to use FXR α as a therapeutic target through the use of antagonist or blocking antibody to improve germ cell capacities at least in cases of pathologies where bile acid levels are increased.

It has been demonstrated that some testicular cells produced primary bile acids (Martinot et al., 2017a). This local testicular synthesis of BA is altered in Fxr $\alpha^{-/-}$ males. This alteration is even worse in Fxr $\alpha^{-/-}$ males fed a diet supplemented with BA. This was associated with a drastic germ cell loss in few weeks. It has been demonstrated that in these mice there is an accumulation of intermediate metabolites of BA synthesis, which were previously described as CAR and PXR modulators. Such BA metabolites can also be found in human (Martinot et al., 2017a). Recent data have shown the critical role of the Constitutive-Androstane-Receptor in this phenotype (Martinot et al., 2017a). These data open interesting perspectives to better define how BA homeostasis contributes to physiological or pathophysiological conditions via the modulation of CAR activity.

3.4.4. FXR α and endocrine disruptors

All the above data highlight the important roles of FXR α in the regulation of the testicular physiology and its associations with testicular abnormalities. Interestingly, over the last decades, environmental molecules such as endocrine disruptors (ED) have been suspected to be a cause of fertility disorders and of testicular dysgenesis syndrome. EDs with estrogenic activities seem to be deleterious for testicular physiology. Interestingly, FXR α interacts with estrogenic signaling pathways (Baptissart et al., 2013). Recently a paper from Sedes et al. showed that

modulation by Bisphenol-A, an estrogenic ED, and by stigmasterol, an antagonist of FXR α lead to impaired fertility through a lower sperm cell production, which is associated with the alteration of the establishment and maintenance of the undifferentiated germ cell pool (Sedes et al., 2018). This interaction between both pathways seems to result from the downregulation of Fxr α expression following BPA exposure. Interestingly, some effects of the combination of BPA and Stigmasterol exposures were also observed in human testis (Sedes et al., 2018). These data show that FXR α activity could be a mediator of the effects of ED on testicular physiology even in human.

4. Conclusions & therapeutic perspectives

Infertility is a major public health issue defined by the World Health Organization as the inability of a couple to conceive after 1 year of unprotected regular intercourse. Today, around 15% of couples around the world are affected by infertility (Agarwal et al., 2015); the male factor being totally or partially involved in 30–50% of cases.

Male infertility can be divided into 2 categories: abnormalities of excretory origin, which define a defect in the delivery of sperm in the genital tract, and abnormalities of secretory origin, which describe an alteration in the production of gametes by the male gonads.

Male fertility disorders and testicular damages have been correlated with adverse conditions such as exposures to environmental molecules (EM, including endocrine disruptors) or metabolic disorders (Bellastella et al., 2019; Foresta et al., 2018; Leisegang and Dutta, 2020). However, 30% of male fertility disorders remain unexplained (García-Baquero et al., 2020). It is therefore necessary to better understand the physiology of the testicle in order to identify the causes of infertility that are still idiopathic.

Testicular physiology is modulated by numbers of molecules through the interactions between the different cell types of this organ through paracrine, autocrine or endocrine factors. Alterations in the homeostasis of these cell types and their secreted factors could lead to the development of pathologies. As the nuclear receptors bind small molecules capable of regulating their biological activity, they are targeted by numbers of physiological molecules and also by exogenous molecules such as endocrine disruptors. In that line, numerous studies have highlighted the critical roles of some nuclear receptors in testicular physiology and pathologies. Advances in the identification of physiological ligands of nuclear receptors have helped the scientific community to decipher their roles in physiology and diseases. The knowledge of their mechanisms of action is essential as several NRs activation and inhibition could have opposite or identical effects on particular molecular mechanisms (gene regulation). One of the main objectives in the field of nuclear receptors is thus to gain a better understanding of the mechanisms underlying their actions in order to selectively modulate their activities in specific tissues or cell types. In addition, the characterization of the impacts of nuclear receptors during the utero/neonatal period is a challenge, because such exposures could lead to immediate diseases, but also to diseases later on in adulthood. The identification of the precise involvements of the NR signaling pathways could help to discover new diagnostic and/or prognostic tools concerning the etiology and/or progression of the diseases. In that line, polymorphisms of these nuclear receptors could be researched to define diagnosis/prognosis marker regarding testicular pathophysiology related to at least for fertility disorders.

The data review here sustained the main emerging roles of PPAR, VDR and FXR in the male reproductive functions and particularly through the control of testicular physiology. These receptors are thus important actors to take into consideration to enlarge our knowledge of male fertility. These major involvements have been defined using experimental models, pharmacological approaches and also studies on human biological samples related to diseases.

In addition, nuclear receptors could be considered in the future as targets, as could be suggested for PPAR or FXR, to be modulated during

assisted procreation such as *in vitro* fecundation to increase the efficiency of the protocols.

Since the activity of nuclear receptors can be modulated by ligands, they are important putative targets for drug development, prompting pharmaceutical companies to make efforts in this regard. NR could be important for offering personalized medicine in the context of specific diseases such as fertility disorders.

In the last decades, at least PPAR and FXR α appear as key mediators of the impacts of environmental molecules, such as endocrine disrupters. These data have opened up new research perspectives in a fascinating research theme, which poses major problems for present and future generations.

Even if there is still a long way to go, the different aspects of the impacts of NR on physiology and/or pathologies highlighted by this review support the idea that this area of research will continue to fascinate researchers with impacts on clinical approaches to improve human health.

Grant supports

The study was funded by Inserm, CNRS, Université Clermont Auvergne. Volle's team received support by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20–25).

Declaration of Competing interest

The authors declare to have no conflict of interests.

References

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., Chyatte, M.R., 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 13. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>.
- Aiken, C.E., Tarry-Adkins, J.L., Ozanne, S.E., 2016. Transgenerational effects of maternal diet on metabolic and reproductive ageing. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 27, 430–439. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9631-1>.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>.
- Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A., Volle, D.H., 2013. Farnesoid X receptor α : a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1387-0>.
- Baptissart, M., Martinot, E., Vega, A., Sédès, L., Rouaisnel, B., de Haze, A., Baron, S., Schoonjans, K., Caira, F., Volle, D.H., 2016. Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7153>.
- Baptissart, M., Sédès, L., Holota, H., Thirouard, L., Martinot, E., de Haze, A., Rouaisnel, B., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, D.H., 2018. Multigenerational impacts of bile exposure are mediated by TGR5 signaling pathways. *Sci. Rep.* 8, 16875. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34863-0>.
- Batool, A., Karimi, N., Wu, X.-N., Chen, S.-R., Liu, Y.-X., 2019. Testicular germ cell tumor: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 1713–1727. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03022-7>.
- Bävner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.-A., Treuter, E., 2005. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.10.005>.
- Bedford, J.M., 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 2 (Suppl. 2), 128–158.
- Bellastella, G., Menafra, D., Puliani, G., Colao, A., Savastano, S., Obesity Programs of nutrition, Education, Research and Assessment (OPERA) Group, 2019. How much does obesity affect the male reproductive function? *Int. J. Obes. Suppl.* 9, 50–64. <https://doi.org/10.1038/s41367-019-0008-2>.
- Boberg, J., Metzendorf, S., Wortzinger, R., Axelstad, M., Brokken, L., Vinggaard, A.M., Dalgaard, M., Nellemann, C., 2008. Impact of diisobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 250, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.05.020>.
- Bremmer, F., Thelen, P., Pottek, T., Behnes, C.L., Radzun, H.J., Schweyer, S., 2012. Expression and function of the vitamin D receptor in malignant germ cell tumour of the testis. *Anticancer Res.* 32, 341–349.
- Carreau, S., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F.R.M.B., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2011. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci.* 89, 584–587. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.06.004>.
- Catalano, S., Malivindi, R., Giordano, C., Gu, G., Panza, S., Bonofiglio, D., Lanzino, M., Sisci, D., Panno, M.L., Andò, S., 2010. Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 285 (8), 5581–5593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052670>. Epub 2009 Dec 21.
- Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2012. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.* 64, 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., Eddy, E.M., 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82–86. <https://doi.org/10.1038/88313>.
- Cito, G., Cocci, A., Micelli, E., Gabutti, A., Russo, G.L., Coccia, M.E., Franco, G., Serni, S., Carini, M., Natali, A., 2020. Vitamin D and male fertility: an updated review. *World J. Mens Health* 38, 164–177. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190057>.
- Dadoune, J.-P., 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.* 61, 56–75. <https://doi.org/10.1002/jemt.10317>.
- Douard, V., Hermier, D., Magistrini, M., Blesbois, E., 2003. Reproductive period affects lipid composition and quality of fresh and stored spermatozoa in Turkeys. *Theriogenology* 59, 753–764. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01086-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01086-5).
- Foresta, C., Tesconi, S., Di Nisio, A., 2018. Impact of perfluorochemicals on human health and reproduction: a male's perspective. *J. Endocrinol. Invest.* 41, 639–645. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0790-z>.
- Froment, P., Gizard, F., Defever, D., Staels, B., Dupont, J., Monget, P., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J. Endocrinol.* 189, 199–209. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06667>.
- Fu, L., Chen, Y.-H., Xu, S., Ji, Y.-L., Zhang, C., Wang, H., Yu, D.-X., Xu, D.-X., 2017. Vitamin D deficiency impairs testicular development and spermatogenesis in mice. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 73, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.047>.
- García-Baquero, R., Fernández-Ávila, C.M., Álvarez-Ossorio, J.L., 2020. Empiric therapy for idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Actas Urol. Esp.* <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2019.10.007>.
- Giguère, V., 1999. Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* 20, 689–725. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.5.0378>.
- Gorowska-Wojtowicz, E., Dutka, P., Kudrycka, M., Pawlicki, P., Milon, A., Plachno, B.J., Tworzydło, W., Pardyak, L., Kaminska, A., Hejmej, A., Bilinska, B., Kotula-Balak, M., 2018. Regulation of steroidogenic function of mouse Leydig cells: G-coupled membrane estrogen receptor and peroxisome proliferator-activated receptor partnership. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 69 <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.3.04>.
- Gray, M.A., Squires, E.J., 2013. Effects of nuclear receptor transactivation on steroid hormone synthesis and gene expression in porcine Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 133, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.014>.
- Harada, Y., Tanaka, N., Ichikawa, M., Kamijo, Y., Sugiyama, E., Gonzalez, F.J., Aoyama, T., 2016. PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Arch. Toxicol.* 90, 3061–3071. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1669-z>.
- Hase, T., Yoshimura, R., Mitsuhashi, M., Segawa, Y., Kawahito, Y., Wada, S., Nakatani, T., Sano, H., 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology* 60, 542–547. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(02\)01747-8](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(02)01747-8).
- Hess, R.A., Cooke, P.S., 2018. Estrogen in the male: a historical perspective. *Biol. Reprod.* 99, 27–44. <https://doi.org/10.1093/biolre/iy043>.
- Holota, H., Thirouard, L., García, M., Monroe, G., de Haze, A., Saru, J.-P., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, D.H., 2019. Fxr α gene is a target gene of hCG signaling pathway and represses hCG induced steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105460. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105460>.
- Holt, R., Juel Mortensen, L., Harpelunde Poulsen, K., Nielsen, J.E., Frederiksen, H., Jørgensen, N., Jørgensen, A., Juul, A., Blomberg Jensen, M., 2020. Vitamin D and sex steroid production in men with normal or impaired Leydig cell function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 199, 105589. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105589>.
- Hu, M.-C., Hsu, H.-J., Guo, I.-C., Chung, B.-C., 2004. Function of Cyp11a1 in animal models. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.024>.
- Jeremy, M., Gurusubramanian, G., Roy, V.K., 2019a. Vitamin D3 mediated regulation of steroidogenesis mitigates testicular activity in an aged rat model. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 190, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.016>.
- Jeremy, M., Gurusubramanian, G., Roy, V.K., 2019b. Vitamin D3 regulates apoptosis and proliferation in the testis of D-galactose-induced aged rat model. *Sci. Rep.* 9, 14103. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50679-y>.
- Karraas, S., Anagnostis, P., Kotsa, K., Goulis, D.G., 2016. Vitamin D and gonadal function in men: a potential inverse U-shaped association? *Andrology* 4, 542–544. <https://doi.org/10.1111/andr.12173>.
- Kotula-Balak, M., Duliban, M., Pawlicki, P., Tuz, R., Bilinska, B., Plachno, B.J., Arent, Z. J., Krakowska, I., Tarasiuk, K., 2020a. The meaning of non-classical estrogen receptors and peroxisome proliferator-activated receptor for boar Leydig cell of immature testis. *Acta Histochem.* 122, 151526. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151526>.
- Kotula-Balak, M., Gorowska-Wojtowicz, E., Milon, A., Pawlicki, P., Tworzydło, W., Plachno, B.J., Krakowska, I., Hejmej, A., Wolksi, J.K., Bilinska, B., 2020b. Towards understanding leydigioma: do G protein-coupled estrogen receptor and peroxisome proliferator-activated receptor regulate lipid metabolism and steroidogenesis in Leydig cell tumors? *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01488-y>.
- Leisegang, K., Dutta, S., 2020. Do lifestyle practices impede male fertility? *Andrologia* e13595. <https://doi.org/10.1111/andr.13595>.
- Litchfield, K., Shipley, J., Turnbull, C., 2015. Common variants identified in genome-wide association studies of testicular germ cell tumour: an update, biological insights and clinical application. *Andrology* 3, 34–46. <https://doi.org/10.1111/andr.304>.
- Liu, L.-L., Xian, H., Cao, J.-C., Zhang, C., Zhang, Y.-H., Chen, M.-M., Qian, Y., Jiang, M., 2015. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in human sperm physiology. *Asian J. Androl.* 17, 942–947. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.150253>.

- Lui, W.-Y., Mruk, D., Lee, W.M., Cheng, C.Y., 2003. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 68, 1087–1097. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010371>.
- Malivindi, R., Santoro, M., De Rose, D., Panza, S., Gervasi, S., Rago, V., Aquila, S., 2018. Activated-farnesoid X receptor (FXR) expressed in human sperm alters its fertilising ability. *Reprod. Camb. Engl.* 156, 249–259. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0203>.
- Martinot, E., Baptissart, M., Vega, A., Sedes, L., Rouaisnel, B., Vaz, F., Saru, J.-P., de Haze, A., Baron, S., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, H., David, 2017a. Bile acid homeostasis controls CAR signaling pathways in mouse testis through FXRalpha. *Sci. Rep.* 7, 42182. <https://doi.org/10.1038/srep42182>.
- Martinot, E., Sedes, L., Baptissart, M., Holota, H., Rouaisnel, B., Damon-Soubeyrand, C., De Haze, A., Saru, J.-P., Thibault-Carpentier, C., Keime, C., Lobaccaro, A., Jean-Marc, Baron, S., Benoit, G., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, H., David, 2017b. The bile acid nuclear receptor FXRalpha is a critical regulator of mouse germ cell fate. *Stem Cell Rep* 9, 315–328. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.036>.
- Menegaz, D., Mizwicki, M.T., Barrientos-Duran, A., Chen, N., Henry, H.L., Norman, A.W., 2011. Vitamin D receptor (VDR) regulation of voltage-gated chloride channels by ligands preferring a VDR-alternative pocket (VDR-AP). *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 25, 1289–1300. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0442>.
- Midzak, A., Papadopoulos, V., 2015. Steroidogenesis: the classics and beyond. *Steroids* 103, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.10.003>.
- Muczynski, V., Lecureuil, C., Messiaen, S., Guerquin, M.-J., N'tumba-Byn, T., Moison, D., Hodroj, W., Benjelloun, H., Baijjer, J., Livera, G., Frydman, R., Benachi, A., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2012. Cellular and molecular effect of MEHP Involving LXR α in human fetal testis and ovary. *PLoS One* 7, e48266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048266>.
- Oakes, M.B., Eyvazzadeh, A.D., Quint, E., Smith, Y.R., 2008. Complete androgen insensitivity syndrome—a review. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 21, 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.jpags.2007.09.006>.
- Palanza, P., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Vom Saal, F.S., 2016. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 7, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.11.017>.
- Rajpert-De Meys, E., 2019. Testicular germ cell cancer: recent developments in biology and clinical management. *Andrology* 7, 391–393. <https://doi.org/10.1111/andr.12675>.
- Sedes, L., Desdoits-Lethimonier, C., Rouaisnel, B., Holota, H., Thirouard, L., Lesne, L., Damon-Soubeyrand, C., Martinot, E., Saru, J.-P., Mazaud-Guittot, S., Caira, F., Beaudoin, C., Jegou, B., Volle, H., David, 2018. Crosstalk between BPA and FXRalpha signaling pathways lead to alterations of undifferentiated germ cell homeostasis and male fertility disorders. *Stem Cell Rep* 11, 944–958. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.08.018>.
- Seol, W., Choi, H.S., Moore, D.D., 1996. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272 (5266), 1336–1339. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1336>. PMID: 8650544.
- Shacham, S., Harris, D., Ben-Shlomo, H., Cohen, I., Bonfil, D., Przeddecki, F., Lewy, H., Ashkenazi, I.E., Seger, R., Naor, Z., 2001. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam. Horm.* 63, 63–90.
- Shi, G.-J., Li, Z.-M., Zheng, J., Chen, J., Han, X.-X., Wu, J., Li, G.-Y., Chang, Q., Li, Y.-X., Yu, J.-Q., 2017. Diabetes associated with male reproductive system damages: onset of presentation, pathophysiological mechanisms and drug intervention. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 90, 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.074>.
- Tarulli, G.A., Stanton, P.G., Meachem, S.J., 2012. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol. Reprod.* 87 (13) <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095091>, 1–11.
- Van Thiel, D.H., Gavalier, J.S., Zajko, A.B., Cobb, C.F., 1985. Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4, 616–621.
- Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.-M.A., Verhoeven, G., Schoonjans, K., Auwerx, J., 2007. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* 21, 303–315. <https://doi.org/10.1101/gad.409307>.
- Wang, S., Lai, K., Moy, F.J., Bhat, A., Hartman, H.B., Evans, M.J., 2006. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* 147, 4025–4033. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1485>.
- Wang, G., Cheng, S., Zhang, S., Zhu, Y., Xiao, Y., Ju, L., 2020. LPS impairs steroidogenesis and ROS metabolism and induces PPAR transcriptional activity to disturb estrogen/androgen receptor expression in testicular cells. *Mol. Biol. Rep.* 47, 1045–1056. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05196-6>.
- Xue, J., Gharaibeh, R.Z., Pietryk, E.W., Brouwer, C., Tarantino, L.M., Valdar, W., Ideraabdullah, F.Y., 2018. Impact of vitamin D depletion during development on mouse sperm DNA methylation. *Epigenetics* 13 (9), 959–974. PMID: 30239288.



Cholesterol: A Gatekeeper of Male Fertility?

Lauriane Sèdes, Laura Thirouard, Salwan Maqdasy, Manon Garcia, Françoise Caira, Jean-Marc A. Lobaccaro, Claude Beaudoin* and David H. Volle*

Université Clermont Auvergne, INSERM U 1103, CNRS, UMR 6293, Génétique Reproduction et Développement, Clermont-Ferrand, France

Cholesterol is essential for mammalian cell functions and integrity. It is an important structural component maintaining the permeability and fluidity of the cell membrane. The balance between synthesis and catabolism of cholesterol should be tightly regulated to ensure normal cellular processes. Male reproductive function has been demonstrated to be dependent on cholesterol homeostasis. Here we review data highlighting the impacts of cholesterol homeostasis on male fertility and the molecular mechanisms implicated through the signaling pathways of some nuclear receptors.

Keywords: cholesterol, fertility, testis, spermatozoa, nuclear receptors

OPEN ACCESS

Edited by:

Vincenzo Pezzi,
University of Calabria, Italy

Reviewed by:

Riccardo Pierantoni,
Università degli Studi della Campania
"Luigi Vanvitelli" Caserta, Italy
Michaela Luconi,
Università degli Studi di Firenze, Italy

*Correspondence:

Claude Beaudoin
claude.beaudoin@uca.fr
David H. Volle
david.volle@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 16 March 2018

Accepted: 19 June 2018

Published: 19 July 2018

Citation:

Sèdes L, Thirouard L, Maqdasy S,
Garcia M, Caira F, Lobaccaro J-MA,
Beaudoin C and Volle DH (2018)
Cholesterol: A Gatekeeper of Male
Fertility? *Front. Endocrinol.* 9:369.
doi: 10.3389/fendo.2018.00369

Infertility is a major public health issue defined by the World Health Organization as the inability of a couple to conceive a child after 1 year of unprotected regular sex. About 15% of couples worldwide are reported to be infertile (1); and male disorders are diagnosed in 30–50% of cases (2). Azoospermia is one of the most severe case of infertility; which is defined by the total absence of spermatozoa in the ejaculate and affects more than 20% of infertile men (3).

Male infertility can be divided into two categories: abnormalities of excretory origin, which define a defect of sperm delivery in the genital tract and abnormalities of secretory origin, which correspond an alteration of the production of the spermatozoa by the testis. The aetiologies of testicular lesions involve multiple genetic, environmental and/or behavioral factors. However, in 30% of cases, male fertility disorders remain unexplained (4). It is therefore necessary to better understand the physiology of the testis in order to identify the causes of infertility that are still idiopathic.

Male reproductive function has been demonstrated to be highly dependent on cholesterol homeostasis. Indeed, cholesterol is the precursor of steroid synthesis which is crucial for normal sperm production (5–7). Moreover, many experimental and clinical data have highlighted the importance of lipid metabolism in the control of testicular physiology and male fertility (8). As example, the depletion of cholesterol in plasma and tissues in a mouse model deficient for the gene encoding 24-dehydrocholesterol reductase (*Dhcr24*) leads to mouse infertility (9).

CHOLESTEROL HOMEOSTASIS

Cholesterol is essential for mammalian cell functions and integrity. It is an important structural component maintaining the permeability and fluidity of the cell membrane. Within the cells, the cholesterol homeostasis is tightly regulated to ensure normal cellular processes. Cholesterol homeostasis is strictly regulated at the cellular level.

Cholesterol is also a precursor for steroid hormones synthesis such as bile acids and vitamin D. Oxidized derivatives of cholesterol, known as oxysterols, are also implicated in numerous biological processes.

The main source of cholesterol is food. Dietary cholesterol is first routed from the small intestine to the liver, and then redistributed to the requesting organs. Cholesterol is uptake from lipoproteins; the Scavenger receptor B type 1 (SR-B1) is the cell surface high-density lipoprotein (HDL) receptor that mediates HDL-cholesterol ester (HDL-CE) uptake. Next to this, less than half of the cholesterol originates from *de novo* synthesis. Cholesterol synthesis is a multi-step enzymatic process. Synthesis of cholesterol begins from the acetyl-CoA, which is transported from the mitochondria to the cytosol. A series of reactions give rise to Hydroxy-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), which is then converted to mevalonate by HMG-CoA reductase. Finally, multi-steps will then give rise to cholesterol.

The cellular efflux of cholesterol is essential to maintain the homeostasis, as cells in peripheral organs do not express genes involved in the catabolism of cholesterol. The efflux of cholesterol requires acceptors such as HDL. There is either a simple diffusion (aqueous diffusion pathway) or a facilitated one through SR-B1 pathway. There could also be active process *via* members of the ATP-binding cassette (ABC) family transporters such as ABCA1 and ABCG1.

Within the body, the liver plays an important role in maintaining cholesterol homeostasis by regulating absorption and synthesis to prevent over accumulation in the plasma and tissues (10, 11) (**Figure 1**). The small intestine is also an important actor of *de novo* synthesis of cholesterol, bile synthesis, and absorption and fecal excretion. Molecular mechanisms involved have been quite well defined in the organs such as liver, adipose tissue, and intestine (12). The cross talks between liver and intestine illustrate the complex mechanisms involved in the regulation of cholesterol homeostasis through the involvement of several factors such as SREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein), LXR (Liver X receptor, NR1H2, NR1H3), and FXR α (Farnesoid X receptor, NR1H4). Many studies suggest that SREBP and LXRs work in a coordinated manner to maintain cholesterol homeostasis (11, 13). SREBP2 up-regulates the expression of genes involved in the biosynthesis and uptake of cholesterol when cholesterol level is low.

LXR α and LXR β are ligand-activated nuclear receptors; which are critical for the elimination of excess cholesterol. LXR α is primarily expressed in macrophages, intestine, liver, adipose, and kidney, whereas LXR β is more ubiquitous (14). The major endogenous LXRs agonists that have been identified are oxysterols [20(S)-, 22(R)-, 24(S)-, 25-, 27-hydroxycholesterol; 24(S), 25-epoxycholesterol] and cholesterol biosynthetic intermediates [desmosterol, follicular fluid meiosis-activating sterol (FF-MAS), or testis meiosis-activating sterol (T-MAS)] (15, 16). Two synthetic LXR α/β agonists were developed and have been used widely such as T0901317 and GW3965 (17). The physiologically most important oxysterols are generated in cells by mitochondrial or endoplasmic reticulum cholesterol hydroxylases belonging to the cytochrome P450 family (CYP46A1, CH25H, CYP27A1 CYP3A4, and CYP7A1). Several natural compounds derived from plants have also been shown to activate (phytosterols, diterpenes...) or inhibit (naringenin) LXRs activity (15). Studies from LXR-knockout mice have demonstrated that LXRs are important in the

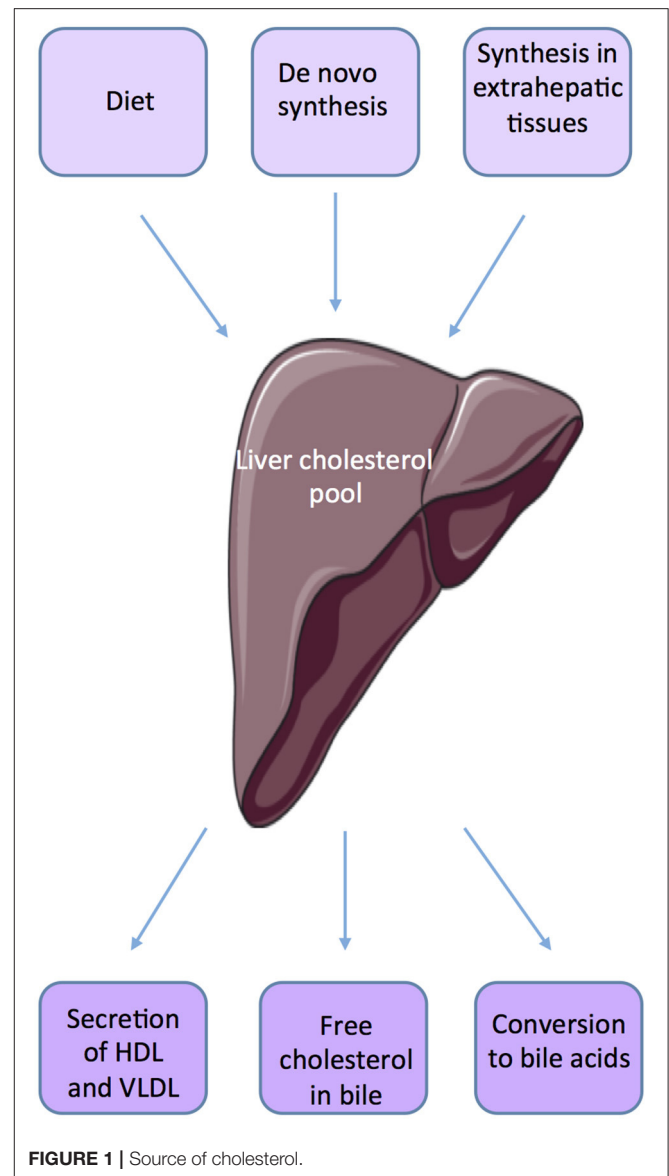


FIGURE 1 | Source of cholesterol.

control of cholesterol homeostasis. Activation of LXRs protects cells from cholesterol accumulation by suppressing cholesterol biosynthesis, activating the conversion of cholesterol to bile acids in the liver, and decreasing intestinal cholesterol absorption (18, 19). Indeed, LXR α -knockout mice fed with a high-cholesterol diet show accumulation of cholesteryl-esters in the liver (20). LXR α is the prevalent isoform acting as hepatic sensor of cholesterol. While *Lxr α* knock-out mice showed an impaired hepatic function when fed high fat diet, mice lacking *Lxr β* are able to resist to the deleterious impact of diet enriched in cholesterol (20, 21).

Cholesterol is the precursor for bile acids (BAs) synthesis within the liver. These molecules are the main constituents of bile and ensure solubilisation and emulsification of fat to help digestion (22). Their synthesis and excretion are major mechanisms of cholesterol catabolism in mammals.

Enzymatic modifications of cholesterol result in the production of primary BAs: cholic acid (CA) and chenodeoxycholic (CDCA) (23). There are two main BA synthesis pathways (24). The «classical» pathway involves CYP7A1 and CYP8B1 enzymes while the «alternative» pathway involves the cholesterol 27-hydroxylase CYP27A1 and 25-hydroxycholesterol 7- α -hydroxylase CYP7B1. Before their excretion, BAs are, in part, conjugated with glycine or taurine in the liver. This leads to the production of tauro-, or glyco-conjugates BAs. Stored in the gallbladder, primary BAs and conjugates are discharged during the meal into the duodenum to facilitate fat digestion. In the ileum, BAs are in part deconjugated and modified to give rise to secondary BAs (25). Deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA) are derived respectively from CA and CDCA. BAs have been described as signaling molecules that signal through two main receptors: the nuclear Farnesoid X receptor α (FXR α ; NR1H4) (26–28) and the membrane G protein-coupled bile acid receptor TGR5 (GPBAR1) (24, 29).

In addition, the nuclear receptor FXR α plays important role on cholesterol homeostasis through the regulation of bile acid metabolism in the liver and in the intestine. In the liver, FXR reduces the expression of the genes encoding key enzymes of bile acids biosynthesis pathways: the cholesterol 7 α -hydroxylase (Cytochrome P450 7a1; CYP7A1) and the sterol 12 α -hydroxylase (CYP8B1). In the intestine, FXR α activates the expression of the Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19 in human) or FGF15 (mouse) which acts in an endocrine manner on hepatocytes *via* the Fibroblast Growth Factor Receptor 4 (FGFR4) to repress *Cyp7a1* expression (30, 31).

THE TESTIS, CHOLESTEROL HOMEOSTASIS

The testis produces male gametes, namely spermatozoa. It is composed of a network of seminiferous tubules, separated from each other by the interstitial space. These two compartments define the two major functions of the testis with the production of gametes (exocrine function) and sexual hormone (endocrine function). Leydig cells within the interstitial space provide part of the endocrine function, and the exocrine function takes places within the seminiferous tubules. Their efficiencies are based on the specific actions of the different cell types and their interactions.

The purpose of this special issue is to collect recent acquisition on the role of cholesterol and/or derivatives as signaling molecules, whose alteration can determine the onset or progression of different pathologies. Here, we will highlight the roles of pathways activated by cholesterol and derivatives through nuclear receptors on male fertility disorders.

The Testicular Endocrine Function

In human and rodents, testosterone is the main type of circulating androgens, which is mainly synthesized by the Leydig cells. Testis also produces small amounts of other hormones such as estrogen and progesterone.

Maintenance of an adequate concentration of intra-testicular testosterone is essential for testicular function, especially for spermatogenesis (32). The hypothalamo-pituitary axis exerts a major control on testicular steroidogenesis. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) secreted by the hypothalamus, stimulates the synthesis and release of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) by the gonadotropic cells of the anterior pituitary (33). The LH acts directly on the Leydig cells to control their steroidogenic activity *via* the activation of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, LHCGR. In return, sex steroids exert a negative feedback on their own synthesis. LH is involved in the regulation of steroidogenesis at different levels. LH pathway promotes the activation of cholesterol ester hydroxylase increasing the free cholesterol pool (34) and also promotes the transfer of cholesterol from the outer membrane to the inner membrane of the mitochondria. LH signaling pathway leads to the transcriptional activation of LH target genes such as *Star* (35), *Cyp11a1* (36), and *3 β Hsd* (37).

The major role of cholesterol in the endocrine function has been well established, as cholesterol is the precursor of steroids. There are multiple sources of cholesterol that contribute to steroidogenesis such as *de novo* synthesized, (b) stored cholesteryl esters, exogenous lipoprotein-supplied cholesterol as well as plasma membrane-derived cholesterol. The plasma lipoproteins are the main source of steroid synthesis. The homeostasis of the interstitial tissue, mainly in Leydig cells, involved factors of cholesterol homeostasis such as HMG-CoA reductase, HSL, and ACAT (38, 39). Among others, the links between cholesterol and steroid synthesis are highlighted by the control of the SCAP/SREBP pathway, a regulator of cholesterol homeostasis by cAMP the secondary messenger of the LH pathways.

Sex steroid hormones share a common biosynthesis pathway, with cholesterol as unique precursor. Leydig cells are able to *de novo* synthesize cholesterol or can also use stored cholesterol ester to ensure steroidogenesis function (40). A recent study shows that the plasma membrane is one of the richest source of free cholesterol available for acute steroidogenesis (41). The first enzymatic step of steroidogenesis involves the conversion of cholesterol to pregnenolone, which occurs within mitochondria. It requires the transport of cholesterol from the outer mitochondrial membrane to the inner membrane. This limiting step is mainly provided by the Steroidogenic Acute Regulatory protein (STAR) (42). This crucial point has been highlighted by the use of transgenic mouse models. Mice lacking *Star* present gonadal insufficiencies due to steroidogenesis defects associated with lipid accumulation in the interstitial compartment (43). Recently, using a mitochondrial reconstitution assay system, it has been shown that SNARE proteins (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) are vital components contributing to cholesterol transport within the mitochondria (44). Then, the biosynthesis involves the oxidative cleavage of the side-chain of cholesterol by cholesterol side-chain cleavage enzyme (cytochrome P450_{scc}, CYP11A1), a mitochondrial cytochrome P450 oxidase, to give pregnenolone (45). Pregnenolone may be converted to testosterone through two pathways called

Delta 4 ($\Delta 4$) and Delta 5 ($\Delta 5$) (46). The Delta 4 ($\Delta 4$) pathway involves conversion of pregnenolone to progesterone by the action of the enzyme 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3 β HSD). Progesterone is then metabolized by cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17A1) in androstenedione, substrate of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme (17 β HSD) for testosterone synthesis. The Delta 5 ($\Delta 5$) pathway is initiated by the CYP17A1 enzyme, that allows the conversion of pregnenolone to dehydroepiandrosterone (DHEA). Then, 17 β HSD and 3 β HSD enzymes ensure its conversion into androstenediol or androstenedione, and testosterone. The 3 β HSD enzyme allows switching from $\Delta 5$ to $\Delta 4$ pathway. In primates including humans, the $\Delta 5$ pathway predominates because CYP17A1 enzyme has a low activity 17, 20 lyase for the conversion of 17 α -hydroxyprogesterone to androstenedione (47, 48). A recent proteomic analysis of murine testis lipid droplets (LDs) revealed that these LDs contained a large number of enzymes involved in metabolism and steroidogenesis. Testicular LDs could be an active organelle functionally involved in steroidogenesis (49).

Androgens exert autocrine action on Leydig cells via the androgen receptor (AR) to control their own synthesis. The AR knockout mice in Leydig cells have decreased plasma testosterone concentrations, despite high rates of LH. This hypoandrogenicity is explained by a defect in the expression of key genes encoding steroidogenic enzymes *Cyp17a1*, *3 β hsd*, and *17 β hsd*. This was shown to be associated with an arrest of spermatogenesis at the stage of round spermatid causing infertility (50, 51). In humans, mutations on the gene encoding the receptor of androgen AR (*NR3C4*) result in androgen resistance syndrome (52). Estrogen action is also important in regulating testicular function. Estrogen mainly mediated their signal through the activation of two specific estrogen receptors (ER), ER α and ER β (53, 54). Estrogen effects on steroidogenesis have been elucidated using mouse model. It has been shown that ER α regulates fetal and neonatal steroidogenesis and ER β is implicated in the control of neonatal gametogenesis. *Era* is expressed in Leydig cells during fetal and neonatal life and its deletion increases testosterone production during fetal life from 13.5 dpc (55). In human, estrogens also play a crucial role in the control of reproductive functions. Studies in patients with inactivating mutations of ER α or CYP19 (aromatase cytochrome P450) suggest a role of estrogens signaling in human male fertility (56). Next to the steroid receptors, it has been shown that numerous nuclear receptors are implicated in the regulation of steroids synthesis. This was recently well reviewed (57, 58). Nuclear receptor family has been described to locally control the expression and activity of enzymes involved in steroidogenesis. Among these, the Steroidogenic Factor 1 (SF-1) and the Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1) are positive regulators of hormone steroids synthesis. They stimulate the expression of common target genes such as *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, and *3 β hsd* encoding enzymes of steroidogenesis (59–62). SF-1 and LRH-1 are also involved in the regulation of cholesterol biosynthesis by regulating the expression of *Sr-b1* (scavenger receptor class B type I) gene which provides plasma cholesterol to steroidogenic tissues (63, 64), and the

enzyme Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase and reductase (HMG CoA) involved in the biosynthesis of cholesterol (65, 66).

In addition, it has been shown that LXR α is expressed within Leydig cells (8, 67, 68). It was demonstrated that in 2.5-month-old LXR α -deficient mice, testosterone production is significantly lower than in wild type control mice. This was associated with a decrease of the expression of *3 β hsd* enzyme (67). Interestingly, LXR agonist T0901317 increased testosterone concentration in wild-type mice in association with an accumulation of StAR at both mRNA and protein levels (67).

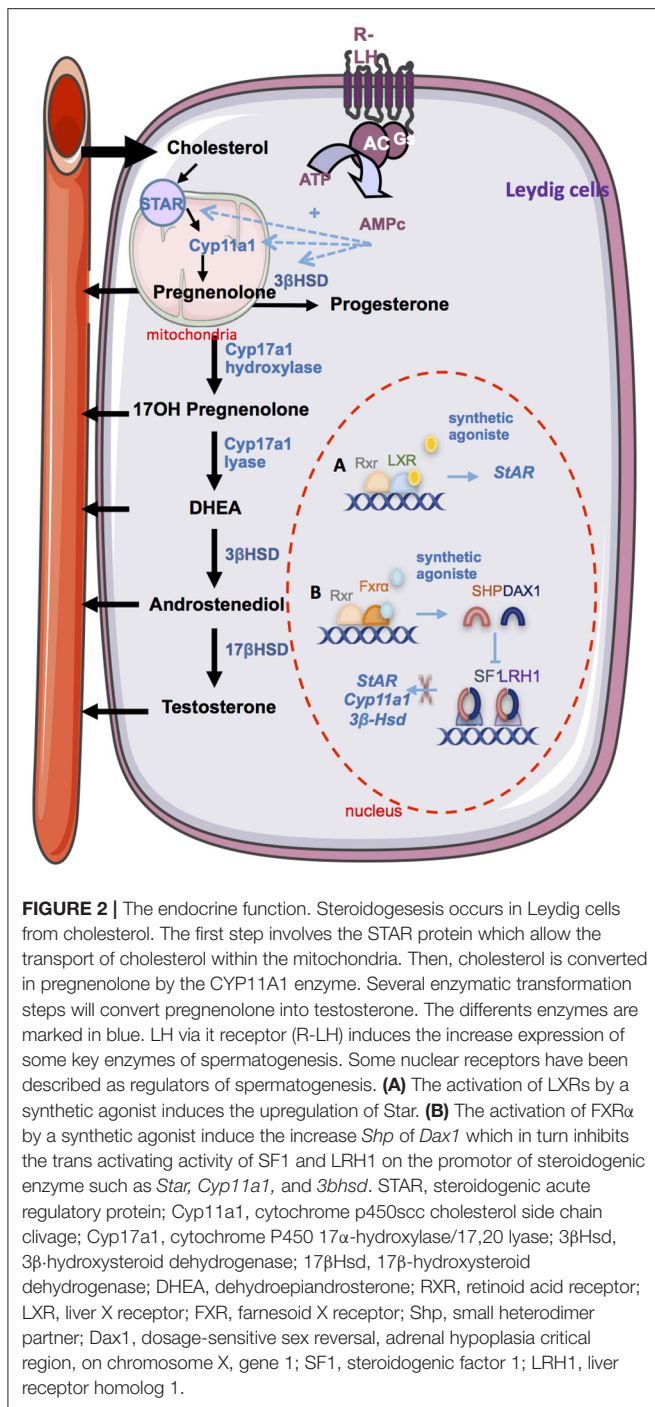
Next to this, a negative regulation of steroid synthesis involving receptors of bile acids has been defined as an important regulator of testicular physiology. BAs receptors, FXR α and TGR5, are expressed within the testis (69, 70) and have been recently shown to be implicated in testis dysfunction (71). Detectable levels of bile acids have been measured in the testis of mice in normal physiological conditions (72) and recently, it was shown that testis expresses key enzymes of BAs synthesis and is able to produce BAs (73).

The bile acids nuclear receptor FXR α is implicated in steroidogenesis regulation. In 2007, the presence of FXR α within mouse Leydig cells was demonstrated for the first time (69). While *Fxr α ^{-/-}* male presented the same plasma testosterone level than control mice, induction of FXR α with a synthetic agonist in wild type mice results in a decrease of androgen production independently of the hypothalamo-pituitary axis. The activation of the FXR α receptor in Leydig cells induces transcription of the gene encoding the orphan nuclear receptors SHP (Small Heterodimer Partner, *Nr0b2*) and DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1, *Nr0b1*), two orphan nuclear receptors, which are negative regulators of steroidogenic Leydig cells activity. Indeed, SHP AND DAX-1 inhibit the expression of *Lrh1* and *Sf1*. SHP also interacts with LRH1 thereby inhibiting its trans-activating activity. This decreases expressions of genes encoding key enzymes of steroidogenesis and thus leads to lower testosterone levels (69). In that line, through the regulation of the endocrine function, it has been demonstrated that BA-FXR α pathways also regulate male sexual maturation (74). Mice fed a diet supplemented with BAs during pubertal age show increased incidence of infertility. This is associated with altered differentiation and increase apoptosis of germ cells due to lower testosterone levels. This is sustained by the fact that supplementation with testosterone abolished the effect of CA-diet on germ cell apoptosis.

These overall data clearly suggest a complex regulation of testicular steroidogenesis by nuclear receptors whose activities are regulated by cholesterol derivatives such as oxysterols and bile acids (Figure 2).

The Testicular Exocrine Function

Germ cell differentiation is closely related to somatic Sertoli cells functions, which provide structural and nutritional supports (Figure 3).



The Sertoli Cells

One primary function of Sertoli cells is to set up the blood testis barrier (BTB) at puberty under the action of androgens, retinoids and thyroid hormones (75–77). The BTB is composed of specialized junctions established between adjacent Sertoli cells near the basement membrane of seminiferous tubules. That defines Sertoli cells polarity giving them different structural and functional poles. The BTB divides the seminiferous tubules in basal and apical compartments. Self-renewal and differentiation

of spermatogonia as well as progression to the stage pre-leptotene spermatocyte I occur in the basal compartment. The two meiotic divisions and post-meiotic steps take place in the apical compartment. The BTB regulates and restricts the passage of nutritional substances, vital molecules, and toxic compounds in the apical compartment of the seminiferous tubules. BTB also defines an immune privileged environment. It isolates many antigens present on the surface of post-meiotic germ cells from the systemic circulation thus preventing the emergence of the corresponding antibodies and autoimmune diseases leading to infertility (78). Sertoli cells also participate to the secretion of components of the extracellular matrix necessary to maintain the integrity of the seminiferous epithelium and intercellular junctions (79). In addition, they synthesize proteases and protease inhibitors contributing to the dynamic of junction complexes allowing the migration of germ cells (80). Sertoli cells provide a set of essential nutrients for germ cells survival and differentiation, including amino acids, carbohydrates, lipids and vitamins (80). Sertoli cells are able to metabolize glucose into pyruvate and lactate (81) which is the preferential energy substrate for post-meiotic germ cells to support their metabolic activity. Sertoli cells secrete numerous growth factors modulating the proliferation and/or differentiation of germ cells (82). In addition Sertoli cells secrete several transport proteins that will ensure the passage of metal ions (Transferrin) (83) or hormone (androgen-binding protein, retinoid binding protein) (84) through the BTB for the metabolic requirement of the post-meiotic germ cells.

Sertoli cells provide large amounts of lipids used for spermatogenesis. *In vitro*, it has been demonstrated that Sertoli cells are able to synthesize cholesterol from acetate (85). However, this *de novo* synthesis is not a sufficient source of cholesterol to ensure spermatogenesis *in vivo*. Therefore, it is necessary to import cholesterol from the blood circulation. In rodent, it has been demonstrated that high density lipoprotein (HDL) is the primary source of cholesterol used by Sertoli cells (86). The high-density lipoprotein transporter SR-B1 is essential to import cholesterol from blood. SR-B1 is an integral membrane glycoprotein expressed in Leydig and Sertoli cells (87, 88). This transporter facilitates the uptake of HDL. It has been demonstrated that the overexpression of SR-B1 is associated with an increase of esterified cholesterol in Sertoli cells (89). SR-B1 is also implicated in the phagocytosis of apoptotic germ cells. This may also increase cholesterol levels in Sertoli cells (90). Another important point is the elimination of cholesterol overflow. Cholesterol is esterified and stored in lipid droplets to limit toxicity. Sertoli cells maintain cholesterol homeostasis through reverse cholesterol transport. This reverse transport primarily relies on the cholesterol transporter ATP-binding cassette A1 (ABCA1) (91). Genetic mutations in *ABCA1* lead to the absence of HDL in the plasma and the accumulation of esterified cholesterol in tissues, increasing the incidence of atherosclerosis (92). *ABCA1* is highly expressed in the testis and it was observed that within the seminiferous tubules, *ABCA1* is more expressed in Sertoli cells (91). Authors demonstrated that TM4 Sertoli cells lacking *Abca1* or primary Sertoli cells cultured from *Abca1*^{-/-} mice fail to efflux cholesterol. *In vivo*, *Abca1*^{-/-}

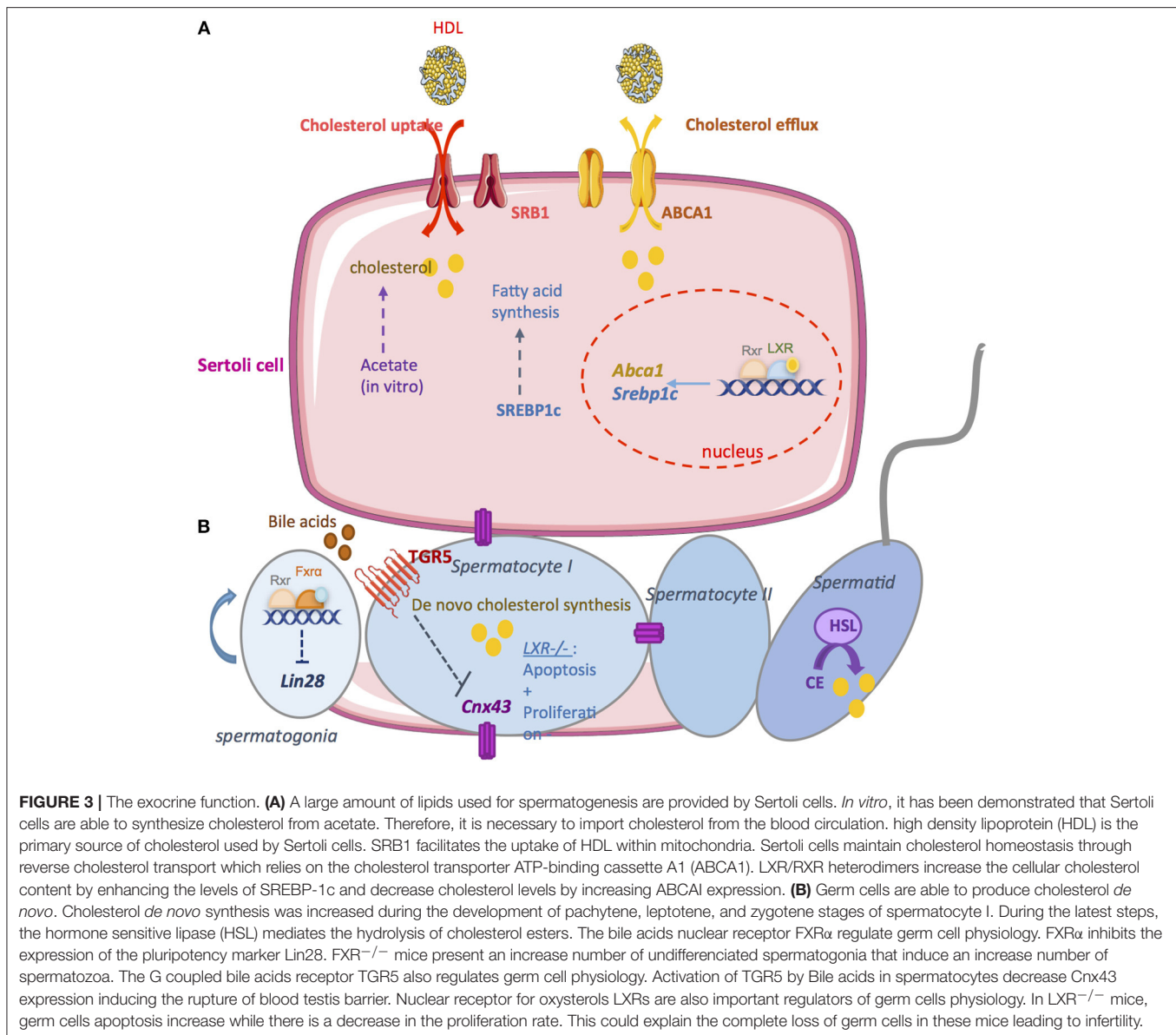


FIGURE 3 | The exocrine function. **(A)** A large amount of lipids used for spermatogenesis are provided by Sertoli cells. *In vitro*, it has been demonstrated that Sertoli cells are able to synthesize cholesterol from acetate. Therefore, it is necessary to import cholesterol from the blood circulation. High density lipoprotein (HDL) is the primary source of cholesterol used by Sertoli cells. SRB1 facilitates the uptake of HDL within mitochondria. Sertoli cells maintain cholesterol homeostasis through reverse cholesterol transport which relies on the cholesterol transporter ATP-binding cassette A1 (ABCA1). LXR/RXR heterodimers increase the cellular cholesterol content by enhancing the levels of SREBP-1c and decrease cholesterol levels by increasing ABCA1 expression. **(B)** Germ cells are able to produce cholesterol *de novo*. Cholesterol *de novo* synthesis was increased during the development of pachytene, leptotene, and zygotene stages of spermatocyte I. During the latest steps, the hormone sensitive lipase (HSL) mediates the hydrolysis of cholesterol esters. The bile acids nuclear receptor FXR α regulate germ cell physiology. FXR α inhibits the expression of the pluripotency marker Lin28. FXR $^{-/-}$ mice present an increase number of undifferentiated spermatogonia that induce an increase number of spermatozoa. The G coupled bile acids receptor TGR5 also regulates germ cell physiology. Activation of TGR5 by Bile acids in spermatocytes decrease Cnx43 expression inducing the rupture of blood testis barrier. Nuclear receptor for oxysterols LXRs are also important regulators of germ cells physiology. In LXR $^{-/-}$ mice, germ cells apoptosis increase while there is a decrease in the proliferation rate. This could explain the complete loss of germ cells in these mice leading to infertility.

mice present lipid accumulation in Sertoli. At 6 months, intra-testicular testosterone levels and sperm counts are significantly reduced in *Abca1* $^{-/-}$ mice compared with controls. Thereby, the fertility of *Abca1* $^{-/-}$ mice is reduced across their reproductive lifespans. These results indicate that ABCA1 play important role to Sertoli cells function and male fertility.

Regarding the cellular signaling, it has been demonstrated that LXR β is expressed in Sertoli cells. The *Lxr β* $^{-/-}$ knockout mice are fertile with few observed defects (57, 67). However, these mice present cholesteryl ester accumulation in the Sertoli cells. This is associated with a decrease of germ cell proliferation rate. Interestingly, it was shown that men with azoospermia present a significant decrease of *Lxr β* expression within the testis associated with fewer proliferating germ cells (93). Mice deficient for both LXRs isoforms present progressive

testicular degeneration associated with germ cell depletion. *Lxr α* $^{-/-}$; *Lxr β* $^{-/-}$ are reported to be infertile by 7–9 months of age (67, 68). As in *Lxr β* $^{-/-}$ mice, lipid accumulation in Sertoli cells appears to be the earliest phenotype of *Lxr α* $^{-/-}$; *Lxr β* $^{-/-}$ mice. A recent study further investigate the roles of LXR β in Sertoli cells by generating a mouse model that re-expresses *Lxr β* only in Sertoli cells in the *Lxr α* $^{-/-}$; *Lxr β* $^{-/-}$ mice (94). Authors showed that this *Lxr β* re-expression is fundamental for Sertoli cells to maintain functional BTB and to sustain the germ cell pool. As expected, *Lxr β* re-expression restored lipid homeostasis in Sertoli cells and regulates the endocrine function of Leydig cells. However, these mice are infertile with spermatogenesis defects. Furthermore, it was also demonstrated that wild-type animals exposed to the synthetic LXR agonist T0901317, within diet, exhibited increased levels of the LXR target genes sterol

regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) and ABCA1 (14, 95). Another study comforts the previous results in MSC-1 cells treated with T0901317 where ABCA1 levels were also increased (68).

These data clearly demonstrate the main roles of LXRs in the regulation lipid homeostasis of Sertoli cell and thus male fertility.

The Germ Cell Lineage

Spermatogenesis is a highly coordinated process leading to the production of male haploid gametes differentiated from diploid germ stem cells. Spermatogenesis begins with a proliferative phase with the differentiation of type A spermatogonia located in contact with the basement membrane of the seminiferous tubules. A_s (A single) spermatogonia possess the ability to renew the population of undifferentiated germ cells. Spermatogonia can also enter in the differentiation process. Then spermatogonia engaged in meiosis, the diploid spermatocyte gives rise to haploid cells called secondary spermatocyte or spermatocyte II and then round spermatids. Meiosis step is followed by spermiogenesis; which is the terminal process of spermatogenesis differentiation. The spermatids nucleus will be reorganized leading to chromatin compaction (96). Firstly the majority of histones is replaced by small basic transition proteins (TNP1 and TNP2). Secondly, transition proteins will be replaced by specific testis nuclear protein, protamines (PRM1 and PRM2) (97) to protect the genome from physical and chemical attack.

There is an intimate association between cholesterol metabolism and fertility during spermatogenesis. Cholesterol is required for the mass production of germ cells during spermatogenesis. A study determined that cholesterol *de novo* synthesis was increased during the development of pachytene, leptotene, and zygotene stages (98), which was associated with increased diameter and surface area of germ cells. In later stages, the rate of cholesterol synthesis tends to decrease and remains low throughout the following phases of spermatogenesis. During the last steps of spermatogenesis the Hormone-sensitive lipase (HSL) is known to mediate the hydrolysis of cholesterol esters. It has been shown that the HSL is localized in elongating spermatids and spermatozoa. The most striking phenotype of *Hsl*^{-/-} mice is male sterility caused by oligospermia (99). *Hsl*^{-/-} mice were found to accumulate diacylglycerols and cholesterol esters in the testis. A recent study further investigate *Hsl*^{-/-} mice testis. Authors showed that spermatogenesis is arrested just before spermiogenesis elongation step (100). An important pathway of lipid metabolism must be lost in *Hsl*^{-/-} testes causing an arrest of cell differentiation.

Like any animal cell, spermatozoa have a lipid bilayer plasma membrane. The proportion of the different constituents gives to the spermatic plasma membrane unique properties. The spermatic membrane has been shown to be rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) important for ensuring the viability and mobility of the spermatozoon (101–103). The high proportion of PUFA also seems to play an important role in the process of membrane fusion between spermatozoon and oocyte. Indeed, PUFAs contribute to flexibility and

membrane fluidity (104, 105). The high proportion of PUFA, especially docosahexaenoic acid (DHA) in humans, is important for fertility. Indeed, one study showed a decrease in PUFAs and an increase in saturated fatty acids (SFA) in spermatozoa of asthenozoospermic men compared to sperm of normozoospermic men (106). Another study also found a negative correlation between body mass index and DHA and a positive correlation between DHA and normal sperm parameters (107). Sterols are the second major components of the plasma membrane. Cholesterol is the most abundant sterol found in the spermatic membrane of many species (102). Spermatozoa are enriched in cholesterol within the seminiferous tubules. Indeed, in the spermatocyte stage, the germ cells are able to synthesize *de novo* cholesterol to allow the increase of their membrane surface (98). Sertoli cells also participate in this process by providing to sperm cells *de novo* synthesized cholesterol or derived from the bloodstream (85, 89). More recently, the presence of oxidized cholesterol derivatives has been described in several species including mice (108). These oxysterols could influence the membrane fluidity (109). The spermatic membrane is also composed of complex lipids such as phospholipids (PL) and sphingolipids (77, 85). The lipid composition of spermatozoa is of great importance during capacitation in the female genital tract and also in membrane fusion events during fertilization. After spermiation, the lipid composition of the spermatic membrane is not definitive and will undergo many modifications during the epididymal transit and the capacitation process. Lipids largely influence post-testicular maturation of spermatozoa. During the epididymal transit, the lipid composition of the gamete is strongly reshuffled (110–112). These modifications influence the membrane dynamics in order to confer greater membrane fluidity. These lipid rearrangements are finely regulated. The epididymis produces lipid vesicles allowing protein transfer to spermatozoa. Finally, capacitation is a stage of post-testicular maturation partly regulated by the lipid composition of the spermatic membrane (113). Therefore, regulation of the lipid profile of gametes is essential for maintaining male fertility. It has recently been shown that the lipid composition of spermatozoa varies according to the dietary intake of lipids (114), demonstrating a direct correlation between diet and gamete composition.

Mammalian spermatozoa are specialized and polarized cells, with one specific function which is the fertilization of the female oocyte. This fertilizing capacity is acquired during a multistep process after spermiation called post testicular maturation. Spermatozoa maturation starts during its epididymal transit and ends in the female genital tract. The maturation of spermatozoa remains the major function of the epididymis. Epididymal maturation is essential for the acquisition of fertilizing power but is also essential to ensure normal embryonic development (115). Epididymal maturation consists of morphological, functional, and biochemical changes.

Regarding the signaling pathways involved, the LXR signaling pathways control implicated in the regulation of spermatogenesis (67). Spermatogenesis results from a balance between cell

proliferation, cell differentiation, and cell death. Proliferation and apoptosis are respectively altered in *Lxr β ^{-/-}* and *Lxr α ^{-/-}* mice, whereas these mice did not show any fertility troubles. In the *Lxr β ^{-/-}* mice the lower proliferation rate was compensated by a decreased apoptosis rate and in *Lxr α ^{-/-}* mice the higher apoptosis level was associated with an increased proliferation rate. The lack of both LXRs led to a dramatic decline in proliferation and increase in apoptosis. This could explain the complete loss of germ cells in these mice and thus infertility. Recently, the implication of LXRs in the physiopathology of defective spermatogenesis in non-obstructive azoospermia (NOA) patients was investigated (93). Indeed, abnormalities observed in NOA patients look like those observed in *Lxr^{-/-}* mice. It has been shown that *Lxr* mRNA levels were decreased in NOA specimens and positively correlated with germ cell number. As expected, authors showed a decreased level of *Idol* (Inducible Degradator of the LDL receptor) and *Srebp1c* (Sterol regulatory element-binding protein 1), which are LXR target genes.

Next to this, a recent study has shown that the G coupled bile acids receptor TGR5 was expressed within the testis (70). It has been shown that BA-TGR5 signaling pathways alter testicular epithelium integrity leading to adult male fertility disorders (72). Indeed, after 4 months of dietary cholic acid (CA) supplementation, 25% of male mice were sterile and in fertile ones a 20% decrease of pups per litter was reported. Male exposed to BAs presented lower spermatozoa in the tail of the epididymis explaining the fertility defect. Interestingly, authors showed that *Tgr5^{-/-}* mice were preserved of the CA deleterious effects on the testis. At the molecular level, BAs exposure induced a repression of cell-cell interactions network through the down-regulation of N-cadherin as well as connexin 43 (CX43) expression. This leads to germ cell sloughing, rupture of the BTB and then spermatids apoptosis. In humans, a reduction in the expression of CX43 was shown to be associated with the degree of spermatogenesis defect (116–118).

Recently, it has been shown that bile acids nuclear receptor FXR α regulates germ cell physiology (73). Authors showed that FXR α plays a role in the establishment and maintenance of the undifferentiated germ cell pool that in turn influences male fertility. *Fxr α ^{-/-}* males present an extended fertility with aging. In *Fxr α ^{-/-}* males, the maintenance of fertility capacities results from a higher number of undifferentiated germ cells during aging associated with high spermatozoa production. FXR α regulates the expression of several pluripotency factors within the germ cell lineage. *In vitro* approaches show that FXR α controls the expression of the pluripotency marker Lin28 in the germ cells.

Obesity and Male Fertility

In the last decades infertility has become a global public health issue affecting 15% of all reproductive couples. It has been estimated that 70 million couples worldwide experience subfertility or infertility (119). Male factors are responsible for ~25% of cases of infertility (2). Currently, the etiology of low semen quality is poorly understood. Many physiological, environmental and genetic factors have been implicated (120).

Metabolic syndrome (MetS) is a group of risk factors such as high blood pressure, high blood sugar, unhealthy cholesterol levels, and abdominal fat. The association between MetS and male hypogonadism is well established and reviewed (121). Cross-sectional studies have found that between 20 and 64% of obese men have low total testosterone levels (122). A number of studies also show that low testosterone is associated with insulin resistance and an increased risk for diabetes mellitus and MetS in men. Testosterone supplementation seems to be beneficial on inflammation, muscle mass, lipid profile, sexual function, and improves comorbidities of obesity, MetS, or cardiovascular disease in males (121).

Evidence from human studies indicates that male obesity and components of the diet could play an important role in the deregulation of spermatogenesis, sperm maturation, or fertilizing ability. Obese or overweight men could present a decrease sperm quantity, quality, and motility (123, 124). A study showed differences between obese and lean patients regarding the acrosome reaction (125). Sperm acrosome reaction is impaired in obese men associated with altered circulating levels of estradiol and sperm cholesterol content. Obese men can also present an increase sperm DNA damage or lower embryo implantation rate (122, 126). The majority of studies in humans focuses on the impact of obesity on male fertility and do not take into account the plasma lipid profile. It is reported that 65% of infertile men show hypercholesterolemia and/or triglyceridemia (127). The impact of dyslipidemia on male fertility remains controversial. Even if cholesterol and lipid homeostasis is essential for male fecundity (57, 128), a recent study reported that hypercholesterolemia is not associated with sperm concentration or motility in men (129). It has also been shown that there is no correlation between sperm concentration and serum total cholesterol or triglyceride in human (130).

Some animal studies revealed that high cholesterol diet can impair fertility and lower sperm quality. Rabbit fed a High fat diet (HFD) is an experimental model of metabolic syndrome (MetS) that closely similar to the human syndrome (131–133). This model has been characterized by hyperglycaemia, hypercholesterolemia, hypertension, hypogonadotropic hypogonadism, penile alterations (131, 132, 134) or nonalcoholic steatohepatitis. This model is very useful to study the deleterious impact of MetS symptoms such as hypercholesterolemia on male fertility. It has been demonstrated that supplementation with testosterone (131, 132) with the FXR α agonist the obeticholic acid (133, 134) normalize several MetS symptoms including HFD-induced penile alterations. These animals presented abnormal sperm morphology, decreased sperm number and declined percentage of motile sperm or acrosome reaction (134–136, 138, 139). It has been shown that administration of tamoxifen, used in the treatment of idiopathic male infertility to HFD rabbits partially restored sperm motility, but further decreased morphology and increased spontaneous acrosome reaction (136). It has also been shown that hypercholesterolemic rabbits present lower testicular efficiency related to both a decrease in spermatogonial cells and an increase in germ cell apoptosis (137). On the other hand,

spermiogenesis, which is the last step of spermatogenesis, was also affected in these animals. In post-meiotic germ cells from hyper-cholesterolemic rabbits, abnormal development of acrosome, nucleus, and inaccurate tail implantation were associated with actin- α -tubulin-GM1 sphingolipid altered distribution. It was recently shown in rabbits that a cholesterol-enriched diet increased lipid deposition in the seminiferous tubules and disrupted the BTB (138). Total protein levels of the tight-junction protein 1 (ZO-1) and occludin and their distribution patterns were markedly affected, impairing fertility.

A similar study has demonstrated a disruption of BTB in mice exposed to High Fat Diet (HFD) (139). It has been reported that male rodents exposed to HFD present a decreased number of motile spermatozoa associated with a decline of fertilization rates (140–142). Intracellular reactive oxygen species (ROS) and sperm DNA damage were elevated in the HFD group compared with controls that could explain the decrease sperm motility (141). It has been demonstrated that HFD induces a decrease in testosterone production associated with a decrease level of steroidogenic enzyme (143, 144). A recent study suggests that the increase of autophagy process could be a cause of fertility defects induced by HFD (145). Authors demonstrate that inhibiting autophagy with chloroquine improves the decreased fertility of HFD male mice. Furthermore, the excessive activation of autophagy was also observed in sperm samples from obese, sub-fertile male patients.

In addition, some studies were interested in the impact of paternal or maternal exposure to HFD on male offspring (146, 147). It has been shown that preconception exposure of fathers to HFD impairs the motility of spermatozoa of male offspring, despite their control diet consumption (146). Feeding females with a HFD through pregnancy and lactation induces a decrease on LH and testosterone levels in male offspring (147). If translatable to human health, these studies suggest that reproductive defects may be amplified throughout generations because of calorie dense diet.

Interestingly, in the last decade, it has been proposed that derivatives of bile acids (BAs) could be interesting molecules for the treatment of metabolic diseases such as diabetes or obesity. Regarding the links between BA signaling pathways and male testicular physiology (72–74), a study has investigated the consequences of a long term exposure to molecules that activate BA signaling pathways to treat obesity. For that purpose, mice were fed HFD to induce obesity and concomitantly treat with BAs (148). Even if BAs improves abnormalities induced by the HFD such as body weight, glycemia, or lipidic profiles, co-exposure of HFD and BAs leads to a higher level of infertility. This was associated with altered germ cell proliferation, default of endocrine function and abnormalities in cell-cell interactions within the seminiferous tubule.

CONCLUSIONS

Male fertility disorders represent serious health problem and in 30% of the cases the cause remains unknown. Understanding

the various pathologic mechanisms causing male infertility represents an active area of research. As reviewed here, cholesterol homeostasis is crucial for testicular functions such as steroidogenesis, Sertoli cells function, or germ cell differentiation. Thus, altered concentrations of plasma cholesterol can affect the reproductive function leading to male infertility. This link between lipid homeostasis and male fertility disorders is clearly evident in patients suffering from hyperlipidemia or metabolic syndrome. Lipid-lowering drugs could probably ameliorate some reproductive symptoms. However, epidemiological data are currently scarce and controversial.

All these data could help in proposing new molecular markers to diagnose cases of infertility or to define whether the results obtained on the incriminated nuclear receptors LXR α and FXR α which can be modulated by ligands can lead to concepts transferable to the clinic either to develop new strategies to treat infertile men or new approaches for male contraception. Such perspectives will require the development of testicular-specific LXR or FXR modulators to treat testicular disorders and therefore male disorders without causing their impacts that may lead to metabolic disorders.

In the opposite way, modulating some of these receptors through the use of agonist or antagonist molecules would improve the symptoms of metabolic syndrome diseases. However, it has been shown in mice that modulating nuclear receptors signaling induce deleterious effects on testicular physiology leading to infertility. In that line, as molecules modulating the BA receptor signaling pathways have been proposed to treat metabolic diseases, it will be important to define the molecular mechanisms involved in the deleterious impact of BAs on testis physiology. Such studies will be essential to define how to pharmacologically or genetically modulate bile acid receptors to treat metabolic disorders while minimizing impacts on male reproductive functions. In addition, the identification of the crosstalk between increased BA levels and metabolic diseases on fertility capacities of male mice should be a mechanism explaining rare clinical situations of infertility following bariatric surgical approach in some obese men.

It will be interesting in the future to identify at the clinical levels, using biopsies of patients suffering from liver disorders (cholestasis, hepatitis...), the potential involvement of bile acid signaling pathways in the human regulation of male fertility. According to previous published data, it will be necessary to analyse both BA levels as well as the BA pool composition. Indeed, it appears that secondary BA, namely DCA, is the one whose levels are inversely correlated with fertility. Such analyses on human cohort will be useful to define if BA levels or pool composition might be a useful biomarker linking liver disorders and male infertility; or even if BA could be markers of idiopathic infertility.

In the recent decades, assisted medical procreation (AMP) has been importantly developed to overpass the fertility disorders. Next to *In vitro* fecundation, important efforts have been done in order to develop approach of *in vitro* production of germ cells from spermatogonial stem cells. This strategy is important to propose AMP to azoospermic men. The recent data regarding the role of FXR α in the establishment of the

pool of undifferentiated spermatogonia, suggest that FXRalpha modulators might be useful in such approaches to increase the rate and efficiency to produce male gametes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LS, LT, SM, MG, FC, JML, CB and DV have participated to the writing of this review.

REFERENCES

- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* (2015) 13:37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1
- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril.* (2002) 77:873–82.
- Jarvi K, Lo K, Grober E, Mak V, Fischer A, Grantmyre J, et al. The workup and management of azoospermic males. *Can Urol Assoc J.* (2015) 9:229–35. doi: 10.5489/cuaj.3209
- Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoeratozoospermia. *Asian J Androl.* (2006) 8:143–57. doi: 10.1111/j.1745-7262.2006.00123.x
- Parton RG, Hancock JF. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* (2004) 14:141–7. doi: 10.1016/j.tcb.2004.02.001
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* (2000) 290:1721–6.
- Yokoyama S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta.* (2000) 1529:231–44. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00152-9
- El-Hajjaji FZ, Oumeddour A, Pommier AJC, Ouvrier A, Viennois E, Dufour J, et al. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1812:974–81. doi: 10.1016/j.bbdis.2011.02.004
- Wechsler A, Brafman A, Shafir M, Heverin M, Gottlieb H, Damari G, et al. Generation of viable cholesterol-free mice. *Science* (2003) 302:2087. doi: 10.1126/science.1090776
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* (1990) 343:425–30. doi: 10.1038/343425a0
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* (2006) 124:35–46. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.022
- Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* (2012) 69:915–30. doi: 10.1007/s00018-011-0857-5
- Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2012) 13:213–24. doi: 10.1038/nrm3312
- Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* (2000) 14:2819–30.
- Komati R, Spadoni D, Zheng S, Sridhar J, Riley KE, Wang G. Ligands of therapeutic utility for the liver X receptors. *Molecules* (2017) 22:e88. doi: 10.3390/molecules22010088
- Mutemberezi V, Guillemot-Legrès O, Muccioli GG. Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Prog Lipid Res.* (2016) 64:152–69. doi: 10.1016/j.plipres.2016.09.002
- Ratni H, Wright MB. Recent progress in liver X receptor-selective modulators. *Curr Opin Drug Discov Devel.* (2010) 13:403–13.
- Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR, Burriss TP. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J Biol Chem.* (2008) 283:26332–9. doi: 10.1074/jbc.M804808200
- Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* (2008) 59(Suppl. 7):31–55.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, et al. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* (1998) 93:693–704.

FUNDING

This work was funded by Inserm, CNRS, Clermont Université, Ligue contre le Cancer (Comité Puy de Dôme to DV), Nouveau Chercheur Auvergne (#R12087CC to DV), and Plan Cancer—Cancer-Environnement InCa/Inserm (C14012CS to DV). DV's team received support by the French government IDEX-ISITE initiative 16-IDEX-0001 (CAP 20-25).

- Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, et al. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest.* (2001) 107:565–73. doi: 10.1172/JCI9794
- Poupon R, Chignard N, Rosmorduc O, Barbu V, Housset C. [Biliary function and its regulation]. *Med Sci.* (2004) 20:1096–9. doi: 10.1051/medsci/200420121096
- Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* (2003) 72:137–74. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712
- Martinot E, Sèdes L, Baptissart M, Lobaccaro J-M, Caira F, Beaudoin C, et al. Bile acids and their receptors. *Mol Aspects Med.* (2017) 56:2–9. doi: 10.1016/j.mam.2017.01.006
- Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* (2006) 47:241–59. doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* (1999) 284:1362–5.
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* (1999) 284:1365–8.
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* (1999) 3:543–53.
- Maruyama T, Tanaka K, Suzuki J, Miyoshi H, Harada N, Nakamura T, et al. Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J Endocrinol.* (2006) 191:197–205. doi: 10.1677/joe.1.06546
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* (2005) 2:217–25. doi: 10.1016/j.cmet.2005.09.001
- Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, et al. Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* (2003) 17:1581–91. doi: 10.1101/gad.1083503
- Woolveridge I, Bryden AA, Taylor ME, George NJ, Wu FC, Morris ID. Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod.* (1998) 4:701–7.
- Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D, Przeddecki F, et al. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm.* (2001) 63:63–90.
- Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol.* (2005) 19:2647–59. doi: 10.1210/me.2004-0532
- Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, et al. Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol.* (2002) 16:184–99. doi: 10.1210/mend.16.1.0759
- Payne AH. Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod.* (1990) 42:399–404.
- Keeney DS, Mason JI. Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5–4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. *Endocrinology* (1992) 130:2007–15. doi: 10.1210/endo.130.4.1312436

38. Kabbaj O, Holm C, Vitale ML, Pelletier RM. Expression, activity, and subcellular localization of testicular hormone-sensitive lipase during postnatal development in the guinea pig. *Biol Reprod.* (2001) 65:601–12. doi: 10.1095/biolreprod65.2.601
39. Kabbaj O, Yoon SR, Holm C, Rose J, Vitale ML, Pelletier R-M. Relationship of the hormone-sensitive lipase-mediated modulation of cholesterol metabolism in individual compartments of the testis to serum pituitary hormone and testosterone concentrations in a seasonal breeder, the mink (*Mustela vison*). *Biol Reprod.* (2003) 68:722–34.
40. Shen WJ, Azhar S, Kraemer FB. Lipid droplets and steroidogenic cells. *Exp Cell Res.* (2016) 340:209–14. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.11.024
41. Venugopal S, Martinez-Arguelles DB, Chebbi S, Hullin-Matsuda F, Kobayashi T, Papadopoulos V. Plasma membrane origin of the steroidogenic pool of cholesterol used in hormone-induced acute steroid formation in Leydig cells. *J Biol Chem.* (2016) 291:26109–25. doi: 10.1074/jbc.M116.740928
42. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol.* (2000) 164:247–53.
43. Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1997) 94:11540–5.
44. Lin Y, Hou X, Shen WJ, Hanssen R, Khor VK, Cortez Y, et al. SNARE-mediated cholesterol movement to mitochondria supports steroidogenesis in rodent cells. *Mol Endocrinol.* (2016) 30:234–47. doi: 10.1210/mend.2015-1281
45. Hu MC, Hsu HJ, Guo IC, Chung BC. Function of Cyp11a1 in animal models. *Mol Cell Endocrinol.* (2004) 215:95–100. doi: 10.1016/j.mce.2003.11.024
46. Conley AJ, Bird IM. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod.* (1997) 56:789–99.
47. Hammar M, Petersson F. Testosterone production *in vitro* in human testicular tissue. *Andrologia* (1986) 18:196–200.
48. Rey R, Campo S, Ayuso S, Nagle C, Chemes H. Testicular steroidogenesis in the Cebus monkey throughout postnatal development. *Biol Reprod.* (1995) 52:997–1002.
49. Wang W, Wei S, Li L, Su X, Du C, Li F, et al. Proteomic analysis of murine testes lipid droplets. *Sci Rep.* (2015) 5:12070. doi: 10.1038/srep12070
50. Tsai EC, Matsumoto AM, Fujimoto WY, Boyko EJ. Association of bioavailable, free, and total testosterone with insulin resistance: influence of sex hormone-binding globulin and body fat. *Diabetes Care* (2004) 27:861–8.
51. Xu Q, Lin HY, Yeh SD, Yu IC, Wang RS, Chen YT, et al. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine* (2007) 32:96–106. doi: 10.1007/s12020-007-9015-0
52. Oakes MB, Eyvazzadeh AD, Quint E, Smith YR. Complete androgen insensitivity syndrome—a review. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* (2008) 21:305–10. doi: 10.1016/j.jpag.2007.09.006
53. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, et al. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem.* (1986) 24:77–83.
54. Koike S, Sakai M, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* (1987) 15:2499–513.
55. Delbès G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P, Habert R. Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology* (2005) 146:2454–61. doi: 10.1210/en.2004-1540
56. Carreau S, Hess RA. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* (2010) 365:1517–35. doi: 10.1098/rstb.2009.0235
57. Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH. Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol.* (2013) 368:30–46. doi: 10.1016/j.mce.2012.06.011
58. Maqdasy S, Trousson A, Tauveron I, Volle DH, Baron S, Lobaccaro JMA. Once and for all, LXR α and LXR β are gatekeepers of the endocrine system. *Mol Aspects Med.* (2016) 49:31–46. doi: 10.1016/j.mam.2016.04.001
59. Chau YM, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Olson LM, Sadovsky Y. Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse. *Biol Reprod.* (1997) 57:765–71.
60. Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH. Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem.* (1997) 272:7960–7.
61. Wang ZN, Bassett M, Rainey WE. Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 beta-hydroxylase. *J Mol Endocrinol.* (2001) 27:255–8.
62. Sirianni R, Seely JB, Attia G, Stocco DM, Carr BR, Pezzi V, et al. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Endocrinol.* (2002) 174:R13–7.
63. Cao G, Zhao L, Stangl H, Hasegawa T, Richardson JA, Parker KL, et al. Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol Endocrinol.* (1999) 13:1460–73. doi: 10.1210/mend.13.9.0346
64. Schoonjans K, Annicotte JS, Huby T, Botrugno OA, Fayard E, Ueda Y, et al. Liver receptor homolog 1 controls the expression of the scavenger receptor class B type I. *EMBO Rep.* (2002) 3:1181–7. doi: 10.1093/embo-reports/kvf238
65. Mascaró C, Ortiz JA, Ramos MM, Haro D, Hegardt FG. Sterol regulatory element binding protein-mediated effect of fluvastatin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase transcription. *Arch Biochem Biophys.* (2000) 374:286–92. doi: 10.1006/abbi.1999.1600
66. Datta S, Wang L, Moore DD, Osborne TF. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter by nuclear receptors liver receptor homologue-1 and small heterodimer partner: a mechanism for differential regulation of cholesterol synthesis and uptake. *J Biol Chem.* (2006) 281:807–12. doi: 10.1074/jbc.M511050200
67. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol.* (2007) 21:1014–27. doi: 10.1210/me.2006-0277
68. Robertson KM, Schuster GU, Steffensen KR, Hovatta O, Meaney S, Hulthenby K, et al. The liver X receptor- β is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* (2005) 146:2519–30. doi: 10.1210/en.2004-1413
69. Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL, Lobaccaro JMA et al. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* (2007) 21:303–15. doi: 10.1101/gad.409307
70. Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, Abbondanzo SJ, Zeng M, Yang S, et al. Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J.* (2006) 398:423–30. doi: 10.1042/BJ20060537
71. Sèdes L, Martinot E, Baptissart M, Baron S, Caira F, Beaudoin C, et al. Bile acids and male fertility: from mouse to human? *Mol Aspects Med.* (2017) 56:101–9. doi: 10.1016/j.mam.2017.05.004
72. Baptissart M, Vega A, Martinot E, Pommier AJ, Houten SM, Marceau G, et al. Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology* (2014) 60:1054–65. doi: 10.1002/hep.27204
73. Martinot E, Sèdes L, Baptissart M, Holota H, Rouaisnel B, Damon-Soubeyrand C, et al. The bile acid nuclear receptor FXR α is a critical regulator of mouse germ cell fate. *Stem Cell Rep.* (2017) 9:315–28. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.05.036
74. Baptissart M, Martinot E, Vega A, Sèdes L, Rouaisnel B, de Haze A, et al. Bile acid-FXR α pathways regulate male sexual maturation in mice. *Oncotarget* (2016) 7:19468–82. doi: 10.18632/oncotarget.7153
75. De França LR, Hess RA, Cooke PS, Russell LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec.* (1995) 242:57–69. doi: 10.1002/ar.1092420108
76. Tarulli GA, Stanton PG, Meachem SJ. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol Reprod.* (2012) 87:13, 1–11. doi: 10.1095/biolreprod.111.095091
77. Willems A, Batlouni SR, Esnal A, Swinnen JV, Saunders PTK, Sharpe RM, et al. Selective ablation of the androgen receptor in mouse sertoli cells affects sertoli cell maturation, barrier formation and cytoskeletal development. *PLoS ONE* (2010) 5:e14168. doi: 10.1371/journal.pone.0014168

78. Francavilla F, Santucci R, Barbonetti A, Francavilla S. Naturally-occurring antisperm antibodies in men: interference with fertility and clinical implications. An update. *Front Biosci.* (2007) 12:2890–2911.
79. Skinner MK, Tung PS, Fritz IB. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol.* (1985) 100:1941–7.
80. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* (2004) 25:747–806. doi: 10.1210/er.2003-0022
81. Robinson R, Fritz IB. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol Reprod.* (1981) 24:1032–41.
82. Chen SR, Liu YX. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction* (2015) 149:R159–67. doi: 10.1530/REP-14-0481
83. Sylvester SR, Griswold MD. The testicular iron shuttle: a “nurse” function of the Sertoli cells. *J Androl.* (1994) 15:381–5.
84. Porter SB, Ong DE, Chytil F, Orgebin-Crist MC. Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein in the rat testis and epididymis. *J Androl.* (1985) 6:197–212.
85. Wiebe JP, Tilbe KS. *De novo* synthesis of steroids (from acetate) by isolated rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (1979) 89:1107–13.
86. Fofana M, Travert C, Carreau S, Le Goff D. Evaluation of cholesteryl ester transfer in the seminiferous tubule cells of immature rats *in vivo* and *in vitro*. *J Reprod Fertil.* (2000) 118:79–83.
87. Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. *Endocr Rev.* (2003) 24:357–87. doi: 10.1210/er.2001-0037
88. Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest.* (1996) 98:984–95. doi: 10.1172/JCI118883
89. Akpovi CD, Yoon SR, Vitale ML, Pelletier RM. The predominance of one of the SR-BI isoforms is associated with increased esterified cholesterol levels not apoptosis in mink testis. *J Lipid Res.* (2006) 47:2233–47. doi: 10.1194/jlr.M600162-JLR200
90. Nakanishi Y, Shiratsuchi A. [Physiological role and mechanism of phagocytic clearance of apoptotic cells]. *Seikagaku* (2003) 75:1429–37.
91. Selva DM, Hirsch-Reinshagen V, Burgess B, Zhou S, Chan J, McIsaac S, et al. The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J Lipid Res.* (2004) 45:1040–50. doi: 10.1194/jlr.M400007-JLR200
92. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJP, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2003) 23:1322–32. doi: 10.1161/01.ATV.0000078520.89539.77
93. Rondanino C, Ouchchane L, Chaffour C, Marceau G, Déchelotte P, Sion B, et al. Levels of liver X receptors in testicular biopsies of patients with azoospermia. *Fertil Steril.* (2014) 102:361–71.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.033
94. Maqdas S, El Hajjaji FZ, Baptissart M, Viennois E, Oumeddour A, Brugnol F, et al. Identification of the functions of liver X receptor- β in sertoli cells using a targeted expression-rescue model. *Endocrinology* (2015) 156:4545–57. doi: 10.1210/en.2015-1382
95. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, et al. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem.* (2001) 276:39438–47. doi: 10.1074/jbc.M105863200
96. Dadoune JP. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech.* (2003) 61:56–75. doi: 10.1002/jemt.10317
97. Hecht NB. Regulation of “haploid expressed genes” in male germ cells. *J Reprod Fertil.* (1990) 88:679–93.
98. Potter JE, Millette CF, James MJ, Kandutsch AA. Elevated cholesterol and dolichol synthesis in mouse pachytene spermatocytes. *J Biol Chem.* (1981) 256:7150–4.
99. Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, et al. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2000) 97:787–92.
100. Wang F, Chen Z, Ren X, Tian Y, Wang F, Liu C, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency alters gene expression and cholesterol content of mouse testis. *Reproduction* (2017) 153:175–85. doi: 10.1530/REP-16-0484
101. Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* (1996) 2:246–56.
102. Ladha S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol.* (1998) 165:1–10.
103. Neill AR, Masters CJ. Metabolism of fatty acids by ovine spermatozoa. *J Reprod Fertil.* (1973) 34:279–87.
104. Fleming AD, Yanagimachi R. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool.* (1984) 229:485–9. doi: 10.1002/jez.1402290317
105. Meizel S, Turner KO. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* (1983) 161:315–8.
106. Tavilani H, Doosti M, Abdi K, Vaisiraygani A, Joshaghani HR. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia* (2006) 38:173–8. doi: 10.1111/j.1439-0272.2006.00735.x
107. Andersen JM, Rønning PO, Herning H, Bekken SD, Haugen TB, Witczak O. Fatty acid composition of spermatozoa is associated with BMI and with semen quality. *Andrology* (2016) 4:857–65. doi: 10.1111/andr.12227
108. Boerke A, Brouwers JF, Olkkonen VM, van de Lest CHA, Sostaric E, Schoevers EJ, et al. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during *in vitro* fertilization. *Biol Reprod.* (2013) 88:21. doi: 10.1095/biolreprod.112.101253
109. Bielska AA, Olsen BN, Gale SE, Mydock-McGrane L, Krishnan K, Baker NA, et al. Side-chain oxysterols modulate cholesterol accessibility through membrane remodeling. *Biochemistry* (2014) 53:3042–51. doi: 10.1021/bi5000096
110. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* (1992) 29:255–66.
111. Rejrabi H, Sion B, Prensier G, Carreras M, Motta C, Frenoux JM, et al. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod.* (2006) 74:1104–13. doi: 10.1095/biolreprod.105.049304
112. Whitfield M, Pollet-Villard X, Levy R, Drevet JR, Saez F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. *Asian J Androl.* (2015) 17:742–8. doi: 10.4103/1008-682X.155536
113. Jin SK, Yang WX. Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated? *Oncotarget* (2017) 8:3600–27. doi: 10.18632/oncotarget.12274
114. Jafaroghli M, Abdi-Benemar H, Zamiri MJ, Khalili B, Farshad A, Shadparvar AA. Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. *Anim Reprod Sci.* (2014) 147:17–24. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.03.013
115. Wazzan WC, Gwatkin RB, Thomas AJ. Zona drilling enhances fertilization by mouse caput epididymal sperm. *Mol Reprod Dev.* (1990) 27:332–6. doi: 10.1002/mrd.1080270407
116. Matsuo Y, Nomata K, Eguchi J, Aoki D, Hayashi T, Hishikawa Y, et al. Immunohistochemical analysis of connexin43 expression in infertile human testes. *Acta Histochem Cytochem.* (2007) 40:69–75. doi: 10.1267/ahc.07001
117. Brehm R, Marks A, Rey R, Kliesch S, Bergmann M, Steger K. Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-*in-situ* or seminoma. *J Pathol.* (2002) 197:647–53. doi: 10.1002/path.1140
118. Segretain D, Decrouy X, Dompierre J, Escalier D, Rahman N, Fiorini C, et al. Sequestration of connexin43 in the early endosomes: an early event of Leydig cell tumor progression. *Mol Carcinog.* (2003) 38:179–87. doi: 10.1002/mc.10160

119. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod.* (2007) 22:1506–12. doi: 10.1093/humrep/dem046
120. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* (2012) 62:324–32. doi: 10.1016/j.eururo.2012.04.048
121. Dimopoulou C, Goulis DG, Corona G, Maggi M. The complex association between metabolic syndrome and male hypogonadism. *Metab Clin Exp.* (2018). doi: 10.1016/j.metabol.2018.03.024. [Epub ahead of print].
122. Kalyani RR, Dobs AS. Androgen deficiency, diabetes, and the metabolic syndrome in men. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* (2007) 14:226–34. doi: 10.1097/MED.0b013e32814db856
123. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril.* (2004) 82:863–70. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.056
124. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* (2013) 19:221–31. doi: 10.1093/humupd/dms050
125. Samavat J, Natali I, Degl'Innocenti S, Filimberti E, Cantini G, Di Franco A, et al. Acrosome reaction is impaired in spermatozoa of obese men: a preliminary study. *Fertil Steril.* (2014) 102:1274–81.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.07.1248
126. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl.* (2013) 15:622–5. doi: 10.1038/aja.2013.65
127. Ramírez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M. [High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men]. *Ginecol Obstet Mex.* (2000) 68:224–9.
128. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* (1998) 59:7–11.
129. Eisenberg ML, Kim S, Chen Z, Sundaram R, Schisterman EF, Louis GMB. The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod.* (2015) 30:493–4. doi: 10.1093/humrep/deu322
130. Lu JC, Jing J, Yao Q, Fan K, Wang GH, Feng RX, et al. Relationship between Lipids Levels of Serum and Seminal Plasma and Semen Parameters in 631 Chinese Subfertile Men. *PLoS ONE* (2016) 11:e0146304. doi: 10.1371/journal.pone.0146304
131. Filippi S, Vignozzi L, Morelli A, Chavalmane AK, Sarchielli E, Fibbi B, et al. Testosterone partially ameliorates metabolic profile and erectile responsiveness to PDE5 inhibitors in an animal model of male metabolic syndrome. *J Sex Med.* (2009) 6:3274–88. doi: 10.1111/j.1743-6109.2009.01467.x
132. Vignozzi L, Morelli A, Sarchielli E, Comeglio P, Filippi S, Cellai I, et al. Testosterone protects from metabolic syndrome-associated prostate inflammation: an experimental study in rabbit. *J Endocrinol.* (2012) 212:71–84. doi: 10.1530/JOE-11-0289
133. Maneschi E, Vignozzi L, Morelli A, Mello T, Filippi S, Cellai I, et al. FXR activation normalizes insulin sensitivity in visceral preadipocytes of a rabbit model of MetS. *J Endocrinol.* (2013) 218:215–31. doi: 10.1530/JOE-13-0109
134. Vignozzi L, Morelli A, Filippi S, Comeglio P, Chavalmane AK, Marchetta M, et al. Farnesoid X receptor activation improves erectile function in animal models of metabolic syndrome and diabetes. *J Sex Med.* (2011) 8:57–77. doi: 10.1111/j.1743-6109.2010.02073.x
135. Maneschi E, Morelli A, Filippi S, Cellai I, Comeglio P, Mazzanti B, et al. Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements. *J Endocrinol.* (2012) 215:347–62. doi: 10.1530/JOE-12-0333
136. Marchiani S, Vignozzi L, Filippi S, Gurrieri B, Comeglio P, Morelli A, et al. Metabolic syndrome-associated sperm alterations in an experimental rabbit model: relation with metabolic profile, testis and epididymis gene expression and effect of tamoxifen treatment. *Mol Cell Endocrinol.* (2015) 401:12–24. doi: 10.1016/j.mce.2014.11.005
137. Simón L, Funes AK, Yapur MA, Cabrilla ME, Monclus MA, Boarelli PV, et al. Manchette-acrosome disorders during spermiogenesis and low efficiency of seminiferous tubules in hypercholesterolemic rabbit model. *PLoS ONE* (2017) 12:e0172994. doi: 10.1371/journal.pone.0172994
138. Morgan DH, Ghribi O, Hui L, Geiger JD, Chen X. Cholesterol-enriched diet disrupts the blood-testis barrier in rabbits. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2014) 307:E1125–30. doi: 10.1152/ajpendo.00416.2014
139. Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y, et al. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS ONE* (2015) 10:e0120775. doi: 10.1371/journal.pone.0120775
140. Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod.* (2010) 82:96–104. doi: 10.1095/biolreprod.109.078915
141. Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* (2011) 34:402–10. doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01092.x
142. Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AE, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol.* (2011) 9:32. doi: 10.1186/1477-7827-9-32
143. Sánchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Manfredi-Lozano M, Leon S, Garcia-Galiano D, Castaño JP, et al. Obesity-induced hypogonadism in the male: premature reproductive neuroendocrine senescence and contribution of Kiss1-mediated mechanisms. *Endocrinology* (2014) 155:1067–79. doi: 10.1210/en.2013-1584
144. Campos-Silva P, Costa WS, Sampaio FJB, Gregorio BM. Prenatal and/or postnatal high-fat diet alters testicular parameters in adult Wistar Albino rats. *Histol Histopathol.* (2017) 33:407–16. doi: 10.14670/HH-11-941
145. Mu Y, Yan WJ, Yin TL, Zhang Y, Li J, Yang J. Diet-induced obesity impairs spermatogenesis: a potential role for autophagy. *Sci Rep.* (2017) 7:43475. doi: 10.1038/srep43475
146. Fullston T, McPherson NO, Owens JA, Kang WX, Sandeman LY, Lane M. Paternal obesity induces metabolic and sperm disturbances in male offspring that are exacerbated by their exposure to an “obesogenic” diet. *Physiol Rep.* (2015) 3:12336. doi: 10.14814/phy2.12336
147. Rodríguez-González GL, Vega CC, Boeck L, Vázquez M, Bautista CJ, Reyes-Castro LA, et al. Maternal obesity and overnutrition increase oxidative stress in male rat offspring reproductive system and decrease fertility. *Int J Obes.* (2015) 39:549–56. doi: 10.1038/ijo.2014.209
148. Vega A, Martinot E, Baptissart M, De Haze A, Vaz F, Kulik W, et al. Bile acid alters male mouse fertility in metabolic syndrome context. *PLoS ONE* (2015) 10:e0139946. doi: 10.1371/journal.pone.0139946

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Sèdes, Thirouard, Maqdasy, Garcia, Caira, Lobaccaro, Beauoin and Volle. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.