



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : Sciences du vivant
Par Monika JAGLA

ETUDE DE L'IMPACT DE MUTATIONS DU DOMAINE DE
LIAISON A L'ADN SUR LES FONCTIONS DU RECEPTEUR DES
ANDROGENES DANS LE CANCER DE LA PROSTATE

Soutenue publiquement le 6 Juillet 2007

Membres du jury

Directeur de thèse : M. Jean-Pierre BERGERAT, PU-PH, EA 3430-ULP

Rapporteur Interne : M. Dominique BURNOUF, HDR, CNRS/UPR9002

Rapporteur Externe : M. Alexandre DE LA TAILLE, HDR, G.E.T.U Centre de
recherche chirurgicale, Hôpital Henri Mondor

Rapporteur Externe : M. Bruno CHAUFFERT, PU-PH, Département d'Oncologie,
Centre Georges-François Leclerc

Examineur : M. Patrick LUTZ, PU-PH, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Jean-Pierre Bergerat, puis Jocelyn Céraline de m'avoir accueilli au sein de « l'Equipe Prostate » et de m'avoir permis réaliser ce travail de thèse

Ensuite, je voudrai remercier tout particulièrement les associations ARECOH et ATGC d'avoir rendu ce travail possible de par le soutien financier apporté tout au long de ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe de la plateforme d'imagerie de l'IGBMC et spécialement Pascal Kessler pour son aide, la formation et conseils avisés au cours des études de colocalisation en microscopie confocale.

Merci, à Christelle Orbillot pour son implication dans le PHRC et pour la détection du variant AR23.

Merci à Julie Lobstein pour sa contribution au cours de la mise au point de la chromatine immunoprécipitation.

Merci à Gaëlle Lapouge pour son amitié, Gemma Marcias et Laetitia Ruck pour leur enthousiasme et leur bonne humeur au quotidien, à Christelle Siebert pour son aide informatique, sans oublier le reste de « l'Equipe Prostate ».

Merci, à Laetitia, Fabrice et Philippe, et tous ceux que je ne cite pas mais qui m'entourent depuis le début et qui attendent depuis si longtemps l'aboutissement de ce travail.

Un énormissime merci à mes parents, ma famille, vous m'avez soutenu et encouragé tout au long de mes études et m'avez permis d'arriver jusque là... sans vous rien n'aurait été possible.

Il n'existe pas de mots pour t'exprimer ma gratitude Adrien, j'espère tout simplement un jour pouvoir te rendre la pareille, alors tout simplement merci.....

Puis, à toi, Olivia mon soleil, merci d'illuminer mes journées

ABREVIATIONS

A : androstènedione ;

Ade : Adénine

ADR3 : Répétitions directes espacées de trois nucléotides

AF-1 : Activation Function 1

AF-2 : Activation Function 2

AIPC : Androgen Independent Prostate Cancer (Cancer de la prostate androgéno-indépendant)

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AKT : Protéine Kinase B

AMACR: α -méthyl-CoA racemase

ARE : Androgen Responsive Elements (Elément de réponse aux androgènes)

ARR19 : AR Corepressor 19kDa

ATF : Activating transcription Factor

AP-1 : Activating Protein 1

CaP : Cancer de la Prostate

CBP : cAMP response-binding protein (CREB) binding protein

CD44 : Cluster of différenciation 44

c-FLIP: cellular- FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein long isoform

CMV : Cytomégalovirus

CoA : co-activateurs

CoR : co-répresseurs

CPA : cyprotérone acétate ;

CRE : cAMP Response Element

CREB: cAMP response-binding protein

CTD: Domaine C-terminal répété

DBD : DNA Binding Domain (Domaine de liaison au ligand)

DES : diéthylstilbestrol

DES: diéthyl-stilbestrol

DHEA : dehydroepiandrosterone

DHEA : déhydroépiandrostérone ;

DHT : dihydrotestostérone

DHT: dihydrotestostérone ;

E2 : β -oestradiol ;

EDTMP : acide éthylènediaminetetra-méthylènephosphonique

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

EPCA: Early Prostate Cancer Antigen

ER: Recepteur des oestrogènes

ERG : V-ETS Avian Erythroblastic Virus E26 Oncogen Related appartenant à la

ETS : E26 Transformation-specific oncogen)

ERK: Extracellular-signal-regulated kinase

ETV : E26 Transformation-specific oncogen (ETS) variant gene

FDA : Food and Drug Administration

FGC: Fast Growth Cells

FGF :Fibroblast Growth Factor

Flut : flutamide ;

FSH: Follicle-stimulating Hormone

GR : Récepteur des glucocorticoïdes

GTFs : facteurs généraux de transcription

HAT : Histone Acétyle Transférase

HC : hydrocortisone

HDAC : Activité histone DéAcétylase

3 β HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase

Her2/neu-erb2: Epidermal Growth factor Receptor tyrosine Kinase

HR : Hinge Region (région charnière)

HRE : Element de réponse aux hormones

HRP : Horse radish peroxydase

HSP : Heat Shock Proteins

IGF: Insuline Growth Factor

IR3 : Répétitions inversées espacées de 3 nucléotides

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IκB: Inhibitors of κB

IκK : IκB Kinase

JNK : Jun N-terminale Kinase

K : kératines

KLK : Kallikréine

LBD : Ligand Binding Domain(domaine de liaison au ligand)

LHRH : luteinising hormone releasing hormone ou gonadolibérine

LNCaP: Lymph Node Cancer Prostate

Mad: Drosophila mothers against dpp (Mad) et *C. elegans* Sma

MADS: MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS SRF

MAF : Musculoaponeurotic fibrosarcoma

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MMTV-LTR : Mouse Mammary Tumour Virus-Long Terminal Repeat

MNAR : Modulator of non genomic activity of estrogen receptor

MP : médroxyprogestérone

mTOR: mamalian target of rapamycine

NCoR : Nuclear Receptor Corepressor

NES : Signal d'Export Nucléaire

NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells

NF-κB: Nuclear Factor κB

NGF1-B (Nerve Growth Factor 1) ou

NLS : signal de localisation nucléaire

NTD : Domaine N-terminal

NURR1 :

P : progestérone

17-OH-Prog : 17-hydroxy-progéstérone

PBARE2 : L'élément de réponse androgéno-spécifique 2 du gène de la Probasine.

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PEMARE1 : élément de réponse présente en amont du gène à homéoboîte PEM.

PDGF: Platelet Derived growth factor

PI-3K : Phosphoinositide-3 Kinase

PIC : cocktail d'inhibiteur de protéases

PIN : néoplasie intra-épithéliale

PKA : Protéine Kinase A

PKB: Protéine Kinase B

PKC : Protéine Kinase C

PM : Poids Moléculaire

PMSF : PhénylMéthylSulfonylFluorure

Pol II : l'ARN Polymérase II

PPAR

PR : Récepteur de la progésterone

ProtyC3 : Précurseur de la Protocadherin γ C3

PSA : l'antigène spécifique de la prostate

PSAL: PSA libre

PSAT: PSA total

PSCA : Prostate Specific Stem Cell Antigen

PSCA : Prostate Stem Cell antigen

PTEN: Phosphatase and Tensin Homologue deleted on chromosome 10

RA : Récepteur des Androgène

RAC3 : Receptor Associated Co-activator 3

RAwt (wild-type): Récepteur des androgènes sauvage

RE : Réticulum Endoplasmique

RN : récepteurs nucléaires

ROR: Retinoid related Orphan Receptor

RT-PCR : Transcription Reverse, réaction de polymérisation en chaîne

RXRs : Retinoid X Receptor

SBMA: Spinal Bulbar Muscular Atrophy

SC : secretory component humain

SCA-1 : Stem cells antigen 1

SHBG: Sex hormone binding globulin

SIAC : Syndrome d'Insensibilité Complète aux androgènes testostérone

SIAP : Syndrome d'Insensibilité Partielle aux androgènes

SMRT : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors

SMRT: Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors

snARNs : small nuclear RNA (petits ARN nucléaires)

SP : spironolactone

SP1: Specificity Protein 1

SRC: Steroid Receptor Coactivator

SRE: Serum Response Element

SRF: Serum Response Factor

STAT 3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T : testostérone

TA : Transit Amplifying

TAD : Domaine de transactivation

TAF : facteur associé à TBP

TAU: Unité de transactivation

TBP : TATA-Box-Binding Protein

TGF β : Tumor growth factor β

TMPRSS2 : TransMembrane Proteases Serine2

TNF α : Tumour Necrosis Factor alpha

TNM : Tumeur Ganglion Métastase

TRE : 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) Responsive Element

UA : Unités Arbitraires

UICC : Union Internationale contre le Cancer

VDR : Récepteur de la vitamine D

VEGF: Vascular and Endothelial Growth Factor

VIH-1 : virus d'immunodéficience humain de type I

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I. Le cancer de la prostate	2
1.) La prostate	2
2.) Le cancer de la prostate	5
a.) Généralités	5
i. Facteurs ethniques, géographiques, environnementaux	6
ii. Facteurs héréditaires et familiaux	6
iii. Les polymorphismes	7
iv. Facteurs incriminant l'alimentation	8
b.) Description du cancers de la prostate	9
c.) Circonstances de diagnostic et données cliniques	11
d.) Classification des cancers de la prostate	13
i. Dimension de la Tumeur primaire : (T)	14
ii. Atteinte des ganglions régionaux: (N)	14
iii Métastases distantes : (M)	15
e.) Stadification du cancer de la prostate	15
f.) Les traitements du cancer de la prostate	15
i. La surveillance	15
ii. La prostatectomie radicale	16
iii. La radiothérapie	16
iv. Hormonothérapie des cancers de la prostate : avantages, inconvénients et lacunes	18
v. Chimiothérapie des cancers de la prostate	24
vi. Thérapeutiques ciblées	27
g.) Mécanismes de développement du cancer de la prostate androgéno-indépendante	28
II. Les récepteurs nucléaires	30
1) Mise en évidence des récepteurs nucléaires et classification	30
2) Structure des récepteurs nucléaires	32
3) Activités transcriptionnelles des récepteurs nucléaires	33
III. Le récepteur des androgènes	37
1) Structure du récepteur des androgènes	37
a.) La région N-terminale et ses propriétés	38
b.) Le domaine de liaison à l'ADN	40
c.) La région Charnière	46
d.) La région carboxy-terminale	46

2) Mode d'action génomique du récepteur des androgènes	49
3) Les modifications post-traductionnelles du récepteur des androgènes	51
a.) La phosphorylation	51
b.) L'acétylation	52
c.) La sumoylation	53
4) La formation du complexe transcriptionnel autour du récepteur des androgènes	53
a.) L'ARN polymérase II	53
b.) Les facteurs généraux de transcription	54
c.) Le complexe de pré-initiation	54
5) Interaction avec les co-facteurs	55
a.) Les principaux co-activateurs du récepteur des androgènes	56
b.) Les principaux co-répresseurs du récepteur des androgènes	57
6) Quelques exemples de gènes cibles du récepteur des androgènes	58
a.) Le gène PSA	60
b.) Le gène TMPRSS2	61
7) Actions non génomiques du récepteur des androgènes	63
a.) Activités non génomiques directes	63
b.) Autres activités non génomiques	65
i. Voie de signalisation du facteur AP-1	65
ii. La voie de signalisation du facteur NF- κ B	67
8) Les mutations touchant le récepteur des androgènes	69
a.) Les mutations affectant le domaine de liaison au ligand du récepteur des androgènes	70
b.) Les mutations affectant le domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes	71
9) Le mécanisme d'épissage	73
10) Les mutations au niveau du DBD du récepteur des androgènes et le Syndrome d'Insensibilité aux Androgènes (SIA)	74

MATERIEL ET METHODES

I. Détection des mutations par le test fonctionnel chez la levure	77
1) Introduction	77
2) Principe du test fonctionnel chez la levure	77
3) Réalisation du test fonctionnel à partir de prélèvements tumoraux	81
II. Protocoles expérimentaux	83
1) Constructions plasmidiques	83
a.) Les constructions des plasmides d'expression	83

TABLE DES MATIERES

i. Les plasmides d'expression pSV-RA sauvage (pSV-AR0), pSV-AR23, pSV-RAT877A, pSV-RA575 et pSV-RA575/877A	83
ii. Les plasmides d'expression pEGFP-RAwt et pEGFP-AR23, pEGFP-RA-T575A	83
b.) Les constructions gène rapporteur luciférase	84
i. Le plasmide PSA61-luc	84
ii. Le plasmide MMTV-LTR-luc	84
iii. Les plasmides luciférase p-TA-AP-1-luc, p-TA-NF- κ B-luc, p-TA-SRE-luc et pTA-luc	84
iv. Le plasmide pDsRed2-ER	84
2.) Culture cellulaire	85
a.) La lignée LNCaP	85
b.) La lignée COS-1	85
c.) La lignée PC-3	85
3) Le retardement sur gel (gel shift)	86
a.) Culture cellulaire et extraction protéique	86
b.) Retardement sur gel	87
4) L'immunoprécipitation de la chromatine (ChiP)	88
5) Activités transcriptionnelles à l'aide d'un gène rapporteur	90
a.) Activation de promoteurs androgéno-dépendants	90
b.) Etude des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire	90
6) Etude de la colocalisation intracellulaire réalisée par microscopie confocale à balayage laser	91
a.) Principe	91
b.) Les fluorochromes utilisés	92
c.) Immunofluorescence par microscopie confocale à balayage laser	93
i. Gamme de plasmide EGFP	93
ii. Cinétique de localisation cellulaire de l'AR23:	94
iii. Distribution intracellulaire du récepteur des androgènes sauvage et des récepteurs des androgènes mutés AR23 et T575A	94
iv. Expériences de colocalisation intracellulaire avec les co-facteurs	94
v. Expériences de colocalisation avec la protéine DsRed2 ER	95
7) Western blot	95
a.) Vérification de la présence des récepteurs des androgènes dans les cellules et quantification	95
b.) Etude de la localisation cellulaire de l'AR23 par fractionnement cellulaire et cinétique	96

RESULTATS ET DISCUSSION

OBJECTIFS

CARACTERISATION DES MUTATIONS

PARTIE I : Conséquences de la substitution d'une thréonine par une alanine en position 575 du domaine de liaison à l'ADN sur la reconnaissance de promoteurs et sur les interactions avec les co-facteurs

I. Caractérisation du variant du récepteur des androgènes T575A _____ **103**

1) Impact de la mutation T575A sur les activités transcriptionnelles du récepteur des androgènes _____ **104**

2) Impact de la localisation de la mutation T575A sur la structure du DBD _ **107**

3) Impact de la mutation T575A sur la reconnaissance de l'ADN _____ **111**

 a.) Etude de l'affinité du récepteur des androgènes T575A vis-à-vis des éléments de réponse _____ **111**

 b.) Occupation des promoteurs androgéno-dépendants *in vivo* par le mutant du récepteur des androgènes T575A _____ **115**

4) Recrutement différent de cofacteurs par le RA T575A _____ **119**

 a) Etude de la formation des complexes autour du récepteur des androgènes T575A _____ **120**

 b) Etude de la colocalisation du récepteur des androgènes T575A avec les cofacteurs _____ **121**

II. Conclusions concernant le récepteur des androgènes muté T575A _____ **126**

PARTIE II:

Impact de l'insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes

I. Caractérisation du variant du récepteur des androgènes : AR23 _____ **130**

1) Les résultats du test fonctionnel chez la levure _____ **130**

2) Détermination de l'origine de la séquence insérée _____ **134**

 a.) Criblage des banques de données _____ **134**

 b.) Vérification de l'expression cellulaire de l'AR23 _____ **138**

3) Etude de la localisation cellulaire de l'AR23 _____ **139**

 a) Etude de la localisation cellulaire de l'AR23 par immunofluorescence et microscopie confocale _____ **139**

 b) Cinétique de localisation cellulaire de l'AR23 après stimulation hormonale _ **141**

c) Analyse <i>in silico</i> de la séquence des 23 acides aminés _____	144
4) Etude de la localisation de l'AR23 au niveau du réticulum endoplasmique	145
5) Premières conclusions et hypothèses de travail _____	147
6) Etudes des activités transcriptionnelles du variant AR23 _____	149
a) Etude des activités transcriptionnelles de l'AR23 dans les cellules COS-1 __	149
b) Etudes des activités transcriptionnelles de l'AR23 dans les cellules LNCaP _	153
7) Conclusions et hypothèses concernant les activités transcriptionnelles de l'AR23 _____	154
8) Impact de l'AR23 sur les activités transcriptionnelles de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire _____	155
a) Activités transcriptionnelles de l'AR23 à partir d'un promoteur minimum __	157
b) Etude des activités transcriptionnelles du facteur SRF _____	158
c.) Etude des activités transcriptionnelles du facteur NF-κB _____	160
d.) Etude des activités transcriptionnelles du facteur AP-1 _____	164
e.) Recherche d'une éventuelle colocalisation entre Jun et l'AR23 _____	166
f.) Conclusions concernant les activités cytoplasmiques de l'AR23 dans les cellules LNCaP et COS-1 _____	170
9.) Etude des activités transcriptionnelles de l'AR23 dans les cellules PC-3 __	171
II. Conclusions générales sur les activités du variant AR23 _____	173
1.) Résumé des résultats obtenus _____	173
2.) Modèle d'action du variant AR23 dans les cellules cancéreuses prostatiques. _____	175

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

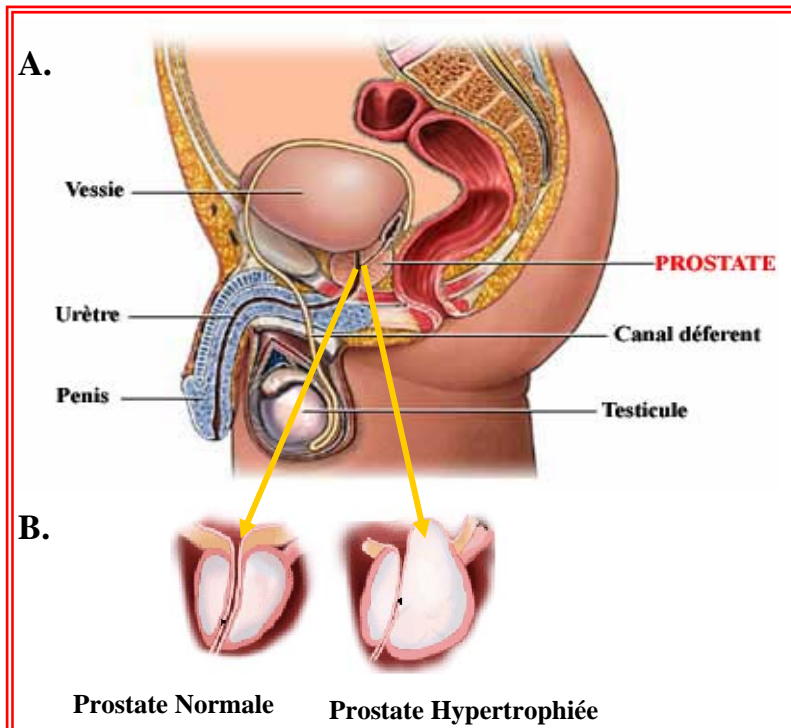
INTRODUCTION

I. Le cancer de la prostate

1.) La prostate

La prostate est un organe sexuel secondaire masculin. A l'âge adulte, c'est une petite glande, approximativement de la taille d'une noix, de 15 à 25 g. Très petite à la naissance, c'est lors de la puberté qu'elle prend du volume, elle va subir une seconde période de croissance après l'âge de 60 ans. Elle est située devant le rectum, entoure l'urètre juste au-dessous de la vessie. C'est à l'intérieur de la prostate que se fait la jonction entre l'urètre venant de la vessie, les canaux déférents et les vésicules séminales. La prostate intervient dans la fabrication de 10 à 30 % du fluide séminal et participe également à l'expulsion du sperme pendant l'éjaculation (Figure 1).

Figure 1: Représentation de l'appareil génital masculin



Légende Figure 1 : A. Appareil génital masculin: Les organes primaires, testicules et pénis, et secondaire, prostate, sont représentés. B. Schématisation d'une prostate normale et d'une prostate hypertrophiée.

La glande prostatique est composée d'un épithélium monostratifié et d'un stroma fibromusculaire. C'est à partir de l'épithélium prostatique que se développe l'adénocarcinome prostatique.

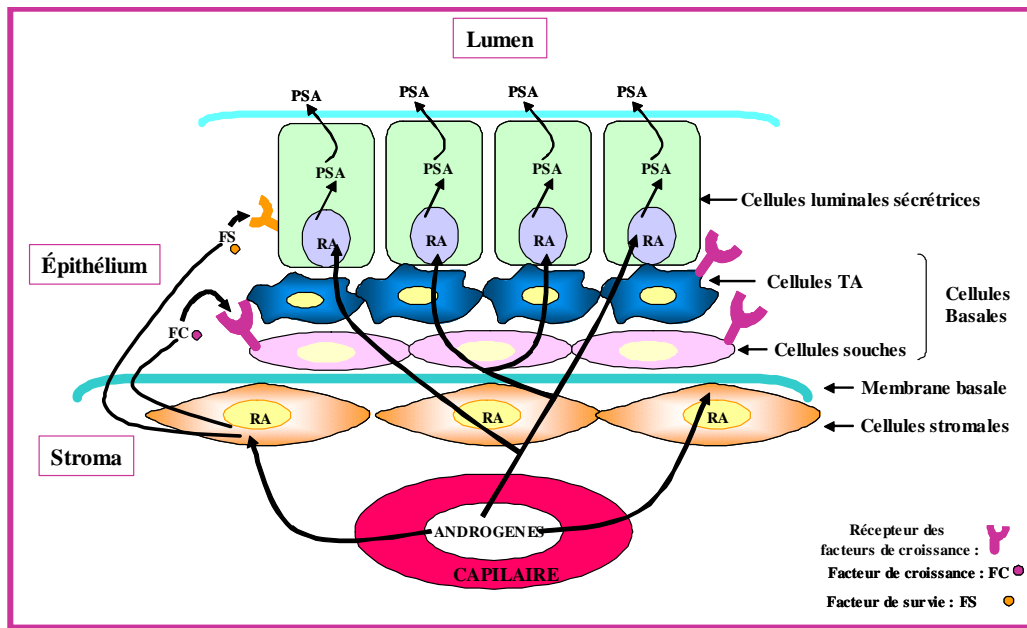
L'épithélium prostatique est composé de trois types cellulaires interconnectés; les cellules souches, les cellules du compartiment d'amplification et de transition, faisant parti de la couche basale, puis de cellules sécrétrices différenciées appartenant à la couche luminale. Un quatrième type de cellules constitué par les cellules neuroendocrines est également retrouvé, dispersé dans tout l'épithélium prostatique.

Les cellules luminales ne prolifèrent pas, elles expriment le récepteur des androgènes (RA) et sont responsables de la sécrétion du fluide séminal et de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Les cellules souches n'expriment pas de RA, mais elles expriment des récepteurs aux facteurs de croissance. Elles constituent les précurseurs des cellules prolifératives. La population de cellules du compartiment de transition et d'amplification constitue un intermédiaire entre les cellules souches indifférenciées et les cellules neuroendocrines et luminales sécrétrices hautement différenciées (Lam JS et Reiter RE, 2006).

Le stroma est formé de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules endothéliales, dendritiques, nerveuses et de quelques cellules infiltrées de type lymphocytaire. Certaines cellules stromales sont également androgéno-dépendantes et produisent des facteurs de croissance et de survie, agissant de façon paracrine sur les cellules épithéliales prostatiques. Les interactions stroma épithélium sont d'une importance capitale dans la régulation de la croissance et de la réponse hormonale prostatique (Cunha GR, 2004) (Figure 2).

Le maintien de l'homéostasie de l'épithélium prostatique est régulé via une organisation hiérarchique des cellules souches. Au niveau de l'épithélium prostatique les cellules souches sont rares, elles représentent environ 1%, et sont localisées au niveau de la couche basale de l'épithélium (Richardson GD *et al.*, 2004).

Figure 2 : Coopération cellulaire au sein d'un tissu prostatique normal

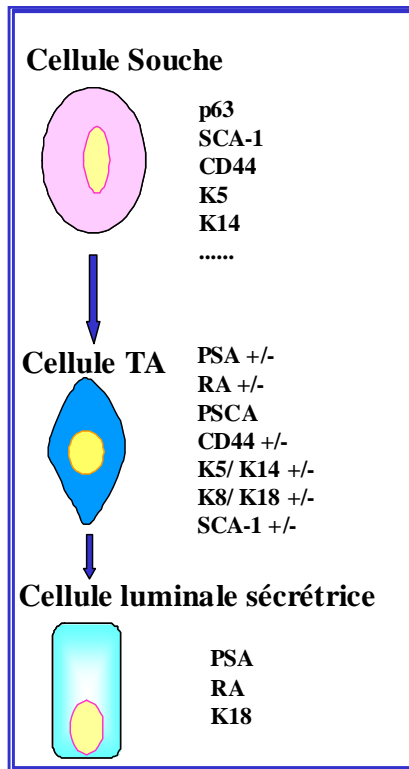


Légende Figure 2 : Schéma représentant la collaboration entre les cellules stromales et les cellules épithéliales au sein d'un tissu prostatique normal. Les androgènes circulants stimulent le RA au niveau des cellules stromales et luminales. Les cellules stromales exercent une action paracrine sur les cellules épithéliales en sécrétant des facteurs de croissance et de survie. Les cellules luminales stimulées sécrètent le PSA de façon androgéno-dépendante.

Au cours de la différenciation de l'épithélium prostatique, les différents types cellulaires sont distinguables par l'expression de marqueurs spécifiques (Schalken JA. et van Leenders G, 2003, Lam JS et Reiter RE, 2006) (Figure 3). La différenciation des cellules de l'épithélium prostatique passe par plusieurs étapes identifiables morphologiquement et phénotypiquement. Le premier stade est appelé compartiment de transition et d'amplification ou TA pour «Transit-Amplifying». Les cellules TA sont des cellules hautement prolifératives localisées au niveau de la couche basale de l'épithélium. Elles expriment très faiblement ou pas du tout le RA et le PSA, cependant elles requièrent des facteurs de croissance paracrines, des « andromedines », pour proliférer (Uzgare AR *et al.*, 2004). Parmi les andromedines identifiées nous pouvons citer, le FGF-7 (Fibroblast Growth Factor 7), le FGF-10 et l'IGF-I (Insuline Growth Factor I) (Yan G *et al.*, 1992, Lu W *et al.*, 1999, Ohlson N *et al.*, 2007). Les andromedines sont fabriquées par les cellules stromales de façon RA dépendante (Gao J *et al.*, 2001). Les cellules TA se différencient ensuite en cellules basales intermédiaires puis en cellules luminales sécrétrices (Garraway LA *et al.*, 2003). A

travers les différentes étapes de maturation les cellules TA acquièrent l'expression de plus en plus forte de RA et du PSA et perdent leur capacité proliférative (Waltregny D *et al.*, 2001).

Figure 3 : Marqueurs de l'épithélium prostatique



Légende Figure 3: La différenciation de l'épithélium prostatique passe par l'expression de marqueurs spécifiques. Ainsi les cellules souches basales expriment entre autres p63, le Stem cells antigen 1 (SCA-1), Cluster of différenciation 44 (CD44) et les kératines 5 et 14 (K5 et K18). Les cellules TA expriment faiblement l'antigène spécifique de la prostate (PSA), le récepteur des androgènes (RA), CD44, les kératines K5, K14, K8 et K18, le SCA-1 et fortement le PSCA (Prostate Stem Cell antigen). Les cellules sécrétrices lumineales expriment fortement le RA le PSA et la kératine 18.

2.) Le cancer de la prostate

a.) Généralités

Le premier cas de cancer de la prostate (CaP) a été diagnostiqué en 1853 par un chirurgien anglais, J. Adams, qui à l'époque l'a qualifié d'extrêmement rare. Cent cinquante ans plus tard, le CaP est devenu un problème majeur de santé publique se plaçant au premier rang des cancers diagnostiqués chez l'homme de plus de 70 ans. En France, chaque année 40 000 nouveaux cas de CaP sont diagnostiqués et ce type de cancer est responsable d'environ 10 000 décès.

Les principaux facteurs de risque de CaP sont l'âge, l'incidence augmentant rapidement à partir de 50 ans, l'origine ethnique, mais également les antécédents familiaux. Par ailleurs, d'autres facteurs comme le régime alimentaire peuvent également être impliqués dans le développement de ce cancer.

i. Facteurs ethniques, géographiques, environnementaux

Les proportions de survenue de CaP varient considérablement à travers le monde. Ce type de cancer est moins répandu en Asie du Sud et en Extrême-Orient et plus commun en Europe et aux Etats-Unis. En Europe, l'incidence du CaP est plus élevée dans le nord (Finlande, Suède), que dans le sud (Espagne, Portugal). En Guadeloupe et en Martinique, le CaP est la pathologie tumorale la plus fréquente et la première cause de mortalité par cancer. La Guadeloupe comme la Martinique présentent une forte incidence de CaP en liaison vraisemblable avec les origines africaines de la population. En 2004, 427 nouveaux cas de CaP ont été diagnostiqués dans le département, représentant une incidence de 169 pour 100 000. Cette forte disparité géographique et ethnique dans l'incidence du CaP suggère la présence de facteurs génétiques, idée renforcée par l'existence de formes familiales ou héréditaires. Néanmoins, des modifications significatives de l'incidence lors des flux migratoires, comme par exemple l'augmentation de l'incidence chez les populations asiatiques récemment émigrées aux USA, suggère également l'influence de facteurs environnementaux (Fournier G *et al.*, 2004).

ii. Facteurs héréditaires et familiaux

Les premières études des formes familiales du CaP ont débuté dans les années 1950, suite au constat d'une fréquence plus élevée du CaP chez les hommes présentant un ou plusieurs antécédents familiaux de ce type de cancer (Morganti G *et al.*, 1956). La prédisposition héréditaire au CaP a été originellement considérée comme transmise par un allèle dominant autosomique rare. Dans ce modèle, elle pourrait concerner un pourcentage élevé des cancers survenant chez l'homme jeune de moins de 55 ans (43%) mais seulement 9 % des cas de CaPs chez les hommes de plus de 85 ans (McLellan DL et Norman RW, 1995).

La définition de la prédisposition héréditaire au CaP a par la suite été affinée. Ainsi, au sein des formes familiales la reconnaissance d'une forme héréditaire est établie sur des critères stricts suivants : au moins trois membres dans la famille apparentés au premier ou au second degré ont développé la maladie, ou au moins deux membres de la famille ont développé la maladie précocement avant l'âge de 55ans. Cependant, la transmission héréditaire peut se faire non seulement sur un mode autosomique dominant (transmission par le père atteint ou la mère porteuse), mais aussi sur un mode lié au sexe (la transmission se fait alors par les mères, atteint les fils, mais ceux-ci ne transmettront pas la prédisposition à leurs propres fils). Il faut donc étendre les critères de reconnaissance des prédispositions héréditaires au CaP d'au moins trois cas (ou deux cas avant 55 ans) chez les apparentés du 2^{ème} degrés sur la branche familiale des mères et des filles des hommes atteints. Cette transmission liée au sexe est probablement sous-estimée car la maladie ignore régulièrement une génération (Fournier G, *et al.*, 2004).

En 1996, une équipe du John-Hopkins Hospital à Baltimore a localisé au niveau de la région 1q24-25 du chromosome 1 un gène de prédisposition au CaP, nommé *Hereditary Prostate Cancer 1 (HPC1)* (Gronberg H *et al.*, 1997). Ensuite, un autre locus de prédisposition au CaP nommé *Predisposing for Cancer of Prostate (PCaP)* a été identifié en 1q42.2-43 (Berthon P *et al.*, 1998). Depuis, plusieurs autres loci de prédisposition aux formes héréditaires du CaP ont été localisés sur les chromosomes: X, 20, 17, et 8 (Xu J 2000, Xu J *et al.*, 1998). Par ailleurs, d'autres loci de prédisposition sont suspectés au niveau des régions chromosomiques 5q31-33, 7q32 et 19q12, et seraient associés à des formes familiales particulièrement agressives du CaP. Ces données confirment l'hétérogénéité des formes de prédisposition héréditaires du CaP et mettent en évidence une double voie de transmission; un mode autosomique dominant, et un mode lié au sexe de part la localisation d'un locus de prédisposition au CaP sur le chromosome X.

iii. Les polymorphismes

Le rôle des androgènes dans le développement de la prostate normale et dans la promotion des CaPs est largement établi depuis les travaux de Charles Huggins dans

les années 1940 (Huggins C et Hodges CV, 1941). Les taux d'androgènes actifs au niveau de la prostate sont déterminés par les taux d'androgènes circulants essentiellement d'origine testiculaire et, à un moindre degré d'origine surrénalienne, mais aussi par la transformation intra-prostatique d'androgènes à partir de précurseurs circulants. La testostérone est métabolisée au niveau de la prostate en dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5- α -réductase de type 2. La DHT va activer le RA dont un des rôles est la régulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ainsi, il est aisé de concevoir qu'un taux d'androgènes circulants plus important ou une 5- α -réductase plus exprimée ou plus active expose à un risque de CaP supérieur à la normale (Shaneyfelt T *et al.*, 2000).

D'autre part, l'activité transcriptionnelle du RA est en partie déterminée par sa région N-terminale riche répétition de glycines (GGC) et de glutamines (CAG). Un petit nombre de répétitions CAG (< 18-23), ou de GGC (<16) est associé à une augmentation du risque de CaP. Il a été montré que la prévalence des allèles courts en CAG et GGC est élevée chez les Afro-américains qui ont par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, un risque plus élevé de développer un CaP, intermédiaire chez les Blancs non hispaniques à risque intermédiaire et basse chez les Asiatiques à très faible risque (Irvine RA *et al.*, 1995, Fournier G, *et al.*, 2004).

iv. Facteurs incriminant l'alimentation

Enfin, le rôle de facteurs alimentaires est également évoqué. Comme décrit plus haut, la fréquence de CaP est beaucoup moins élevée au sein des populations asiatiques que chez les populations occidentales (Theobald S, 2006).

La principale différence alimentaire entre ces populations repose sur la consommation de matières grasses. Chez les Asiatiques l'apport calorique moyen apporté par les graisses est de 20 %, contre 40 % chez les Nord-Américains. En outre, la consommation d'aliments typiquement occidentaux tels que les viandes animales et des fromages riches en acides gras poly-insaturés tels que l'acide α linoléique élèveraient le risque de CaP (Chan JM *et al.*, 2005).

Par ailleurs, suivant des mécanismes divers, l'augmentation de taux d'hormones sexuelles, la réponse immunitaire, la composition des membranes cellulaires en

phospholipides, la formation de radicaux libres, de même que la consommation importante de calcium et des produits laitiers seraient associés à un risque plus élevé de CaP (Fournier G, *et al.*, 2004).

En contrepartie, d'autres éléments ont été promus au rang de « facteurs protecteurs », ainsi le sélénium (Santillo VM et Lowe FC, 2006), les lycopènes (Rao AV, Demark-Wahnefried W, 2006) contenus dans les tomates et le soja, de même que la vitamine D, sont autant d'éléments dont l'apport semble avoir une importance sur la diminution du risque du CaP (Schwartz GG et Skinner HG, 2007).

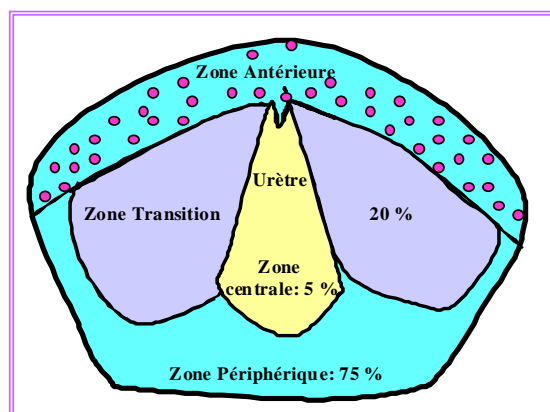
En résumé, l'origine du CaP est multifactorielle, sa survenue peut être favorisée par les origines ethniques, les facteurs environnementaux tels que la position géographique et l'alimentation ou encore peut être liée à une prédisposition héréditaire ou polymorphique.

b.) Description du cancer de la prostate

Le CaP est un cancer d'homme âgé, la forte incidence du CaP histologique découvert après autopsie montre qu'une proportion élevée des hommes développe un CaP qui demeure infraclinique.

Environ 75 % des CaPs se développent dans la zone périphérique de la glande prostatique, n'entraînant des manifestations urologiques que très tardivement, 20 % dans la zone de transition et 5 % dans la zone centrale, conduisant à des complications urinaires imminentes (Figure 4).

Figure 4 : Coupe axiale de la glande prostatique



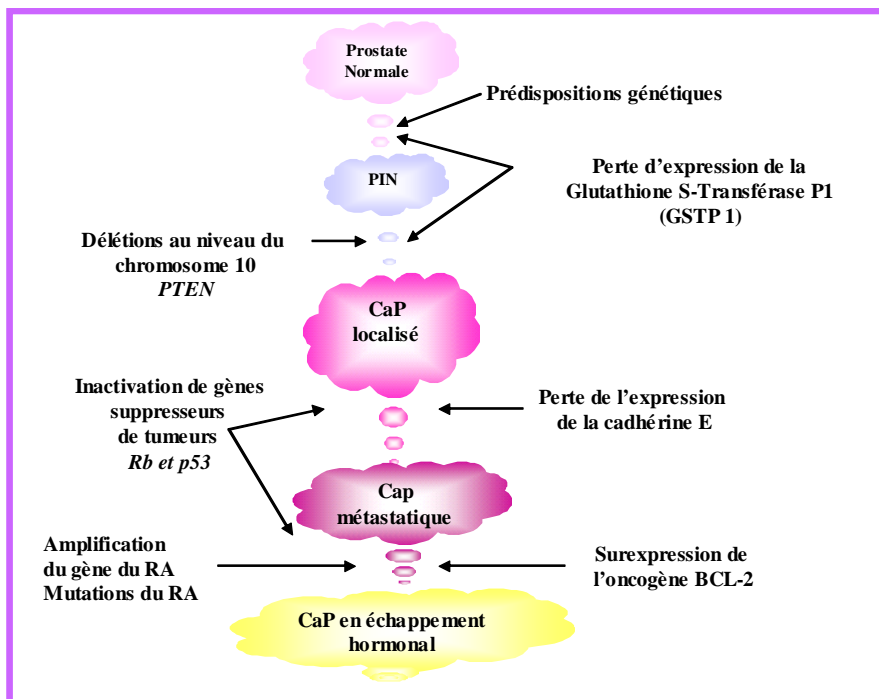
Légende Figure 4 : La glande prostatique peut être subdivisée en quatre zones : périphérique, de transition, centrale et antérieure. 75 % des CaPs se développent dans la zone périphérique.

Le carcinome prostatique se développe à partir de cellules épithéliales prostatiques, son évolution est lente et implique plusieurs étapes (Figure 5).

Le CaP peut évoluer et dépasser la capsule prostatique par envahissement direct des tissus et des organes situés près de la prostate. Il peut également coloniser les organes plus lointains lorsque les cellules cancéreuses ont acquis l'habilité à pénétrer les vaisseaux lymphatiques et sanguins.

La dissémination par voie sanguine donne des métastases à distance, principalement au niveau des os (rachis, côtes, bassin et sternum) et beaucoup plus rarement d'autres organes tels que les poumons, le foie, la peau ou le cerveau. La dissémination par voie lymphatique engendre des métastases ganglionnaires, généralement pelviennes et plus rarement lombo- aortiques.

Figure 5 : Représentation schématique des événements clés de la carcinogenèse prostatique



Légende Figure 5 : La carcinogenèse prostatique consiste en une succession d'étapes pouvant être reliées à des événements moléculaires. Des facteurs «génétiques» peuvent être à l'origine de la survenue d'une néoplasie intra-épithéliale (PIN), dont la forme de haut grade peut être associée au CaP. Les PIN peuvent évoluer en CaP dit «Histologique» souvent asymptomatique et découvert fortuitement lors d'une autopsie post mortem. Le CaP histologique après plusieurs altérations moléculaires telles que les pertes chromosomiques ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs peut évoluer en CaP localisé puis en CaP métastatique. La dernière étape de la carcinogenèse prostatique est formée par le CaP en échappement hormonal pour lequel aucun traitement efficace n'a été mis au point.

c.) Circonstances de diagnostic et données cliniques

Le CaP est diagnostiqué lors d'un dépistage individuel consistant en un dosage du PSA ou en un toucher rectal, lors de l'apparition de symptômes urinaires ou par découverte fortuite durant une chirurgie pratiquée pour une hypertrophie bénigne de la prostate ou enfin lors de l'apparition de douleurs osseuses.

L'anormalité de l'un ou de ces deux éléments clés conduit à la réalisation de biopsies prostatiques. Seule la positivité de ces biopsies autorise à planifier et à débiter le traitement spécifique du CaP.

Lors du toucher rectal, le signe le plus spécifique est une induration de la glande prostatique. Cette induration peut être nodulaire, elle peut également intéresser tout un lobe prostatique et voire même l'ensemble de la glande. Une consistance hétérogène ou une asymétrie de la prostate sont des signes beaucoup moins spécifiques, qui peuvent aussi bien traduire un simple adénome, notamment lorsque la prostate est de grande taille.

Depuis la découverte par Albin RJ en 1970 (Albin RJ *et al.*, 1970) d'une petite glycoprotéine de 33 kDa, le PSA, dont la sécrétion par l'épithélium prostatique augmente dans le cas du CaP, le dosage routinier de PSA est devenu le moyen majeur du diagnostic. En effet, le PSA est une sérine protéase normalement sécrétée par les cellules prostatiques. Cependant, on considère qu'une cellule cancéreuse en sécrète 10 fois plus qu'une cellule normale. Cette propriété a suscité de nombreux espoirs en terme de dépistage. Néanmoins, le taux sanguin de PSA peut toutefois être augmenté par d'autres facteurs comme l'âge, l'extension d'un adénome, les infections ou les contraintes mécaniques constituées par le toucher rectal.

Parallèlement, le taux plasmatique de PSA peut également être diminué par certains traitements de l'hypertrophie prostatique bénigne. Il est ainsi difficile de définir un seuil de confiance. Il est admis qu'un taux de PSA est normal lorsqu'il est inférieur à 4ng/ml, suspect lorsqu'il est compris entre 4 et 10ng/ml et nettement significatif au-delà des 10ng/ml. Les taux très élevés de PSA témoignent le plus souvent de formes évoluées de CaP (Bradford TJ *et al.*, 2006).

De ce fait, d'autres paramètres sont pris en compte, pour parfaire la corrélation entre les taux de PSA modérément élevés et le diagnostic de CaP.

Le PSA existe dans le sang sous deux formes, libre et complexée à l'alpha-1 chymotrypsine (ACT), la mesure du ratio PSA libre (PSAL) sur le PSA total (PSAT) est une indication diagnostique supplémentaire. Ce ratio est déterminé quand le taux de PSA se situe entre 4 et 20ng/ml. Ainsi, un rapport PSAL/PSAT élevé va en faveur d'une hypertrophie bénigne de la prostate alors que des rapports inférieurs à 15 % pressentent un CaP (Ali K *et al.*, 2007).

De même, le temps de doublement du PSA ainsi que la vélocité du PSA mesurant l'évolution du PSA au cours du temps ont une valeur de présomption diagnostique. Ainsi, un temps de doublement faible et une vélocité élevée constituent des éléments défavorables.

Le PSA est actuellement le seul biomarqueur du CaP reconnu par la FDA (Food and Drug Administration) pour le dépistage du CaP. De plus, le taux de PSA est un indicateur essentiel pour le suivi et le traitement des cancers déclarés. Il existe cependant d'autres candidats potentiels au statut de biomarqueurs de CaP, dont les plus étudiés sont listés dans le tableau ci-après (Tableau 1, d'après Bradford TJ *et al.*, 2006).

Le diagnostic du CaP établi, le bilan d'extension est pratiqué de manière à apprécier l'extension locale de la tumeur. Ce bilan consiste à réaliser un toucher rectal, une échographie et une biopsie de la prostate.

L'atteinte ganglionnaire est évaluée à l'aide d'un scanner ou de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). L'IRM permet aussi de renseigner sur l'état de la capsule prostatique Une scintigraphie osseuse peut également être pratiquée pour évaluer l'existence de métastases.

Tableau 1 : Les biomarqueurs candidats pour la détection de cancers de la prostate

Marqueur	Description	Fonction	Méthode de détection
Prostate Specific Membrane Antigen (PMSA)	Glycoprotéine membranaire 100 kDa surexprimée par les cellules du CaP	Peptidase de surface cellulaire, transduction du signal, migration cellulaire, récepteur potentiel	Mesurée dans le sérum, dans le fluide séminal, dans l'urine par PCR et spectrométrie de masse, ou in vivo par immunoscintigraphie
Prostate Stem Cell Antigen (PSCA)	Glycoprotéine de 123 acides aminés exprimée à la surface des cellules basales prostatiques	Inconnue, rôle possible dans la progression clinique du CaP	Détectée dans les tissus par immunohistochimie et dans le sang par RT-PCR
Early Prostate Cancer Antigen (EPCA)	Protéine de structure nucléaire associée au CaP	Inconnue, probable implication dans la carcinogenèse prostatique	Détectée dans les tissus par immunohistochimie et dans le sérum par test ELISA
Chromogranin A	Peptide pro-hormone relargué par les cellules neuroendocrines	Inconnue, possibles fonctions autocrines et paracrines	Détecté dans le sérum par test ELISA ou par des méthodes immunoradiométriques
α-méthyl-CoA racemase (AMACR)	Enzyme peroxisomale et mitochondriale d'environ 44 k Da surexprimée dans les CaP	Synthèse de l'acide biliaire et l'oxydation des chaînes ramifiées des acides gras	Détectée dans les tissus par immunohistochimie, RT-PCR, dans l'urine par western-blot
Fusions de gènes	Fusion de la partie 5' terminale du gène régulé par les androgènes <i>TMPRSS2</i> aux facteurs transcriptionnels ERG et ETV1	Inconnue, régulation probable des gènes ERG et ETV1 de façon androgéno-dépendante	Détection par FISH, RT-PCR

d.) Classification des cancers de la prostate

La classification la plus couramment utilisée, est le système TNM (tumeur, ganglion, métastase). Le système TNM décrit l'extension de la tumeur primitive (stade T), l'absence ou la présence de métastases aux ganglions avoisinants (stade N) et l'absence ou la présence de métastases à distance (stade M). Ce système a été adopté en 1997 par le «American Joint Committee on Cancer» (AJCC) et par l'Union

Internationale contre le Cancer (UICC). Cette classification décrite ci-après est d'une grande importance pour évaluer l'état clinique du patient et décider d'un traitement adapté (Hoedemaeker RF *et al.*, 2000)

i. Dimension de la Tumeur primaire : (T)

- TX: Tumeur primaire ne pouvant pas être évaluée
- T0: Aucune évidence de tumeur primaire
- T1: Tumeur cliniquement indétectable par palpation ou par imagerie
 - T1a: Détection histologique de tumeur dans 5% ou moins de tissus disséqués
 - T1b: Détection histologique de tumeur dans plus de 5% de tissus disséqués
 - T1c: Tumeur détectée par biopsie
- T2: Tumeur confinée à la prostate
 - T2a: La tumeur est étendue à 50 % ou moins du lobe prostatique
 - T2b: La tumeur est étendue à plus de 50 % du lobe prostatique mais pas aux deux lobes
 - T2c: Les deux lobes prostatiques sont touchés par la tumeur
- T3: Tumeur étendue à l'extérieur de la capsule prostatique
 - T3a: Extension extra-capsulaire unilatérale ou bilatérale
 - T3b: Invasion des vésicules séminales
- T4: La tumeur envahit les organes et les structures adjacentes autres que les vésicules séminales (vessie, rectum, muscles pelviens)

ii. Atteinte des ganglions régionaux: (N)

Les ganglions régionaux correspondent essentiellement aux ganglions pelviens situés au-dessous de la bifurcation des artères iliaques.

- N0: Absence de métastases au niveau des ganglions régionaux
- N1: Présence de métastases au niveau des ganglions régionaux
- NX: non renseigné

iii. Métastases distantes : (M)

- M0: Absence de métastases distantes
- M1: Présence de métastases distantes
- MX: Métastases à distance non renseignées

e.) Stadification du cancer de la prostate

La différenciation des tumeurs est déterminée grâce au score de Gleason qui attribue à la tumeur un chiffre allant de 2 à 10, inversement proportionnel à la différenciation et l'agressivité de la tumeur. Ainsi, un score de Gleason proche de la valeur «10» qualifie une tumeur peu différenciée et hautement agressive alors qu'un score de Gleason faible est associé aux tumeurs différenciées faiblement agressives.

f.) Les traitements du cancer de la prostate

Les traitements doivent être discutés au cas par cas suivant l'extension du cancer, l'état général du patient et les maladies associées. On peut traiter le CaP par la chirurgie, la radiothérapie, la thérapie hormonale, la chimiothérapie, ou une combinaison de ces méthodes. Plusieurs types de thérapeutiques ciblées sont également en cours d'études chez ces patients. L'âge, la santé et l'état générale du patient aussi bien que l'état de différenciation de la tumeur et son étendue sont importants pour le choix de la thérapeutique. Par ailleurs, le bien-être du patient doit également être pris en compte. En effet, décider de la manière dont on traitera un cancer, repose sur un arbitrage entre les effets favorables et nuisibles de la thérapeutique adoptée sur la survie du patient et sur sa qualité de vie.

i. La surveillance

La surveillance est généralement préconisée chez les patients d'âge moyen de 70 ans, ayant une tumeur bien ou moyennement différenciée et asymptomatique (T1-T2, N0, M0), et dont l'espérance de vie est inférieure à 10 ans. Ce n'est que lors de la survenue des symptômes qu'un traitement hormonal est proposé. La surveillance

évite aux patients les désagréments du traitement sans grands bénéfices et permet de préserver une qualité de vie. Cette option est choisie suite à un accord préalable avec le patient.

ii. La prostatectomie radicale

Elle consiste en l'ablation de toute la tumeur en enlevant la prostate et les vésicules séminales. Cette opération est précédée d'un prélèvement et d'une analyse extemporanée des ganglions ilio-obturbateurs. La chirurgie est réservée aux cancers localisés (T1-T2, N0, M0) à la prostate et offre de grandes chances de guérison si le cancer est effectivement localisé au niveau de la glande prostatique et peu ou moyennement agressif. Elle n'est pas pratiquée s'il y a atteinte ganglionnaire (N+). Malheureusement, suite à l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire, environ 30% des CaP initialement évalués au stade T2 sont en réalité au stade T3, et ont déjà dépassé la capsule prostatique. La prostatectomie peut entraîner une incontinence urinaire, le plus souvent temporaire ainsi que des troubles de l'érection.

iii. La radiothérapie

Elle peut être externe ou par implantation de composants radioactifs dans le corps même de la prostate. Le but de la radiothérapie locale est d'éradiquer toute la tumeur par irradiation de toute l'aire prostatique. La radiothérapie externe est proposée en alternative au traitement chirurgical pour les malades de plus de 70 ans atteints d'un CaP (T1-T2, No, Mo) si l'état de santé du patient est altéré, si la chirurgie est contre-indiquée ou encore lorsque le malade préfère cette option. Dans ce cas là, 65 à 70 Gy sont appliqués sur la prostate. La radiothérapie locale peut engendrer une incontinence urinaire ainsi que des diarrhées.

La curiethérapie, est une forme particulière de radiothérapie, consistant en l'implantation dans la prostate de grains d'iode radioactif. Ce type de traitement est réservé aux tumeurs localisées, ne dépassant pas la capsule prostatique.

La radiothérapie est également utilisée pour traiter les CaPs métastatiques. Ainsi, un recours à la radiothérapie externe est envisagé pour l'irradiation palliative de métastases localisées, algiques et résistantes aux traitements médicaux ou menaçants

de complications. Actuellement trois radio-isotopes sont utilisés pour le traitement des douleurs osseuses chez les patients atteints de métastases osseuses diffuses et résistantes aux médicaments: le strontium-89, le samarium-153 et le phosphore 32. Ces trois radio-isotopes ciblent les métastases osseuses en émettant les rayons β , ils se distinguent par leur énergie et leur demi vie ainsi que par leur mode d'action (Sartor O, 2004).

Le phosphore-32 utilise la voie d'absorption du phosphate inorganique dans les os, sa demi-vie est de 14,3 jours. Il émet des particules de haute énergie associées avec une toxicité hématologique importante et n'est plus employé actuellement dans cette indication.

Le strontium-89 est assimilé comme un analogue du calcium, il améliore significativement la qualité de vie de patients, cependant il a une demi-vie de 50,5 jours et présente également une haute toxicité hématologique.

Le samarium-153 est acheminé jusqu'aux os par chélation d'EDTMP (acide éthylènediaminetetra-méthylènéphosphonique) avec une demi-vie seulement de 1,9 jour, il a prouvé son efficacité quant au contrôle de la douleur osseuse chez les patients atteints d'un CaP métastatique, il entraîne moins d'effets secondaires et peut le cas échéant être combiné à la chimiothérapie (Sartor O, 2004).

Pour le traitement d'un CaP localement avancé (T3 ou récurrence locale), il n'existe pas de traitement idéal. La chirurgie est rarement efficace, la radiothérapie peut avoir une efficacité si le CaP est peu évolué. Pour ces cancers une hormonothérapie seule ou en combinaison avec la radiothérapie est proposée.

En revanche, pour les CaPs localement avancés (T4 ou N+) ou d'emblée métastatiques, les traitements locaux ou régionaux à visée curative ne sont pas indiqués et l'hormonothérapie n'a qu'un but palliatif. Dans cette situation, de même que lors des évolutions métastatiques secondaires, la première ligne thérapeutique traditionnelle est le recours à l'hormonothérapie.

iv. Hormonothérapie des cancers de la prostate : avantages, inconvénients et lacunes

En 1941, Huggins et Hodges (Huggins C et Hodges CV, 1941) ont présenté leur travaux qui leur ont valu le prix Nobel vingt ans plus tard, intitulé «The Effect of Estrogen and Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Prostate Cancer» démontrant ainsi l'hormono-dépendance des CaPs et par la même, la possibilité d'utilisation «d'hormones» en guise de traitement (Figure 6).

Figure 6 : Portrait de Charles Brenton Huggins

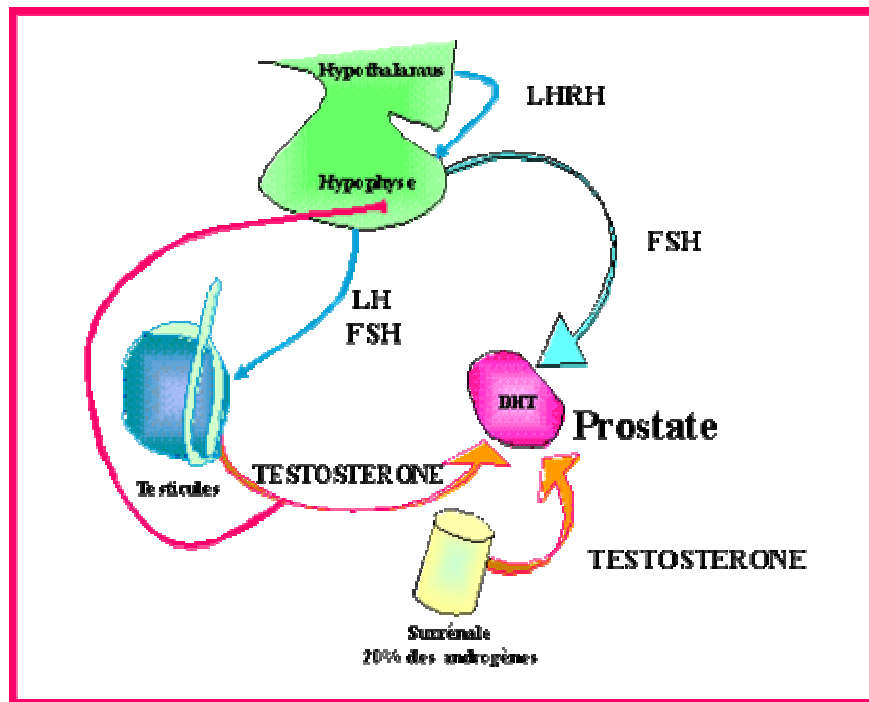


Légende Figure 6 : Dr. Charles Brenton Huggins est né le 22 Septembre 1901 à Halifax et est mort en 1997 à Chicago. Il était physicien, physiologiste et chercheur spécialisé dans le cancer de la prostate et fut récompensé en 1966 par le prix Nobel de Physiologie et de Médecine pour ses travaux sur les hormones. Il a été le premier à démontrer que les cancers de la prostate pouvaient être traités par hormonothérapie.

Le CaP est donc qualifié de cancer hormono-dépendant ce qui signifie qu'il existe une corrélation entre la multiplication des cellules cancéreuses de la prostate et la présence d'hormones sexuelles mâles telles que la testostérone et la DHT (Figure 7). Un traitement bloquant ou réduisant fortement la production de ces hormones permet de freiner très efficacement l'évolution de la maladie.

Ainsi, les patients atteints d'un CaP localement évolué, présentant des récives locales après prostatectomie ou atteints d'un CaP métastatique, sont traités par hormonothérapie de première ligne ou castration médicale qui vise à abaisser considérablement le taux plasmatique de testostérone et de son dérivé, la DHT.

Figure 7: Contrôle hormonal de la prostate



Légende Figure 7: La croissance des cellules de la prostate est régulée par la testostérone, hormone sécrétée principalement par les testicules. Une partie de la testostérone est également sécrétée par la glande surrénale. La testostérone sécrétée par les testicules exerce un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui en retour par la sécrétion de la LHRH (luteinising hormone releasing hormone ou gonadolibérine) et de la FSH (Follicle-stimulating Hormone) va stimuler la glande prostatique et entraîner une sécrétion de testostérone par les testicules.

La première ligne d'hormonothérapie consiste à réaliser une privation androgénique. Les testicules représentant la principale source d'androgènes la castration chirurgicale ou orchidectomie a longtemps été utilisée. Cette castration physique est encore pratiquée dans les pays anglo-saxons, plus rarement en France et alors sous forme de pulpéctomie.

De nos jours la castration chimique est couramment utilisée en première ligne d'hormonothérapie. Ainsi, la suppression de la sécrétion d'androgènes par les testicules peut être obtenue par l'inhibition de la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires, LH et FSH, (Luteinising Hormone Releasing Hormone et Follicle-Stimulating Hormone). Cette castration chimique pouvait être obtenue par l'administration de fortes doses d'œstrogènes comme le DES (diéthylstilbestrol).

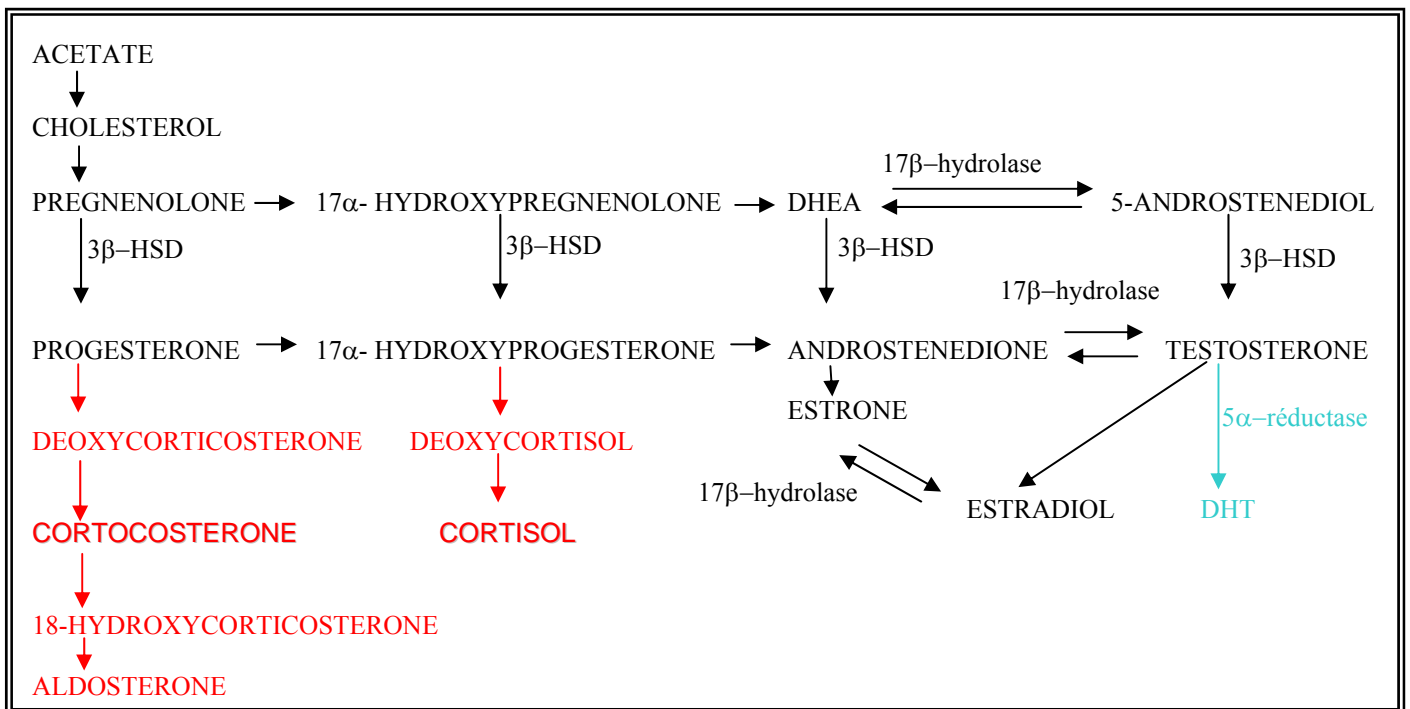
L'administration d'œstrogènes permet d'exercer un rétrocontrôle négatif au niveau des récepteurs hypophysaires pour les hormones sexuelles. Elle n'est plus utilisée actuellement en raison du risque élevé de complications cardiovasculaires.

Une méthode alternative consiste à désensibiliser les récepteurs hypophysaires de la LHRH au moyen d'agonistes de la LHRH. L'administration d'agonistes de la LHRH, remplace la castration physique. Après une augmentation transitoire de la valeur des taux de testostérone, qualifiée de « Flare up », la désensibilisation des récepteurs et l'effondrement des taux des gonadotrophines hypophysaires permettent d'abaisser considérablement les niveaux de testostérone circulante. Pour éviter l'effet « Flare up », un anti-androgène est couramment administré pendant les 15 premiers jours de traitement.

Malgré, l'effondrement des taux sériques de la testostérone suite à l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire, le taux de testostérone et de son homologue actif, la DHT peut se maintenir à des niveaux assez élevés au niveau du tissu prostatique cancéreux atteignant 40% du niveau normal avant la castration. En effet, la surrénale est responsable de la production d'environ 20% de testostérone chez l'homme.

Les précurseurs stéroïdiens tels que l'androstènediol, l'androstènedione et la dehydroepiandrosterone (DHEA) dont les taux sériques ne sont réduits que de 50-70% après castration sont convertis en testostérone et en DHT dans les tissus périphériques et en particulier dans la prostate, en fonction de leur teneur respective en 17 β -hydrolase, en 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β HSD) (Figure 8). L'administration d'anti-androgènes a pour but d'inhiber l'action des androgènes produits dans les tissus périphériques à partir de précurseurs surrénaliens.

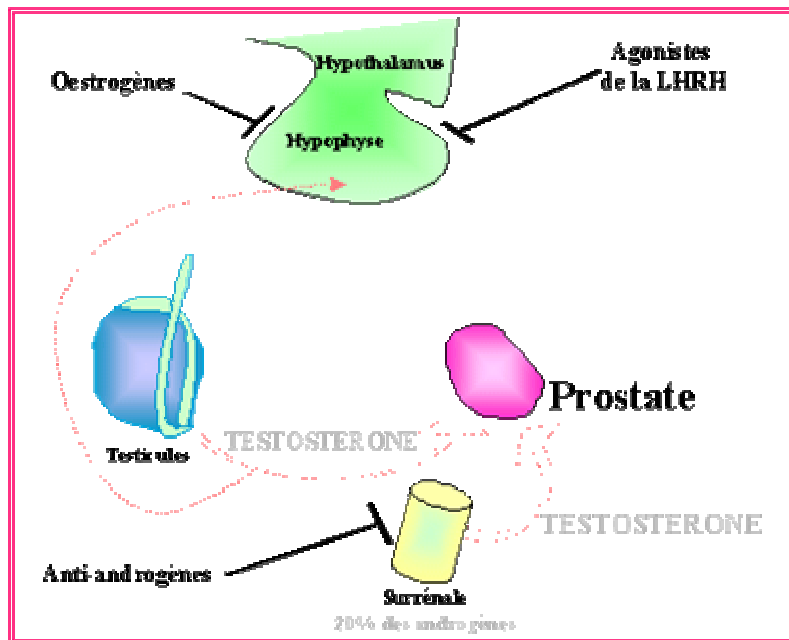
Figure 8 : Biosynthèse des hormones stéroïdes au niveau des gonades et de la glande surrénale



Légende Figure 8 : La synthèse des hormones stéroïdiennes au niveau des gonades (noir) et de la glande surrénale (rouge et noir) ainsi que les enzymes (bleu) intervenant dans la conversion des précurseurs en hormones stéroïdiennes sont représentés. En «vert» sont visualisées les étapes de conversion se déroulant dans les organes périphériques. La première étape limitante lors de la synthèse des hormones stéroïdiennes est la conversion au niveau des mitochondries du cholestérol, dont la quantité au sein des cellules est limitée et finement régulée, en pregnénolone. La pregnénolone est convertie en progestérone par la 3β-HSD. La 3β-HSD est une enzyme localisée au niveau des membranes des organelles telles que la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Elle intervient de nombreuses fois au cours de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes. La synthèse de la testostérone fait intervenir la 17β-hydrolase. Cette enzyme soluble permet de convertir la DHEA en androstènedione ou en 5-androstenediol, ces derniers pouvant être transformés en testostérone. La dernière enzyme importante est la 5α-réductase, elle assure la conversion de la testostérone en son homologue actif la DHT.

Ainsi, les agonistes de la LHRH, peuvent être associés à des anti-androgènes, de nature stéroïdienne, comme le progestatif l'acétate de cyprotérone ou non stéroïdienne, tels que le flutamide ou le bicalutamide. Le traitement par la castration physique ou chimique associé à des anti-androgènes constitue « le blocage androgénique complet » (Figure 9).

Figure 9 : « Blocage androgénique complet »



Légende Figure 9: Le blocage androgénique complet consiste à combiner la castration chimique constituée par l'inhibition de la voie hypothalamo-hypophysaire (administration d'agonistes ou d'antagonistes de la LHRH) à l'administration d'anti-androgènes visant neutraliser les effets des précurseurs stéroïdiens sécrétés par la glande surrénale.

Plus de 90% des patients traités répondent à la privation androgénique. Malheureusement, cette réponse est transitoire, sa durée varie de quelques mois à quelques années, la médiane étant de 12 à 18 mois, puis une rechute est observée dans 100 % des cas. Après échappement à cette première ligne d'hormonothérapie, les réponses aux manipulations hormonales alternatives sont rares, la tumeur étant en échappement hormonal.

Après échappement à la première ligne thérapeutique, des hormonothérapies de seconde et de troisième ligne peuvent être envisagées. La castration par les agonistes de la LHRH est poursuivie en étant associée à un autre agent. Le kétoconazole et l'aminogluthétimide peuvent être utilisés pour inhiber les enzymes dépendantes du cytochrome P450 et la synthèse des stéroïdes surrénaliens et testiculaires tels que la DHEA ou d'adrostènedione, mais ces traitements sont mal tolérés et la réponse est de courte durée.

Les glucocorticoïdes tels que la prednisone et l'hydrocortisone conduisent à une réponse chez 15 à 30% des patients en échappement hormonal. En effet, leur efficacité passe probablement par une diminution de la sécrétion de l'ACTH et une baisse de taux des précurseurs surrénaliens tels que l'adrostènedione et la DHEA. Par ailleurs il a également été décrit que les cellules prostatiques en échappement hormonal

expriment le récepteur des glucocorticoïdes (Dondi D, 2001) et que ce dernier en présence de son ligand exerce un effet négatif sur la prolifération cellulaire par le biais de l'induction d'une diminution de l'expression du RA, de l'IGF-1 (Insuline Growth Factor 1) et d'une augmentation de l'expression du TGF β (Tumor growth factor β) (Koutsilieris M, 1997).

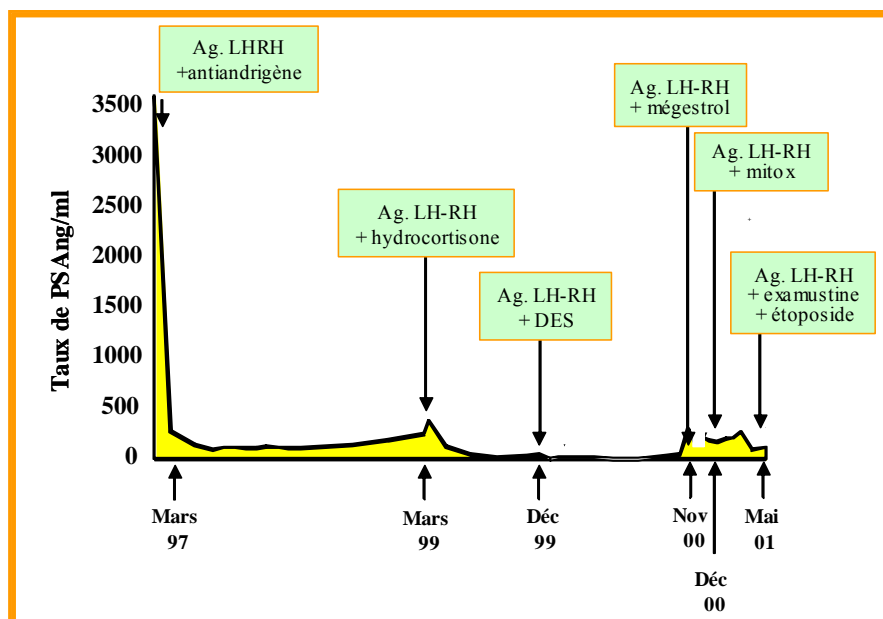
Les oestrogènes forts tels que le DES, chez les patients atteints d'un CaP androgéno-indépendant, peuvent agir à différents niveaux. Tout d'abord, ils peuvent directement inhiber la stéroïdogénèse au niveau des cellules de Leydig, inhiber la 5 α -réductase ou diminuer le taux des androgènes libres circulants en augmentant l'expression de la SHBG (Sex hormone binding globulin). Par ailleurs, il a également été montré que les oestrogènes exercent au niveau du RA un effet agoniste à faible dose et un effet antagoniste lorsqu'ils sont administrés à des doses plus importantes (Turner KJ *et al.*, 2001).

Les progestatifs de la même manière que les oestrogènes à fortes doses exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie hypothalamo-hypophysaire. Le progestatif, l'acétate de cyprotérone exerce de plus des effets antagonistes forts au niveau du RA (Bonkhoff H, 2001).

Environ 25% des patients en échappement hormonal répondent positivement aux hormonothérapies de seconde et de troisième ligne, indiquant que l'échappement à la privation androgénique n'est pas synonyme d'hormono-indépendance.

En effet, même après échappement à la première ligne d'hormonothérapie, des réponses transitoires aux hormonothérapies suivantes sont observées (Figure 10).

Figure 10: Illustration de la réponse aux différentes tentatives d'hormonothérapie d'un patient atteint d'un CaP métastatique en échappement hormonal.



Légende figure 10 : Le taux plasmatique de PSA mesuré en ng/ml est représenté mesuré à chaque étape du traitement et traduit son efficacité. Le patient répond pendant 2 ans au blocage androgénique complet. En mars 1999 il échappe à la privation androgénique, il est alors traité par des agonistes de la LHRH et l'hydrocortisone. En décembre 1999 son taux de PSA s'élève à nouveau, le patient est alors traité par des agonistes de la LHRH et par un œstrogène. La réponse à ce traitement dure environ un an. En novembre 2000 son taux de PSA augmente brutalement, le traitement par le progestatif mégestrol n'entraîne pas d'amélioration de l'état du patient. De décembre 2000 à mai 2001 le patient reçoit plusieurs lignes de chimiothérapie.

v. Chimiothérapie des cancers de la prostate

Le bénéfice potentiel de la chimiothérapie par agents cytotoxiques a longtemps été mis en doute dans les CaP en échappement hormonal. Plusieurs raisons expliquent les mauvais résultats de la chimiothérapie dans les CaP jusqu'à ce jour :

- les CaPs sont peu sensibles à la plupart des agents chimiothérapeutiques disponibles
- le terrain de ces patients (âge élevé, co-morbidités fréquentes, difficultés de déplacement liés aux douleurs osseuses, pertes d'autonomie) est souvent la cause de contre-indications, de limitations de dose, ou de mauvaise compliance.
- la menée d'essais cliniques incluant un nombre suffisant de patients évaluables pour la réponse était compliquée par le fait que l'analyse des réponses

objectives est impossible sur les métastases osseuses qui sont le site métastatique de loin le plus fréquent des CaP. Quatre-vingt à 90% des patients atteints de CaP en échappement hormonal n'ont pas de lésion mesurable de façon bidimensionnelle. De ce fait, le nombre de patients éligibles inclus dans les anciennes études était limité et les résultats biaisés car la population de patients analysée, présentant des métastases viscérales, ganglionnaires ou cutanées mesurables, n'était pas représentative de la population globale des patients atteints de CaP métastatique.

Dans une méta-analyse portant sur 26 essais randomisés publiée en 1993, Yagoda et ses collaborateurs (Yagoda A et Petrylak D, 1993) concluaient que le CaP en échappement hormonal ne répondait pas à la plupart des chimiothérapies, que le taux de réponses objectives était le plus souvent inférieur à 10%, et qu'aucun de ces essais ne montrait un bénéfice de survie par rapport à un placebo ou une hormonothérapie de deuxième ligne.

Depuis 1999, un consensus international a permis d'adopter le PSA comme critère de réponse dans les essais cliniques portant sur le CaP et a considérablement facilité l'évaluation de l'efficacité de nouveaux agents (Bubley GJ *et al.*, 1999). Ce consensus s'appuie sur la démonstration qu'une diminution de 50% ou plus du taux de PSA confirmée au moins 2 fois à 4 semaines d'intervalle est corrélée à une amélioration de la survie (Scher HI *et al.*, 1999). Il convient toutefois d'être attentif au fait que ce critère de réponse ne peut pas être utilisé pour tous les agents, certains d'entre eux, comme la suramine par exemple, pouvant inhiber l'expression du PSA en dehors de tout effet anti-tumoral.

Si les taux de réponse observés dans les nouveaux essais depuis « l'ère du PSA » sont plus élevés, les résultats des différentes chimiothérapies testées restent décevants en terme de bénéfice de survie (Winqvist E *et al.*, 2006). Nous ne résumerons dans la suite que les données concernant les agents les plus couramment utilisés, à savoir l'estramustine, la mitoxantrone et les taxanes.

L'estramustine est un conjugué stable d'estradiol et d'une moutarde azotée. Longtemps considérée à tort comme un agent alkylant ciblé, l'estramustine fait preuve

de propriétés oestrogéniques, anti-androgéniques, et également d'effets cytotoxiques par interférence avec la polymérisation de la tubuline. Bien qu'utilisée depuis 1975, le mécanisme de ses effets anti-cancéreux dans le CaP, potentiellement multifactoriel reste incertain. Utilisant le PSA comme critère d'évaluation, le taux de réponse (PSA<50%) à l'estramustine atteint 25 à 35% en monothérapie. Des taux de réponse plus élevés sont observés en associant l'estramustine avec d'autres agents tels que l'étoposide, les molécules interférant avec le métabolisme des microtubules telles que la vinblastine et la vinorelbine et tout particulièrement les taxanes, paclitaxel et docetaxel (Winqvist E *et al.*, 2006).

Dans une étude multicentrique dont l'objectif principal était la diminution de la douleur, Tannock et ses collaborateurs ont montré que l'association de mitoxantrone et de prednisone donnait un bénéfice significatif en termes de palliation de la douleur, de diminution de consommation d'antalgiques et de qualité de vie par rapport à la prednisone seule (Tannock IF *et al.*, 1996). Il n'y avait pas de bénéfice significatif de survie globale.

Les taxanes, agents cytotoxiques interférant avec la dépolymérisation de la tubuline, ont une efficacité démontrée dans les CaP évolués. Les essais de phase 2 avec le docetaxel ont donné des taux de réponse de l'ordre de 30 à 50% selon les schémas d'administration, avec des durées de réponse malheureusement relativement courtes, de l'ordre de 4 à 6 mois. Deux grands essais multicentriques randomisés, publiés en 2004 et utilisant le docetaxel (associé dans l'un des essais à l'estramustine), ont pour la première fois permis de mettre en évidence un bénéfice de survie significatif (de l'ordre de 2 à 3 mois) par rapport aux bras témoins (Tannock IF *et al.*, 2004, Petrylak DP *et al.*, 2004).

Les bons résultats observés dans ces études ont encouragé l'initiation d'essais de chimiothérapies néo-adjuvantes ou adjuvantes à base de docetaxel chez les patients présentant des CaP localisés à haut risque de rechute après traitement local dont les résultats sont en attente (Eisenberger MA, 2003, Calabro F et Sternberg CN, 2007).

Si le docetaxel permet indiscutablement une amélioration de la survie globale chez ce groupe de patients, il n'en reste pas moins que 50% environ des patients ne répondent pas au traitement, que la durée médiane des rémissions chez les patients

répondeurs est courte, et que l'espérance de vie médiane des patients atteints de CaP en échappement hormonal traités par docetaxel ne dépasse pas 18 mois (Tannock IF *et al.*, 2004, Petrylak DP *et al.*, 2004).

La stratégie thérapeutique après échappement au docetaxel n'est pas codifiée; le recours à la mitoxantrone ne permet que des taux de réponse faibles et des durées de survie sans progression très courtes (Oh WK *et al.*, 2006).

Le pronostic des CaP évolués en échappement hormonal reste donc très mauvais. Outre la quête de nouvelles associations, ou de nouveaux agents chimiothérapeutiques efficaces, les efforts s'orientent également vers la recherches de thérapeutiques alternatives innovantes, en particulier dans le domaine de l'immunothérapie et des thérapeutiques dites ciblées.

vi. Thérapeutiques ciblées

Le traitement des CaPs métastatiques ayant échappé à la privation androgénique peut être également envisagé par l'utilisation de plusieurs classes de nouvelles molécules ciblant les voies de signalisation des facteurs de croissance, les molécules angiogéniques ou encore en faisant recours à l'immunothérapie (Tan WW, 2006, Mendiratta P *et al.*, 2007).

La perte du gène suppresseur de tumeurs PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue deleted on chromosome 10) est couramment trouvée dans les CaPs, conduisant à l'activation de la voie de signalisation PI-3K/Akt (Phosphoinositide-3 Kinase/Protéine Kinase B). L'activation accrue de la voie Akt conduit à la surexpression de la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin), aussi de nombreux inhibiteurs de mTOR tels que le *Temsirolimus* ou l'*Everolimus* ont été développés.

D'autres agents, comme le *Lapatinib*, vont cibler l'activité tyrosine kinase des récepteurs membranaires EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor 1) et Her2/neu-erb2 (Epidermal Growth Factor Receptor 2) responsable entre autres de l'activation du RA.

Une autre cible potentielle est le récepteur de la vitamine D. Ainsi, le calcitrol (1.25-dihydroxyvitamine D3), un analogue de la vitamine D est en cours d'étude de

phase III. Cet agent induit la différenciation cellulaire et diminue la prolifération ainsi que le pouvoir invasif des cellules.

L'angiogénèse, est une étape cruciale au cours de la progression tumorale autorisant l'invasion des tissus à distance. Aussi, le facteur VEGF (Vascular and Endothelial Growth Factor) impliqué dans la synthèse de nouveaux vaisseaux, est fréquemment surexprimé dans les CaPs métastatiques. Le VEGF constitue donc une autre cible thérapeutique intéressante. Un anticorps monoclonal (Bevacizumab) dirigé contre ce facteur a été développé et est en cours d'étude de phase III. D'autres études sont en cours pour déterminer le bénéfice de l'*Imatinib*, un inhibiteur du PDGF (Platelet Derived Growth Factor), dans les CaPs.

Par ailleurs, l'immunothérapie, également en cours d'étude, tente de développer des vaccins stimulant le système immunitaire. Les différentes cibles vaccinales incluent ainsi le PSA, la phosphatase prostatique acide et les antigènes membranaires de surface. Un des vaccins développés, le GM-CSF-GVAX, est composé de deux populations cellulaires prostatiques génétiquement modifiées pour sécréter la cytokine GM-CSF. Cette cytokine régule la différenciation et la prolifération cellulaire, stimule la présentation des antigènes tumoraux et induit les cellules T.

Les thérapeutiques ciblées sont nombreuses, et la quête de nouvelles cibles potentielles continue. La plupart de ces thérapeutiques sont en cours d'essais de phase II ou III en association avec la chimiothérapie.

g.). Mécanismes de développement du cancer de la prostate androgéno-indépendant

Néanmoins, quelque soit la ligne thérapeutique choisie, beaucoup d'hommes ne répondent pas ou échappent à ces thérapies et meurent d'un cancer de la prostate qualifié d'androgéno-indépendant (AIPC: Androgen Independent Prostate Cancer) pour lequel il n'existe pas actuellement de traitement efficace. Ainsi la compréhension des voies menant à l'acquisition de l'hormono-indépendance des CaPs est une étape essentielle pour l'élaboration de nouvelles thérapeutiques.

Cinq voies distinctes ont été impliquées dans la progression du CaP vers l'androgène-indépendance, quatre d'entre-elles engagent le RA. Aussi, le RA apparaît jouer un rôle primordial au cours de la progression vers l'androgène-indépendance des CaPs (Feldman B et Feldman D, 2001) (Tableau 2).

Tableau 2 : Mécanismes de développement du cancer de la prostate androgène-indépendant

Voies	Dépendance du Ligand	Dépendance du RA	Mécanisme impliqué
RA «Hypersensible»	Dépendant des androgènes	Dépendant du RA	- Amplification du RA - Hypersensibilité du RA face pour les androgènes - Taux de DHT plus élevé
RA «Débauché»	Dépendant des pseudo-androgènes, antagonistes des androgènes, corticostéroïdes	Dépendant d'un RA muté	Elargissement du spectre de spécificité vis-à-vis du ligand du RA muté
RA «Hors la loi»	Indépendant des androgènes et de tout ligand	Dépendant du RA	- PTEN muté - HER-2/neu amplifié - PI3K activé - MAPK activée - Co-régulateurs mutés
RA «court-circuité»	Indépendant des androgènes	Indépendant du RA	Activation de voies de survie parallèles : surexpression de BCL, activation d'autres oncogènes, inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs
Les cellules cachées	Indépendant des androgènes	Indépendant du RA	Cellules souches épithéliales malignes

Le RA appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN). Ainsi, la compréhension de son mode de fonctionnement nécessite tout d'abord l'étude de ses origines.

II. Les récepteurs nucléaires

1.) Mise en évidence des récepteurs nucléaires et classification

La famille des récepteurs nucléaires regroupe des facteurs de transcription qui dépendent d'un ligand pour leur activation. Les RNs se fixent sur des séquences d'ADN spécifiques, situées au niveau du promoteur des gènes qu'ils régulent. D'un point de vue physiologique, ces facteurs transcriptionnels sont directement impliqués dans le contrôle de grandes fonctions comme la reproduction, la différenciation cellulaire ou l'homéostasie (Gronemeyer H *et al.*, 2004).

Les études phylogéniques ont démontré que les RNs sont apparus très tôt au cours de l'évolution, au début des métazoaires, bien avant la séparation des vertébrés et des invertébrés (Escrivia H *et al.*, 1997). De nos jours, les membres de la superfamille des RNs, très conservée au cours de l'évolution, sont présents aussi bien chez les insectes que chez les mammifères (Mangesdorf DJ *et al.*, 1995). De plus, l'homologie de séquences des RNs suggère qu'ils dérivent d'un gène ancestral commun (Laudet V, 1997).

La première notion de RN a été introduite dans les années 1960 par Eldwood Jensen et ses collaborateurs qui ont constaté que l'activité cellulaire d'œstradiol était médiée par le biais d'un récepteur spécifique (Jensen E, 1962). Vingt ans plus tard, Ron Evans clona le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg *et al.*, 1985). Parallèlement, Pierre Chambon et Geoffrey Green ont réalisé le clonage de la forme α du récepteur des œstrogènes (ER) et les RNs ont été reconnus comme une superfamille de facteurs transcriptionnels (Green S *et al.*, 1986). Ce moment marqua le début de «l'ère des RNs».

Le séquençage du génome humain a permis d'identifier 48 RNs distincts, chacun caractérisé par un rôle spécifique et non redondant dans la régulation de nombreux processus biologiques (Germain P *et al.*, 2006). Parmi les 48 RNs identifiés, 24 agissent de manière ligand dépendante. Ces RNs dits «classiques» sont des facteurs de transcription activables par des hormones ou par d'autres métabolites cellulaires tels que les acides gras ou le cholestérol. La liaison du ligand induit un changement

INTRODUCTION

conformationnel du RN classique, qui à son tour recrute des co-régulateurs et des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine nécessaires à la régulation transcriptionnelle des gènes cibles. Les 24 autres RNs, sont qualifiés de récepteurs «orphelins », leurs ligands sont inexistantes ou inconnus à ce jour (Germain P *et al.*, 2006). De par leur similarité de séquences, leur phylogénie et sur la base de leur mode de dimérisation, les RNs peuvent être subdivisés en six groupes de taille inégale (Escriva H *et al.*, 2000) (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification des récepteurs nucléaires humains

Groupe	Nom des RNs	Nom complet	Nomenclature	Ligand
1	TR α	Thyroid hormone Receptor α	NR1A1	hormones thyroïdes
1	TR β	Thyroid hormone Receptor β	NR1A2	hormones thyroïdes
1	RAR α	Retinoic Acid Receptor α	NR1B1	acide rétinoïque
1	RAR β	Retinoic Acid Receptor β	NR1B2	acide rétinoïque
1	RAR γ	Retinoic Acid Receptor γ	NR1B3	acide rétinoïque
1	PPAR α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor α	NR1C1	acides gras, leukotrene B4
1	PPAR β	Peroxisome Proliferator Activated Receptor β	NR1C2	acides gras
1	PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ	NR1C3	acides gras, prostaglandines J2, thiazolidinediones
1	Rev-erb α	Rev-erb α	NR1D1	orphelin
1	Rev-erb β	Rev-erb β	NR1D2	orphelin
1	ROR α	Retinoid related orphan receptor α	NR1F1	cholestérol, sulfate de cholestérol
1	ROR β	Retinoid related orphan receptor β	NR1F2	acide rétinoïque
1	ROR γ	Retinoid related orphan receptor γ	NR1F3	orphelin
1	LXR α	Liver X Receptor α	NR1H3	Oxystérols
1	LXR β	Liver X Receptor β	NR1H2	Oxystérols
1	FXR α	Farnesoid X Receptor α	NR1H4	acide biliaire, fexaramine
1	FXR β	Farnesoid X Receptor β	NR1H5	lanosterol
1	VDR	Vitamin D Receptor	NR1I1	vitamine D, 1,25-dihydroxyvitamine D3
1	PXR	Pregnane X Receptor	NR1I2	Xénobiotiques, 16 α -cyanopregnenolone
1	CAR	Constitutive Androstane Receptor	NR1I3	Xénobiotiques, phenobarbital
2	HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor -4 α	NR2A1	orphelin
2	HNF4 γ	Hepatocyte Nuclear Factor -4 γ	NR2A2	orphelin
2	RXR α	Retinoid X Receptor α	NR2B1	acide rétinoïque
2	RXR β	Retinoid X Receptor β	NR2B2	acide rétinoïque
2	RXR γ	Retinoid X Receptor γ	NR2B3	acide rétinoïque
2	TR2	Testicular Receptor 2	NR2C1	orphelin
2	TR4	Testicular Receptor 4	NR2C2	orphelin
2	TLL	Telloid Like	NR2E2	orphelin
2	PNR	Photoreceptor Specific Nuclear Receptor	NR2E3	orphelin
2	COUP-TFI	Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor 1	NR2F1	orphelin
2	COUP-TFII	Chicken Ovalbumine Upstream Promoter Transcription Factor 2	NR2F2	orphelin
2	EAR2	Eosinophil-Associated Ribonuclease 2	NR2F6	orphelin
3	ER α	Estrogen Receptor α	NR3A1	Estradiol-17 β , tamoxifène, raloxifène
3	ER β	Estrogen Receptor β	NR3A2	Estradiol-17 β , composants synthétiques
3	ERR α	Estrogen Related Receptor α	NR3B1	orphelin
3	ERR β	Estrogen Related Receptor β	NR3B2	DES, 4-OH tamoxifène
3	ERR γ	Estrogen Related Receptor γ	NR3B3	DES, 4-OH tamoxifène
3	GR	Glucocorticoid Receptor	NR3C1	Cortisol, dexaméthasone, RU486
3	MR	Mineralocorticoid Receptor	NR3C2	Aldosterone, spiro lactone
3	PR	Progesterone Receptor	NR3C3	Progesterone, médroxyprogesterone acétate, RU486
3	AR	Androgen Receptor	NR3C4	Testostérone, flutamide
4	NGFI-B	Nerve Growth Factor 1B	NR4A1	orphelin
4	NURR1	Nuclear Receptor Related 1	NR4A2	orphelin
4	NOR1	Neuron Derived Orphan Receptor 1	NR4A3	orphelin
5	SF1	Steroidogenic Factor 1	NR5A1	orphelin
5	LRH-1	Liver Receptor Homolog 1	NR5A2	orphelin
6	GCNF	Germ Cell Nuclear Factor	NR6A1	orphelin
0	DAX-1	DSS-AHC critical region on the X gene 1	NR0B1	orphelin
0	SHP	Short heterodimer partner	NR0B2	orphelin

D'après Germain P *et al.*, 2006, "An overview of nomenclature of Nuclear Receptors"

Ainsi, presque tous les RNs non stéroïdiens reconnaissent une séquence consensus commune, 5'-AGGTCA-3'. Le large groupe constitué par les RXRs (Retinoid X Receptor), forme des hétérodimères sur des séquences espacées d'une ou de cinq paires de bases dans une conformation «Head-to-tail» (Rastinejad F *et al.*, 1995). D'autres RNs non- stéroïdiens tels que NGF1-B (Nerve Growth Factor 1) ou ROR (Retinoid related Orphan Receptor), reconnaissent l'ADN sous forme de monomères (Wilson TE *et al.*, 1993, Giguere V *et al.*, 1995).

Le sous groupe de récepteurs stéroïdiens (groupe 3), mis à part l'ER, reconnaît des répétitions palindromiques « 5'-TGTTCTnnnTCTTGT-3' » espacées de trois nucléotides sous forme d'homodimères dans une conformation «head-to-head».

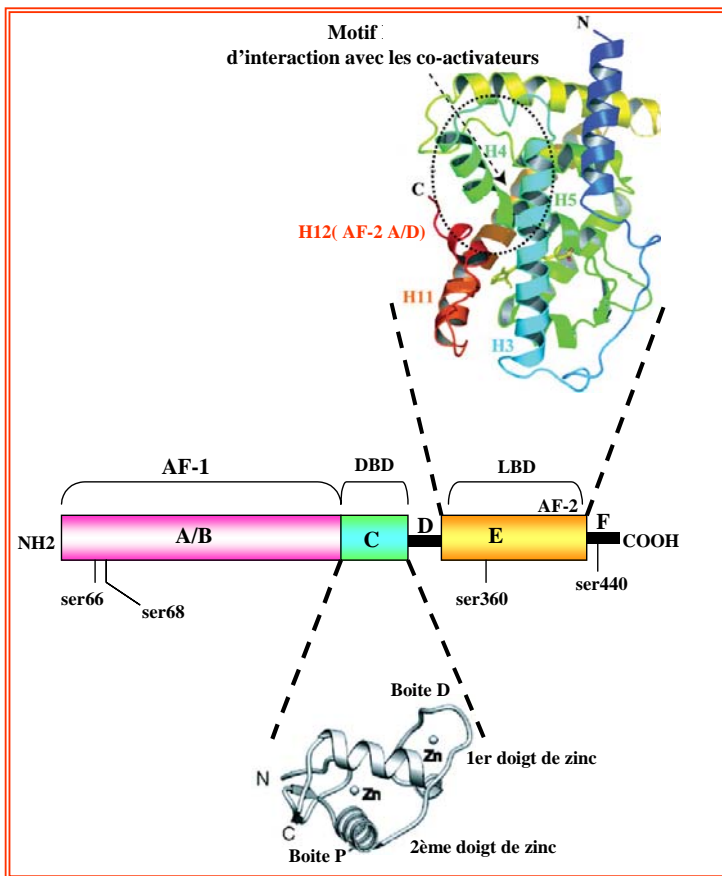
L'ER est le seul au sein de cette famille à reconnaître des répétitions inversées «5'-TGACCTnnnTCCAGT-3'», également espacées de trois nucléotides (Beato M *et al.*, 1995).

Les caractéristiques générales communes des RNs seront commentées ci-après, des précisions supplémentaires seront apportées par la suite pour le récepteur des androgènes.

2.) Structure des récepteurs nucléaires

Tous les RNs se distinguent par une structure commune caractéristique. Ils peuvent être subdivisés en 5 domaines, nommés de A/B à F à partir de la partie N-terminale vers la partie C-terminale. Ces régions ont été définies d'après leur homologie de séquence et leur fonction, et seront commentées en détail ultérieurement dans le chapitre consacré au RA. (Figure 11).

Figure 11 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires



Légende Figure 11 : Les RNs sont constitués de 5 domaines nommés de A/B à F depuis leur partie N-terminale vers la partie C-terminale. Les positions des sérines conservées au sein de la famille des RNs sont indiquées. Les structures du DBD avec les deux doigts de zinc et les boîtes P et D et celle du LBD montrant l'hélice α 12 sont représentées. La région C-terminale F, contiguë à la région E, n'est pas présente chez tous les RNs et sa fonction est à ce jour peu connue. D'après, Germain P et al., 2006

3.) Activités transcriptionnelles des récepteurs nucléaires

Les activités transcriptionnelles des RNs peuvent être génomiques, non génomiques pour certains d'entre eux et dépendantes ou non du ligand.

Les RNs exercent leur activités génomiques en tant que facteurs de transcription reconnaissant des séquences ADN spécifiques au niveau de promoteurs de leurs gènes cibles en activant ou en réprimant leur transcription. Certains RNs tels que l'ER, PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) ou encore RAR (Retinoic Acid Receptor) sont toujours nucléaires même en absence de leur ligand activateur, d'autres comme le RA ou le GR demeurent à l'état inactif dans le cytoplasme et leur translocation nucléaire survient après la liaison du ligand.

L'activité transcriptionnelle des RNs dépend de l'interaction avec des co-facteurs. Ces co-facteurs ne sont pas spécifiques des RNs et peuvent être utilisés alternativement par d'autres facteurs de transcription (Cosma MP *et al.*, 2002).

Au sein de la classe des RN ligand dépendants, la liaison du ligand induit un changement conformationnel permettant le passage d'un état inactif vers un état actif, et de ce fait est primordiale pour l'initiation des activités transcriptionnelles des RNs (Bourguet W *et al.*, 2000). Cette étape essentielle permet le recrutement de co-facteurs et l'activation de la machinerie transcriptionnelle générale constituée par l'ARN Polymérase II (Pol II) et les facteurs généraux de transcription (GTFs) (Roeder RG, 1996).

Les co-activateurs recrutés préférentiellement par les RNs appartiennent à la famille protéique de p160, mais sont constitués également de CBP (cAMP response-binding protein (CREB) binding protein) et de p300 (Vo N et Goodman RH, 2001, McKenna NJ et O'Malley WB, 2002).

Les membres de la famille p160, incluant SRC1, SCR2 et SRC3 (Steroid Receptor Coactivator), grâce au motif «LxxLL» où «L» désigne une leucine et «x» tout autre acide aminé interagissent physiquement avec la poche hydrophobe présente au niveau du domaine de liaison au ligand (LBD) des RNs. Cette interaction est suivie d'un recrutement de facteurs remodelant la chromatine, puis d'une dissociation de p160 et du recrutement concomitant de la Pol II (Chen D *et al.*, 1999).

En revanche, CBP et p300 sont dotés d'une fonction histone acétylase transférase (HAT), leur permettant d'acétyler les résidus lysines au niveau des extrémités N-terminales des queues d'histones, affaiblissant l'interaction de ces dernières avec les nucléosomes, décompactant l'ADN et le rendant ainsi accessible à la machinerie transcriptionnelle (Vo N et Goodman RH, 2001).

Les RNs peuvent également réprimer la transcription en interagissant avec des co-répresseurs de la transcription, tels que NCoR (Nuclear Receptor Corepressor), ou SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors). Ces co-répresseurs ont été initialement identifiés en tant que membres du complexe repressif formé autour des récepteurs TR (Thyroid hormone Receptor) et RAR en absence de leur ligands respectifs (Chen JD et Evans RM, 1995, Horlein AJ *et al.*,

1995, Ordentlich P *et al.*, 1999). L'extrémité C-terminale de NCoR et de SMRT contient une région reconnaissant spécifiquement un sillon hydrophobe à la surface du LBD de TR, de RXR (Retinoic X Receptor) ainsi que le LBD des récepteurs stéroïdes, lorsque ce dernier est dans une conformation antagoniste.

Les co-répresseurs NCoR et SMRT sont dépourvus d'activité enzymatique intrinsèque, cependant ils recrutent des complexes dotés d'une activité histone déacétylase (HDAC). Les complexes HDAC déacétylent les extrémités N-terminales des queues d'histones, conduisant à la condensation de la chromatine et à la répression de la transcription (Sengupta N et Seto E, 2004). Par ailleurs, il a été montré que HDAC3 nécessite l'activation par NCoR ou par SMRT pour exercer sa fonction d'histone deacétylase (Hartman HB *et al.*, 2005).

Généralement, en absence de ligand les RNs montrent une préférence pour les co-répresseurs alors qu'en présence de ligands agonistes, ce sont les co-activateurs qui sont recrutés. Néanmoins, même en présence d'un ligand activateur si les co-répresseurs sont plus abondants, ils peuvent entrer en compétition avec les co-activateurs et empêcher leur recrutement TR (Thyroid Receptor)

L'activation transcriptionnelle des récepteurs orphelins, dépourvus de ligands connus, reste actuellement controversée. L'hétérodimérisation de certains d'entre eux avec des RNs dont le ligand est connu pourrait en partie expliquer leur mode d'action. Ainsi, NURR1 (Nuclear Receptor Related 1) en s'hétérodimérisant avec RXR est capable de reconnaître des séquences spécifiques situées en amont de ses gènes cibles (Perlmann T et Jansson L, 1995). Par ailleurs, certaines petites molécules lipophiles, comme les acides gras ou le cholestérol pourraient servir de ligands à ces RNs orphelins. Ainsi, la liaison irréversible de l'acide palmitique au niveau du LBD de HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4), stabilise l'hélice AF-2 (Activation Function-2) dans une conformation active et rendant ce récepteur constitutivement actif (Dhe-Paganon *et al.*, 2002).

Les RNs peuvent également avoir des activités non génomiques, en dehors du noyau, activant des cascades de signalisation à partir du cytoplasme. Ces activités non génomiques sont extrêmement rapides, elles se déroulent dans les minutes qui suivent l'activation du RN et ne sont pas affectées par les inhibiteurs de la

transcription ou de la synthèse protéique tels que l'actinomycine D ou le cycloheximide. Cependant ces activités restent ligands dépendants, étant donné que l'administration d'un ligand antagoniste permet leur inhibition. De telles activités ont été entre autres décrites pour le RA, l'ER et le PR (Récepteur de la progestérone). Ainsi, le RA active de manière non génomique PI-3K dans les cellules épithéliales androgéno-sensibles (Baron S *et al.*, 2004). Similairement, l'ER α est également capable d'activer les voies PI-3K/Akt (Hisamoto K *et al.*, 2001) et le PR possède un domaine riche en résidus prolines pouvant directement interagir avec le motif SH3 de la famille des tyrosines kinases c-Src et ainsi procéder à leur activation (Boonyaratanakornkit V *et al.*, 2001).

La suite de cette étude sera essentiellement consacrée au récepteur des androgènes ainsi qu'à ses mécanismes d'action dans les CaPs.

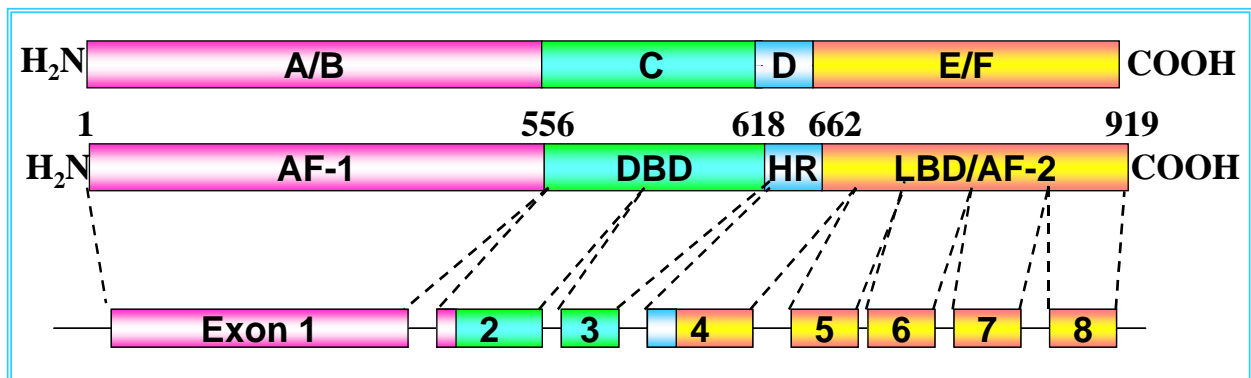
III. Le récepteur des androgènes

Le récepteur des androgènes appartient à la troisième classe des RNs constituant la famille des récepteurs aux hormones stéroïdes (Evans RM, 1988). Le RA joue un rôle primordial au cours du développement et dans le maintien des organes sexuels primaires et secondaires masculins. Le RA intervient dans la régulation de plus d'une centaine de gènes distincts dans la lignée LNCaP (Lymph Node Cancer Prostate) dérivée d'un adénocarcinome prostatique humain. Certains de ces gènes interviennent dans la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi le RA est la cible de nombreuses thérapeutiques anti-cancéreuses (Nelson PS *et al.*, 2002).

1.) Structure du récepteur des androgènes

Le gène codant pour le RA est localisé sur le bras long du chromosome X en position q11.12 et contient 8 exons. Le RA est une protéine de 919 acides aminés et d'un poids moléculaire de 110 kDa.

Figure 12 : Structure du récepteur des androgènes



Légende figure 12 : Le RA comme les autres RN est structuré en 5 domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal composé de régions A et B est codé par l'exon 1 et est faiblement conservé dans la famille des RNs. Il est responsable de l'activation de la transcription ligand indépendante (AF-1). Le domaine central comprend le domaine de liaison à l'ADN (DBD ou région C) hautement conservé, codé par les exons 2 et 3, ainsi que la région charnière (HR ou région D) et un signal de localisation nucléaire (NLS). Le domaine carboxy-terminal (régions E et F), codé par les exons 4 à 8, contient la poche de liaison au ligand (LBD) couplée à une fonction d'activation de la transcription ligand dépendante (AF-2).

a.) La région N-terminale et ses propriétés

La région N-terminale où A/B est très peu conservée au sein de la superfamille des RNs, sa longueur et sa séquence nucléotidique étant variables d'un RN à l'autre. Le domaine A/B contient une fonction d'activation de transcription ligand indépendante nommée AF-1, pour Activation Function 1, pouvant fonctionner de façon autonome quand délaîtée de la partie C-terminale.

Le domaine AF-1 du RA est riche en variations polymorphiques de part la présence de nombreuses répétitions de glutamines (poly-Q), de glycines (poly-G) et de prolines (poly-P). En effet, un nombre plus important de répétitions poly-Q et poly-G altère la fonction et la structure du RA et a pu être corrélé avec plusieurs maladies (McEwan IJ *et al.*, 2001). Ainsi, une extension poly-Q de plus de 40 résidus a été associée à une maladie neurodégénérative, la SBMA (Spinal Bulbar Muscular Atrophy), le RA trop long étant incapable d'exercer correctement sa fonction de facteur de transcription (Choong CS et Wilson EM, 1998). D'autre part, la présence de courtes répétitions poly-Q a pu également être associée avec un risque plus élevé de CaP, alors que l'existence de répétitions plus longues avec l'infertilité (Correa-Cerro L *et al.*, 1999).

La structure tridimensionnelle du domaine AF-1 n'a pas encore été résolue. Cependant des études préliminaires de spectroscopie et de « prédiction de structure » ont révélé que le domaine AF-1 n'a pas de structure secondaire stable en solution. Il serait néanmoins composé à 13 à 16% d'hélices α , à 20 % de feuillets β et entre 24 et 36 % de structures non ordonnées. Le manque de conformation « ordonnée » de cette région serait en rapport avec sa richesse en résidus prolines, sérines et glycines (Lavery DN et MCEwan JI, 2005, Reid J *et al.*, 2002).

Malgré tout, l'analyse de séquences du domaine N-terminal (NTD) du RA chez plusieurs organismes distincts a révélée trois régions conservant une certaine homologie de séquences. Les séquences concernées impliquent les acides aminés de 1 à 30, de 224 à 258, puis des acides aminés de 500 à 541.

Les trente premiers acides aminés, et en particulier le motif « ²³FQNLF²⁷ », jouent un rôle dans l'interaction avec le LBD (He B et Wilson EM, 2002).

Les acides aminés 500 à 541, précèdent le DBD et pourraient avoir une importance dans la reconnaissance des éléments de réponse aux hormones (HRE) (Liu GZ *et al.*, 2003).

Les résidus 224 à 258 sont impliqués dans la fonction de transactivation TAD (TransActivation Domain) du domaine AF-1 du RA et sont caractérisés par la présence d'acides aminés hydrophobes fonctionnellement importants, ils sont hautement conservés au sein de la famille des RNs (Betney R et McEwan IJ, 2003).

Par ailleurs, plusieurs études de mutagenèse dirigée occasionnant des mutations et des délétions ponctuelles dans le NTD ont démontré que le domaine AF-1 renferme plusieurs unités de transactivation ou TAU (Transactivation Unit), ainsi TAU1 s'étend de l'acide aminé 101 à 360 et TAU5 correspond aux acides aminés 360 à 485. Une protéine de synthèse composée d'acides aminés 142 à 485, consistant en l'intégralité de la fonction TAU5 et de presque toute la fonction TAU1 retient 70% des activités du domaine NTD (Jenster G, 1995, Chamberlain NL *et al.*, 1996, Lavery DN et McEwan IJ, 2005).

Une autre séquence d'acides aminés, « ⁴³³WHTLF⁴³⁷ », présente dans cette région est importante pour la régulation des activités transcriptionnelles du RA, elle interagit au niveau de différents sites du LBD et stabilise le complexe formé par le récepteur et son ligand. Ce domaine rentrerait également en compétition avec le LBD pour l'interaction avec des co-facteurs pourvus de domaine « LxxLL » (He B *et al.*, 2000).

De plus, la majorité des sites de modifications post-traductionnelles incluant les phosphorylations et les sumoylations sont localisées au niveau du domaine AF-1, suggérant que ces modifications pourraient directement moduler les capacités de transactivation du RA (McEwan IJ, 2001).

Enfin, le domaine NTD est le siège de nombreuses interactions protéine-protéine entre le RA et les co-facteurs. Ainsi, le RA interagit directement avec le facteur général de transcription TFIIF par le biais de sa région NTD (McEwan IJ et Gustafsson, 1997). De surcroît, d'autres co-facteurs tels que SMAD3 (*Drosophila* mothers against dpp (Mad) et *C. elegans* Sma), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), ART-27 (Androgen Receptor Trapped clone-27), SMRT

(Silencing Mediator for Retinoid and Tyroid Hormone Receptors) et p160 montrent une préférence pour l'interaction avec ce domaine du RA (McEwan IJ, 2004).

b.) Le domaine de liaison à l'ADN

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD ou région C) absent au niveau du récepteur orphelin DAX-1 (DSS-AHC critical region on the X gene 1), et LBD sont les plus conservés au sein de la superfamille de RNs. Ces deux régions sont d'une importance cruciale pour la fonction des RNs, et sont interchangeables. En effet, Green et ses collègues ont démontré en 1988 qu'une protéine chimérique formée du GR et du ER, où le DBD du ER a été substitué par celui du GR, était capable de lier l'œstradiol, cependant reconnaissait les gènes régulés par le GR (Green S et al, 1988).

Le DBD est conservé à plus de 90 % au sein de la famille des RNs. Grâce à cette région les RNs (mis à part DAX1) reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques, nommées « HRE » pour « Hormone Response Elements » (Kumar V *et al.*, 1986).

Le « corps » du DBD des RNs est formé de 66 acides aminées, organisés en deux doigts de zinc, deux hélices α et une extension C-terminale. De plus, la contribution de plusieurs séquences qualifiées des boîtes : P, et D a été montrée au niveau de la reconnaissance spécifique et du contact avec les HREs ainsi qu'avec la dimérisation des RNs, et la reconnaissance de séquences régulatrices (Umesono K et Evans RM, 1989) (Tableau 4).

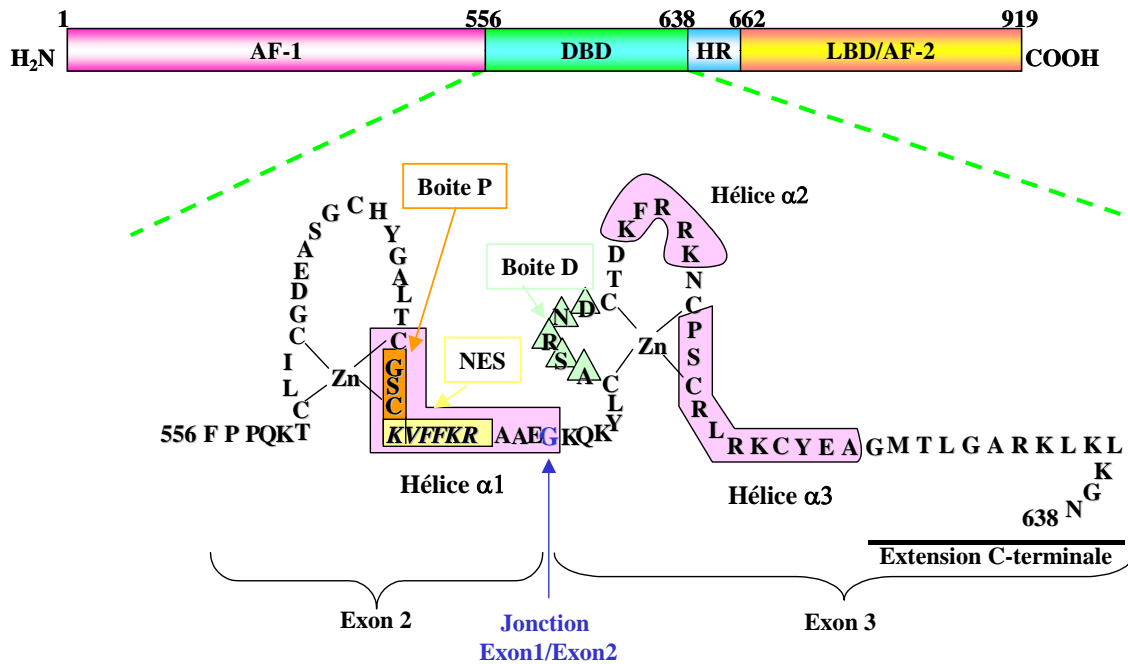
Tableau 4 : Classification des récepteurs nucléaires en fonction de leur mode de dimérisation et de leur reconnaissance des séquences spécifiques.

Récepteur Nucléaire	Séquence de la « Boîte P »	HRE	Mode de dimérisation	Conformation
RA, GR, PR, MR	G S C K V	5'-TGTTCT-3'	Palindromes espacés de 3nt homodimères	« head-to-head »
RA	G S C K V	5'-TGTTCT-3'	Répétitions directes espacés de 3nt homodimères	
ERs	E G C K A	5'-TGACCT-3'	Palindromes espacés de 3nt homodimères, ou monomères	« head-to-head »
RXR, RAR, TR, VDR, PPAR, RevErb	E G C K G	5'-TGACCT-3'	Répétitions directes ou indirectes espacées de 0 à 6 nt	« head-to-tail »
NGFIB, ERR 1,2	E G C K G, E A C K A	5'-TGACCTTTT-3'	Monomère	Monomère

Le DBD du RA est composé d'environ 80 acides aminés organisés en deux doigts de zinc, où un ion Zn^{2+} est lié à quatre résidus cystéines. Il est structuré en trois hélices α , dont la première concerne la partie C-terminale du premier doigt de zinc et s'étend jusqu'à la région centrale. La première hélice renferme la « Boîte-P » et une séquence d'export nucléaire (NES). La seconde est localisée dans la partie haute du second doigt de zinc, à proximité de la région responsable de la dimérisation du RA nommée « Boîte-D ». Enfin, la troisième et dernière hélice α s'étend depuis la partie C-terminale du second doigt de zinc jusqu'à l'extension C-terminale (CTE). La région CTE est cruciale pour la structure tridimensionnelle adéquate du DBD (Verrijdt G *et al.*, 2006) (Figure 13).

La séquence « CGSCKVF » ou Boîte-P est responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN, cette séquence est conservée chez tous les récepteurs stéroïdiens excepté l'ER où la glycine en deuxième position est substituée par un acide glutamique.

Figure 13 : Représentation schématique du récepteur des androgènes et de son domaine de liaison à l'ADN



Légende Figure 13 : Le DBD du RA est organisé en deux doigts de zinc constitués de trois hélices α (entourées en violet), chaque doigt de zinc referme des séquences importantes pour les fonctions du RA. Ainsi le premier doigt de zinc comporte Boîte-P (orange) responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN, et le motif « KVFFKR » (jaune) qui constitue le signal d'export nucléaire (NES). Le second doigt de zinc composé de deux hélices α comporte la séquence de dimérisation ou Boîte-D et se termine par une extension C-terminale importante pour la structure tridimensionnelle du RA. Le point de jonction entre les exons 1 et 2 est représenté.

Curieusement, chaque doigt de zinc du DBD du RA est codé par un exon distinct. Au sein de la superfamille des RNs la position du point de jonction entre les deux exons varie en fonction des sous-groupes (cf. Tableau 3). Cette position a été acquise par le RA au cours de l'évolution, suggérant l'importance de ce point pour la fonction du RA (Tableau 5) (Whitfield GK *et al.*, 1999).

En effet, des mutations au niveau des sites d'épissage conduisent à des erreurs au cours de la maturation des ARNs messagers du RA, et de ce fait à des protéines dont la fonction est altérée (Wickert L et Selbig J, 2002).

Tableau 5: Evolution du point de jonction entre les deux doigts de zinc du DBD au sein de la famille des récepteurs nucléaires

Jonction Exon1/ Exon 2	Vertébrés	Arthropodes	<i>C. elegans</i> / Méduses
↓ Boîte-P G(n) ₇ C EGCKG FFKR	HNF4 RXR TR2/TR4 TLX COUP-TFs	dHNF4 USP DHR78 TLL SVP	RXR de méduse CeNHR-67 CeUNC-55
↓ EGCKG FFKR	TRs PPARs RARs RevErbs RORs SF-1	 E75 E78 DHR3 FTZ-F1	 CeNHR-23 CeNFR-25
↓ EGCKG FFKRR	FXRs LXRs VDR PXR/ONR CARs NOR1 NURR1	EcR DHR.38	CeSEX-1 CeNHR-6
↓ EGCKA FFKR(n) ₃ G	ER ERR		
↓ GSCKV FFKR(n) ₃ G	GR AR PR MR		

*Légende Tableau 5: La localisation du point de jonction (indiqué par les flèches noires) entre les exons 1 et 2 du DBD n'est pas constante au sein de la famille des RNs. Chez les RNs dont on retrouve des homologues aussi bien chez les arthropodes que chez les méduses et chez le nématode *C. elegans* ce point de jonction est localisé avant la Boîte-P. Au cours de l'évolution il a avancé progressivement vers l'extrémité C-terminale du premier doigt de zinc, en passant par la Boîte-P. Au sein du groupe des RNs stéroïdiens, la jonction exon1/exon2 est localisée au niveau de la glycine, soit 8 acides aminés après la Boîte-P, cette localisation n'est retrouvée ni chez les arthropodes ni chez *C. elegans*, indiquant que cette position spécifique a été acquise au cours de l'évolution.*

Tous les récepteurs stéroïdiens reconnaissent une même séquence consensus au niveau de l'ADN consistant en deux demi-sites hexamériques « 5'-TGTTCTnnnTCTTGT-3' », arrangés en répétition inversées et espacées de trois nucléotides (IR3). Les récepteurs stéroïdiens se fixent sur ces séquences sous forme d'homodimères dans une conformation « head-to-head ».

Ainsi, pendant longtemps la question de la spécificité de la régulation des gènes cibles par les différents récepteurs stéroïdiens a été soulevée.

Néanmoins, il est admis que le niveau d'expression tissu spécifique de ces récepteurs, des différences dans le métabolisme stéroïdien, la structure de la chromatine et la disponibilité des co-facteurs contribue à la spécificité de leur réponse.

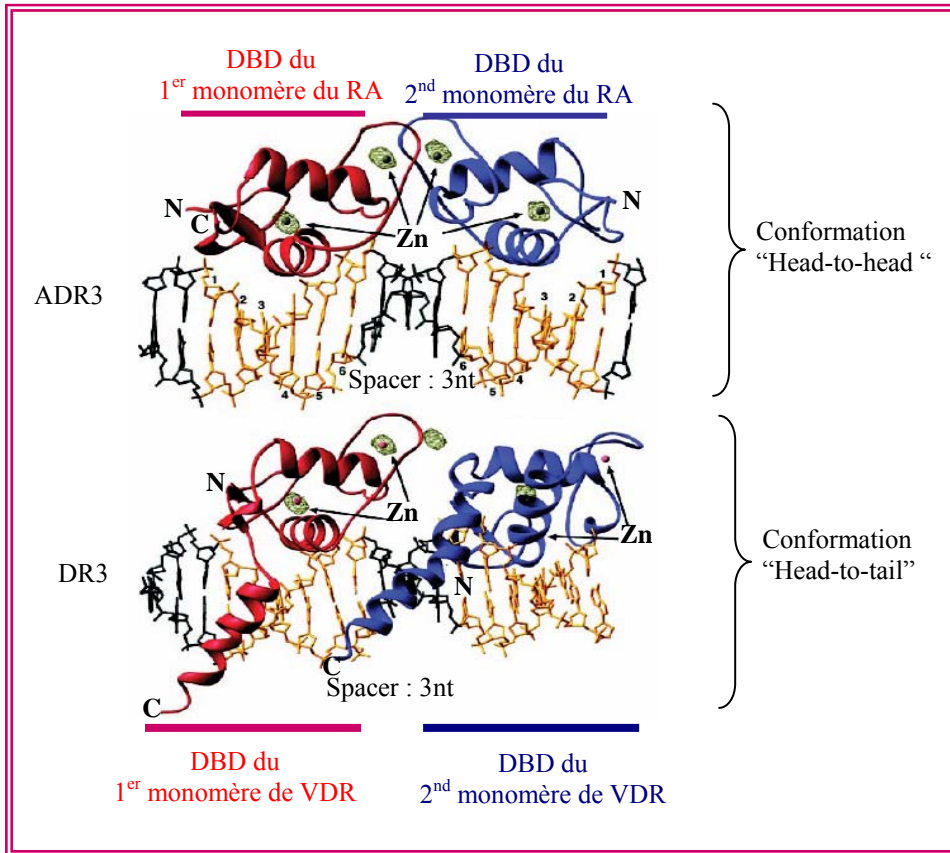
De plus, des éléments de réponse spécifiques du RA ont également été identifiés. Ainsi, le DBD du RA reconnaît des éléments AREs (Androgen Responsive Elements), qui consistent en des répétitions directes de deux demi sites hexamériques sur le même brin d'ADN, espacés par trois nucléotides « 5'-TGTTCTnnnTGTTCT-3' » appelées ADR3 (Verrijdt G *et al.*, 2003).

Des études de cristallographie réalisées avec des récepteurs reconnaissant des répétitions directes similaires, de type DR3 (Répétitions Directe) , tels que le DBD du VDR, ont révélé une conformation « head-to-tail » du dimère. En revanche, le RA se fixe dans une conformation « head-to-head » aussi bien sur les éléments communs IR3 que sur les séquences spécifiques ADR3. Cette conformation spécifique du RA contribuerait ainsi à la spécificité de son mode d'action (Schaffer PL, *et al.*, 2004, Verrijdt G *et al.*, 2003).

Des expériences de délétions d'acides aminés pratiquées au sein du DBD ont permis d'identifier la thréonine en position 602 ainsi que la Glycine 627 et la Leucine 634 comme étant importantes pour la reconnaissance spécifique des ADR3 par le RA. Ces acides aminés permettent aux deux monomères du RA d'établir des contacts favorisant la conformation « head-to-head » (Schoenmakers E *et al.*, 2000) (Figure 14).

Par ailleurs, la partie C-terminale du premier doigt de zinc du DBD de l'AR, comporte également le motif « KVFFKR » qualifié de NES (Signal d'Export Nucléaire), ce motif est reconnu par la calréticuline, un co-répresseur empêchant l'interaction du récepteur avec l'ADN et responsable du transport des RNs du noyau vers le cytoplasme (Dedhar S *et al.*, 1994).

Figure 14 : Représentation des homodimères du récepteur des androgènes et du récepteur de la vitamine D (VDR) dans leur conformation respective « head-to-head » et « head-to-tail » au niveau des répétitions directes de l'ADN



Légende Figure 14 :
 Les séquences consensus au niveau de l'ADN, arrangées en répétitions directes (DR3 ou ADR3), sont représentées en jaune, elles sont séparées par un « spacer » de 3 nucléotides (nt) (noir). Les deux monomères du RA et de VDR sont représentés en rouge et bleu dans leurs conformations respectives « head-to-head » et « head-to-tail ».

D'après Schaffer PL, et al., 2004

Le DBD est une région hautement structurée, comportant plusieurs éléments clés pour la fonction du RA, telles que la boîte de reconnaissance de l'ADN (Boîte-P), le motif NES, la « Boîte-D » de dimérisation, l'extension C-terminale, puis le point de jonction entre les exons 1 et 2. Les mutations au sein de l'un de ses domaines ont de ce fait de graves répercussions sur la fonction du RA.

La majorité des mutations au niveau du DBD (83%), du RA sont corrélées avec des formes partielles ou complètes d'insensibilité aux androgènes (SIAC ou SIAP), cependant une certaine fraction d'entre elles (17%) concerne le CaP (Verrijdt G, et al., 2006).

c.) La région Charnière

Initialement cette petite région de 36 acides aminés qualifiée de « charnière » (HR : Hinge Region) était considérée comme un domaine dépourvu de toute fonction, servant uniquement de « lien » ou de séparation entre le DBD et le LBD des RNs. Cependant, des études relativement récentes ont démontré que cette région est multifonctionnelle et qu'elle a son importance dans la localisation nucléaire, la liaison à l'ADN et dans la modulation des capacités de transactivation du RA.

Il a été montré que le signal de localisation nucléaire du RA, « **RKCYEAGMTLGARKLKK** », est une séquence bipartite localisée en partie dans la région C-terminale du DBD et en partie dans la région HR. Cette séquence nécessiterait cependant la coopération du second doigt de zinc et de l'extension C-terminale du DBD pour assurer pleinement la fonction d'import nucléaire (Zhou ZX *et al.*, 1994).

De plus, la région HR possède un domaine « PEST », riche en prolines, acides glutamiques, sérines et thréonines, impliqué dans l'engagement des protéines vers la voie de dégradation du protéosome 26S (Tanner T *et al.*, 2004)

De surcroît, la région HR est le siège de plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation au niveau du résidu sérine 650 (McEwan, 2001), et des acétylations au niveau des résidus lysine K630, K632 et K633 effectuées par les co-facteurs p300/pCAF et Tip 60 (Fu M *et al.*, 2000, Gaughan L, *et al.*, 2002)

d.) La région carboxy-terminale

Le LBD des RNs, bien qu'étant moins conservé que le DBD, sa structure tridimensionnelle est relativement constante au sein de la famille des RNs.

La première structure cristallographique du LBD a été résolue pour RXR α (Bourguet W *et al.*, 1995). Ainsi, ce domaine est constitué de 12 hélices α et de feuillet β arrangés en trois couches antiparallèles formant un «sandwich- α ». Les hélices de 1-3 forment la première face de LBD, les hélices 4 et 5 ainsi que le feuillet β , les hélices 8

et 9 correspondent à la couche centrale, et les hélices 6, 7 et 10 forment la troisième face du « sandwich ». La capacité du LBD des RNs à réguler la transcription est contrôlée par l'hélice α 12 ou AF-2 (Figure 11).

Le LBD du RA est une structure globulaire formée de 11 hélices α numérotées de H1 à H12, l'hélice H2 n'existant pas. La poche de liaison au ligand est formée par les hélices α 3, 4, 5, 7, 11 et 12 et par le feuillet β précédant l'hélice α 6 (Matias PM *et al.*, 2000).

A ce jour 28 structures cristallographiques des formes sauvages ou mutées du LBD du RA, libres ou complexées à son ligand, ont été déposées dans la base de données « Entrez Structural data base » (Duff J *et al.*, 2006).

Le LBD du RA peut être subdivisé en quatre séquences distinctes d'un point de vue structural mais fonctionnellement liées.

La première séquence est une surface de dimérisation, responsable de la reconnaissance spécifique du ligand.

La seconde, appelée poche de liaison au ligand ou LBP (Ligand Binding Pocket) peut interagir avec des petites molécules lipidiques en absence de ligand spécifique. Tous les stéroïdes partagent la même structure de base, le noyau stérol, composé de quatre cycles aromatiques nommés de A à D. Au niveau du RA la discrimination entre les androgènes et les autres stéroïdes est cependant possible grâce aux différences au niveau du cycle D de la testostérone et de la DHT. La partie C-terminale de l'hélice α 11 renferme une séquence hautement conservée au niveau des RAs des différentes espèces « L873HQFTFDL880 », suggérant l'importance de cette séquence pour la spécificité vis-à-vis du ligand. D'autre part, l'importance de plusieurs acides aminés au niveau du LBP entourant le cycle D tels que l'asparagine en position 705, l'arginine 779, l'histidine 874, et la thréonine 877 a été soulignée pour la reconnaissance spécifique du ligand. Des mutations au niveau de ces résidus pourraient influencer les interactions avec les androgènes et être responsables d'un gain ou d'une perte de fonction (Poujol N *et al.*, 2000). En effet, la mutation T877A amplement décrite suite à sa fréquente détection dans les CaPs, permet un élargissement du spectre de reconnaissance des ligands. Ainsi, le RA portant cette

mutation, peut être activé par d'autres ligands comme la progestérone et le flutamide (Steketee K et al., 2002).

La troisième séquence riche en acides aminés hydrophobes constitue le motif d'interaction avec les co-activateurs pourvus de motif « LxxLL » comme SRC1, 2 et 3 (Steroid Receptor Coactivator) ou RAC3 (Receptor Associated Co-activator 3) (Duff J et al., 2006) (cf. Figure 11).

La dernière séquence correspond à AF-2 et est responsable d'une activation transcriptionnelle ligand dépendante. Le mécanisme par lequel AF-2 devient active est commun pour de nombreux RNs. Ainsi, la liaison du ligand induit une série de changements intramoléculaires aboutissant au réalignement de l'hélice 11 avec l'hélice 10 et au «swing» ou au repositionnement de l'hélice 12. Ces changements activent la fonction AF-2 en créant une surface d'interaction avec les co-facteurs (Bourguet W et al., 2000).

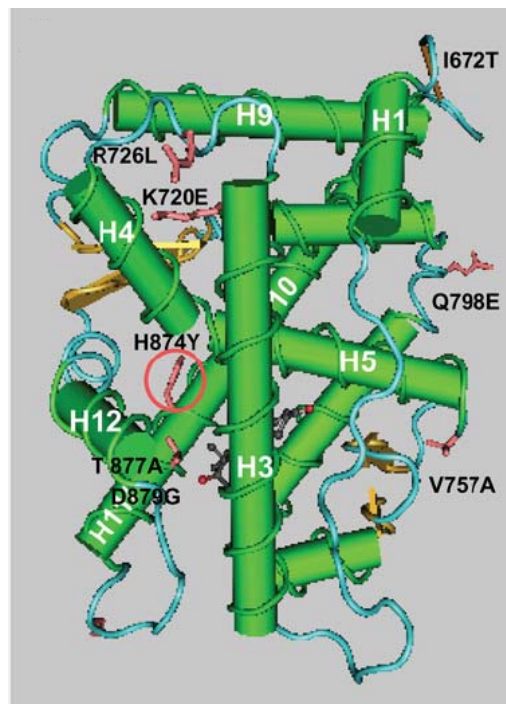
Le LBD interagit également avec le domaine NTD du RA, cette interaction est dépendante du ligand agoniste, et est médiée par le biais des motifs «²³FQNLF²⁷» et «⁴³³WHTLF⁴³⁷» présents au niveau du NTD. L'interaction N/C-terminale stabiliserait le LBD du récepteur dans sa conformation agoniste en maintenant le ligand dans sa poche, et permettrait au RA de rester actif même en présence de faible taux d'androgènes (Jaaskelainen J *et al.*, 2006).

Chez certains membres de la famille de RNs (GR, PR, RA, ER, MR), le LBD interagit également avec les protéines de choc thermique de type HSP (Pratt WB et Toft DO, 1997).

Le LBD, est également la cible favorite de mutations ponctuelles identifiées dans le cadre de CaPs. Tout un panel de mutation ponctuelles a été détecté aussi bien au niveau des tumeurs primitives (substitutions d'acides aminées : I672T, R726L, Q798E, H874Y) que dans des tumeurs métastatiques (substitutions d'acides aminés : K720E, R726L, V757A, Q798E, T877A, et D879G). Tous ces variants du RA reconnaissent leur ligand naturel, la DHT ou la testostérone mais également d'autres ligands stéroïdiens non androgéniques, tels que la progestérone, les oestrogènes, ou la DHEA (Duff J *et al.*, 2006) (Figure 15).

Des mutations au niveau du LBD sont également retrouvées dans les cas de SIA ou par exemple la substitution N705S, est responsable de l'abolition complète de la reconnaissance des androgènes par le RA au profit des progestatifs (Poujol N *et al.*, 2000).

Figure 15 : Représentation de la structure du domaine de liaison au ligand du récepteur des androgènes ainsi que des différentes mutations détectées dans les cancers de la prostate



D'après, Duff J et al., 2006

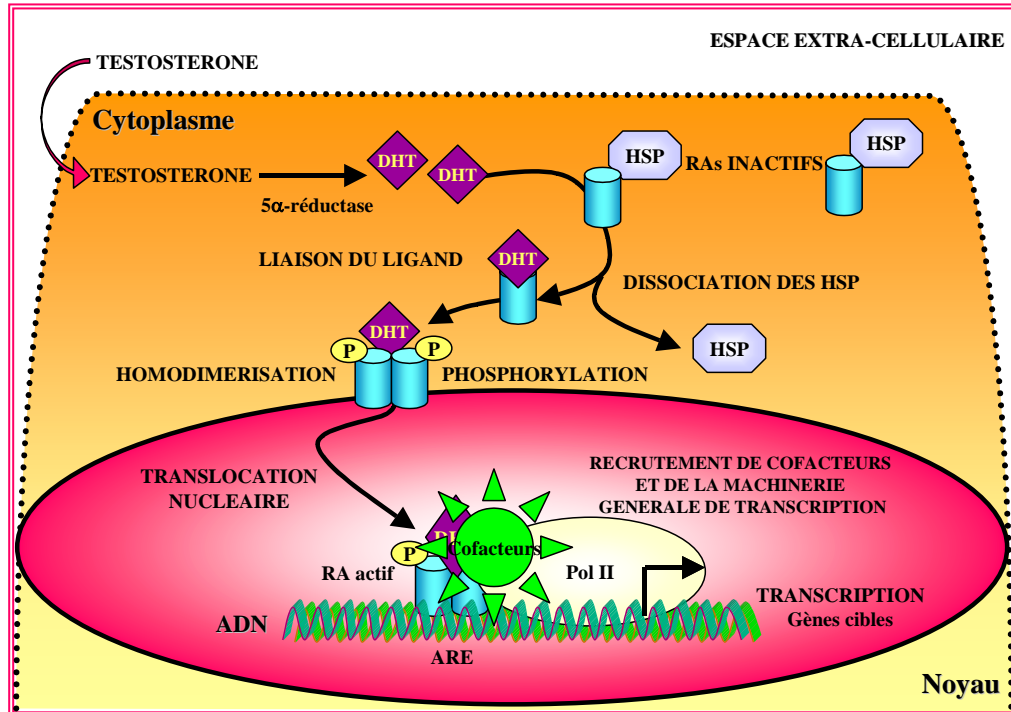
Légende Figure 15 : Le LBD du RA est formé de 12 hélices α , représentées par les cylindres verts, agencées en sandwich tri-lamellaire. Les différentes mutations ponctuelles décrites dans les CaPs sont représentées en rose.

2.) Mode d'action génomique du récepteur des androgènes

Le RA inactif est localisé dans le cytoplasme est séquestré par des protéines chaperonnes de type HSP. En effet, les HSP40, HSP70 et HSP90 permettent d'induire une conformation adéquate de la poche de liaison au ligand du RA, pour favoriser la liaison du ligand lorsque celui-ci se présente. Selon certaines hypothèses, en absence du ligand, les chaperonnes modifieraient en permanence la conformation du RA,

rendant la poche de liaison au ligand toujours accessible (Cardozo CP *et al.*, 2003) (Figure 16).

Figure 16 : Mode d'activation génomique du récepteur des androgènes



Légende figure 16 : Le RA comme la plupart des autres récepteurs stéroïdiens en absence de son ligand la DHT est localisé dans le cytoplasme complexé à des protéines chaperonnes, HSP. En présence de son ligand activateur le RA s'homodimérise, est phosphorylé, se transloque dans le noyau où avec la collaboration de co-facteurs il régule la transcription de gènes cibles.

Par ailleurs, le RA inactif est rapidement poly-ubiquitiné et dirigé vers le protéosome 26S où il est dégradé. Les sites exacts d'ubiquitination du RA ne sont pas encore connus (Faus H et Haendler B, 2006).

Le ligand naturel du RA est la DHT, qui comme nous l'avons vu précédemment résulte de la conversion de la testostérone par la 5 α -réductase au niveau des tissus cibles. La DHT constitue un agoniste puissant du RA, de par une affinité supérieure de dix fois par rapport à son précurseur, la testostérone (Edwards J et Barlett JM, 2005). La conversion de la testostérone en DHT est également régulée par la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), une petite glycoprotéine plasmatique possédant une haute affinité pour les hormones stéroïdes. En se liant à la testostérone, la SHBG

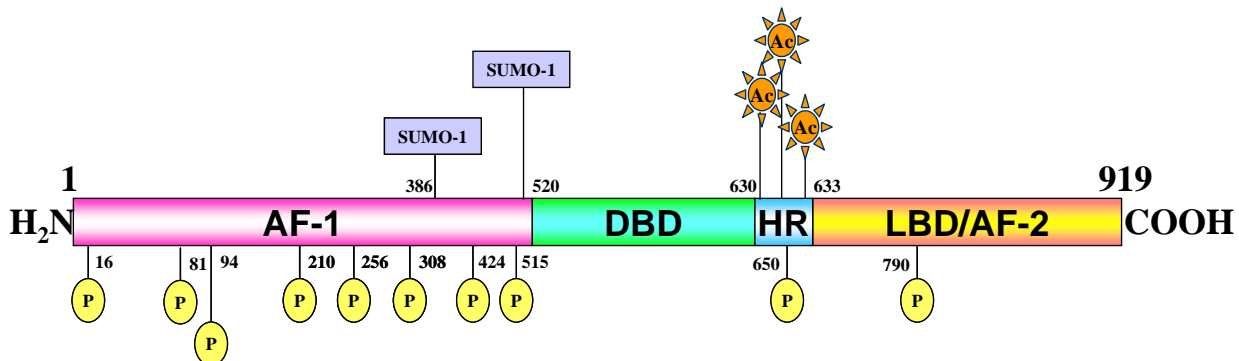
permet de réguler la concentration plasmatique de la testostérone libre, et par là même, sa conversion en DHT (Ding VD *et al.*, 1998).

En présence de son ligand naturel, le RA subit une série de modifications fonctionnelles et conformationnelles, il est phosphorylé, s'homodimérise, rentre dans le noyau, se fixe au niveau des promoteurs de ses gènes cibles, recrute des co-facteurs et régule la transcription de ses gènes cibles (Kumar R *et al.*, 2004).

3.) Les modifications post-traductionnelles du récepteur des androgènes

La régulation des activités du RA implique une série de modifications post-traductionnelles localisées au niveau de tous les domaines de la protéine. Certaines d'entre-elles sont constitutives, d'autres sont induites par la liaison du ligand, ou encore orientent le RA vers le protéosome (Figure 17).

Figure 17 : Les modifications post-traductionnelles du récepteur des androgènes



Légende Figure 17 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles du RA, les positions des phosphorylations (P), des sumoylations (SUMO-1), et des acétylations (Ac) sont représentées. L'essentiel des modifications concerne la région AF-1.

a.) La phosphorylation

Ce n'est qu'en 1990 que van Laar et ses collègues ont démontré que le RA était une protéine polyphosphorylée (van Laar JH *et al.*, 1990). En effet, dans les quinze minutes qui suivent sa synthèse, même en absence de ligand, le RA est phosphorylé.

Ainsi, la phosphorylation de la sérine 94 (S94) est une modification dite constitutive du RA.

D'autre part, la liaison de la DHT promeut toute une série d'autres phosphorylations au niveau des résidus sérines en positions 16, 81, 210, 256, 308, 424, 515, 650 et 790 par le recrutement de protéines kinases telles que Akt, MAPK et PKC (Protéine Kinase C). Ces phosphorylations dites « activatrices » stabilisent le RA dans une configuration homodimérique en le protégeant de la protéolyse. La phosphorylation du RA rend aussi ce dernier plus sensible à la DHT, favorise le recrutement de co-activateurs et régule positivement l'expression des gènes cibles.

En résumé, plusieurs voies de signalisation agissent de manière synergique dans le but de promouvoir, via la phosphorylation, l'activation du RA au niveau de nombreux sites. Alors que la phosphorylation de certains résidus tels que la sérine 515 par la MAPK ou des sérines 210 et 790 par Akt, rend respectivement le RA hypersensible aux niveaux des androgènes circulants et promeut son activité transcriptionnelle, le rôle des nombreuses autres phosphorylations reste encore à déterminer (Faus H et Haendler B, 2006).

b.) L'acétylation

Le RA est acétylé au niveau du motif « KxKK », sur les lysines (K) 630, 632 et 633 de la région charnière. Comme nous l'avons vu, ces modifications sont effectuées par l'activité acétyl transférase des les co-activateurs Tip60, pCAF et p300. La substitution d'un résidu lysine par une alanine altère sévèrement la fonction du RA, en empêchant le recrutement de co-activateurs et en favorisant celui des co-répresseurs (Fu M *et al.*, 2000). Ainsi, l'acétylation du RA représenterait une modification clé, modulant le recrutement de co-facteurs.

Par ailleurs, la translocation nucléaire d'un RA présentant un défaut d'acétylation serait ralentie (K630A, K632A, et K633A), (Thomas M *et al.*, 2004) et, inversement, des mutations mimant les acétylations stimuleraient les activités transcriptionnelles du RA, en promouvant sa nucléarisation et le recrutement de co-activateurs (Fu M *et al.*, 2004).

c.) La sumoylation

Le RA fut le premier récepteur des hormones stéroïdes pour lequel une sumoylation a été décrite (Poukka H *et al.*, 2000). La sumoylation est une modification hormono-dépendante, et ses effets sont majoritairement répressifs. Ainsi des mutations au niveau des sites de sumoylation du RA influencent de manière positive ses activités transcriptionnelles (Faus H et Haendler B, 2006).

4.) La formation du complexe transcriptionnel autour du récepteur des androgènes

En tant que facteur de transcription, le RA se fixe sur des séquences d'ADN spécifiques les AREs, au niveau du promoteur des gènes cibles et y recrute des co-activateurs, la machinerie générale de transcription et la l'ARN Polymérase II (Pol II). Le recrutement de Pol II est assuré par les facteurs généraux de transcription (GTFs) assemblés en complexe de pré-initiation ou PIC.

a.) L'ARN polymérase II

L'ARN polymérase II (Pol II) a été caractérisée chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, et est impliquée dans la transcription des ARNs messagers. La Pol II forme un large complexe multiprotéique d'environ 0.5 MDa composée de 12 sous-unités nommées RPB, de taille comprise entre 10 et 20 kDa. Les deux plus larges sous-unités de la Pol II sont formées par RPB1 et RPB2. Les sous-unités RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 et RPB12, quant à elles sont communes aux deux autres ARN polymérases eucaryotiques, l'ARN polymérase I impliquée dans la transcription des ARNs ribosomiques et l'ARN polymérase III responsable de la transcription des ARNs de transfert, des ARNs ribosomiques 5S, de l'ARN U6 (spliceosome) et des snARNs (small nuclear RNA). La Pol II de levure peut être dissociée en deux parties, une « core » enzyme composée de 10 sous-unités et en un hétérodimère RBP4/RBP7. La sous-unité RPB1 possède une extrémité CTD (C-terminal Repeat Domain) constituée d'une répétition d'hexapeptides (YSPTSPS)_n. L'état de phosphorylation de l'extrémité

CTD régule le début et la fin de la transcription, puisque l'initiation de la transcription nécessite la phosphorylation de deux résidus sérines du motif (Cramer P, 2004).

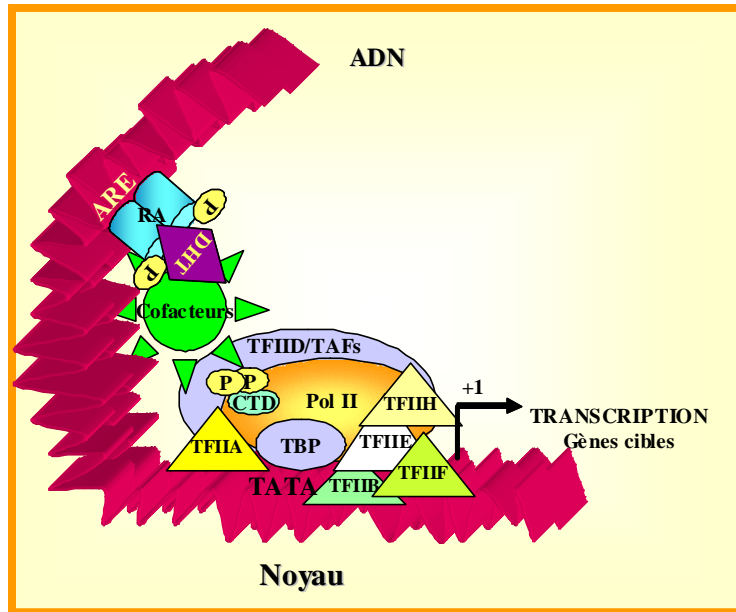
b.) Les facteurs généraux de transcription

Les facteurs généraux de transcription (GTFs) ont été définis comme des composants requis et nécessaires à l'initiation de la transcription par la Pol II à partir d'un promoteur incluant une boîte TATA et une séquence initiatrice. Les 6 GTFs connus : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH collaborent ensemble pour former le complexe de pré-initiation ou PIC. Le facteur TFIID est un facteur central du PIC, il est composé de la TATA-Box-Binding Protein (TBP) et de 14 facteurs associées à TBP (TAFs) (Muller F et Tora L, 2004).

c.) Le complexe de pré-initiation

La première étape d'assemblage du PIC consiste en la fixation de TBP au niveau de la boîte TATA située respectivement 30 et 60 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription chez les mammifères et chez la levure. Cette fixation induit une courbure de l'ADN permettant certainement l'interaction des GTFs avec le complexe formé par le RA et ses co-activateurs. Le facteur TFIIB s'associe directement à TBP et permet le recrutement de TFIIF et de la Pol II phosphorylée. Pour finir, le facteur TFIIE doté d'une activité ATPase et kinase ainsi que le facteur TFIIH possédant une fonction hélicase sont recrutés pour faciliter le remodelage de la chromatine (Martinez E, 2002)

Figure 18 : Formation du Complexe transcriptionnel autour du récepteur des androgènes



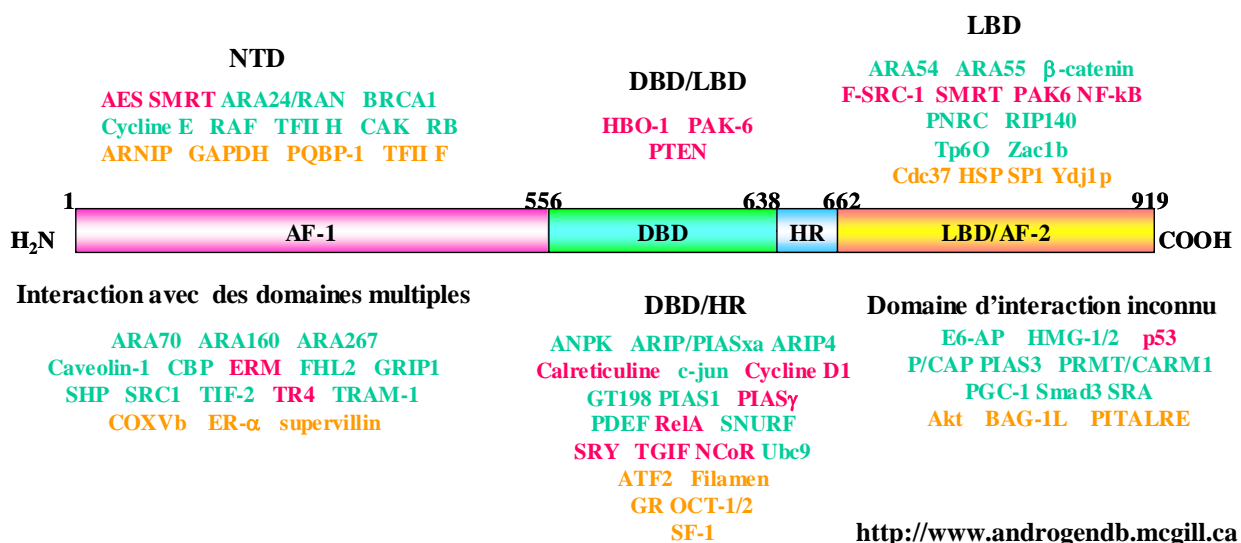
Légende Figure 18 : La formation du complexe transcriptionnel autour du RA implique la machinerie générale de transcription, l'ARN polymérase II et les co-facteurs.

Les GTFs ne sont pas des co-activateurs proprement dits du RA, parce qu'ils influencent directement le niveau de base de la transcription, cependant l'interaction directe du RA avec TFIIF et TFIIH régule positivement les activités transcriptionnelles du RA (McEwan IJ, et Gustafsson 1997, Heinlein CA et Chang C, 2002, Lee DK et Chang C, 2003).

5.) Interaction avec les co-facteurs

Les activités transcriptionnelles du RA sont modulées par sa capacité d'interagir avec de nombreux co-régulateurs. Tout d'abord, le RA interagit avec des co-activateurs qui modifient localement la structure de la chromatine grâce à leur fonction histone acétylase (HAT), ou qui permettent de relier le RA à la machinerie générale de transcription. Ensuite, le RA peut également réprimer la transcription de ses gènes cibles en interagissant avec des co-répresseurs qui recrutent les histone déacétylases (HDAC) au niveau des sites d'initiation de la transcription ou qui inhibent la translocation nucléaire du RA (Figure 19).

Figure 19 : Représentation schématique du récepteur des androgènes et de ses différents partenaires d'interaction



Légende Figure 19 : Les co-régulateurs du RA interagissent avec différents domaines du récepteur. Les co-activateurs sont représentés en vert, les co-répresseurs en rouge, et les autres partenaires en orange

a.) Les principaux co-activateurs du récepteur des androgènes

L'action génomique du RA est modulée principalement par des co-activateurs (CoA) de deux types (Heinlein CA et Chang C, 2002).

Les CoA de type I appartiennent à la famille de p300 ou de son homologue CBP (cAMP Response Element Binding Protein (CREB) Binding Protein). Grâce à leur activité HAT, ces co-activateurs collaborent avec le RA en remodelant localement la chromatine au niveau des gènes cibles du RA, et d'autre part ils recrutent la machinerie générale de transcription.

La fonction principale des CoA de type II est de permettre au RA de remplir pleinement sa fonction, en assurant son repliement correct, en facilitant et en stabilisant la liaison du ligand au niveau du LBD ou encore en favorisant l'interaction entre les parties N- et C-terminales du RA. Les membres représentatifs de cette famille sont constitués par la Filamine A, qui favorise la translocation nucléaire du RA activé ou encore par ARA70 qui stabilise le ligand au niveau du LBD (Heinlein CA et Chang C, 2002). D'autres CoA de type II, appartenant à la famille de p160, tels que SRC-1, 2

ou 3 (Steroid Receptor Coactivator) ne possèdent pas d'activité HAT intrinsèque propre. Cependant ils permettent le recrutement de complexes tels que SWI/SNF assurant le remodelage de la chromatine.

b.) Les principaux co-répresseurs du récepteur des androgènes

Le mode d'action des co-répresseurs (CoR) du RA est aussi varié que celui des co-activateurs, ils peuvent être subdivisés en différentes catégories en fonction de leur mode d'action.

Ainsi, certains peuvent rendre la chromatine inaccessible en déacétylant les queues d'histones, d'autres empêchent l'interaction entre les parties N- et C-terminales du récepteur ou encore sa translocation nucléaire. Puis, les CoR peuvent également rentrer en compétition avec les CoA (Burd CJ *et al.*, 2006).

Les CoR tels que NCoR (Nuclear Receptor Corepressor), la cycline D1 et l'ARR19 (AR Corepressor 19KDa) sont responsables de la modification de la chromatine en recrutant un complexe à activité HDAC

Par ailleurs, SMRT (Silencing Mediator for Retinoid acid and Thyroid Hormone Receptor) un autre CoR du RA a un double mode d'action. D'une part il peut recruter les HDAC et d'autre part en interagissant en même temps avec le LBD et le NTD du RA, il empêche l'interaction entre les deux extrémités.

Un petit sous-groupe de CoR, par son interaction avec le RA le séquestre dans le cytoplasme et empêche sa translocation nucléaire. C'est le cas de PTEN (Phosphate and Tensin homolog), un suppresseur de tumeurs inactivé dans plus de 50 % de CaPs.

D'autre part, la calréticuline, en interagissant directement avec la séquence « KVFFKR » présente au niveau du DBD du RA empêche la fixation du RA au niveau de l'ADN et induit son export nucléaire.

Par ailleurs, SMRT et NCoR par leur interaction respective au niveau du LBD/NTD et du DBD du RA pourraient entrer en compétition avec les CoA, et empêcher leur recrutement. De plus, lorsqu'ils sont prépondérants, NCoR et SMRT peuvent non seulement être recrutés au niveau du RA lié à un antagoniste partiel tel que l'acétate de cyprotérone mais également au niveau du RA lié à la DHT. Ces

données soulignent l'importance des Co-R dans le développement ainsi qu'au niveau de la thérapeutique des CaPs (Hodgson MC *et al.*, 2005 Yoon HG et Wong J, 2006).

6.) Quelques exemples de gènes cibles du récepteur des androgènes

Le RA intervient dans la régulation de plus d'une centaine de gènes distincts dans la lignée LNCaP dérivée d'un adénocarcinome prostatique humain. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme, la prolifération la différenciation, le stress cellulaires et bien d'autres processus encore (Nelson PS *et al.*, 2002) (Tableau 6).

La régulation des gènes cibles du RA peut être directe, par la liaison du RA au niveau des AREs situés au niveau des promoteurs ou indirecte, entant qu'aboutissement d'une cascade de signalisation.

Tableau 6 : Principaux gènes régulés par le RA (d'après Nelson PS, *et al.*, 2006)

Gene	Δ Fold 24hr	48hr	Accession	Description	
Metabolism					
HPGD	25.0	41.3	NM_000860	hydroxyprostaglandin dehydrogenase	} Métabolisme
PPAP2A	7.6	9.0	NM_003711	phosphatidic acid phosphatase 2A	
SCD	5.9	4.5	NM_005063	stearoyl-CoA desaturase	
SORD	4.5	5.4	NM_003104	sorbitol dehydrogenase	
DHCR24	4.5	6.0	NM_014762	24-dehydrocholesterol reductase/Seladin	
SMS	3.9	5.8	NM_004595	spermine synthase	
LOC51171	3.7	3.6	NM_016246	dehydrogenase/reductase retSDR3	
ALDH1A3	3.7	5.2	NM_000693	aldehyde dehydrogenase 1, member A3	
SAT	3.7	7.3	NM_002970	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	
HMGCS1	3.5	2.7	NM_002130	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A syn 1	
DBI	3.4	4.0	NM_020548	diazepam binding inhibitor	
B4GALT1	3.3	3.3	NM_001497	betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase	
PHYH	3.1	4.4	NM_06214	phytanoyl-CoA hydroxylase	
ID11	3.1	2.7	NM_004508	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	
HELO1	3.0	3.2	NM_021814	long chain polyunsaturated FA elongation	
UGDH	2.9	4.0	NM_003359	UDP-glucose dehydrogenase	
FACL3	2.7	3.7	NM_004457	fatty acid-Coenzyme A ligase, long-chain 3	
DDC	-2.6	-4.1	NM_000790	dopa decarboxylase	
Proliferation/differentiation/apoptosis					
MAF	14.7	16.6	NM_005360	v-maf fibrosarcoma oncogene homolog	} Prolifération et différenciation cellulaire
NDRG1	13.7	14.8	NM_006096	N-myc downstream regulated	
ELL2	11.8	6.3	NM_012081	RNA Polymerase II, elongation factor	
GG2-1	4.9	5.1	NM_014350	TNF-induced protein	
CDC14	3.0	3.1	NM_003671	cell division cycle 14 homolog B	
B	2.5	3.5	NM_002166	inhibitor of differentiation 2	
ID2	1.6	3.8	NM_018645	Hes6 neuronal differentiation gene ortholog	
HES6	-3.4	-3.5	NM_001328	C-terminal binding protein 1	
CTBP1	-3.6	-3.4	NM_001260	cyclin-dependent kinase 8	
CDK8	-3.7	-5.1	NM_000465	BRCA1 associated RING domain 1	
Transport/trafficking					
FKBP5	24.4	25.4	NM_004117	FK506 binding protein 5	} Transport et trafic
UNC13	7.3	9.5	NM_006377	unc-13-like (C. elegans)	
ABCC4	5.5	7.8	NM_005845	ATP-binding cassette, sub-family C	
ANKH	5.3	6.3	NM_019847	ankylosis, progressive (mouse) homolog	
KIAA1382	4.8	4.7	NM_018976	amino acid transporter 2	
SNAP25	3.9	5.2	NM_003081	synaplosomal-associated protein, 25kD	
APPBP2	3.2	3.0	NM_006380	amyloid beta precursor protein binding protein 2	
AZGP1	3.3	5.6	NM_001185	alpha-2-glycoprotein 1, zinc	
LMAN1	3.1	2.7	NM_005570	lectin, mannose-binding, 1	
RAB4	3.0	2.3	NM_004578	member, Ras oncogene family	
SRP19	3.0	2.3	NM_003135	signal recognition particle 19kD	
SLC26A2	3.0	2.2	NM_000112	solute carrier family 26, member 2	
SEC24D	3.0	2.6	NM_014822	SEC24 related gene family, member D	
VAPA	2.7	4.0	NM_003574	vesicle-associated membrane protein-associated	
SCNN1A	-3.2	-2.5	NM_001038	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	
SLC29A	-5.1	-2.1	NM_004955	solute carrier family 29	
Transcription regulation					
NKX3A	14.9	14.1	NM_006167	NK3 transcription factor homolog A (Drosophila)	} Régulation Transcriptionnelle
PDEF	4.4	3.5	NM_012391	prostate epithelium-specific Ets transcription factor	
RINZF	4.0	3.2	NM_023929	zinc finger protein RINZF	
DDXBP1	3.9	3.4	NM_016166	DEAD/H (Asp-Glu-Als-Asp/His) box binding protein 1	
TSC22	3.5	5.4	NM_006022	TGF beta-stimulated protein TSC-22	
MRF2-hom	2.8	3.7	XM_058394	modulator recognition factor 2 homolog	
KLF4	2.3	3.0	NM_004235	Kruppel-like factor 4	
MYC	-2.7	-2.8	NM_002467	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	
Protease/protease Inhibitor					
TMPRSS2	15.5	18.3	NM_005656	transmembrane protease, serine 2	} Protéases et Inhibiteurs de protéases
KLK2	8.8	9.0	NM_005551	kallikrein 2, prostatic	
KLK3	7.9	10.2	NM_001648	kallikrein 3, prostate specific antigen	
KLK4	3.7	4.6	NM_004917	kallikrein 4 (prostase, EMSP1)	
CPD	2.6	4.9	NM_001304	carboxypeptidase D	
SERPIN1	-3.5	-2.1	NM_005025	serine (or cysteine) proteinase inhibitor	
Signal transduction					
LIFR	7.8	7.5	NM_002310	leukemia inhibitory factor receptor	} Transduction de Signal
IQGAP2	4.3	6.8	NM_006633	IQ motif GTPase activating protein 2	
AGM1	3.7	4.2	NM_015599	N-acetylglucosamine-phosphate mutase	
HOMER-2B	3.5	3.3	NM_004839	neuronal immediate early gene, 2	
AKAP12	3.5	5.1	NM_005100	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	
TPD52	3.5	2.9	NM_005079	tumor protein D52	
LIM	3.5	2.7	NM_006457	LIM protein	
CAMKK2	3.3	1.9	NM_006549	calcium/calmodulin kinase kinase 2, beta	
PTPN21	3.0	4.0	NM_007039	protein tyrosine phosphatase, type 21	
GUCY1A3	2.9	3.3	NM_000856	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	
INPP4B	2.3	4.6	NM_003866	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II	
MERTK	2.3	3.4	Hs.117078	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	
AKAP2	1.7	4.4	NM_007203	A kinase (PRKA) anchor protein 2	
BCHE	-3.0	-4.9	NM_000055	butyrylcholinesterase	
PRKCM	-3.0	-2.5	NM_002742	protein kinase C, mu	
SDC4	-3.1	-2.7	NM_002999	syndecan 4	
PEG3	-3.2	-4.0	Hs.139033	paternally expressed 3	
TUSP	-3.5	-2.1	NM_020245	tubby super-family protein	
PIK3R3	-3.8	-3.6	NM_003629	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit	
RDC1	-7.8	-4.5	XM_051522	G protein-coupled receptor	

Tableau 6 : Principaux gènes régulés par le RA (d'après Nelson PS, *et al.*, 2006)*suite*

Gene	ΔFold		Accession	Description	
	24hr	48hr			
Structure/motility/adhesion					
KRT8	5.0	4.3	NM_002273	keratin 8	} Structure, mobilité et adhésion cellulaire
ADRM1	3.7	5.9	NM_007002	adhesion regulating molecule 1	
ACTN1	3.6	2.9	NM_001102	actinin, alpha 1	
ITGAV	3.1	3.0	NM_002210	integrin, alpha V, CD51	
KRT19	3.1	3.6	NM_002276	keratin 19	
H1FO	2.9	3.2	NM_007234	histone family, member 0	
DCTN3	2.1	3.4	NM_005318	dynactin 3	
MLCB	2.0	3.2	NM_006471	myosin, light polypeptide, regulatory	
MMP16	-2.3	-3.3	NM_005941	matrix metalloproteinase 16	
FN1	-2.5	-4.4	NM_002026	fibronectin 1	
Stress response					
ORM1	5.3	8.1	NM_000608	orosomucoid 1	} Réponse au stress
SEPP1	4.9	5.5	NM_005410	selenoprotein P, plasma, 1	
GSR	4.5	3.1	NM_000637	glutathione reductase	
SGK	4.4	2.4	NM_005627	serum/glucocorticoid regulated kinase	
SPAK	4.0	4.9	NM_013233	Ste-20 related kinase	
DNAJB9	4.0	3.6	NM_012328	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B	
Other functions					
TMEPAI	9.2	8.6	NM_020182	transmembrane, prostate androgen induced	} Autres fonctions
B2M	7.6	7.8	NM_004048	beta-2-microglobulin	
TCRG/TARP	5.2	5.5	NM_030806	T cell receptor gamma locus/ (TARP)	
HERC3	5.1	6.6	NM_014606	hect domain and RLD 3	
FLJ23153	5.0	4.6	NM_024636	TNF-alpha-induced adipose-related (ortholog)	
ADAMTS	4.0	2.6	NM_006988	disintegrin-like metalloprotease	
HS1-2	3.7	4.6	NM_007011	putative transmembrane protein	
RBM10	3.3	2.9	NM_005676	RNA binding motif protein 10	
UAP1	3.0	3.1	NM_003115	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase	
ST7	-2.7	-4.2	NM_018412	suppression of tumorigenicity 7	
DPH2L1	-3.0	-4.4	NM_001383	diphtheria toxin resistance protein like 1	

Au cours de mes travaux de thèse j'ai été amenée à travailler sur deux gènes cibles bien connus du RA, le gène *PSA* (l'antigène spécifique de la prostate) et le gène *TMPRSS2* (TransMembrane Proteases Serine2) qui ont tous deux un intérêt particulier dans les CaPs (Kim J et Coetzee GA, 2004, Hermans KG *et al.*, 2006).

a.) Le gène *PSA*

Le *PSA* appartient à la famille de gènes codant pour des sérines protéases «Kallikrein-like». Le séquençage du génome humain a permis d'identifier 15 gènes *Kallikréine* (KLK), tous localisés sur le bras long du chromosome 19 en positions q13.3-13.4. Les transcrits de ces gènes sont tous codés par 5 exons, ont une taille similaire et conservent une homologie de séquence de 40 à 80 %. Les gènes *KLK2*, *KLK3* ou *PSA*, et *KLK4* sont régulés par les récepteurs des stéroïdes (Kim J et Coetzee GA, 2004).

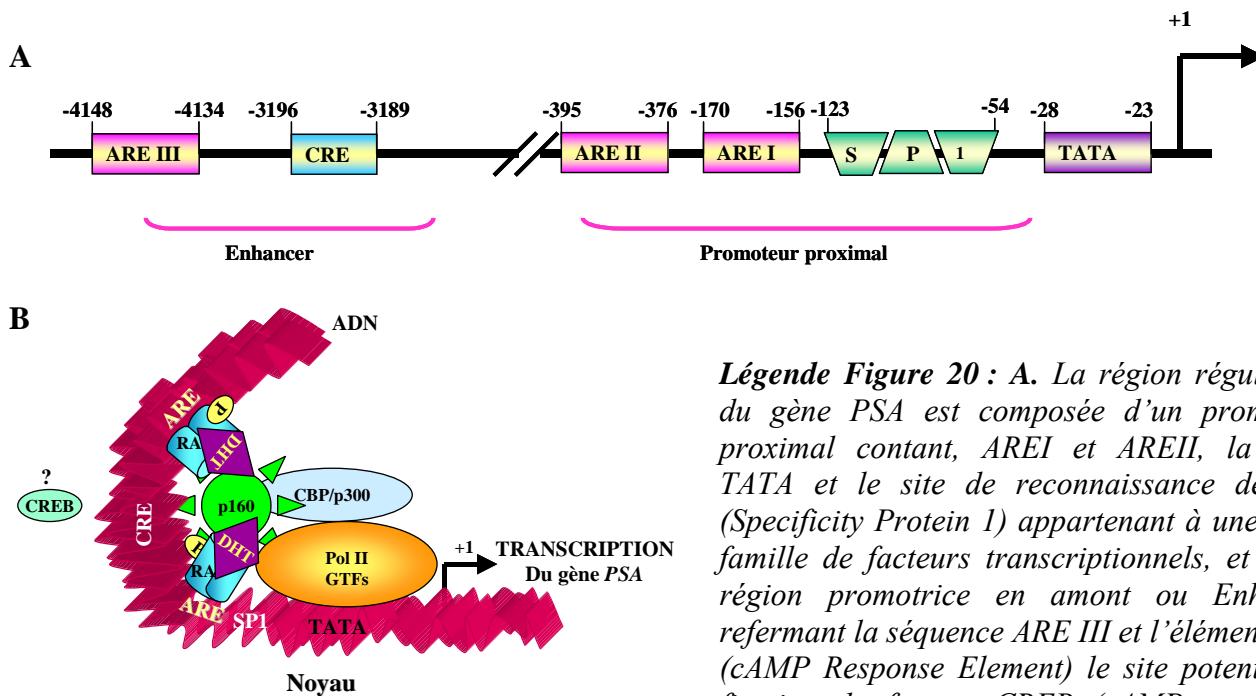
Le gène *PSA* code pour une petite glycoprotéine de 33kDa, composée d'une seule chaîne polypeptidique de 240 acides aminés, impliquée dans la dégradation de

INTRODUCTION

protéines de haut poids moléculaire synthétisées dans les vésicules séminales, afin d'éviter la coagulation du liquide séminal. Le PSA est sécrété par la plupart des CaPs et représente le biomarqueur du CaP le plus utilisé en clinique, tant pour le dépistage que pour le suivi thérapeutique.

L'expression du PSA est principalement régulée par le RA se fixant au niveau de trois éléments ARE présents au niveau du promoteur et de l'enhancer du gène. Cependant elle nécessite également l'interaction avec de nombreux CoA tels que ceux appartenant à la famille de p160, CBP/p300 et de la machinerie générale de transcription (Figure 20).

Figure 20 : Régulation transcriptionnelle du gène PSA



Légende Figure 20 : A. La région régulatrice du gène PSA est composée d'un promoteur proximal contenant, ARE I et ARE II, la boîte TATA et le site de reconnaissance de SPI (Specificity Protein 1) appartenant à une large famille de facteurs transcriptionnels, et d'une région promotrice en amont ou Enhancer contenant la séquence ARE III et l'élément CRE (cAMP Response Element) le site potentiel de fixation du facteur CREB (cAMP responsive Binding Protein). B. L'activation transcriptionnelle nécessite l'interaction du RA avec les co-facteurs de la famille de p160 et de CBP/p300.

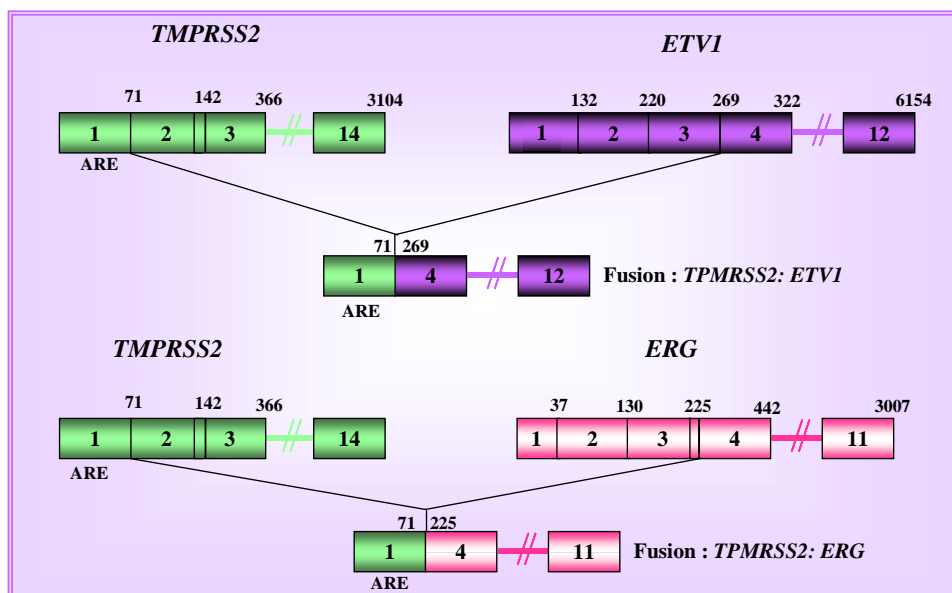
b.) Le gène *TMPRSS2*

Récemment, une surexpression des facteurs transcriptionnels oncogéniques *ETV* (E26 Transformation-specific oncogen (ETS) variant gene) et *ERG* (V-ETS Avian

Erythroblastic Transformation (E26 Oncogenes Related) appartenant à la famille *ETS* (E26 Transformation-specific oncogenes) a été décrite dans le cadre du CaP. La famille des facteurs *ETS* est impliquée dans l'intégration des signaux engagés dans la régulation de la croissance cellulaire, de la différenciation et de la réponse au stress des cellules (Petrovic G *et al.*, 2005).

Cette surexpression est due à des translocations récurrentes avec fusions géniques entre la région promotrice du gène androgéno-dépendant *TPMRSS2* localisé en position q22 du chromosome 21 et le facteur *ERG* situé sur le même chromosome en position 21q22.3. Alternativement, la région promotrice du gène *TPMRSS2* peut être transloquée en amont de gènes codant pour les facteurs appartenant à la famille *ETV*, comme *ETV1* en 7p21 ou *ETV4* en 17q21. Ces translocations aboutissent aux gènes de fusion *TPMRSS2:ERG*, *TPMRSS2:ETV1* ou *TPMRSS2:ETV4*, dont l'expression devient ainsi androgéno-dépendante. L'expression de ces gènes de fusion dans les cellules du CaP pourraient promouvoir leur croissance et jouer un rôle important dans la carcinogenèse prostatique (Tomlins SA *et al.*, 2005) (Figure 21).

Figure 21 : Représentation schématique des fusions de gènes *TPMRSS2 : ERG* et *TPMRSS2 :ETV1*



Légende Figure 21 : Les fusions de gènes *TPMRSS2 : ERG* et *TPMRSS2 : ETV1* ont lieu au niveau de la région promotrice du gène *TPMRSS2* incluant l'exon 1 et la jonction entre l'exon3/exon 4 des oncogènes *ERG* ou *ETV1*.

Suivant les études, les réarrangements chromosomiques issus de fusions géniques *TMPRSS2 : ETS* seraient présents dans 50 à 70 % des CaPs (Tomlins SA *et al.*, 2005). Ces fusions sont responsables de la surexpression des oncogènes ERG et ETV dans les cellules cancéreuses prostatiques et par là même contribueraient à l'agressivité de la tumeur. Les cellules cancéreuses arborant ces fusions géniques, possèdent des caractéristiques morphologiques spécifiques aussi, la recherche de ces fusions au niveau des tumeurs pourrait devenir ainsi un moyen de diagnostic routinier (Mosquera JM *et al.*, 2007).

Enfin, l'implication de ces facteurs dans l'intégration de signaux de prolifération permet d'établir un lien entre le RA et la prolifération de cellules cancéreuses et la progression du CaP.

7.) Actions non génomiques du récepteur des androgènes

Les actions non génomiques définissent une signalisation rapide et non nucléaire des RNs, se déroulant dans les minutes qui suivent la stimulation par le ligand. La signalisation rapide des récepteurs aux hormones stéroïdes a été décrite pour la première fois il y a trente ans et aujourd'hui est admise comme un mode d'action alternatif de presque tous les récepteurs stéroïdiens incluant le GR, le PR, les deux ERs et le RA (Cancela L *et al.*, 1988).

a.) Activités non génomiques directes

Les actions non génomiques, par la transduction d'un second messager, activent les cascades de signalisation des Protéine Kinase A (PKA), Protéine Kinase B (PKB/Akt) ou encore de MAPK (Heinlein CA et Chang C, 2002).

En effet, le RA, le PR et l'ER sont capables d'activer les voies de signalisation MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular-signal-regulated kinase) par un mécanisme indépendant de leur activité transcriptionnelle (Kousteni S *et al.*, 2001).

Un des mécanismes d'activation de la cascade de signalisation des MAPK implique la tyrosine kinase c-Src. Ainsi, une minute seulement après stimulation par la DHT, le RA interagit avec le domaine SH3 de c-Src entraînant son activation. Le traitement par la DHT, dans un temps compris entre 2 et 5 minutes, stimule deux autres membres de la cascade de signalisation de MAPK, Raf-1 et ERK-2. L'induction de ces cascades de signalisation Src/Raf/ERK est inhibée par les anti-androgènes, mais n'est pas affectée par les inhibiteurs de transcription ou de la synthèse protéique tels que l'actinomycine D ou le cycloheximide démontrant que ces activités sont spécifiques du RA mais indépendantes de ses activités de facteur de transcription (Heinlein CA et Chang C, 2002).

D'autre part, un récepteur membranaire, MNAR (Modulator of non genomic activity of estrogen receptor), modulateur de l'activité non génomique, a récemment été identifié. MNAR possède plusieurs motifs « LxxLL » et « PxxP » (régions riches respectivement en résidus leucines (L) et prolines (P)) interagissant avec l'ER α et le domaine SH3 de c-Src, le même type d'interaction a également été suggéré entre le RA, MNAR et c-Src (Unni E *et al.*, 2004, Freeman MR *et al.*, 2005).

Les actions non génomiques seraient également influencées par la localisation du RA. En effet, certaines études ont montré qu'un RA déficient dans sa fonction de liaison à l'ADN et de translocation nucléaire était doté d'activités non génomiques plus importantes qu'un RA sauvage (Unni E *et al.*, 2004).

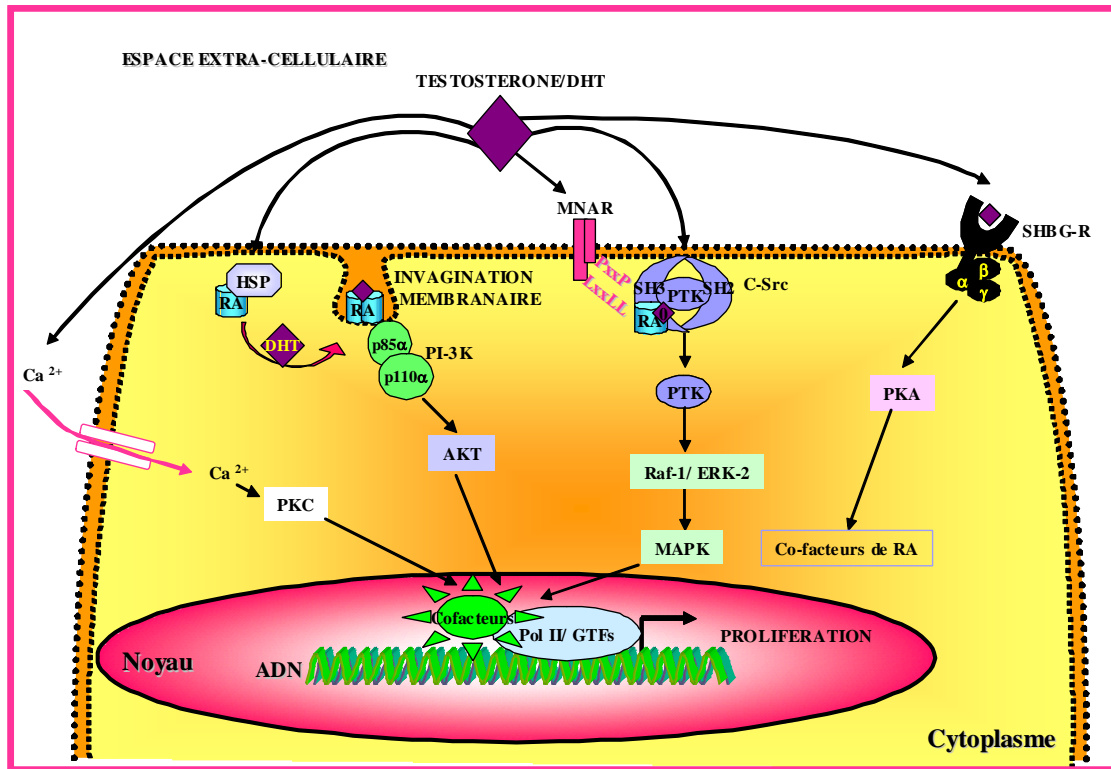
Par ailleurs, le RA peut être localisé dans des compartiments cellulaires particuliers qualifiés de « lipidic rafts », localisés au niveau des invaginations membranaires des cellules, à partir desquels une activation des voies de signalisation PI-3K/Akt a été observée (Freeman MR *et al.*, 2005). D'autre part, une interaction activatrice directe entre la sous-unité p85 α de PI-3K et le RA a également été décrite. Cette interaction entraînerait la phosphorylation de AKT (Baron S *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données suggère que le RA activerait PI-3K en se complexant à sa sous-unité p85 α au niveau des invaginations membranaires.

De surcroît, les androgènes peuvent directement agir au niveau du récepteur des hormones sexuelles (SHBGR) et activer la PKA, ou alternativement influencer sur un

second messenger comme le calcium, et activer la PKC (Heinlein CA et Chang C, 2002) (Figure 22).

Figure 22 : Actions non génomiques du récepteur des androgènes et des androgènes



Légende Figure 22: Les actions non génomiques du RA et des androgènes se distinguent par l'activation des voies de signalisation PKC (Protéine Kinase C), PI-3K/Akt (Phosphoinositide-3 Kinase/Protéine Kinase B), PKA (Protéine kinase A), et la cascade de signalisation des MAP Kinases, incluant Raf et ERK (Extracellular-signal-regulated kinase). Toutes ces voies de signalisation dans les cellules cancéreuses collaborent dans un but commun, soutenir la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose.

b.) Autres activités non génomiques

i. Voie de signalisation du facteur AP-1

La dénomination « AP-1 » (Activation Protein 1) est attribuée un groupe de protéines structurellement et fonctionnellement liées dont les membres principaux sont constitués par les protéines Fos (FosB, Fra-1, Fra-2) et Jun (JunB, JunD). Le facteur transcriptionnel AP-1 est un complexe dimérique pouvant être constitué de plusieurs combinaisons de ces protéines, formant des homo- ou des hétérodimères. Par ailleurs

les membres de la famille des facteurs de transcription ATF (Activating transcription Factor) ou MAF (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) forment également des complexes avec AP-1 et en particulier avec Jun. La composition du facteur AP-1 est déterminante pour le choix des gènes cibles de ce facteur (Hess J *et al.*, 2004).

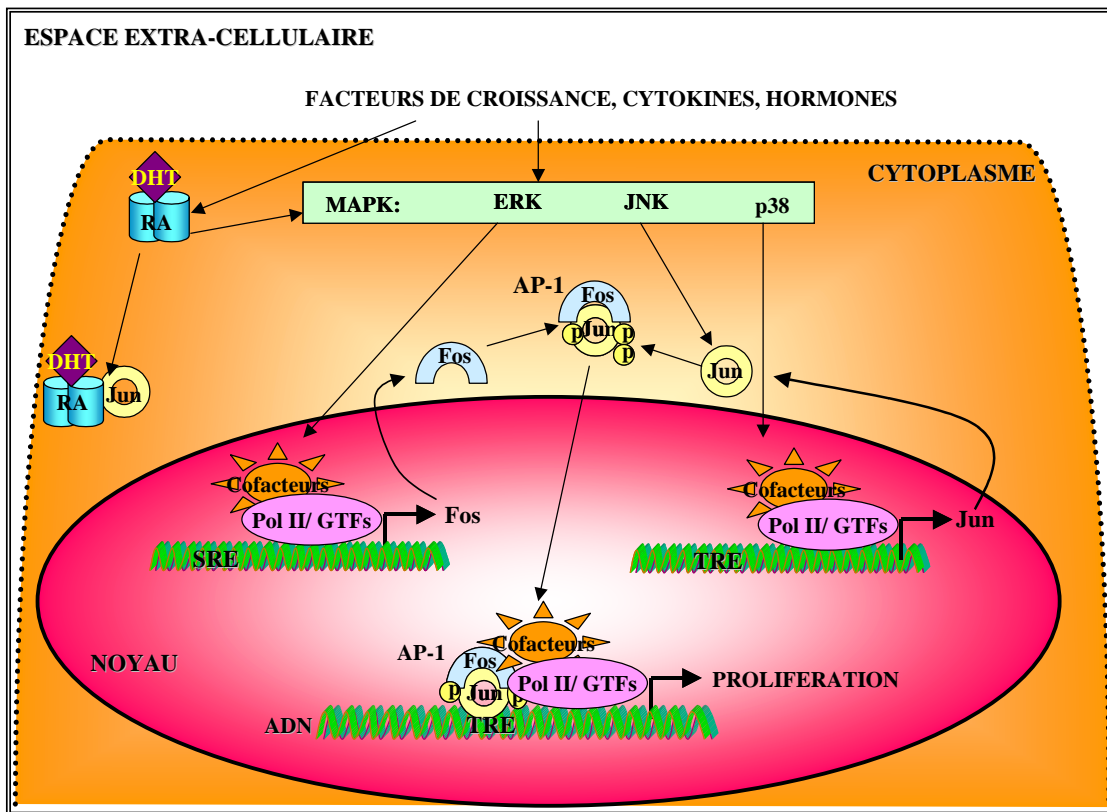
Les protéines AP-1 sont des facteurs de transcription à «leucine-zipper», domaine responsable de leur dimérisation, un pré-requis pour la fixation au niveau de l'ADN. Les facteurs AP-1 reconnaissent la séquence consensus, « 5'TGAGCTCA-3' », appelée TRE pour 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) Responsive Element située en amont de gènes, dont les produits sont impliqués dans la prolifération, la croissance, la transformation et la survie cellulaire (Eferl R et Wagner EF, 2003).

Les activités transcriptionnelles du facteur AP-1 sont régulées à de multiples niveaux, incluant les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles, les signaux émanant des cascades de signalisation MAPK/ERK, ainsi que la composition dimérique du facteur et les interactions protéine/protéine qu'il établit.

L'interaction directe entre le DBD du RA et le domaine « leucine zipper » du facteur Jun est une autre manière de régulation du facteur AP-1. En effet, de par son interaction avec Jun, le RA peut séquestrer cette protéine et ainsi empêcher la formation du complexe AP-1 contenant cette protéine. Cette interaction serait mutuellement inhibitrice pour les deux partenaires (Sato N *et al.*, 1997, Wise SC *et al.*, 1998, Edwards J *et al.*, 2004).

De plus, comme décrit plus haut, le RA intervient dans la régulation des voies de signalisation MAPK/ERK, impliquées également dans la régulation du complexe AP-1. Ainsi, l'interaction entre le facteur AP-1 et les voies de signalisation est une autre manière d'influer sur la signalisation du complexe AP-1 (Figure 23).

Figure 23 : Mode d'action des facteurs AP1



Légende Figure 23 : Les facteurs transcriptionnels AP-1 sont régulés par les signaux extracellulaires et par les voies de signalisation MAPK, JNK (Jun N-terminale Kinase), p38, ERK influant directement sur la transcription des gènes Jun et Fos, puis par les interactions protéine/protéine pouvant être établies entre Jun et Fos et les autres facteurs de transcription tels que le RA. Le RA peut exercer des activités inhibitrices sur le facteur AP-1 en séquestrant Jun.

ii. La voie de signalisation du facteur NF- κ B

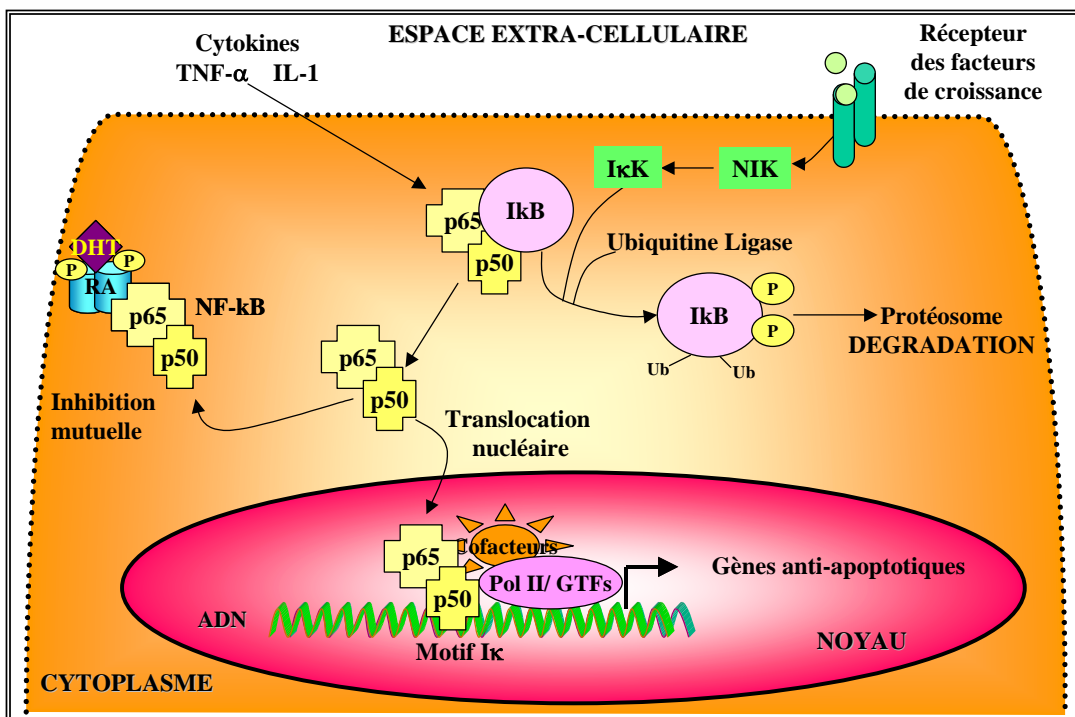
Les protéines de la famille de NF- κ B (Nuclear Factor κ B) ont été originellement décrites dans les cellules lymphocytaires B, néanmoins il est aujourd'hui admis que ces facteurs sont exprimés de façon ubiquitaire dans de nombreux types cellulaires. Ces facteurs de transcription régulent de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La famille protéique de NF- κ B est composée de cinq membres, c-Rel, RelA ou p65, RelB et NF- κ B1 ou p50 et NF- κ B2 pouvant former des homo- ou des hétérodimères pour activer la transcription de leurs gènes cibles (Suh J et Rabson AB, 2004).

Dans la plus part des cellules, les protéines NF- κ B résident dans le cytoplasme où elles sont maintenues inactives en formant des complexes avec les kinases I κ B

(Inhibitors of κ B). L'arrivée de signaux tels que le $\text{TNF}\alpha$ (Tumour Necrosis Factor alpha) ou l'interleukine-1 active la protéine $\text{I}\kappa\text{K}$ ($\text{I}\kappa\text{B}$ Kinase) qui en phosphorylant $\text{I}\kappa\text{B}$ libère le facteur $\text{NF-}\kappa\text{B}$.

Par ailleurs, le RA peut également influencer les activités transcriptionnelles du facteur $\text{NF-}\kappa\text{B}$. En effet, la sous-unité p65 est capable d'interagir avec l'extrémité N-terminale du RA, entre le résidu 297 et le DBD. Cette interaction entre les deux protéines exerce un effet mutuellement antagoniste (Palvimo JJ *et al.*, 1996). Alors que d'autres auteurs démontrent qu'une surexpression des sous-unités p50 et p65 entraînerait une activité plus importante à partir des promoteurs RA-dépendants, indiquant que l'effet antagoniste ne peut pas être généralisé (Zhang L *et al.*, 2004) (Figure 24).

Figure 24 : Mode d'action des facteurs $\text{NF-}\kappa\text{B}$



Légende Figure 24 : Les facteurs de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$, à l'état inactif résident dans le cytoplasme, complexés à la protéine $\text{I}\kappa\text{B}$. L'arrivée dans la cellule de signaux stimulateurs, active entre autres la kinase NIK ($\text{NF}\kappa\text{B-}$ inducing Kinase) qui a son tour active la kinase $\text{I}\kappa\text{K}$ responsable de la phosphorylation de $\text{I}\kappa\text{B}$. Cette phosphorylation, entraîne la libération du complexe $\text{NF-}\kappa\text{B}$, sa translocation nucléaire et sa fixation au niveau d'ADN sur les motifs $\text{I}\kappa\text{B}$. $\text{I}\kappa\text{K}$ est ubiquitinée et dégradée au niveau du protéosome.

8.) Les mutations touchant le récepteur des androgènes

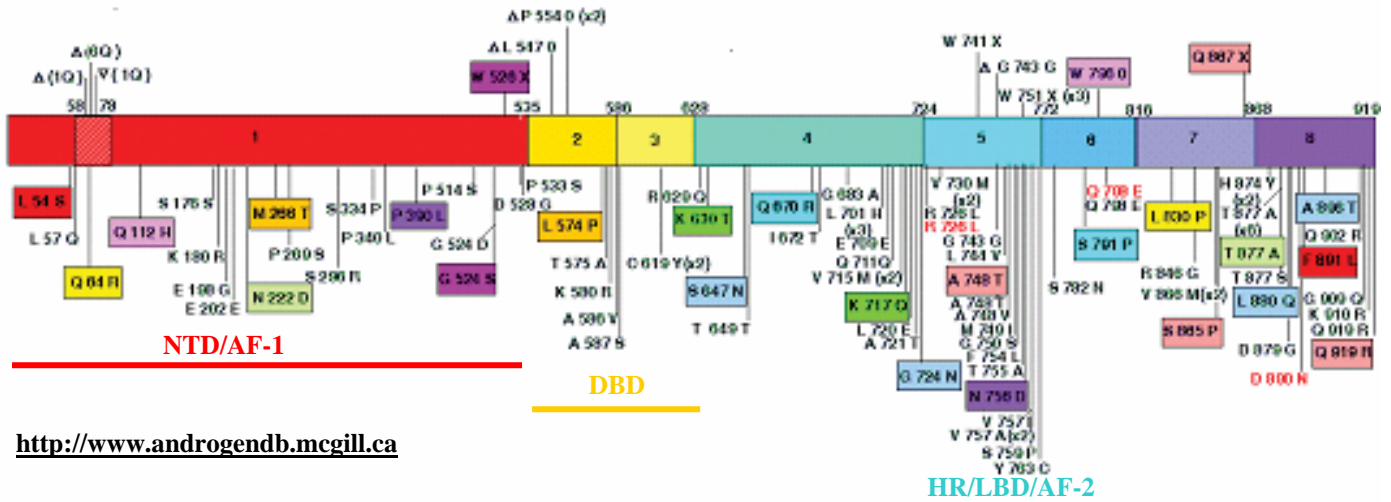
Comme décrit précédemment, quatre des cinq voies caractérisées comme étant impliquées dans la progression du CaP vers l'androgéno-idépendance engagent le RA. Ces voies peuvent rendre le RA hypersensibles aux androgènes circulants, le rendre inductible par d'autres ligands non androgéniques, ou voire même indépendant de tout ligand ou encore influencer sa capacité d'activation des voies de signalisation comme MAPK/ERK ou PI-3K et des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (cf. Tableau 3 et 6) (Feldman B et Feldman D, 2001, Lapouge G *et al.*, 2007).

Lors du diagnostic initial plus de 90% des CaPs restent dépendants du RA, ce dernier continuant d'être exprimé voire même surexprimé. Cette caractéristique des CaPs permet l'utilisation du « blocage androgénique » en guise de traitement de première ligne.

Les mutations du RA sont présentes dans 20 à 45 % des CaPs métastatiques n'ayant pas subi d'hormonothérapie, suggérant que la privation androgénique n'est pas responsable de l'apparition des mutations du RA. Ceci n'exclue cependant pas le fait que l'hormonothérapie pourrait entraîner la sélection de mutations conférant des avantages de survie ou de prolifération aux cellules cancéreuses.

A ce jour, 85 mutations distinctes du RA ont été détectées dans le CaP, et la majorité d'entre elles sont des mutations ponctuelles, résultant en une simple substitution d'acide aminé et concernent principalement la région carboxy-terminale du RA (Heinlein CA et Chang C, 2004, Gottlieb B *et al.*, 2004) (Figure25).

Figure 25 : Positions des mutations localisées au niveau du récepteur des androgènes



a.) Les mutations affectant le domaine de liaison au ligand du récepteur des androgènes

Les mutations du RA survenant dans le LBD sont susceptibles de modifier considérablement le spectre de sa spécificité envers les différents ligands agonistes ou antagonistes potentiels. Ainsi, la mutation T877A, le plus fréquemment décrite dans les CaP, tout en augmentant la sensibilité du RA vis-à-vis de la DHT, le rend activable par l'hydroxyflutamide. Par ailleurs, la mutation T877A renforce également les interactions du RA avec les motifs de type « FxxLF », présents au niveau de nombreux co-facteurs tels que la famille p160 (Tan J *et al.*, 1997, Ozers MS *et al.*, 2007).

Une autre mutation ponctuelle, L701H, diminue considérablement l'affinité du RA pour la DHT tout en le rendant activable par l'hydrocortisone et d'autres glucocorticoïdes (Zhao XY *et al.*, 1999).

D'autre part, l'interaction avec les co-facteurs peut contribuer au choix du ligand nécessaire pour l'induction de l'activité transcriptionnelle du RA. Le co-activateur le mieux étudié, pouvant élargir la spécificité du RA vis-à-vis du ligand est l'ARA70. Ainsi, l'ARA70 peut rendre le RA sauvage activable par deux anti-androgènes, l'hydroxyflutamide et le bicalutamide. D'autre part, l'interaction entre ARA70 (Androgen Receptor C-oactivator 70) et le RA muté T877S originellement détecté dans un CaP hormono-réfractaire autorise son induction par la DHEA ou

l'androstènediol. D'autres co-régulateurs tels que l'ARA55 permettent au RA d'être activé en présence d'œstrogènes (Heinlein CA et Chang C, 2004).

b.) Les mutations affectant le domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes

Les mutations au niveau du DBD du RA ont été principalement détectées dans les cas d'insensibilité partielle (SIAP : Partial Androgen Insensitivity Syndrome) ou totale (SIAC : Complete Androgen Insensitivity Syndrome) aux androgènes. Néanmoins, 17% d'entre elles sont également engagées dans les CaPs (Figure 26) (Verrijdt G, *et al.*, 2006).

Les mutations au niveau du DBD seraient responsables de la modification de spécificité d'interaction avec l'ADN, mais également de l'altération des capacités de dimérisation et de translocation nucléaire du récepteur, souvent elles entraînent une perte de fonction du RA qui devient incapable d'exercer ses fonctions de facteur transcriptionnel.

Ainsi, les variants du RA portant les mutations G551V et C562G au niveau du premier doigt de zinc possèdent une moindre affinité pour les éléments ARE et une capacité de transactivation réduite. Cependant ces variants accentuent la fonction de répression du RA sur le facteur AP-1 et diminuent celle exercée sur le facteur NF- κ B.

Par ailleurs, la substitution R590Q au niveau du second doigt de zinc, diminue les capacités de transactivation du RA à partir d'un promoteur comportant un ARE unique, alors que l'activité transcriptionnelle à partir d'un promoteur possédant de multiples ARE n'est pas affectée (Aarnisalo P *et al.*, 1999).

D'autre part, les 81 derniers acides aminés de région N-terminale du RA referment un domaine dit « inhibiteur » responsable par son interaction directe avec le DBD de l'altération de la reconnaissance des ARE et des capacités de transactivation du RA. Les substitutions touchant les acides aminés conservés K520E et R538E augmenteraient spécifiquement les capacités de transactivation du RA (Liu GZ *et al.*, 2003).

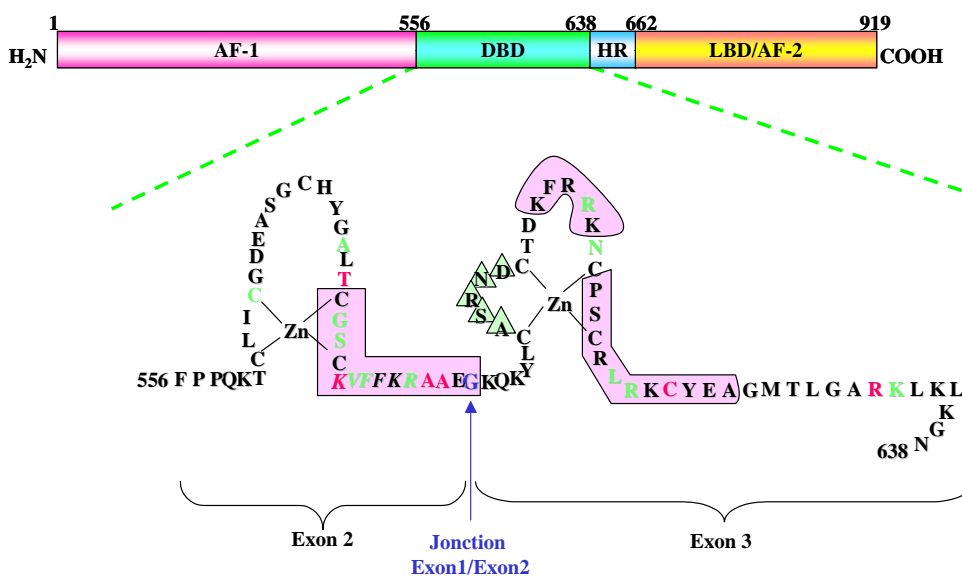
Au sein du laboratoire, dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) (cf : chapitre Matériel et Méthodes), nous avons mis en évidence une

substitution T575A au niveau du premier doigt de zinc du DBD du RA (Monge A *et al.*, 2006). Cette mutation a été détectée dans un CaP métastatique en échappement hormonal et contrairement aux exemples de mutations décrites ci-dessus, en modifiant la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse aux hormones du RA, cette substitution serait responsable d'un « gain de fonction » du RA muté. Comme nous allons le voir par la suite, j'ai consacré une partie de mon travail de thèse à l'étude de cette mutation.

Ainsi, les mutations les plus fréquemment observées au niveau du DBD du RA sont des mutations faux-sens ou non-sens, cependant un certain nombre d'entre elles résulte en des erreurs d'épissage aboutissant à des insertions ou à des délétions de séquences exoniques ou introniques.

Ainsi, une mutation au niveau du site d'épissage entre les exons 2 et 3 résulte en l'utilisation d'un site accepteur cryptique conduisant à la conservation de 69 derniers nucléotides de l'intron 2 au niveau de l'ARN messager mature. Cette mutation a été décrite à plusieurs reprises dans le cadre de SIAP, cependant nous apportons pour la première fois la preuve de l'existence d'une telle mutation dans le CaP (Bruggenwirth HT *et al.*, 1997, Jaaskelainen J *et al.*, 2006, Jagla M *et al.*, 2007). L'étude des propriétés structurales et fonctionnelles d'un RA portant cette mutation a constitué la seconde partie de ma thèse.

Figure 26 : Position des mutations au niveau du DBD du récepteur des androgènes retrouvées dans les cancers de la prostate et dans le syndrome d'insensibilité aux androgènes



Légende Figure 26 :
 Représentation schématique du RA et de son domaine de liaison à l'ADN structuré en deux doigts de zinc. Les cases roses représentent les hélices α , les acides aminés en rouges sont fréquemment mutés dans les CaPs et les acides aminés en vert dans le SIAC/SIAP.

9.) Le mécanisme d'épissage

Chez les organismes eucaryotes, un gène code fréquemment pour plusieurs isoformes d'une protéine. Ce phénomène est dû à l'existence d'un épissage alternatif qui permet à partir d'un seul ARN messager d'obtenir différents isoformes d'une protéine donnée.

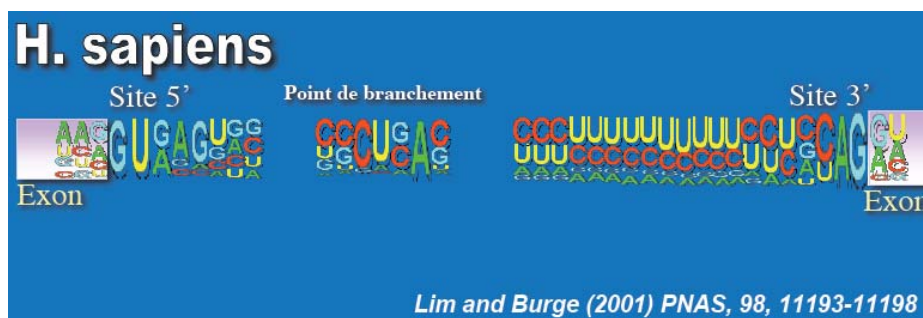
En effet, après la transcription, les ARN messagers eucaryotiques sont formés de parties « codantes » ou exons et de séquences « non codantes » ou introns. Au cours du processus de maturation, les introns sont excisés et les exons sont reliés les uns aux autres. Ce processus appelé épissage, est assuré par un ensemble de complexes ribonucléoprotéiques appelé collectivement spliceosome. Les jonctions intron/exon contiennent des séquences nucléotidiques spécifiques et conservées reconnues par le spliceosome. Les introns contiennent en plus une séquence particulière qualifiée de « boîte de branchement » jouant un rôle primordial au cours du processus d'épissage (Figure 27).

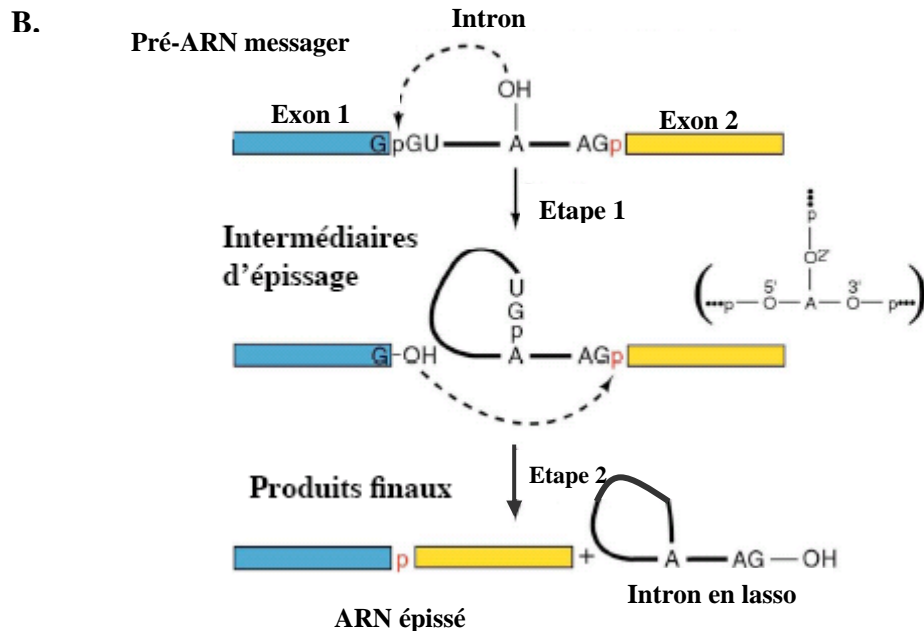
L'épissage alternatif en excisant certains exons en même temps que les introns permet de réaliser différentes combinaisons exoniques à partir d'un même ARN messager. Un changement au niveau de sites consensus d'épissage, conduit à des erreurs, donnant naissance à de protéines mutées et parfois même non fonctionnelles (Hellwinkel OJ *et al.*, 2001).

De plus, des données récentes accordent une place très importante à des mécanismes d'épissage aberrants au cours de la carcinogenèse (Pajares MJ, *et al.*, 2007).

Figure 27 : Schéma de l'organisation des jonctions exon-intron-exon et du mécanisme d'épissage

A.





Légende Figure 27 : A. Les jonctions exon/intron contiennent des séquences nucléotidiques spécifiques et conservées : ainsi le site donneur d'épissage en 5' est le plus fréquemment constitué par AG/GU et le site accepteur en 3' par AG/GG. D'autres combinaisons moins fréquentes mais possibles sont également indiquées. Par ailleurs, l'adénosine au niveau du point de branchement est particulièrement importante. B. L'épissage s'effectue en deux temps : on a tout d'abord une attaque nucléophile de la fonction 2'-OH du ribose de l'adénosine de la boîte de branchement sur le phosphate de la jonction exon/intron en 5'. Après cette coupure, le 3'-OH libéré au niveau de l'exon 1 attaque le phosphate de la jonction intron/exon 2. Les produits de cette réaction sont d'une part les deux exons ligaturés correctement et d'autre part, l'intron cyclisé « en lasso » au niveau de l'adénosine de la boîte de branchement.

10.) Les mutations au niveau du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes et le Syndrome d'Insensibilité aux Androgènes (SIA)

Le SIA, ou Syndrome d'Insensibilité aux Androgènes est une maladie génétique rendant les fœtus masculins XY, insensibles aux hormones sexuelles masculines, résultant en un phénotype féminin.

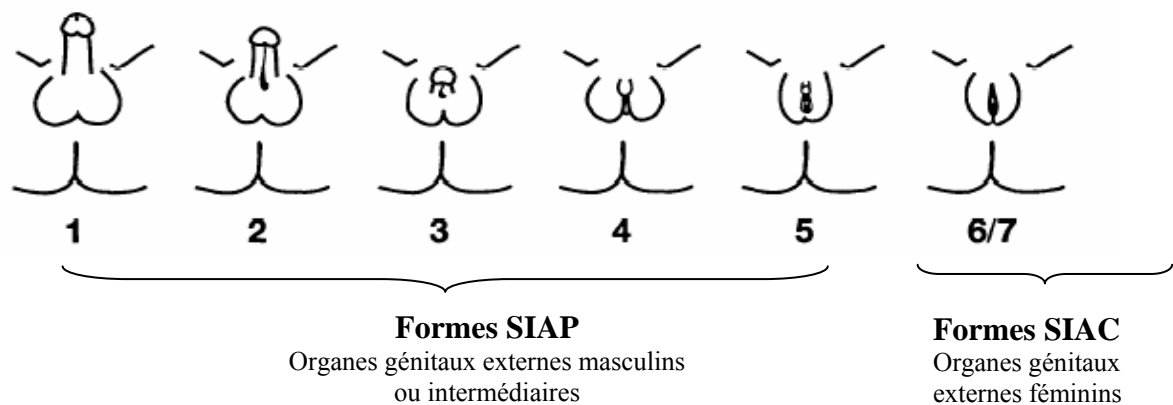
Les formes de SIA peuvent être plus ou moins sévères, allant de perturbations partielles de la différenciation sexuelle à un phénotype entièrement féminin chez les individus 46 XY. Une caractéristique importante chez ces individus est la présence de taux sériques d'androgènes normaux voire même élevés (Quigley CA *et al.*, 1995) (Figure 28).

Les sujets atteints de la forme sévère de SIAC pour Syndrome d'Insensibilité aux Androgènes Complète, naissent avec des organes génitaux externes féminins. Ils ne possèdent ni utérus, ni trompes de Fallope, ni ovaires, mais au contraire leur abdomen renferme des bourgeons testiculaires non développés. Les individus atteints de SIAC sont stériles. Cette forme sévère de la pathologie, est usuellement détecté à la puberté, lorsque la jeune fille ne présente pas de cycle menstruel.

Les formes de SIAP pour Syndrome d'Insensibilité Partielle aux Androgènes, peuvent être mineures, les sujets présentent alors un phénotype masculin avec des organes génitaux externes normaux cependant ils sont atteints de stérilité. Des formes plus sévères de SIAP aboutissent à un phénotype ambigu, avec des organes génitaux externes intermédiaires entre ceux d'un sujet mâle et d'un sujet femelle (Figure 28).

Figure 28: Les différentes formes de Syndrome d'insensibilité aux Androgènes

D'après Quigley CA et al., 1995



La sévérité des formes de SIA est liée aux capacités de transactivation du RA. En effet, la fréquence des mutations du RA est supérieure à 95% dans les formes complètes, et inférieure à 50% dans les formes partielles (Gottlieb *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans les formes SIAC, le RA est fréquemment transcriptionnellement inactif, alors que dans les formes partielles, diverses formes de compétence transcriptionnelle ont pu être démontrées (De Bellis A *et al.*, 1994, Beitel LK *et al.*, 1994, Bruggenwirth HT *et al.*, 1997, Jaaskelainen J *et al.*, 2006).

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Détection des mutations par le test fonctionnel chez la levure

1.) Introduction

Le CaP est un cancer hormono-dépendant, aussi la prolifération de cellules cancéreuses est soutenue par les hormones sexuelles mâles comme la testostérone ou la DHT, et cette dépendance vis-à-vis des androgènes est mise à profit dans les traitements hormonaux de la prostate. Plus de 90% des patients répondent aux hormonothérapies de première ligne mais cette réponse est transitoire, sa durée variant de quelques mois à quelques années, la médiane étant de 12-18 mois environ. Après échappement à cette première ligne d'hormonothérapie, les réponses aux manipulations hormonales alternatives sont rares, la tumeur étant en échappement hormonal.

Il est clairement établi que la voie de signalisation des androgènes joue un rôle prépondérant dans cet échappement à la privation androgénique. Aussi, la surexpression du RA ou la présence de mutations au niveau de ce récepteur est fréquemment observée dans le CaP en échappement hormonal.

Pour cette raison, un test fonctionnel chez la levure a été mis au point au laboratoire. Il permet de détecter les mutations du RA dans les échantillons tumoraux de CaP. Ce test est basé sur les capacités d'activation transcriptionnelle du RA et permet également d'étudier le profil de sensibilité des mutants aux différentes hormones stéroïdes utilisées en hormonothérapie (Céraline *et al.*, 2003).

2.) Principe du test fonctionnel chez la levure

Ce test est inspiré de celui de Iggo R (Ishioka C *et al.*, 1993), mis au point dans la levure pour détecter les mutants de p53 au moyen d'un gène rapporteur. Dans le test fonctionnel mis au point au laboratoire, l'auxotrophie de la souche de levures utilisée

pour l'adénine et pour le tryptophane va être mise à profit. Ces deux gènes vont être utilisés séquentiellement pour sélectionner les levures.

En effet, le gène codant pour une enzyme responsable la biosynthèse d'une base purique, l'adénine, nécessaire à la prolifération des levures, est délété. Ainsi, nos levures ont un statut *ade2-* et sont incapables de pousser en milieu dépourvu d'adénine. Le gène *ADE2* a été réintroduit dans la souche de levures, par le biais d'un plasmide intégratif, dans lequel il est placé sous le contrôle d'un promoteur androgéno-dépendant faible, contenant trois répétitions d'un motif ARE. La souche de levure ainsi obtenue a été appelée EJ250. Le gène *ADE2* devenu androgéno-dépendant est transcrit seulement si le RA exprimé dans la levure reconnaît le ligand ajouté au milieu de culture et s'il a conservé ses capacités de liaison aux éléments ARE. Le RA du patient est introduit dans la levure par le biais d'un plasmide Gap-repair portant le gène du tryptophane TRP-1.

Dans ce système, la croissance des levures dépend de l'affinité du RA exprimé pour le ligand ajouté au milieu de culture et de l'affinité du RA pour les éléments AREs présents en amont du gène *ADE2* (Figure 29).

Ce test permet ainsi de mettre en évidence deux types de mutations du RA.

Le premier type concerne le spectre de sensibilité du RA testé vis-à-vis des différentes hormones stéroïdes, ligands agonistes et antagonistes ajoutés dans le milieu de culture, et permet ainsi de mettre en évidence des mutations au niveau du LBD.

Le second type de mutations pouvant être mises en évidence grâce à ce test concerne le DBD du RA. Dans ce deuxième cas de figure, un RA muté va avoir une affinité pour les AREs modifiée, augmentant ou au contraire diminuant l'expression du gène *ADE2*.

Lors de ce test, deux cas de figures peuvent se présenter :

- *Le récepteur exprimé dans la levure est sauvage* : il sera alors activé par ses ligands naturels (DHT et T) et va conduire à l'expression du gène *ADE2*. Les levures deviennent alors *ade2+* et vont pouvoir pousser sur milieu sélectif, aboutissant à la formation de colonies. En présence d'un antagoniste ou d'une hormone autre que les ligands naturels, il n'y aura pas d'activation du RA et par conséquent pas d'expression du gène *ADE2*, les levures restent *ade2-* et ne poussent pas sur milieu sélectif.

□ *Le RA exprimé dans la levure porte une mutation qui modifie son spectre de spécificité vis-à-vis du ligand ou vis-à-vis de l'ADN :*

✓ Le RA exprimé dans les levures porte une mutation au niveau de son domaine de liaison au ligand :

Ce type de mutation peut modifier le spectre de sensibilité hormonale du récepteur, entraînant une formation de colonies en présence de stéroïdes autres que ceux normalement reconnus par le RA sauvage, et voire même en présence d'un anti-androgène comme le flutamide.

✓ Le RA exprimé dans les levures est dépourvu du domaine de liaison au ligand :

Ce type de mutation rend le récepteur actif de manière constitutive, dans ce cas il y aura croissance de levures en absence de tout ligand.

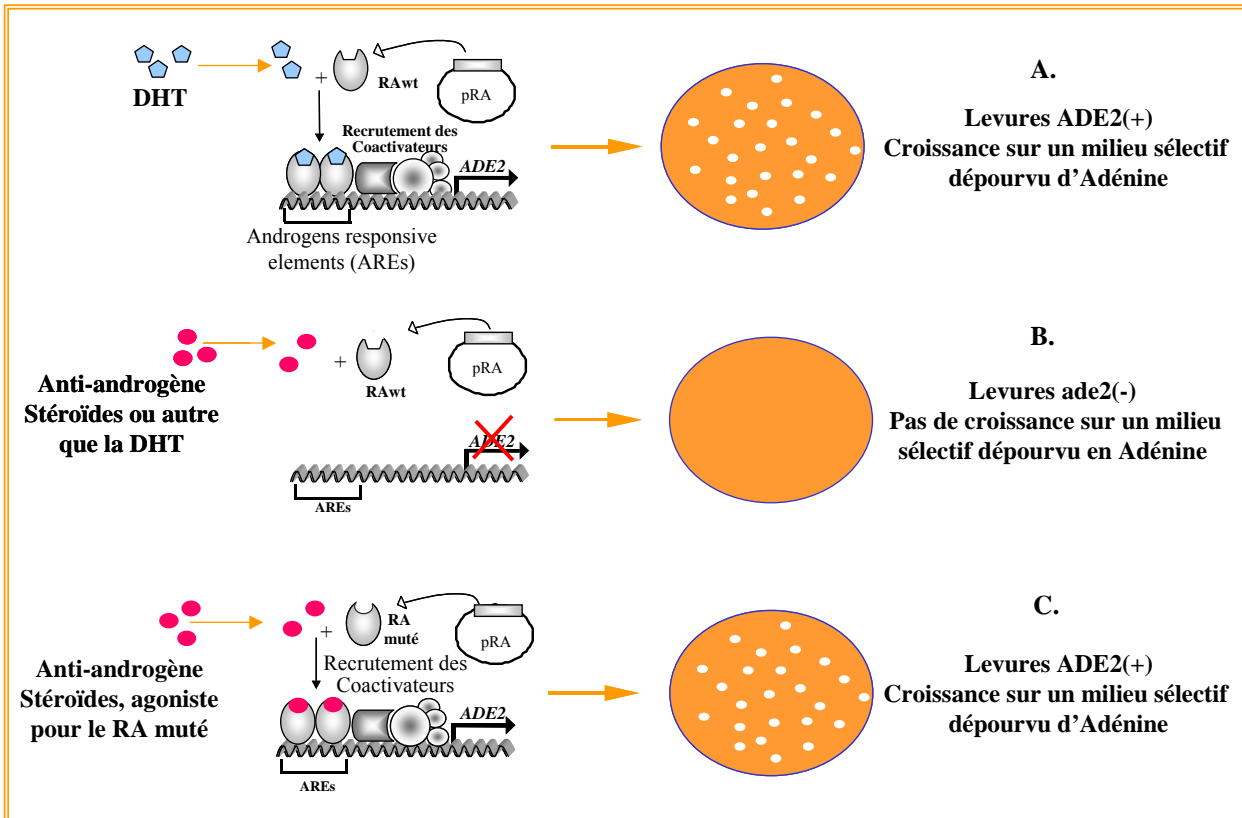
✓ Le RA exprimé dans les levures porte une mutation au niveau de son domaine de liaison à l'ADN:

Ce type de mutation modifie ou abroge la reconnaissance des séquences ARE par le RA muté, entraînant une croissance de levures altérée. Dans le cas où l'affinité du RA muté pour les AREs est augmentée une croissance plus élevée des levures sur milieu sélectif va être observée. Inversement, si la mutation ne permet pas la reconnaissance des AREs il n'y aura pas d'expression du gène *ADE2* et pas de formation de colonies levures. En dehors de ces deux extrêmes, des réponses intermédiaires peuvent également être obtenues.

Ce système va nous permettre d'établir « un hormonogramme » (cf : le chapitre : Résultats et Discussion), c'est à dire le profil de réponse de RA donnée en présence de différents agonistes et antagonistes de synthèse. Ces molécules comprennent les androgènes comme la DHT, les précurseurs androgéniques comme l'adrostènedione, la DHEA, la pregnénolone, mais également les oestrogènes (β -oestradiol), les progestatifs (progestérone, 17α -hydroxyprogestérone ou son dérivé synthétique la médroxyprogestérone), les glucocorticoïdes (hydrocortisone, acétate de cortisone), l'aldostérone, un minéralocorticoïde, un anti-minéralocorticoïde, la spironolactone, mais aussi le flutamide comme anti-androgène et l'acétate de cyprotérone comme agoniste partiel. Certaines de ces molécules testées dans ce test fonctionnel sont utilisées dans les

lignes d'hormonothérapie comme le flutamide, l'hydrocortisone et la médroxyprogestérone et l'acétate de cyprotérone.

Figure 29 : Test fonctionnel chez la levure EJ250 :



Légende Figure 29 : **A.** Le RA sauvage exprimé dans la levure reconnaît son ligand naturel, la DHT, ajoutée dans le milieu de culture. Le complexe RA/DHT ainsi formé, se lie de façon spécifique aux séquences ARE présentes au niveau du promoteur du gène rapporteur ADE2, permettant ainsi l'expression de ce dernier. Les levures deviennent dès lors *ade2+* et peuvent pousser sur un milieu sélectif dépourvu d'adénine. **B.** Le RA sauvage ne reconnaît pas comme agoniste les autres stéroïdes comme les glucocorticoïdes, les progestatifs et les oestrogènes. Il n'y a donc pas d'expression du gène ADE2 et donc pas de croissance de levures sur le milieu sélectif. **C.** Par contre un RA muté pouvant reconnaître d'autres stéroïdes ou anti-androgènes comme agonistes potentiels conduira le cas échéant à la prolifération des levures en absence de tout ligand, ou en présence de cet autre stéroïde ou anti-androgène. Un RA muté au niveau de son DBD induira ou pas une croissance de levures en fonction de son affinité pour les AREs.

Ce test fonctionnel a été utilisé dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique pour détecter la fréquence des mutations du RA dans les CaPs à différent stade de la maladie. Les cancers localisés (groupe A), les cancers métastatiques avant hormonothérapie (groupe B), en cours de traitement par privation

androgénique (groupe C), et après échappement à la privation androgénique (groupe D).

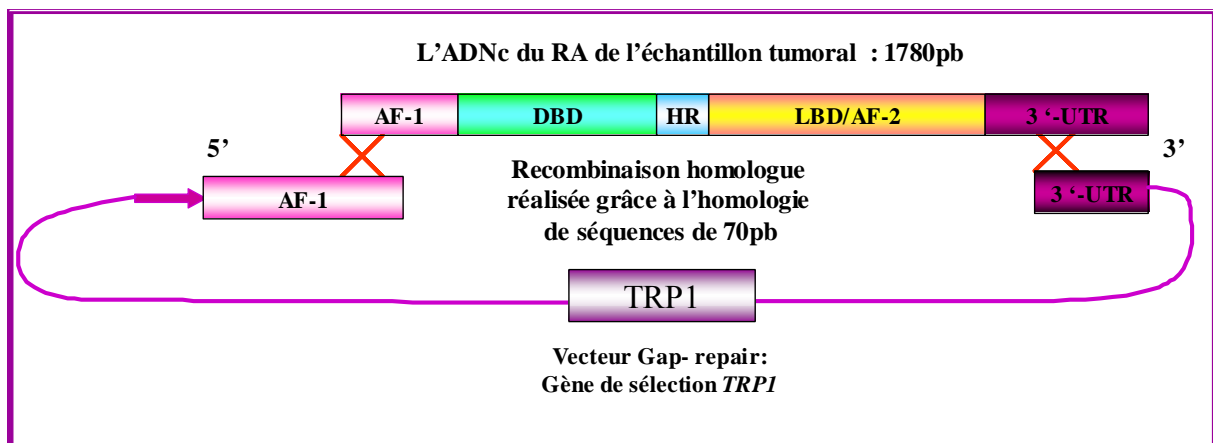
3.) Réalisation du test fonctionnel à partir de prélèvements tumoraux

La première étape de ce test fonctionnel consiste à extraire les ARN totaux à partir des prélèvements recueillis. Ces prélèvements peuvent être de deux types, il peut s'agir d'un fragment de la pièce opératoire (prostatectomie) pour les patients du groupe A, ou une ponction de moelle osseuse pour les patients des groupes B, C et D.

Une RT-PCR spécifique du RA est réalisée à partir de 400ng d'ARN pour amplifier un fragment d'ADNc du RA de 1780pb comprenant une partie de AF-1, le DBD, la région charnière et le domaine carboxy-terminal.

L'ADNc ainsi obtenu est inséré dans un vecteur linéarisé contenant au niveau de l'extrémité 5' une grande partie du domaine AF-1 du RA et en 3' une partie de l'extrémité 3'UTR. Ce vecteur renferme également le gène *TRP1* codant pour une enzyme intervenant dans la biosynthèse du tryptophane. L'expression de ce gène est utilisée ensuite comme marqueur de sélection. L'ADNc du patient est inséré par recombinaison homologue dans la levure transformée (Figure 30).

Figure 30 : Principe d'expression du récepteur des androgènes du patient chez la levure lors du test fonctionnel



Légende Figure 30 : L'ADNc du RA est introduit par recombinaison homologue dans un vecteur Gap-repair lors de la transformation des levures. L'ADNc de l'échantillon tumoral correspond à un fragment de 1780pb du RA et ne comporte qu'une petite partie du domaine AF-1. Le vecteur Gap-repair apporte l'essentiel du domaine AF-1 et le gène de résistance au tryptophane permettant de sélectionner les levures transformées.

Les levures transformées sont ensuite étalées sur boîtes de culture contenant un milieu sélectif dépourvu en adénine et en tryptophane et additionné des différentes hormones ou molécules synthétiques à tester. Après 3 jours d'incubation à 30°C, les colonies de levures sont comptées et le profil de réponse hormonale du patient est ainsi réalisé. Les résultats obtenus pour chaque patient sont comparés à un hormonogramme de référence correspondant à celui du RA sauvage (cf. le chapitre : Résultats et Discussion).

Ce test fonctionnel nous a d'ores et déjà permis de détecter de nombreuses mutations du RA. Tout particulièrement, une nouvelle classe de mutation du RA conduisant à des récepteurs tronqués de leur partie carboxy-terminale (Lapouge G *et al.*, 2007) et à deux mutations au niveau du domaine de liaison à l'ADN que j'ai étudié au cours de ma thèse (Monge A *et al.*, 2006 et Jagla M *et al.*, 2007) (Tableau 7).

Tableau 7 : Exemple de mutations détectées par le test fonctionnel chez la levure au sein du laboratoire.

Type de mutation	Acide aminé	Changement	Localisation
Double substitution	575 et 877	Ala au lieu de Thr (T575A/T877A)	DBD et LBD
Insertion	589	Insertion de 23 acides aminés	DBD
Substitution	640	Codon stop au lieu de Gln (Q640X)	Région charnière
Substitution	670	Codon stop au lieu de Gln (Q670X)	LBD
Substitution	693	Codon stop au lieu de Gln (Q693X)	LBD
Substitution	701	Leu au lieu de His (L701H)	LBD
Substitution	709	Codon stop au lieu de Glu (E709X)	LBD
Substitution	711	Arg au lieu de Gln (Q711R)	LBD
Substitution	711	Codon stop au lieu de Gln (Q711X)	LBD
Substitution	738	Arg au lieu de Gln (Q738R)	LBD
Substitution	877	Ala au lieu de Thr (T877A)	LBD

Légende Tableau 7 : La majorité des mutations détectées sont localisées au niveau du LBD, et résultent de substitutions d'acides aminés. Elles aboutissent à des protéines tronquées lorsque la substitution entraîne la formation d'un codon stop, ou à des protéines dont la reconnaissance du ligand est modifiée. Deux mutations au niveau du DBD, une substitution et une insertion ont également été mises en évidence (en gras dans le tableau).

II. Protocoles expérimentaux

1.) Constructions plasmidiques

a.) Les constructions des plasmides d'expression

i. Les plasmides d'expression pSV-RA sauvage, pSV-AR23, pSV-RAT877A, pSV-RA575 et pSV-RA575/877A

Le plasmide d'expression du RA sauvage humain (Genbank, NM_000044), pSV-AR0, a été gracieusement donné par le Dr A.O. Brinkmann (Erasmus University, Rotterdam, Pays-Bas). Dans ce plasmide, l'expression du RA est placée sous le contrôle du promoteur SV40 (Simian Virus). Les plasmides d'expression des différents variants de RA étudiés, pSV-AR23, pSV-RAT877A, pSV-RA575 et pSV-RA575/877A ont été construits à partir du pSV-AR0 en remplaçant le fragment *BstEII* et *ECORI* du RA sauvage par le fragment équivalent RA muté. Ce fragment provient du plasmide d'expression chez la levure issu du test fonctionnel développé au sein du laboratoire pour la détection des mutations du RA (Céraline *et al.*, 2003 et 2004).

ii. Les plasmides d'expression pEGFP-RAwt et pEGFP-AR23, pEGFP-RA-T575A

L'ADNc du RA sauvage a été amplifié à partir du pSV-AR0 par PCR en utilisant les amorces sens 5'-GCCAAGCTCGAGAGGATGGAAGT-3' (site de restriction souligné : *XhoI*) et antisens 5'-TAGGGATCCAATGCTTCACTGGG-3' (site de restriction souligné : *BamHI*) puis inséré en phase avec la séquence codante pour l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) entre les sites *XhoI* et *BamHI* du plasmide d'expression pEGFP-C3 (Clontech laboratories, Ozyme Saint-Quentin, Yvelines, France) pour donner le plasmide d'expression pEGFP-RAwt (RA sauvage). De même, l'ADNc de l'AR23 et du RA T575A ont été amplifiés par PCR à partir des vecteurs pSV-AR23 et pSV-RA-T575A utilisant les mêmes amorces, et insérés entre les sites de restriction *XhoI* et *BamHI* du plasmide pEGFP-C3 pour donner les plasmides d'expression pEGFP-AR23 et pEGFP-RA-T575A. Dans ces plasmides, l'expression du gène de fusion EGFP-RA est placée sous le contrôle du promoteur fort CMV (Cytomégalo virus).

b.) Les constructions gène rapporteur luciférase

i. Le plasmide PSA61-luc

Le plasmide luciférase PSA-61-luc contient un fragment de 6-kb du promoteur du gène *PSA* humain et a été gracieusement donné par le Dr. J. Trapman (Erasmus University, Rotterdam). Ce fragment contient trois AREs, situés à -170 pb (AREI), -394 pb (AREII) et à -4.2kb (AREIII) du site d'initiation de transcription (Cleutjens *et al.*, 1997).

ii. Le plasmide MMTV-LTR-luc

Le plasmide luciférase MMTV-LTR-luc (mouse mammary tumour virus, Long terminal Repeats) a été gracieusement donné par le Pr. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France). Le promoteur LTR contient plusieurs GREs qui sont aussi reconnus par le RA.

iii. Les plasmides luciférase p-TA-AP-1-luc, p-TA-NF- κ B-luc, p-TA-SRE-luc et pTA-luc

Les plasmides pTA-luc, pTA-AP-1-luc et pTA-SRE-luc proviennent de chez Clontech (Clontech laboratories, Ozyme Saint-Quentin, Yvelines, France). La région promotrice TATA provient du promoteur de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex. Le plasmide pTA-NF- κ B-luc a été construit par l'insertion d'une séquence oligonucléotidique représentant les sites de liaison de NF- κ B entre les sites de restriction NheI et BglII au niveau du plasmide pTA-luc. Ces sites de liaison contiennent 4 répétitions du site du κ B du promoteur de l'IL-6 pour pTA-NF- κ B-luc (Suh J *et al.*, 2002).

iv. Le plasmide pDsRed2-ER

Le plasmide pDSRed2-ER provient de chez Clontech (Clontech laboratories, Ozyme Saint-Quentin, Yvelines, France). Il a été utilisé pour réaliser le marquage spécifique du réticulum endoplasmique. Ce plasmide renferme la séquence « 5'-AAGGACGAGCTG-3' » codant pour le motif « KDEL », responsable de la localisation de la protéine fluorescente DsRed au niveau du réticulum endoplasmique.

2.) Culture cellulaire

a.) La lignée LNCaP

La lignée LNCaP (Lymph Node Cancer Prostate) clone FGC (Fast Growth Cells) est une lignée de cellules épithéliales humaines dérivées d'un adénocarcinome prostatique humain provenant de la collection ECACC (European Collection of Cell Cultures, UK). Ces cellules sont dérivées d'une métastase développée au niveau du nœud lymphatique supra claviculaire gauche d'un patient âgé d'une cinquantaine d'années avec un diagnostic confirmé pour un carcinome prostatique métastatique. La culture de ces cellules est réalisée dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 10 % de SVF (Sérum de veau foetal) décomplémenté avec 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine, 2 mM de L-glutamine, 10 mM de HEPES et 1 mM de sodium Pyruvate.

b.) La lignée COS-1

La lignée COS-1 est une lignée de cellules de rein de singe vert. Ces cellules sont dérivées de la lignée cellulaire CV-1 et transformée par le virus SV40. Elle a été gracieusement fournie par le service de culture cellulaire de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire, Illkirch, France).

c.) La lignée PC-3

La lignée PC3 est une lignée humaine d'un adénocarcinome de la prostate. Elle a été établie à partir d'un adénocarcinome prostatique de grade 4 provenant d'un homme caucasien de 62 ans. Cette lignée cellulaire a été gracieusement donnée par le Dr M-F. Poupon de l'Institut Curie (Paris, France)

Ces deux lignées sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) supplémenté de 10 % de SVF décomplémenté et supplémenté de 2 mM de L-glutamine, de 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine.

3.) Le retardement sur gel (gel shift)

a.) Culture cellulaire et extraction protéique

Les cellules COS-1 sontensemencées à $1 \cdot 10^6$ cellules dans des boites de Pétri de 10 cm de diamètre. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules sont transfectées avec 15 μ g de plasmide d'expression pSV-RA, pSV-AR0 codant pour le RA sauvage, pSV-AR23 codant pour l'AR23, pSV-RA-T575A codant pour le RA T575A, pSV-RA-T877A codant pour le RA T877A et pSV-RA-T575A/T877A codant pour le double mutant RA T575A/T877A, en utilisant l'agent transfectant JetPEI (Polyplus, Ozyme, Illkirch).

Le JetPEI est un polymère linéaire de polyéthylène imine. Le groupement imine est chargé positivement et interagit avec les phosphates de l'ADN. Ce complexe JetPEI/ADN forme des micelles permettant le passage de l'ADN à travers la membrane cellulaire par endocytose. Dans nos conditions de transfection, un rapport ADN/JetPEI de 5 est utilisé. Vingt quatre heures après transfection les cellules sont traitées par 100nM de DHT ou par son diluant l'éthanol comme contrôle. Quarante-huit heures après transfection, les protéines nucléaires sont extraites d'après le protocole suivant. Les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir dans 1 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) et centrifugées 5 min à 1700 tr/min (tours par minute) à 4°C. Les culots sont repris dans un premier tampon (10 mM d'HEPES-KOH, 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl, 0.5 mM de DTT (Dithiothreitol), 20 mM de PMSF (PhénylMéthylSulfonylFluorure), 1X de cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC)) et incubés pendant 10 min sur glace. Après centrifugation pendant 30 sec à 13.000 tr/min, les culots sont repris dans un deuxième tampon de lyse (20 mM d'HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM de $MgCl_2$, 420 mM de KCL, 25% de glycérol, 0.5 mM de DTT, 20 mM de PMSF, 1X de PIC) et incubés sur glace pendant 30 min. Les lysats sont centrifugés 2 min à 13.000 tr/min à 4°C, et les surnageants correspondant aux extraits de protéines nucléaires sont stockés à $-80^\circ C$.

b.) Retardement sur gel

Le retardement sur gel a été réalisé en suivant le protocole décrit par De Vos et ses collaborateurs (De Vos *et al.*, 1991). Brièvement, deux oligonucléotides simples brins complémentaires sont hybridés pour former un oligonucléotide double brin avec des extrémités cohésives (Tableau 8). Ces oligonucléotides double brin sont ensuite marqués au Phosphore-32 par une réaction de « fill-in » à 37°C pendant 30 min dans un tampon (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 5 mM de MgCl₂, 7.5 mM de DTT, 0.15 mM de dTTP, de dATP et de dGTP, 0.2 mM d'oligonucléotides double brins, 1 mCi/ml de [α -P³²]dCTP (GE HealthCare, Saclay, France), et 0.25 U/ml de fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (New England BioLabs, Ozyme, France). La réaction est stoppée par addition d'EDTA à une concentration finale de 10 mM. Les oligonucléotides (sondes) ainsi radiomarqués sont purifiés sur colonnes de Séphadex G-25. La formation des complexes ADN/RA a lieu au cours d'une incubation des extraits protéiques nucléaires avec les sondes radiomarquées dans un tampon (20 mM d'HEPES-KOH, pH7.9; 5 mM de MgCl₂ ; 0.1 mM d'EDTA ; 17 % de glycérol ; 100 mM de NaCl, 0.05 % de Triton X-100, 50 ng de poly(dI-dC), et 1 mM de DTT, 1 μ g d'anticorps anti-RA (BD Pharmingen, Le Pont-De-Claix, France) pour le supershift). Après une incubation de 15 min sur glace, la sonde radiomarquée (2000 coups par seconde) et purifiée est ajoutée et le mélange est incubé pendant 15 min sur glace. Ces complexes (sondes radiomarquées-RA) sont déposés sur un gel de polyacrylamide 5%. Après une migration de 5 h à 120V à température ambiante, le gel est séché pendant 60 min à 80°C, puis révélé à l'aide d'un phosphoimager (GE HealthCare, Saclay, France).

Tableau 8 : Séquences des éléments de réponse utilisés lors du retardement sur gel

Nom	Séquence	Spécificité
C3(1)ARE	5'-AGTACGtgaTGTTCT-3'	Non spécifique
GRE consensus	5'-TGTACA tgaTGTTCT-3'	Non spécifique
sc-ARE1.2	5'-GGCTCT ttc AGTTCT-3'	RA spécifique
PSA-ARE1	5'-AGAACA gcaAGTGCT-3'	RA spécifique
ARE consensus	5'-GGTACA gggTGTTCT-3'	RA spécifique
PBARE2	5'-GGTTCT tggAGTACT-3'	RA spécifique
PEMARE1	5'-AGATCT cattcTGTTCC-3'	RA spécifique

Légende Tableau 8 : Les séquences des éléments de réponse aux hormones ainsi que leur spécificité vis-à-vis du RA sont représentées. sc-ARE1.2: gène du « secretory component » humain (SC), ARE-PSAI: ARE 1 du gène PSA, C3(1)ARE: ARE du gène du complément C3, PBARE2 : L'élément de réponse androgéno-spécifique 2 du gène de la Probasine. PEMARE1 : élément de réponse présente en amont du gène à homéoboîte PEM.

4.) L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Le principe de la technique consiste à figer les interactions protéines/ADN par un traitement au formaldéhyde. L'ADN est ensuite clivé en fragments de 500 à 2000 pb par sonication. La protéine d'intérêt est immunoprécipitée, l'ADN lié par la protéine est récupéré et amplifié par PCR avec des amorces choisies au niveau des régions promotrices d'intérêt.

Les cellules LNCaP sont ensemencées à 1.10^6 cellules dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, puis transfectées avec 10 μ g de plasmide d'expression pEGFP-RAwt ou pEGFP-RA-T575A avec l'agent transfectant JetPEI dans du milieu sans rouge de phénol et sans sérum. La DHT (100nM) ou le bicalutamide (1 μ M) sont ajoutés 24 h après transfection dans les boîtes de cellules transfectées. Cette expérience est réalisée sur 3 jours.

Jour1 : Les cellules sont incubées 10 min à température ambiante dans 1 % de formaldéhyde pour la fixation des complexes ADN/protéines, puis de la glycine à 125 mM final est ajoutée pour neutraliser le formaldéhyde. Après 3 lavages au PBS, les cellules de 4 boîtes de Pétri sont récupérées à l'aide d'un grattoir dans 2.5 ml de PBS froid contenant 0.5 mM de PMSF. Après centrifugation pendant 5 min à 1000 tr/min à 4°C, le culot est repris dans 5 volumes de tampon I (25 mM de HEPES-KOH pH, 7.9 ;

1.5 mM de MgCl₂ ; 10 mM de KCl ; 0.1 % de NP-40 ; 1 mM de DTT ; 0.5 mM de PMSF ; 1X de PIC). Après centrifugation de 5 min à 5.000 tr/min à 4°C, le culot est repris dans 300 µl de tampon de sonication (50 mM de HEPES-KOH, pH 7.9 ; 140 mM de NaCl ; 1 mM de EDTA ; 1 % de Triton ; 0.1 % de deoxycholate de sodium ; 0.1 % de SDS ; 0.5 mM de PMSF ; 1X de PIC), l'ADN est fragmenté par sonication. La taille des fragments d'ADN est contrôlée sur un gel d'agarose à 0.8 % ; la taille optimale des fragments se situe entre 1.000 et 2.000 pb après sonication.

Après sonication, les échantillons sont centrifugés à 14.000 tr/min pendant 15 min à 4°C. Les surnageants sont divisés en deux, une partie (1/10^{ème} du volume final) est stockée à - 80°C et correspond à la fraction totale ou « INPUT »; l'autre partie est immunoprécipitée. A cette fin, une première étape de « pre-clearing » est réalisée par une première incubation des échantillons de 20 min sur glace, suivie d'une deuxième incubation de 90 min à 4°C sous agitation, en présence de 66 µg/ml d'ADN de sperme de saumon soniqué, 100 µg/ml de BSA (New England Biolabs, Ozyme, Saint-Quentin, Yvelines, France) et 100 µl de protéine A couplée à des billes d'agarose (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cette étape de « pre-clearing » a pour but d'éliminer les contaminants qui pourraient se fixer de manière non spécifique à la protéine A. Après centrifugation pendant 1 min à 1800 tr/min à 4°C, les surnageants sont incubés toute une nuit en présence de 10 µg/ml d'un anticorps anti-GFP (Santa-Cruz Biotechnology, CA, USA).

Jour2 : Les complexes anticorps-RA-ADN sont ensuite immunoprécipités en présence de protéine A pendant 2h30 à 4°C. Après une brève centrifugation à 1.800 tr/min à 4°C, plusieurs cycles de lavages sont effectués : 2 lavages dans le tampon de sonication, 2 lavages dans le tampon A (50 mM d'HEPES-KOH pH 7.9 ; 500 mM de NaCl ; 1 mM de EDTA ; 1 % de Triton ; 0.1 % de deoxycholate de sodium ; 0.1 % de SDS ; 0.5 mM de PMSF ; 1X de PIC), 2 lavages dans le tampon B (20 mM de Tris , pH 8 ; 1 mM de EDTA ; 250 mM de LiCl ; 0.5 % de NP-40 ; 0.5 % de deoxycholate de sodium ; 0.5 mM de PMSF ; 1X de PIC). Les complexes RA-ADN sont élués des billes d'agarose par une incubation de 10 min à 65°C dans le tampon C (50 mM de Tris pH 8 ; 1 mM de EDTA ; 1 % de SDS), suivie d'une centrifugation pendant 1 min à 13.000 tr/min à 4°C.

Jour3: Les fragments d'ADN sont ensuite séparés des complexes nucléoprotéiques par une première incubation de 5 h à 65°C dans un tampon de séparation (0.2 M de NaCl et de 25 µg/ml de ribonucléase A), suivi d'une deuxième incubation de 2 h à 42°C après addition de 0.5 mM d'EDTA et de 50 µg/ml de protéinase K au tampon de séparation. Enfin, l'ADN est purifié en utilisant le kit d'extraction plasmidique (NucleoSpin® Extract II, Macherey-Nagel, Hoerd, France).

Une PCR dirigée contre chacune des séquences ARE du promoteur du gène humain du *PSA* et du gène *TMPRSS2* est ensuite réalisée en utilisant les amorces décrites ci-dessous (Tableau 9).

Tableau 9: Amorces utilisées pour amplifier les motifs AREs du promoteur des gènes humains *PSA* et *TMPRSS2*

ARE étudié	Amorce sens	Amorce anti-sens
AREI	5'-TCTGCCTTTGTCCCCTAGAT-3',	5'-AACCTTCATTCCCCAGGACT-3' ;
AREIII	5'-CCTCCCAGGTTCAAGTGATT-3'	5'-GCCTGTAATCCCAGCACTTT-3'
ARE TMPRSS2	5'-GACCCACTTGTGCCTTAGAGGTTAC-3'	5'-TGGGTAAAGTCCAGCAGGATGC -3'

Après une première dénaturation de 2 min à 94°C, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45 sec, d'hybridation pendant 45sec à 45°C pour AREI et pour ARE TMPRSS2 ou à 38°C pour AREIII et d'élongation à 68°C pendant 1 min sont réalisés, suivis d'une terminaison à 68°C pendant 5 min.

Les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 0.8% contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium, et révélés par l'utilisation du GelDoc (Biorad, Marnes-la-Coquette, France).

5.) Activités transcriptionnelles à l'aide d'un gène rapporteur

a.)Activation de promoteurs androgéno-dépendants

Les cellules LNCaP et COS-1 sontensemencées dans des plaques 12 puits (8x10⁴ cellules/puits) dans du milieu complet et co-transfectées avec 1µg de pEGFP-C3, pEGFP-RAwt ou de pEGFP-AR23 et avec 2 µg de PSA-61-luc ou de MMTV-

LTR-luc en utilisant l'agent transfectant JetPEI (Polyplus Transfection). Vingt-quatre heures après, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum et sans rouge de phénol additionné ou non de 100 nM de DHT (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les tests luciférase sont réalisés 48 h après suivant le protocole recommandé par Promega (Charbonnières, France). Les activités luciférases sont mesurées en utilisant le luminomètre TD20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). Chaque condition est réalisée en triplicat et l'induction de la luciférase est indiquée en unité arbitraire (UA).

b.) Etude des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire

Les tests *luciférase* réalisés sur les cellules LNCaP et COS-1 et PC-3 suivent le même schéma expérimental. Les cellules sontensemencées à 8.10^4 cellules par puits dans des plaques 12 puits dans du milieu complet et transfectées avec 0.5 μ g de plasmide luciférase pTA-AP-1-luc, pTA-SRE-luc, pTA-NF- κ B-luc ou pTA-luc et avec 0.5 μ g de plasmide d'expression pEGFP-RAwt, pEGFP-AR23 ou pEGFP-C3. Vingt-quatre après transfection, le milieu complet est remplacé par du milieu sans sérum et sans rouge de phénol. Après 24 h d'incubation, les cellules sont traitées ou non avec 100 nM de DHT et les tests luciférase sont réalisés comme décrit précédemment 24 h après.

6.) Etude de la colocalisation intracellulaire réalisée par microscopie confocale à balayage laser

a.) Principe

Une des limitations de la microscopie classique est la faible profondeur de champ de l'image. La zone observée de mise au point est nette, les zones immédiatement au dessus et au dessous sont floues et perturbent l'image observée. La microscopie confocale permet de contourner ce problème. La microscopie confocale est basée sur la microscopie à fluorescence (c'est donc une technique de microscopie optique), mais la lampe à lumière blanche est remplacée par un laser, qui fournit une lumière parfaitement cohérente.

Le laser est focalisé sur la préparation et seule la zone de focalisation sera suffisamment excitée pour émettre de la fluorescence, le reste de la préparation, que se soit sur les côtés ou sur un autre plan de focalisation (plan focal) restent sombres. Le balayage par le laser de tout le plan de focalisation permet d'obtenir une image très nette de ce plan focal, les zones floues n'apparaissant plus. Ainsi, le principe de la microscopie confocale est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de fluorescence émise dans le plan.

De plus, le plan focal pouvant être déplacé suivant un axe vertical, il est possible d'analyser toute l'épaisseur de la préparation. On dispose alors de la luminosité de tous les points de la préparation qui peuvent être utilisés de plusieurs façons. Une des applications est l'étude de colocalisation entre deux protéines. En effet, les marquages des deux protéines d'intérêt peuvent être superposés pour chaque plan focal et reconstitué pour toute la préparation. Ainsi, en exploitant les coupes une à une, la co-localisation observée sera réelle et ne pourra être un artefact issu de la fluorescence provenant des autres plans focaux, comme observé en microscopie optique classique.

b.) Les fluorochromes utilisés

Les fluorochromes sont des molécules composées d'un noyau aromatique qui peuvent augmenter d'énergie de façon transitoire sous l'influence d'une source lumineuse. Cette augmentation d'énergie est due à la délocalisation de doublets d'électrons suivant les règles de mésomérie. Lors du retour au niveau énergétique basal, il y a une perte d'énergie sous forme de chaleur. Ainsi les photons d'émission auront une longueur d'onde plus élevée que les photons d'excitation.

Les fluorochromes utilisés pour les expériences d'immunofluorescence en microscopie confocale sont l'EGFP, le CY5TM (Jackson Immunoresearch, Newmarket, Royaume-Uni).

Tableau 10: Spectre de fluorescence des fluorochromes utilisés pour les études de microscopie confocale.

Fluorochromes	Longueur d'excitation (nm)	Longueur d'émission (nm)	Laser Ar-Kr (nm)
CY5™	625-650	670	647
EGFP	488	509	488
Hoeschst 33258	343	483	365
DsRed	558	583	558

Légende Tableau 10: Le laser utilisé est un laser Argon (Ar)-Krypton (Kr) sauf pour le Hoeschst où une lampe Ultraviolet (UV) est utilisée.

Les fluorochromes ont été choisis avec des longueurs d'excitation distinctes et des longueurs d'émission ne se superposant pas afin d'éviter une superposition des spectres de fluorescence et empêcher ainsi le passage d'un fluorochrome sur le suivant créant une interférence. Par ailleurs, l'excitation des différentes combinaisons des fluorochromes et l'acquisition des données sont réalisées de manière séquentielle pour chaque fluorochrome. De plus, pour chaque combinaison de fluorochrome, de nombreux contrôles ont été réalisés. Ces contrôles ont consisté à la vérification de l'absence d'émissions de fluorescence de l'EGFP après excitation par le laser à une longueur d'onde de 568 nm et à une longueur de 647 nm. Ce contrôle est réalisé pour chaque fluorochromes utilisés.

c.) Immunofluorescence par microscopie confocale à balayage laser

i. Gamme de plasmide EGFP

Les cellules LNCaP sontensemencées dans des plaques 12 puits à une densité de 8×10^4 cellules/chambre et transfectées dans du milieu complet avec 0,5, 1 et 2 μg de pEGFP-AR23, en utilisant l'agent transfectant JetPEI. Vingt-quatre heures après transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu frais sans sérum et les cellules sont traitées ou non avec 100 nM DHT. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 2 % et les noyaux des cellules sont marqués au Hoeschst 33258. L'expression de l'EGFP-AR23 est visualisée l'aide du

microscope confocal inversé DMIRBE Leica SP2 UV (IGBMC, plate-forme d'imagerie, Illkirch, France).

ii. Cinétique de localisation cellulaire de l'AR23:

Les cellules LNCaP sontensemencées dans des Lab-Tek[®] 2 chambres (Nalge Nunc, Hereford, Royaume-Uni) à une densité de 8×10^4 cellules/chambre et transfectées dans du milieu sans rouge de phénol et sans sérum avec 2 μ g de pEGFP-AR23 ou pEGFP-RAwt en utilisant l'agent transfectant JetPEI. La DHT 100nM, ou son diluant EtOH 0,1% ont été ajoutée dans les chambres 48 h après transfection. Les cellules ont été fixées T= 20 min et T=40 min après stimulation. Un contrôle T=0 avant tout traitement a été réalisé. Les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. La fluorescence est visualisée à l'aide du microscope confocal inversé DMIRBE Leica SP2 UV (IGBMC, plate-forme d'imagerie, Illkirch, France).

iii. Distribution intracellulaire du récepteur des androgènes sauvage et des récepteurs des androgènes mutés AR23 et T575A

Les cellules LNCaP ou COS-1 sontensemencées dans des Lab-Tek[®] 2 chambres (Nalge Nunc, Hereford, Royaume-Uni) à une densité de 8×10^4 cellules/chambre et transfectées dans du milieu sans rouge de phénol et sans sérum avec 2 μ g de pEGFP-AR23, pEGFP-RA-T575A, pEGFP-RAwt ou pEGFP-C3 en utilisant l'agent transfectant JetPEI. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules sont traitées ou non avec 100nM DHT ou 1 μ M de bicalutamide. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 2 % et les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. La fluorescence est visualisée à l'aide du microscope confocal inversé DMIRBE Leica SP2 UV (IGBMC, plate-forme d'imagerie, Illkirch, France).

iv. Expériences de colocalisation intracellulaire avec les cofacteurs

L'évaluation du niveau d'expression et de la localisation intracellulaire des cofacteurs endogènes des cellules LNCaP est réalisé par l'utilisation d'anticorps primaires polyclonaux de lapin anti-CBP (H-300), anti-SRC-2 (M-343), anti-NCoR ou anti-c-Jun, Santa (sc169) (Santa Cruz biotechnology, CA), additionnés de l'anticorps

secondaire anti-lapin couplé au CY5TM (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Royaume-Uni). L'ensemble des marquages a été visualisé à l'aide du microscope confocal inversé DMIRBE Leica SP2UV (IGBMC, plate-forme d'imagerie, Illkirch). Le contrôle isotypique des anticorps anti-SRC-2, anti-CBP, anti-NCoR et de l'anticorps anti-cJun est réalisé avec l'isotype de lapin (Santa Cruz Biotechnology, CA).

v. Expériences de colocalisation avec la protéine DsRed2 ER

Les cellules LNCaP sontensemencées dans des Lab-Tek[®] 2 chambres (Nalge Nunc, Hereford, Royaume-Uni) à une densité de 8×10^4 cellules/chambre et transfectées dans du milieu complet avec 1 μ g de pEGFP-RA sauvage, pEGFP-AR23 ou pEGFP-C3 en combinaison avec 1 μ g de plasmide pDsRed2-ER en utilisant l'agent transfectant JetPEI. Quarante huit heures après transfection les cellules sont fixées avec 2 % paraformaldéhyde et les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. Les protéines de fusion EGFP-RA et le marquage du réticulum endoplasmique sont visualisés à l'aide du microscope confocal inversé DMIRBE Leica SP2 UV (IGBMC, plate-forme d'imagerie, Illkirch, France).

7.) Western blot

a.) Vérification de la présence des RAs dans les cellules et quantification

Les LNCaP ou les COS-1 sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre à 1.10^6 cellules/boite dans du milieu sans sérum et transfectées avec le plasmide d'expression EGFP-RA sauvage, EGFP-AR23, EGFP-RAT575A ou avec le plasmide vide EGFP-C3 par l'agent transfectant JetPEI. Les protéines totales sont extraites et dosées en utilisant le Kit BCA assay (Pierce, Perbio Science, Brebières, France). Une quantité totale de 15 μ g de protéines est déposée sur un gel de polyacrylamide de 7.5 %. Le signal correspondant au RA est révélé à l'aide d'un anticorps primaire anti-AR (BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France) et à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Horseradish peroxydase goat anti-mouse IgG, BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France)

La quantification du RA endogène dans les LNCaP a été réalisée en utilisant un gène de ménage, la β actine. Aussi, après détection du signal correspondant au RA comme décrit ci-dessus, les membranes sont strippées et sont incubées avec l'anticorps primaire anti- β actine (mouse IgG1 κ mAb C4, Chemicon International, Hampshire, Royaume Uni) puis et à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Horseradish peroxydase goat anti-mouse IgG, BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France). Les signaux obtenus sont quantifiés en utilisant le système Gel Doc 2000 et le logiciel QuantityOne™ (BioRad, Marne-la-Coquette, France), puis sont normalisés par rapport à la β actine.

b.) Etude de la localisation cellulaire de l'AR23 par fractionnement cellulaire et cinétique

Les LNCaP sont ensemencées dans de boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre à 2.10^6 cellules/boîte dans du milieu sans sérum et transfectées avec le plasmide d'expression EGFP-RA sauvage ou de EGFP-AR23 par l'agent transfectant JetPEI. Quarante huit heures plus tard, la DHT 100nM a été rajoutée dans les boîtes de culture et le fractionnement cellulaire est réalisé aux temps T=20 et T=40 minutes après stimulation par DHT à l'aide du Kit ProtéoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Allemagne). Un témoin avant stimulation hormonale, T=0min, est également réalisé. Le kit utilisé est spécialement étudié pour permettre le fractionnement des cellules en compartiments, nucléaires, cytoplasmiques ainsi que membranaires et tout particulièrement en compartiment membranaire des organelles. Une quantité totale de 15 μ g de protéines extraites de chaque compartiment est déposée sur un gel de polyacrylamide de 7.5%. Le signal correspondant au RA est révélé à l'aide d'un anticorps primaire anti-AR (BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France) et à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (Horseradish peroxydase goat anti-mouse IgG, BD Pharmingen, Pont-de-Claix, France)

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

OBJECTIFS

Comme décrit précédemment, le RA et ses variants mutés constituent un maillon important de la carcinogenèse prostatique. Dans le but d'étudier l'impact des mutations du RA au cours de cette carcinogenèse prostatique nous avons mis au point au laboratoire un test fonctionnel visant à détecter les mutations du RA dans les CaPs (Céraline *et al.*, 2003) (cf :chapitre Matériel et Méthodes).

L'étude de ces mutations a été réalisée dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique, dans lequel quatre groupes de patients ont été pris en considération. Le premier groupe (A), réunissait les patients présentant un CaP localisé, puis les trois groupes suivants incluaient les patients atteints d'un CaP métastatique, avant tout traitement (groupe B), en cours de traitement (groupe C) et après échappement hormonal (groupe D).

Parmi les mutations identifiées qui touchent le plus souvent le LBD, deux mutations au niveau du DBD ont été mises en évidence au laboratoire par un test fonctionnel chez la levure.

La première consiste en une substitution d'une thréonine (T) par une alanine (A) en position 575 du DBD, conduisant au récepteur muté RA T575A.

La seconde résulte d'un épissage aberrant et conduit à l'insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD. Cette mutation aboutit à un variant du RA que nous avons appelé AR23.

Le DBD des RNs est une région hautement conservée au cours de l'évolution, nécessaire pour la reconnaissance spécifique des AREs situées en amont des gènes cibles du RA, une altération de cette région peut ainsi avoir de graves répercussion sur la régulation de gènes androgéno-dépendants et sur les capacités de transactivation du RA muté.

Les objectifs principaux de mon travail de thèse ont été de relier ces deux mutations du RA à une information fonctionnelle et structurale afin de mieux comprendre les conséquences de l'altération génétique sur la fonction du RA.

Ainsi, je me suis intéressée à l'impact des mutations sur les propriétés de liaison à l'ADN des RAs mutés, sur leurs activités transcriptionnelles génomiques ou d'origine cytoplasmique, et enfin sur le recrutement de co-régulateurs.

CARACTERISATION DES MUTATIONS

L'AR23 et le RA T575A ont tout d'abord été caractérisés par le test fonctionnel dans la souche de levure EJ250 (Céraline J *et al.*, 2003). Leur étude a par la suite été poursuivie dans trois lignées cellulaires distinctes, deux lignées cancéreuses prostatiques humaines, la lignée LNCaP et la lignée PC-3, puis dans les cellules de singe COS-1.

Les cellules PC-3 sont androgéno-indépendantes car elles n'expriment pas de RA. Cette absence d'expression du RA s'explique par une hyperméthylation du promoteur du gène du RA de ces cellules (Jarrard DF *et al.*, 1998). Cette lignée permet d'étudier facilement les propriétés fonctionnelles du RA muté après transfection. Cependant, ces cellules contrairement aux LNCaP, présentent l'inconvénient d'être androgéno-indépendantes et de ne plus requérir la voie de signalisation du RA pour leur prolifération et leur survie. La transfection d'un RA sauvage n'est pas suffisante pour rendre ces cellules PC-3 androgéno-dépendantes pour leur prolifération et leur survie. Dans cette étude, les cellules PC-3 ne sont utilisées que pour l'investigation des propriétés fonctionnelles de l'AR23. Ces cellules restent cependant très difficiles à transférer par les méthodes classiques disponibles au laboratoire et requises pour notre étude.

Pour pallier à ce problème, nous avons choisi d'utiliser les cellules COS-1, issues de rein de singe vert. Ces cellules COS-1 n'expriment pas de RA, mais toutefois, il est possible d'y étudier les activités transcriptionnelles d'un RA transfecté. Par ailleurs, ces cellules se laissent plus facilement transférer que les cellules PC-3. Les cellules COS-1 dérivent des cellules CV-1 par transformation avec l'antigène T du virus SV40. Cette propriété leur permet d'exprimer fortement tout plasmide pourvu d'une origine de répllication virale, comme c'est le cas des plasmides pSV-RA que nous avons utilisé. Cette lignée nous a permis d'obtenir des taux d'expression élevés de nos RAs transfectés.

Notre objectif étant de comprendre l'impact des RAs mutés sur la prolifération et la survie des cellules cancéreuses prostatiques, nous avons privilégié pour notre étude les cellules LNCaP pour leur voie de signalisation du RA toujours active. Tous

les composants intracellulaires nécessaires au mode d'action du RA sont présents dans les cellules. Dès lors, il est possible après transfection des LNCaP avec un plasmide d'expression codant pour le RA sauvage ou le RA muté, ou avec un plasmide d'expression vide comme contrôle, de comparer respectivement les activités transcriptionnelles du RA sauvage, de l'AR23 à celles du RA endogène.

La lignée LNCaP issue d'un adénocarcinome prostatique humain est androgéno-sensible. Ces cellules expriment un RA dit « endogène », portant la mutation T877A au niveau du LBD, où la thréonine en position 877 est substituée par une alanine, élargissant de ce fait le spectre de reconnaissance des ligands (Tan J *et al.*, 1997).

Une des limites de cette étude est le faible taux de transfection obtenu (10-20%) de ces cellules LNCaP. De ce fait, l'étude de nos RA mutés est réalisée sur une population cellulaire restreinte.

L'utilisation de cellules LNCaP dans lesquelles l'expression du RA endogène serait remplacée par celle des RAs mutés à étudier serait idéale. Nous avons réalisé de multiples essais pour inhiber l'expression du RA endogène dans la lignée LNCaP par la technique de siRNA. La forte dépendance vis-à-vis du RA de la lignée LNCaP a rendu à ce jour tous ces essais infructueux. Parallèlement, nous avons récemment utilisé la technologie Amaxa (Nucleofector™, Amaxa, GmbH, Köln, Allemagne), permettant théoriquement d'atteindre des taux de transfection avoisinant les 60%. Cependant, appliquée aux cellules LNCaP cette technique entraîne un fort taux de mortalité cellulaire. Aussi, l'intégralité des expériences a été réalisée avec la technique JetPEI, avec des taux de transfection de 10-20%.

1^{ère} PARTIE :

CONSEQUENCES DE LA SUBSTITUTION D'UNE
THREONINE PAR UNE ALANINE EN POSITION 575 DU
DOMAINE DE LIAISON A L'ADN SUR LA
RECONNAISSANCE DE L'ADN ET SUR LES
INTERACTIONS AVEC LES CO-FACTEURS

I. Caractérisation du variant du récepteur des androgènes T575A

Un récepteur des androgènes portant la mutation T575A/T877A a été mis en évidence dans un échantillon de cancer de la prostate en échappement à la privation androgénique. Ce patient a été diagnostiqué pour un cancer de la prostate métastatique d'emblée. Dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique, une ponction médullaire orientée sur un des sites métastatiques a été réalisée. A la date de cette ponction, le patient était en échappement à plusieurs lignes d'hormonothérapie. La première ligne d'hormonothérapie a consistée en l'administration de la goséréline, un agoniste de la LHRH, combinée au flutamide, un anti-androgène. Après une réponse clinique à ce blocage androgénique complet d'une durée de 17 mois un échappement hormonal a été observé. Plusieurs lignes d'hormonothérapie combinées ou non à la chimiothérapie ont ensuite été administrées. La ponction médullaire a été réalisée 5 ans après le diagnostic et un examen cytologique réalisé au laboratoire d'hématologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg a confirmé la présence de nombreuses cellules métastatiques au niveau de cette ponction médullaire. Des mutations du RA ont été recherchées dans cet échantillon tumoral à l'aide du test fonctionnel chez la levure.

Comme nous l'avons vu le remplacement d'une thréonine en position 877 par une alanine conduit à un élargissement du spectre de reconnaissance du ligand par le LBD de ce variant du RA. Cette mutation largement décrite dans la littérature, autorise ainsi la liaison au niveau du LBD d'anti-androgènes tels que l'hydroxyflutamide, comme agoniste ou encore la reconnaissance de la cortisone et de dérivés progestatifs à de faibles concentrations (Steketee K *et al.*, 2002).

La substitution de l'alanine en position 575 du domaine de liaison à l'ADN par une thréonine (T575A) a déjà été décrite dans un CaP métastatique, cependant les propriétés fonctionnelles de cette substitution n'ont pas fait jusqu'à lors objet d'une étude approfondie (Marcelli M *et al.*, 2000).

La caractérisation des conséquences fonctionnelles et structurales de la mutation T575A est réalisée en collaboration avec Mlle Audrey Monge, doctorante au sein du

laboratoire (Monge A *et al.*, 2006). Le premier volet de cette étude a été consacré à l'étude des activités transcriptionnelles du variant T575A dans deux lignées cellulaires LNCaP et CV-1. Ce travail est réalisé par Mlle Audrey Monge et ne sera pas développé ici.

Au cours de ma thèse, je me suis consacrée à l'étude d'un autre aspect de cette mutation, et plus particulièrement aux conséquences directes de la substitution T575A sur les capacités de reconnaissance et de liaison à l'ADN de ce variant, ainsi qu'à ses interactions avec les co-facteurs. L'étude de l'impact de la mutation T575A sur les propriétés de liaison à l'ADN du RA a tout d'abord été initiée par le test fonctionnel chez la levure. Puis, des études d'interaction protéine/ADN ont été réalisées à partir des cellules LNCaP et COS-1. Enfin, l'impact de la mutation T575 sur le recrutement de co-facteurs du RA a ensuite été analysé par des études d'interaction protéine/protéine réalisées dans les cellules LNCaP.

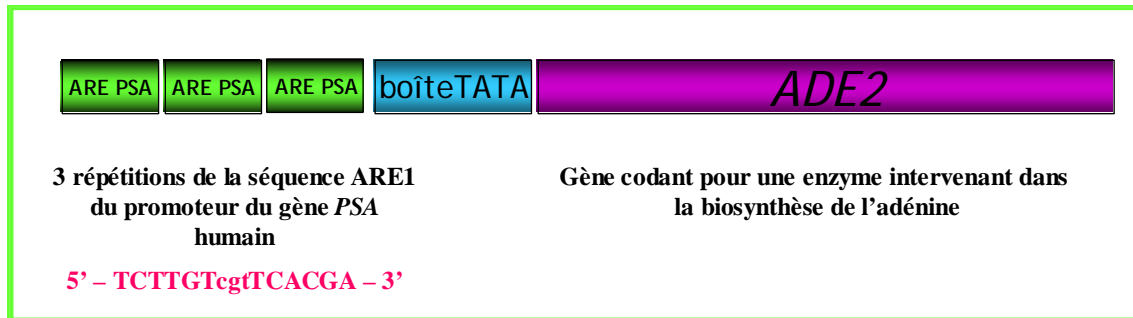
1.) Impact de la mutation T575A sur les activités transcriptionnelles du récepteur des androgènes

Le test fonctionnel réalisé chez la levure a pour but de détecter des mutations du RA au sein d'un échantillon tumoral et de déceler des modifications d'activités transcriptionnelles dues à la mutation en analysant le profil de réponse à un panel de molécules stéroïdiennes ou non stéroïdiennes testées à différentes concentrations. Dans la souche de levures EJ250, l'expression du gène *ADE2*, codant pour une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'adénine, est placée sous le contrôle d'un promoteur androgéno-dépendant (Figure 31). Les hormonogrammes correspondant au nombre de colonies de levures ayant poussé en présence d'une concentration donnée d'un ligand représentent la sensibilité et la spécificité du RA pour les molécules testées.

L'homonogramme du RA sauvage se caractérise par une réponse forte dès la plus faible concentration de DHT (10nM) et une faible réponse en présence de fortes concentrations (1 et 10µM) d'adrostènedione (Figure 32). Aucune réponse n'est obtenue en présence des autres précurseurs androgéniques comme la DHEA et la

pregnénolone. Une faible réponse est par contre observée en présence de fortes concentrations de dérivés progestatifs ou oestrogéniques.

Figure 31 : Construction plasmidique conduisant à une expression androgéno-dépendante du gène *ADE2* dans la souche de levures EJ250.



Légende Figure 31 : Le gène *ADE2* codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'adénine est placé sous la dépendance d'un promoteur androgéno-dépendant renfermant trois répétitions de l'élément ARE1 du gène PSA humain. Aussi, ce gène sera transcrit sous condition de reconnaissance et d'induction de ce promoteur androgéno-dépendant par le RA.

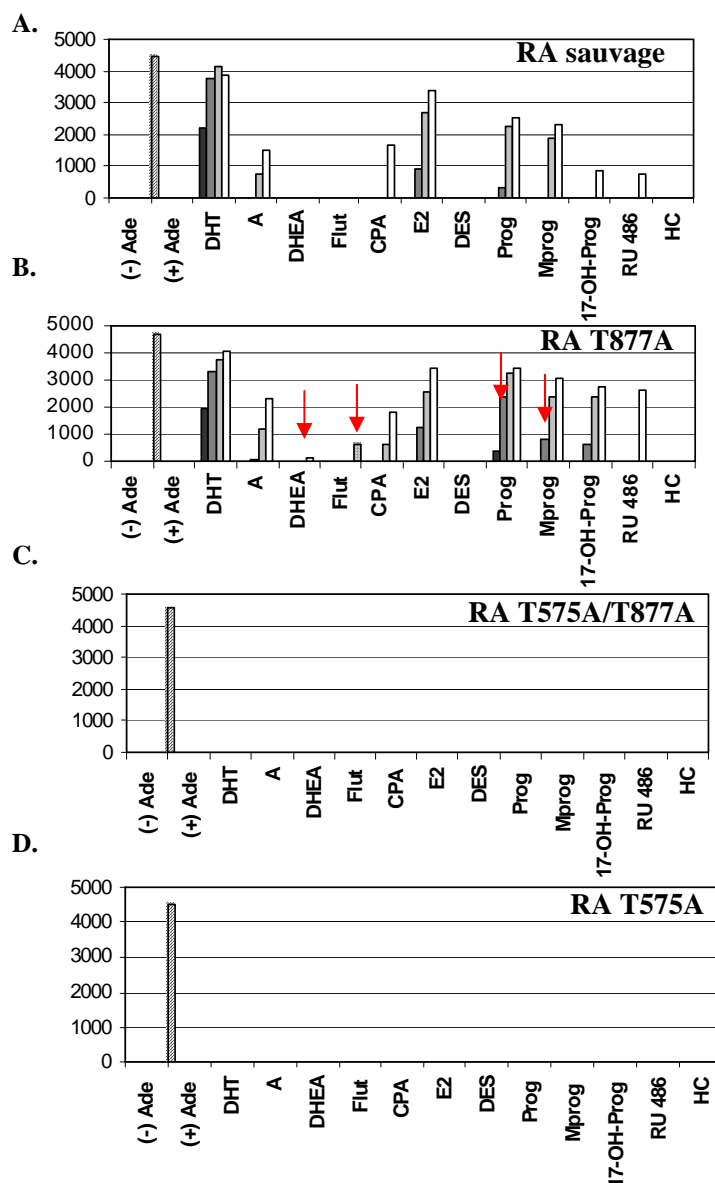
L'ensemble de ces résultats illustre le spectre de réponse du RA sauvage vis-à-vis des hormones stéroïdes. Il est également important de préciser qu'aucune croissance de levures n'est observée en présence du flutamide, un antagoniste du RA (Figure 32A).

De manière semblable aux descriptions faites dans la littérature, le RA T877A reconnaît le flutamide comme un agoniste et est activable dès les plus faibles concentrations de progestatifs (Figure 32B, flèches rouges), indiquant le spectre de sensibilité aux ligands élargi de ce variant du RA (Steketee K *et al.*, 2002).

En revanche, aucune colonie de levures, signe d'une absence d'activité transcriptionnelle à partir du promoteur androgéno-dépendant de levure, n'a pu être observée en présence du double mutant T575A/T877A, et ce, quelque soit le ligand ajouté dans le milieu de culture (Figure 32C). L'absence de l'activité transcriptionnelle du double mutant T575A/T877A ne peut être attribuée à la simple mutation T877A étant donné que, comme nous venons de le voir, ce mutant est doté de toutes ses capacités de transactivation (Figure 32B). Aussi, nous avons réalisé le test fonctionnel en transformant les levures avec un plasmide d'expression du RA portant uniquement la simple mutation T575A. Les résultats obtenus montrent que ce mutant est incapable

d'induire la transcription à partir du promoteur androgéno-dépendant présent dans notre système (Figure 32D). Ces résultats nous ont permis de conclure que l'absence d'activité transcriptionnelle du double mutant T575A/T877A était due à la présence de la mutation T575A.

Figure 31 : Test fonctionnel chez la levure : détection du variant RA T575A



Légende Figure 31 : Les histogrammes représentent le nombre de colonies de levures obtenues après transformation avec le RA sauvage (A.) ou RA T877A (B.) ou le double mutant T575A/T877A (C.) puis avec le simple mutant T575A (D) sur différents milieux sélectifs contenant alternativement une des hormones suivantes : (-) Ade, contrôle négatif sans adénine; (+) Ade, contrôle positif avec adénine; DHT, dihydrotestostérone ; A, adrostènedione ; DHEA, déhydroépiandrostérone ; Flut flutamide ; CPA, cyprotérone acétate ; E2, β -oestradiol ; DES, diéthylstilbestrol ; P, progestérone ; MP, médroxyprogestérone ; 17-OH-Prog, 17-hydroxy-progèsterone ; HC, hydrocotisone et SP, spironolactone. Des concentrations d'hormones allant de 1nM à 100 μ M sont utilisées. Les flèches rouges mettent l'accent sur l'élargissement du spectre de reconnaissance du ligand par le mutant T 877A.

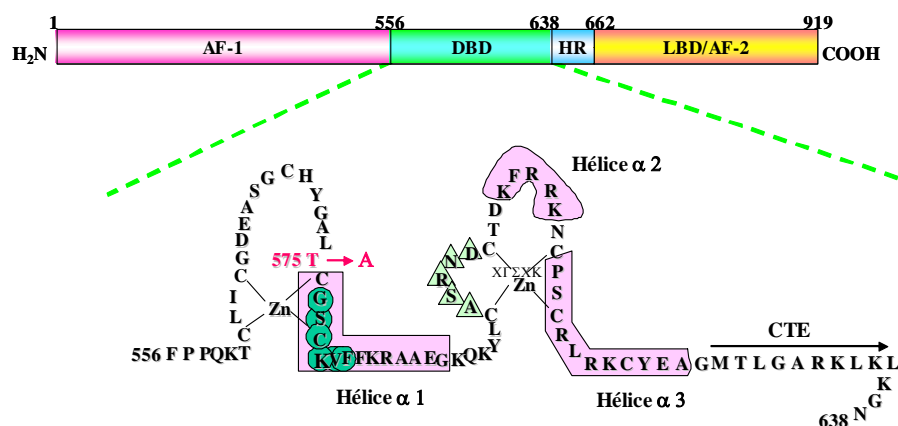
Une analyse par western-blot d'extraits protéiques de levures transformées avec les différents variants du RA a permis de confirmer que le niveau d'expression des RAs T575 et T575A/T877A est comparable à ceux du RA sauvage et du RA muté T877A (Monge *et al.*, 2006).

Ces résultats suggèrent que l'absence d'activité transcriptionnelle du RAT575 ainsi que celle du double mutant T575A/T877A est probablement liée à un défaut de reconnaissance du promoteur androgéno-dépendant régulant l'expression du gène *ADE2* dans notre système (Figure 31).

2.) Impact de la localisation de la mutation T575A sur la structure du domaine de liaison à l'ADN

La substitution de la thréonine par une alanine en position 575 concerne le premier doigt de zinc du DBD du RA. Cette mutation est localisée juste au dessus de la Boîte-P responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN (Figure 33).

Figure 33 : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes et position de la mutation T575A



Légende Figure 33 : Le DBD du RA est organisé en deux doigts de zinc constitués de trois hélices α (entourées en violet), chaque doigt de zinc renferme des séquences importantes pour les fonctions du RA. Ainsi, le premier doigt de zinc comporte la Boîte-P (vert). Le second doigt de zinc composé de deux hélices α , comporte la séquence de dimérisation ou Boîte-D et se termine par une extension C-terminale importante pour la structure tridimensionnelle du RA. La substitution de la thréonine en position 575 par l'alanine est localisée au niveau du premier doigt de zinc, juste au dessus de la Boîte-P.

La spécificité d'activation transcriptionnelle du RA repose sur plusieurs éléments dont la séquence nucléotidique des éléments de réponse ARE (IR3 et ADR3), le positionnement du RA sur ces ARE (conformation « head-to-head »), mais également la séquence de la Boîte-P (Shaffer PL, *et al.*, 2004, Verrijdt G, *et al.*, 2003).

La séquence « CGSCKVF » de la Boîte-P, est conservée chez tous les récepteurs stéroïdiens excepté l'ER où la glycine en deuxième position est substituée par un acide glutamique, soulignant l'importance de ces acides aminés dans la reconnaissance de l'ADN.

Une étude sur le GR a également suggéré que d'autres acides aminés entourant la Boîte-P pourraient avoir leur importance dans la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). Dans cette étude, l'importance du résidu 437, situé 6 acides aminés en amont de la Boîte-P du DBD du GR, a été soulignée. En effet, une des différences entre le GR de souris et le GR humain est la présence d'une valine à la place d'une glycine en position 437. Ce simple changement d'acide aminé est suffisant pour induire une reconnaissance de promoteurs différente par les deux GR (Necela BM et Cidlowski JA, 2004).

Aussi, nous nous sommes intéressés à l'importance que pouvait avoir le résidu thréonine en position 575 du DBD.

La comparaison de séquences du DBD des RNs a révélé que cet acide aminé était extrêmement conservé au sein de cette superfamille. Mis à part le RAR α et le RAR β qui ont une alanine en position 575, tous les autres RNs portent un acide aminé possédant un groupement hydroxyle en cette position.

Ces données suggèrent que la présence du groupement hydroxyle à ce niveau là du doigt de zinc doit avoir une importance pour la reconnaissance spécifique de l'ADN par le RA (Figure 34).

Figure 34 : Alignement de séquences soulignant la conservation du résidu thréonine au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires



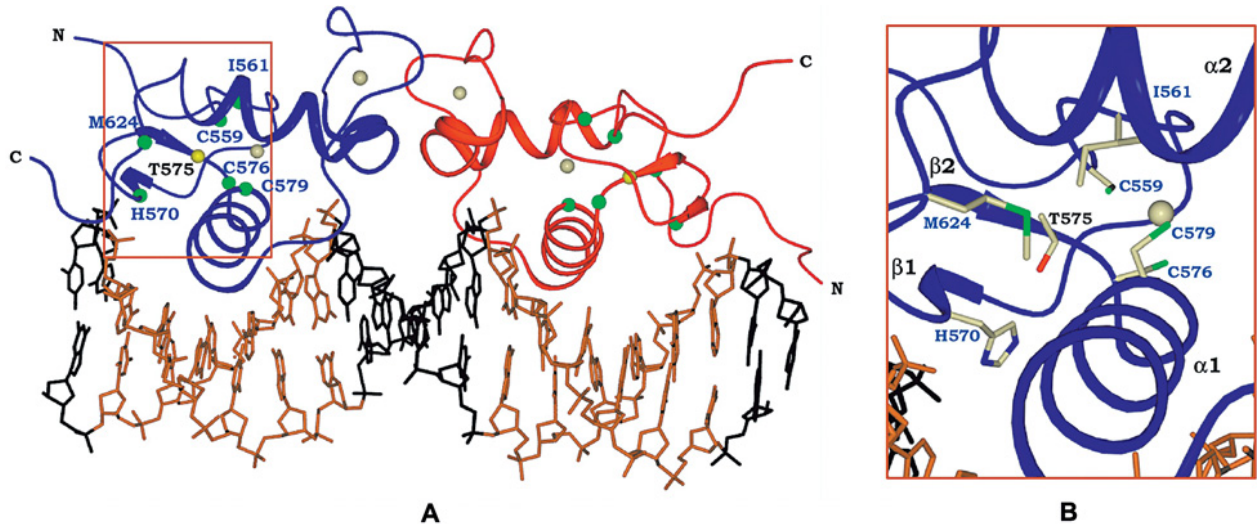
Légende Figure 34 : Alignement de séquences du DBD des RNs a été réalisé en utilisant le programme Clustal. Les acides aminés grisés indiquent les cystéines au niveau des deux doigts de zinc. La thréonine conservée en position 575 est indiquée par une flèche rose. Les résidus sérines possédant un groupement hydroxyle sont en bleu clair, et les deux alanines présentes au niveau de RARα et RARβ sont en bleu foncé. Plusieurs abréviations sont utilisées : h, Homo Sapiens ; m, Mus musculus (souris) ; r, Rattus norvegicus ; c, Canis familiaris ; x, Xenopus Laevis.

La conservation de ce résidu et plus particulièrement du groupement hydroxyle qu'il porte, nous a conduit à nous interroger sur son importance au niveau de la structure du DBD. Ainsi, en collaboration avec l'équipe de Jean-Marie Wurtz du Département de Biologie et de Génomique Structurales de l'IGBMC, nous avons réalisé la modélisation *in silico* du DBD du RA sauvage sur un élément ADR3 (Figure 35).

Ces données indiquent que la T575A n'est pas localisée en surface, mais au contraire est enfouie à l'intérieur de la structure globulaire formée par le DBD, et de ce fait ne peut pas être impliquée dans une interaction directe avec l'ADN. Cependant la T575 pourrait jouer un rôle dans l'établissement des liaisons de Van der Waals avec des résidus voisins localisés au niveau des différentes hélices du DBD. Ainsi, une des interactions possibles implique les deux cystéines C576 et C579, appartenant à l'hélice

$\alpha 1$ de reconnaissance (Figure 35 B) Une autre interaction pourrait être établie entre thréonine 575 et la méthionine en position 624 au niveau de l'extension C-terminale. La substitution de la thréonine par un résidu non chargé comme l'alanine en position 575 aboutirait ainsi à l'abolissement de toutes ces liaisons de Van der Waals.

Figure 35 : Modélisation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes sauvage sur un élément ADR3



Légende Figure 35 : La modélisation du DBD du RA sur un élément ADR3 a été réalisée en se basant sur la structure du DBD du GR humain (pdb entry 1GLU). **A.** Les deux monomères du RA sont représentés en bleu en rouge, les deux demi sites « ARE » sont figurés en brun et les atomes de zinc en argent. La thréonine T575A est représentée en jaune et les résidus interagissant avec la thréonine en vert. **B.** Agrandissement de l'encadré de la figure A.

Les forces de Van der Waals sont des interactions de faible intensité entre des solides moléculaires ou des atomes dont elles assurent la cohésion, et parfois l'agrégation. Elles résultent de l'interaction entre les électrons gravitant autour d'atomes ou de molécules chargées. Ainsi, la perte de telles interactions au niveau d'une structure telle que le DBD peut altérer la cohésion de ce domaine et par là même ses capacités d'interaction avec l'ADN.

Aussi, la première partie de mon étude concernant de la mutation T575A a été consacrée aux interactions du RA muté T575A avec l'ADN.

3.) Impact de la mutation T575A sur la reconnaissance de l'ADN

L'impact de la mutation T575A au niveau du DBD du RA sur la reconnaissance de l'ADN a été mené par deux approches successives et complémentaires.

Tout d'abord, l'affinité du RA muté vis-à-vis des éléments de réponse aux hormones spécifiques (ARE consensus (cs), AREPSA, scARE, PBARE2, PEM ARE, AREcs) ou non spécifiques (GREcs, C3(1)ARE) a été examinée *in vitro* par la technique de retardement sur gel (EMSA) dans les cellules COS-1 transfectées.

Ensuite, la capacité de fixation du RA T575A au niveau de promoteurs de deux gènes androgéno-dépendants *PSA* et *TMPRSS2* a été étudiée *in vivo* dans la lignée LNCaP en utilisant la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

a.) Etude de l'affinité du RA T575A vis-à-vis des éléments de réponse

L'étude de l'affinité vis-à-vis des éléments de réponse du RA T575A a été réalisée par la technique de retardement sur gel (EMSA). En effet, cette technique permet de mesurer l'affinité d'une protéine pour une séquence d'ADN. Elle consiste à marquer la séquence d'ADN choisie radioactivement puis à l'incuber avec la protéine d'intérêt. Plus la protéine a d'affinité pour cette séquence plus le complexe formé entre les deux partenaires sera fort. L'ensemble sera ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant permettant la séparation des complexes en fonction du poids et de la taille. Ainsi, les séquences d'ADN non fixées par les protéines vont aisément traverser les mailles du gel et ne seront pas retardées, en revanche les complexes protéine/ADN plus lourds vont migrer plus lentement, ils vont être qualifiés de retardés ou de « shift ». L'ajout supplémentaire d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt permet de témoigner de la spécificité du complexe observé. En effet le complexe ternaire constitué par l'ADN, la protéine d'intérêt et l'anticorps, de part sa taille importante, va migrer encore plus lentement sur le gel polyacrylamide entraînant la formation d'un supershift (bande super retardée).

Pour cette étude nous avons fait le choix d'utiliser la lignée COS-1. Ce choix a été guidé par deux propriétés de cette lignée. Tout d'abord, les cellules COS-1 permettent un haut niveau d'expression des RAs transfectés lorsque ces derniers sont exprimés à partir d'un vecteur doté d'une origine de réplication du virus SV-40, pSV-RA. D'autre part, les cellules COS-1 n'expriment pas de RA endogène, permettant ainsi d'éviter les interférences engendrées par le RA endogène de la lignée LNCaP au niveau de la liaison à l'ADN.

Les éléments de réponse aux hormones étudiés peuvent être subdivisés en deux classes. Tout d'abord, nous pouvons distinguer les éléments spécifiques du RA, c'est-à-dire situés au niveau des promoteurs de gènes régulés par le RA *in vivo*, comme l'AREPSA, le *sc*ARE, le PBARE, ou le PEMARE (cf. chapitre Matériels et Méthodes, Tableau 8).

La séquence AREPSA correspond à élément AREI du promoteur du gène *PSA* humain. Comme nous l'avons vu, le promoteur du gène *PSA* renferme trois éléments ARE, deux au niveau proximal, AREI et AREII et le troisième AREIII au niveau de la région activatrice en amont ou *l'enhancer*. Ce gène est spécifiquement régulé par le RA et code pour le PSA (Albin RJ *et al.*, 1970, Bradford TJ *et al.*, 2006).

Le « Secretory Component » (SC) joue un rôle majeur dans le transport des immunoglobulines, IgA et IgM dans la lumière de nombreuses glandes. Ce gène est exprimé de manière constitutive, néanmoins son expression peut être modulée par les hormones. Le promoteur et le premier exon du gène codant pour le SC comporte un ARE (Haelens A *et al.*, 1999).

La Probasine (PB) est exprimé par l'épithélium prostatique chez le rat, elle peut se présenter sous une forme nucléaire ou sécrétée. Son expression dans la prostate du rat est régulée par le zinc et par les androgènes de part la présence des AREs dans la région promotrice (Zhang J *et al.*, 2004).

Le gène *PEM* code pour un facteur de transcription à homéoboîte, il est exprimé au niveau des testicules et de l'épididyme et son expression est régulée par les androgènes. Le promoteur de ce gène renferme deux éléments ARE (Barbulescu K *et al.*, 2001).

La deuxième classe d'éléments étudiés concerne des séquences non spécifiques du RA telles que la séquence GREcs ou le C3(1)ARE.

Le GREcs est une séquence consensus artificielle, elle est spécifique du GR et n'est pas retrouvée *in vivo* au niveau de promoteurs des gènes régulés par le GR.

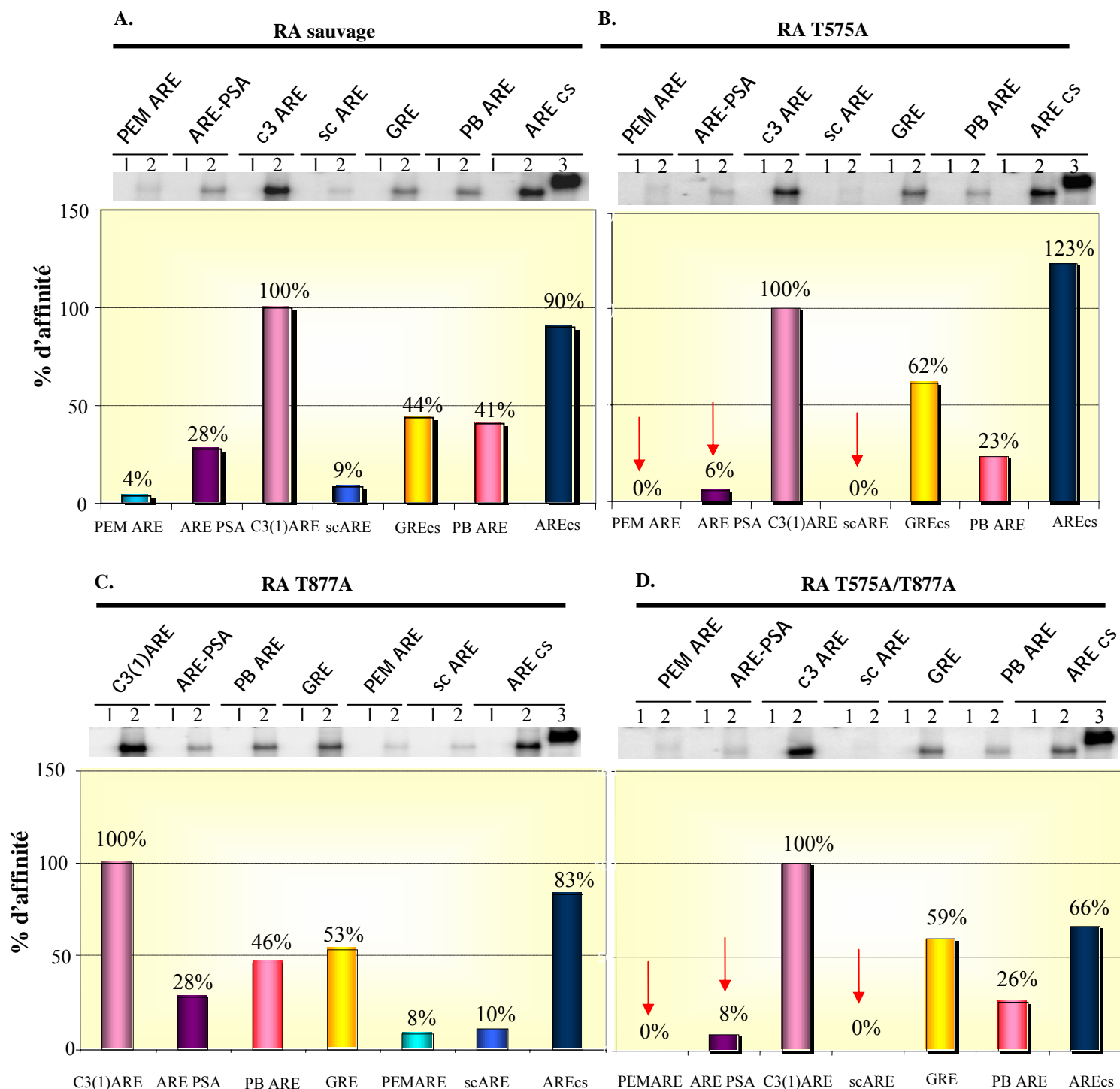
Le C3(1)ARE, est une séquence présente en amont du gène codant pour le complément C3, cette séquence est reconnue par le RA mais également par d'autres récepteurs stéroïdiens et de ce fait n'est pas considérée comme spécifique du RA (Claessens F *et al.*, 2001).

Ainsi, les expériences de retardement sur gel ont été réalisées à partir d'extraits nucléaires de cellules de rein de singe COS-1. Brièvement, les cellules COS-1 ont été transfectées avec le plasmide d'expression pSV, codant soit pour le RA sauvage ou pour un RA portant la mutation T575A, T877A ou T575A/T877A. Vingt quatre heures après transfection les cellules sont stimulées par 100nM de DHT et les extraits nucléaires réalisés 24h plus tard. Parallèlement, un marquage radioactif des éléments de réponse aux hormones, spécifiques ou non du RA a été réalisé. Les sondes ainsi obtenues ont été incubées avec les protéines nucléaires extraites afin de permettre la formation des complexes, puis l'ensemble a été déposé sur un gel polyacrylamide non dénaturant (Figure 36).

Le RA sauvage présente une forte affinité pour tous les éléments testés avec une préférence pour l'AREcs (90%) et le C3(1) ARE (établie à 100%). Il reconnaît également tous les éléments spécifiques du RA avec une affinité allant de 4% à 28% respectivement pour le *PEMARE* et l'*AREPSA*. Même si, au premier abord les pourcentages d'affinité vis-à-vis des AREs spécifiques semblent faibles, il faut prendre en considération le caractère isolé des séquences étudiées, qui classiquement fonctionnent dans le contexte d'une région promotrice (Figure 36A).

Le RA T575A a une affinité réduite pour tous les éléments spécifiques du RA avec seulement 8% d'affinité pour *AREPSA* et une perte totale de fixation au niveau de *PEMARE* et de *scARE*. En revanche, son affinité pour les séquences non spécifiques, telles que la séquence consensus de réponse aux GRE est augmentée (63% contre 53% pour le RA sauvage) (Figure 36B, flèches rouges).

Figure 36 : Comparaison de l'affinité des récepteurs des androgènes sauvage et muté pour les éléments de réponse aux hormones



Légende Figure 36 : Les expériences de retardement sur gel ont été réalisées avec le RA sauvages (A.), le RA T575A (B.), le RA T877A (C.) ou le RA T575A/T877A et avec les éléments de réponse aux hormones suivants : sc-ARE (bleu), AREPSA (violet foncé), C3(1)ARE (violet clair), PBARE2(rose/rouge), PEM ARE1(turquoise), ARE cs (bleu marine), GRE cs (jaune/orange). Les chiffres au dessus des gels: (1) : la sonde seule (2) : sonde+RA et (3) : sonde+RA+anticorps-anti-RA. La quantification des signaux a été réalisée en utilisant le logiciel QuantityOne™ Gel Doc 2000, les affinités ont par la suite été traduites en pourcentages, l'affinité par rapport à la séquence C3(1)ARE fixée à 100%. Les histogrammes représentent les pourcentages d'affinité des différents RAs pour les éléments de réponse. Les flèches rouges indiquent les principaux changements d'affinité induits par la mutation T575A.

Les affinités du mutant T877A vis-à-vis des éléments de réponse sont très similaires à celles du RA sauvage, indiquant que la mutation T877A n'a pas d'impact sur la liaison à l'ADN du RA (Comparer Figure 36A et C).

Comme attendu, le double mutant T575A/T877A apparaît avoir les mêmes affinités pour les AREs que le simple mutant T575A, avec une affinité réduite pour les éléments spécifiques et augmentée pour les AREs non spécifiques (Figure 36D).

L'ensemble de ces résultats montre que la substitution de la thréonine par une alanine en position 575 du DBD peut modifier les affinités du RA pour les ARE *in vitro*. Dans notre système, la mutation T575A oriente la reconnaissance du RA vers des éléments non spécifiques aux dépens des séquences spécifiques.

Nous avons ensuite voulu vérifier comment se comportait un variant du RA portant cette mutation *in vivo*, dans un contexte de promoteur entier, aussi la prochaine étape de mon travail a consisté en la mise au point et la réalisation d'expériences de ChIP.

b.) Occupation des promoteurs androgéno-dépendants *in vivo* par le récepteur des androgènes muté T575A

L'occupation des promoteurs androgéno-dépendants *in vivo* a été réalisée après transfection des cellules LNCaP par le RA sauvage ou par le RA muté T575A étiquetés à l'aide de la protéine fluorescente GFP. Au cours de cette étude, deux promoteurs de gènes androgéno-dépendants exprimés dans la lignée LNCaP, *PSA* et *TMPRSS2*, ont été étudiés par la méthode de ChIP (Figure 37).

Comme décrit précédemment, le gène *PSA* humain contient trois AREs, situés à -170 pb (AREI), -394 pb (AREII) et à -4.2kb (AREIII) du site d'initiation de transcription. La proximité de AREI et de AREII ne nous permettant pas de distinguer ces éléments au cours de nos expériences, nous avons décidé d'axer notre étude sur les deux éléments extrêmes AREI et AREIII.

Parallèlement, nous avons également étudié la région promotrice du gène *TMPRSS2*. Le premier exon du gène *TMPRSS2* contient un élément ARE qui contribue à la régulation androgéno-dépendante de ce gène. Dans les CaPs, ce premier exon du gène *TMPRSS2* se retrouve fréquemment transloquée en amont de deux gènes appartenant à la famille de facteurs de transcription ETS (E26 Transformation-specific

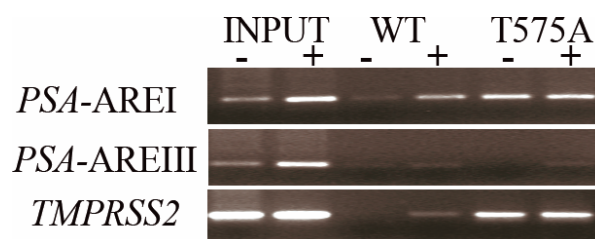
oncogen), *ERG* (21q22.3) et *ETV1* (7p21.3) aboutissant respectivement aux gènes de fusion *TMPRSS2/ERG* et *TMPRSS2/ETV*. L'expression de ces facteurs oncogéniques devient androgéno-dépendante (Tomlins SA *et al.*, 2005).

Les cellules LNCaP sont transfectées avec le plasmide pEGFP-RA sauvage ou pEGFP-RA T575A puis, traitées 24h après par 100nM de DHT ou 1µM de bicalutamide. Vingt quatre heures après traitement, les cellules sont fixées par un « cross-link » au formaldéhyde, les lysats cellulaires sont ensuite préparés et l'ADN est soniqué. Les complexes protéine/ADN ainsi obtenus sont immunoprécipités à l'aide d'un anticorps anti-étiquette EGFP, puis une protéolyse permet de libérer les fragments d'ADN retenus par les RAs étiquetés. La dernière étape consiste en la réalisation d'une PCR dont les amorces sont dirigées contre l'AREI ou l'AREII du gène *PSA*, ou contre l'ARE du gène *TMPRSS2*. (Figure 37).

Nous avons choisi les plasmides EGFP de façon à pouvoir distinguer nos RAs transfectés étiquetés « EGFP » du RA endogène des cellules LNCaP et de pouvoir ainsi aisément immunoprécipiter les complexes contenant nos RAs transfectés en utilisant un anticorps spécifique dirigé contre l'étiquette EGFP.

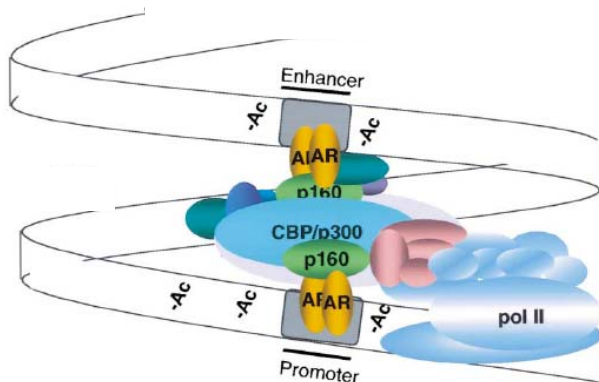
Figure 37 : Occupation des promoteurs in vivo par le récepteur des androgènes sauvage et le récepteur des androgènes T575A

A.



Légende Figure 37A : Les cellules LNCaP sont transfectées avec la construction pEGFP-RA sauvage (WT) ou pEGFP-RA T575A. Vingt quatre heures après transfection les cellules sont traitées par 100nM de DHT (+) ou par 1µM de bicalutamide (-). Les complexes protéine/ADN sont fixés au formaldéhyde et la chromatine est fragmentée par sonication. La précipitation des complexes est réalisée en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette EGFP. Après protéolyse, les fragments d'ADN obtenus sont amplifiés par PCR en utilisant les amorces spécifiques dirigées contre l'AREI et l'AREIII du gène *PSA* et contre l'ARE du gène *TMPRSS2*. Les « INPUT » témoignent de la présence de l'ADN avant l'immunoprécipitation.

B.



Légende Figure 37B : Modèle représentant la collaboration entre la région promotrice et l'enhancer du gène PSA en présence d'un agoniste. La machinerie générale de transcription (Pol II et GTFs) ainsi que les co-activateurs CBP/p300 et p160 sont représentés. L'état actif de la chromatine est représenté par la présence de groupements acétyles. D'après Shang Y et al., 2002.

Nos expériences de ChIP présentent un inconvénient de taille, consistant en la réalisation d'une PCR simple et non d'une PCR quantitative. Malheureusement, le recours à une PCR classique qualitative ne permet pas l'analyse de nos résultats d'un point de vue quantitatif. Aussi l'interprétation des données a été réalisée uniquement sous un aspect qualitatif, se basant sur la présence ou de l'absence de la fixation des RA au niveau des ARE étudiées. Le RA sauvage a été choisi comme référence.

Le contrôle constitué par « l'INPUT », atteste de la présence de l'ADN avant immunoprécipitation, il représente l'ADN total fragmenté présent dans les cellules après « cross-link » et lyse cellulaire.

Le RA sauvage se fixe sur les trois éléments étudiés en présence du ligand agoniste, la DHT. Une faible fixation au niveau de l'AREI peut également être constatée en présence de bicalutamide.

Le RA T575A se fixe également au niveau des trois AREs étudiés en présence de DHT avec une certaine préférence pour l'ARE du promoteur du gène *TMPRSS2*. De manière intrigante et contrairement au RA sauvage, le RA muté T575A est fortement recruté au niveau de AREI et de ARE *TMPRSS2* en présence de l'antagoniste, le bicalutamide. Alors que l'amplification à partir de l'AREIII en présence de bicalutamide est très faible pour les deux RAs sauvage ou muté.

Nos résultats concernant le RA sauvage sont en parfait accord avec les données décrites dans la littérature. En effet, le RA sauvage est recruté au niveau du promoteur

du gène *PSA* (AREI) en présence de ligands agonistes et antagonistes, alors que sa fixation au niveau de *l'enhancer* (AREIII) ne peut être observée qu'en présence d'agoniste (Shang Y *et al.*, 2002).

Par ailleurs, il est admis que les RNs régulent la transcription en recrutant au niveau des promoteurs de gènes des co-activateurs et des co-répresseurs (Heinlein CA et Chang C, 2002). Shang et ses collaborateurs ont par ailleurs démontré que la liaison d'un ligand agoniste au niveau du RA induit un recrutement de co-activateurs au niveau de la région promotrice et de *l'enhancer* (Shang Y *et al.*, 2002). En revanche, en présence de bicalutamide ce sont les co-répresseurs qui sont recrutés et uniquement au niveau de la région promotrice. Ces données indiquent que la formation d'un complexe activateur par un RA lié à un ligand agoniste, implique une collaboration entre la région promotrice et *l'enhancer* (Figure 37B). Inversement, la formation d'un complexe répressif en présence d'un RA lié à un antagoniste ne requiert que la région promotrice.

Le bicalutamide autorise la translocation nucléaire du RA, cependant il empêche l'interaction entre les parties N- et C-terminales du récepteur (Masiello D *et al.*, 2002). Or cette interaction est un prérequis fondamental pour l'interaction avec le co-activateur SRC-1 (Steroid Receptor Co-activator 1). Aussi, le bicalutamide est un antagoniste puissant du RA permettant la liaison du RA au niveau de l'ADN mais dans une conformation inactive et de manière très labile (Shang Y *et al.*, 2002, Farla P *et al.*, 2005). La liaison plus importante du RA muté T575A au niveau de AREI et de l'ARE TMPRSS2 observée en présence de bicalutamide par rapport au RA sauvage, suggère une stabilité plus importante des complexes formés au niveau de l'ADN.

En résumé, les données de cette étude indiquent que la mutation T575A affecte la liaison à l'ADN du RA muté et résulte en une reconnaissance différente des promoteurs.

Par ailleurs, il existe un «contraste» entre la forte occupation de l'élément AREI du promoteur du gène *PSA* par le RA T575A dans les cellules LNCaP et les résultats obtenus par retardement sur gel dans la lignée COS-1, montrant une faible reconnaissance de cet élément par le RA muté (Figure 36B et D). Dans cette étude, nous n'avons pas été en mesure d'évaluer dans les cellules LNCaP la liaison du RA

sauvage ou du RA muté sur les différents éléments de réponse aux hormones testés dans les COS-1, en raison de la présence du RA endogène. Néanmoins, il est fort probable que dans les LNCaP, les capacités de liaison du RA T575A à l'élément ARE1 soient les mêmes si non supérieures à celles du RA sauvage sur ce même élément. Cette hypothèse est soutenue par les résultats obtenus par Mlle Audrey Monge au sein du laboratoire, montrant une plus forte activité transcriptionnelle du RA T575A à partir du promoteur PSA dans les cellules LNCaP.

Cette divergence entre les deux lignées LNCaP et COS-1 pourrait s'expliquer par un recrutement distinct de co-facteurs par les deux RAs et par le niveau d'expression de ces co-facteurs, variable d'une lignée à l'autre.

Aussi, l'étape suivante de mon travail a consisté en la comparaison du recrutement des co-facteurs par le RA sauvage et par le RA T575A dans la lignée LNCaP.

4.) Recrutement différent de co-facteurs par le RA T575A

Le recrutement des co-facteurs par le RA T575A a été étudié par deux méthodes distinctes. La technique de retardement sur gel a été appliquée aux cellules LNCaP transfectées avec les constructions pEGFP-RA sauvage ou pEGFP-RAT575A pour évaluer la taille des complexes formés par les deux RAs au niveau des éléments de réponse aux hormones. En effet, cette technique étant réalisée en conditions non dénaturantes permet de préserver les complexes ADN/protéines dans une conformation native. Le retardement des complexes EGFP-RA/ADN est analysé de manière spécifique à l'aide d'un anticorps anti-EGFP.

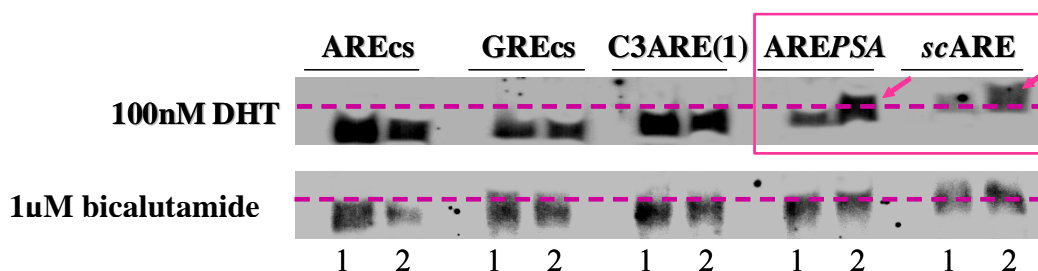
En parallèle, j'ai également étudié la colocalisation du RA T575A avec les co-activateurs CBP (CREB (cAMP Response Element Binding) Binding Protein) et SRC-2 (Steroid Receptor Coactivator-2) et avec le co-répresseur NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) par immunofluorescence en microscopie confocale dans les cellules LNCaP transfectées avec les vecteurs d'expression EGFP.

a.) Etude de la formation des complexes autour du RA T575A

La technique d'EMSA a été utilisée pour étudier la taille des complexes transcriptionnels formés par le RA sauvage et le RA muté dans les cellules LNCaP.

A cet effet, les cellules LNCaP sont transfectées avec les plasmides d'expression EGFP-RA sauvage ou EGFP-RA-T575A et traitées 24 heures après par 100nM de DHT ou par 1µM de bicalutamide. Vingt quatre heures plus tard les protéines nucléaires sont extraites et incubées avec les sondes préalablement préparées. Les complexes protéine/ADN formés sont ensuite déposés sur un gel polyacrylamide non dénaturant de façon à préserver leur intégrité (Figure 38).

Figure 38 : Etude des complexes formés autour des récepteurs des androgènes sauvage et T575A



Légende Figure 38 : Les expériences de retardement sur gel sont réalisées avec le RA sauvage (1) ou le RA T575A (2), et en présence des éléments de réponse aux hormones suivants : sc-ARE, ARE PSA, C3(1)ARE, AREcs et GREcs. Les lignes horizontales permettent d'évaluer la taille des complexes formés par les deux RAs sur les différents séquences. L'encadré et les flèches indiquent la variation de taille observée entre les complexes formés par le RA sauvage et le RA T575A au niveau des éléments spécifiques.

La taille des complexes transcriptionnels formés par le RA T575A et le RA sauvage est différente sur les AREs spécifiques en présence d'un ligand agoniste. En effet, les complexes transcriptionnels formés par le RA T575A sur les deux éléments de réponse aux androgènes spécifiques, AREPSA et scARE, sont plus retardés que les complexes formés par le RA sauvage sur ces mêmes motifs (Figure 38, encadré rose et les flèches).

Ces différences de taille entre les deux RAs ne sont pas retrouvées en présence de bicalutamide, ni au niveau des éléments non spécifiques tels que le GREcs ou le C3(1)ARE ou encore sur l'AREcs.

Nos résultats révèlent que le complexe transcriptionnel formé autour du RA T575A lié à un agoniste au niveau des AREs spécifiques est d'une taille différente, suggérant une composition distincte par rapport à celui formé autour du RA sauvage sur ces mêmes ARE. Ces données pourraient s'expliquer par un recrutement différent de co-facteurs.

Dans l'optique de mieux comprendre l'impact de la mutation T575A sur la formation du complexe transcriptionnel autour de ce variant du RA, je me suis intéressée au recrutement des co-facteurs. Aussi, j'ai procédé à la réalisation d'expériences de colocalisation avec les co-activateurs CBP et SRC-2, et avec le corépresseur NCoR.

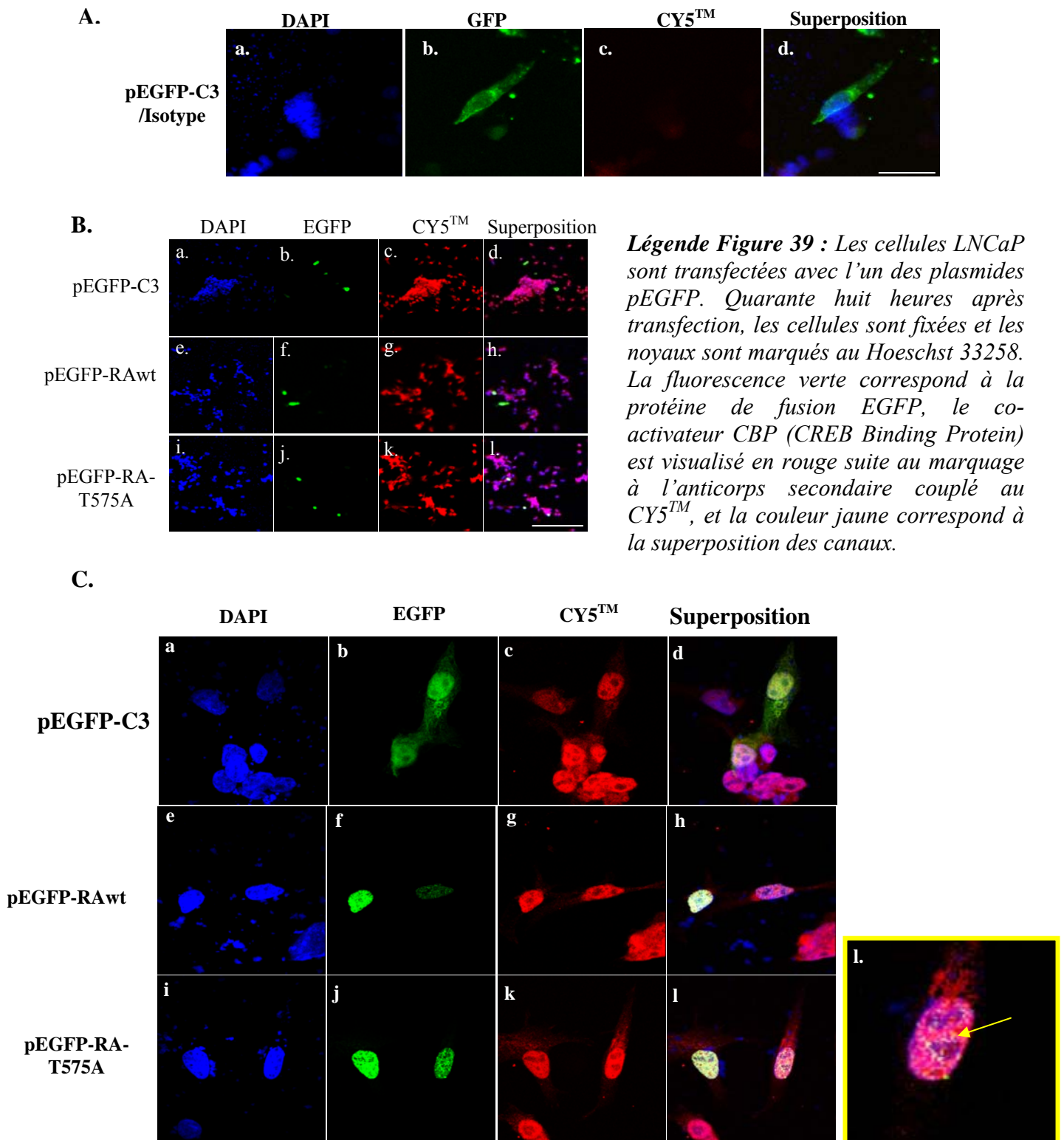
b.)Etude de la colocalisation du récepteur des androgènes T575A avec les co-facteurs

Afin de visualiser une différence de recrutement des co-facteurs mentionnés ci-dessus, les cellules LNCaP sont transfectées avec le plasmide d'expression du RA sauvage ou du RA T575A étiqueté à la protéine EGFP ou avec le plasmide contrôle pEGFP-C3. Toutes les expériences sont réalisées en présence de 100nM de DHT. La colocalisation avec les co-facteurs a été mise en évidence à l'aide d'anticorps primaires spécifiques et d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome CY5. En parallèle, un contrôle isotypique témoigne de la spécificité de l'immunofluorescence.

L'étude de la colocalisation a été réalisée en deux temps. Premièrement, une acquisition à faible grossissement (x20) nous a permis d'évaluer le taux de transfection ainsi que le niveau d'expression du co-facteur étudié dans les cellules transfectées et dans les cellules avoisinantes. Deuxièmement, une acquisition à fort grossissement (x100), a été réalisée pour étudier la colocalisation au niveau des cellules transfectées.

Le co-activateur CBP, appartient à la classe I des co-activateurs. Son rôle est de remodeler la chromatine au niveau des gènes cibles du RA et de recruter la machinerie générale de transcription.

Figure 39 : Etude du recrutement de CBP par le récepteur des androgènes T575A



A. Contrôle isotypique réalisé avec des IgG de lapin, Grossissement x100, barre=29,5µM
B. Evaluation du taux de transfection, grossissement x20, la barre =112µM. **C.** Etude de la colocalisation, grossissement x100, barre= 20,2µM. Dans l'encadrement jaune, les images correspondant au RA T575A peuvent être observées, les flèches indiquent quelques points de colocalisation entre le cofacteur CBP et le variant T575A. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV.

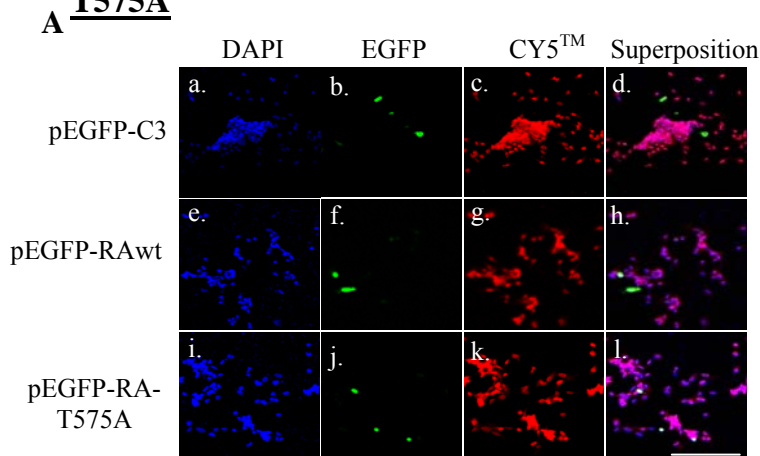
Les données observées témoignent du faible taux de transfection que nous obtenons lors de nos expériences. Par ailleurs, le marquage de CBP paraît homogène dans toute la population de cellules et ne semble pas affecté par la transfection par les plasmides d'expression (Figure 39A).

Cette étude m'a permis de mettre en évidence deux différences principales entre le RA sauvage et le RA T575A. Tout d'abord, le RA T575A activé par la DHT présente une distribution intranucléaire sous forme d'amas, alors que le RA sauvage dans les mêmes conditions reste diffus. Ensuite, j'ai pu démontrer que le RA T575A modifie la distribution intranucléaire du co-activateur CBP. En effet, alors que la protéine CBP décrit un profil d'expression diffus dans tout le noyau en présence du RA sauvage activé par la DHT, elle est en partie redistribuée dans les amas formés par le RA T575A (Figure 39B). Néanmoins, les amas de colocalisation sont peu nombreux, suggérant que le co-activateur CBP n'est pas le partenaire principal du RA T575A.

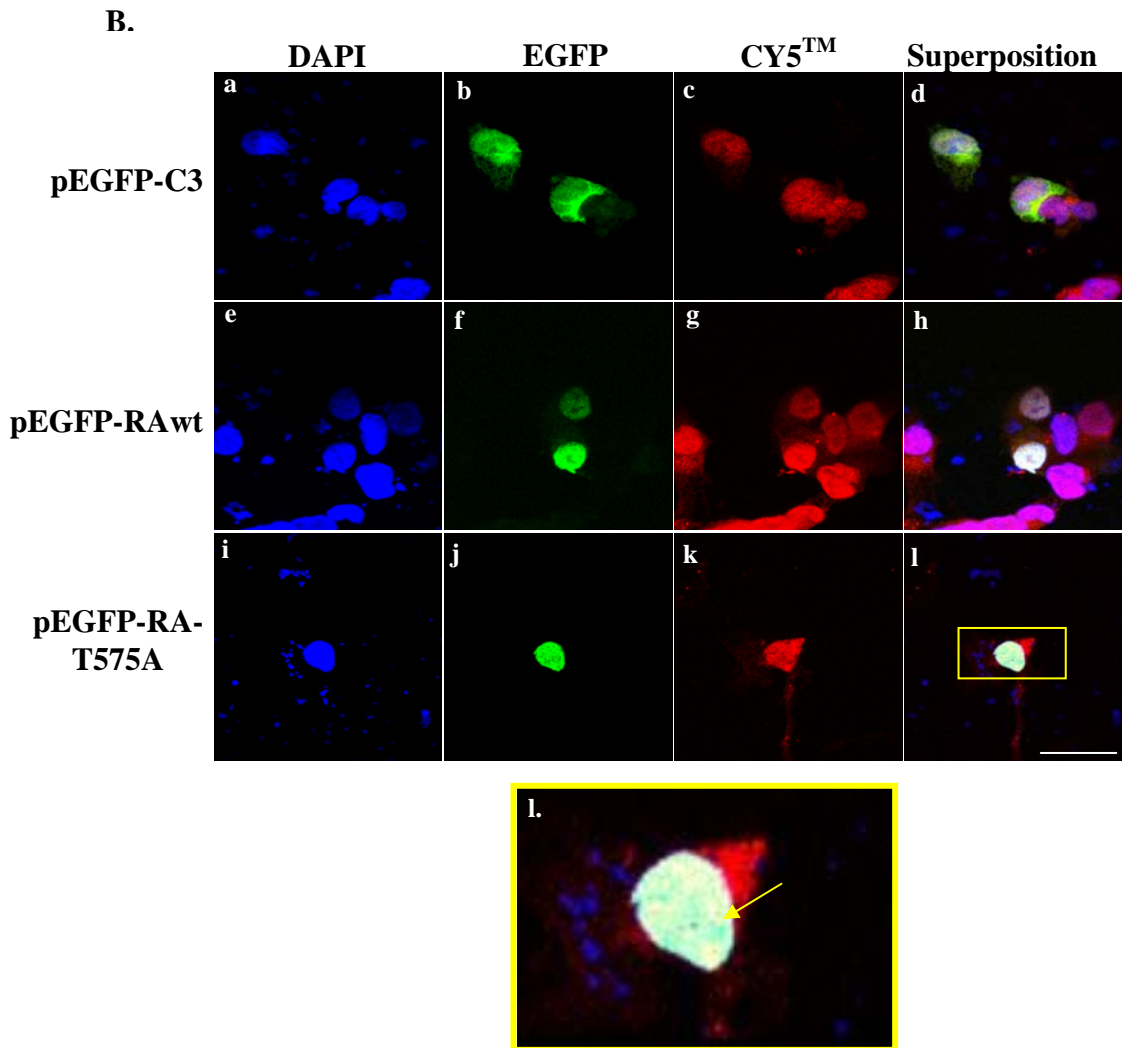
Je me suis ensuite intéressée au recrutement d'un second co-activateur important du RA, SRC-2. La protéine SRC-2 appartient à la seconde classe des co-activateurs, et sa fonction activatrice repose sur le recrutement du complexe SWI/SNF et sur l'optimisation de l'interaction entre les parties N- et C-terminales du RA (Heinlein CA et Chang C, 2002).

De la même manière que pour CBP, la distribution du marquage obtenu pour SRC-2 est homogène dans toute la population cellulaire et n'est pas modifiée par les plasmides d'expression utilisés (Figure 40 A.).

Figure 40 : Etude du recrutement de SRC-2 par le récepteur des androgènes T575A



Légende Figure 40. Les cellules LNCaP sont transfectées avec l'un des plasmides pEGFP. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. La fluorescence verte correspond à la protéine de fusion EGFP, le co-activateur SRC-2 (Steroid Receptor Coactivator 2) est visualisé en rouge suite au marquage par l'anticorps secondaire couplé au CY5TM, et la couleur jaune correspond à la superposition des deux canaux.



A. Evaluation du taux de transfection, grossissement $\times 20$, la barre = $112\mu\text{M}$. **B.** Etude de la colocalisation, grossissement $\times 100$, barre = $20,2\mu\text{M}$. Dans l'encadrement jaune, les images correspondant au RA T575A peuvent être observées, les flèches indiquent quelques points de colocalisation entre le cofacteur SRC-2 et le variant T575A. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV.

Le co-activateur SRC-2 montre une distribution intranucléaire diffuse en présence du RA sauvage activé par la DHT, colocalisant parfaitement avec ce dernier (Figure 40B e-h). En présence du RA T575A, ce co-facteur est redistribué de la même manière que CBP au niveau des amas intranucléaires formés par ce variant (Figure 40B i-l et encadré jaune). La superposition des marquages obtenus pour le RA T575A et le co-activateur SRC-2 montre une forte colocalisation entre les deux protéines au niveau des amas formés. De plus, le nombre important de ces amas et leur dispersion sur toute la surface du noyau, suggère un recrutement important de ce co-facteur par le RA muté.

A vu de ces résultats, montrant une redistribution intranucléaire de co-activateurs CBP et SRC-2, je me suis intéressée au recrutement par le RA T575A de co-répresseurs. En effet, les RNs peuvent réprimer la transcription en interagissant avec des co-répresseurs de la transcription comme NCoR. Ce co-répresseur interagissant avec le LBD et le DBD du RA est dépourvu d'activité enzymatique intrinsèque. Cependant, NCoR permet le recrutement de complexes HDAC (Histone déacétylase) (Hartman HB *et al.*, 2005).

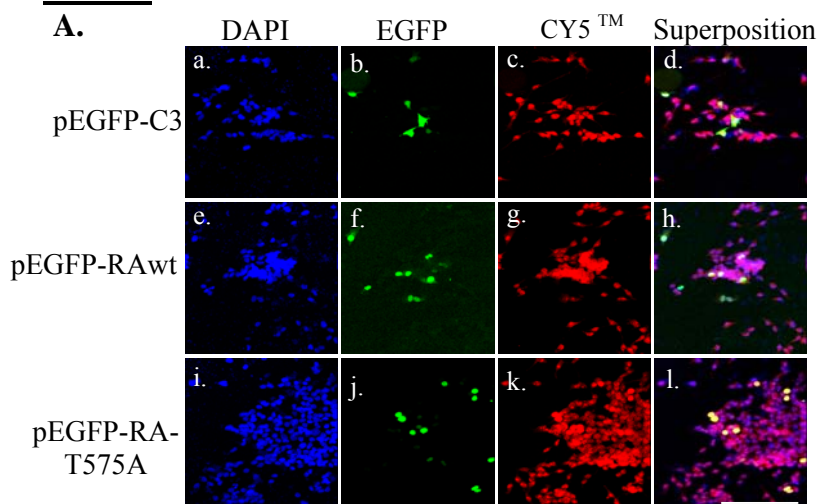
Une nette différence entre les deux RAs a pu être observée au niveau du recrutement de NCoR.

Contrairement aux résultats obtenus avec les deux co-activateurs, l'intensité de la fluorescence rouge correspondant à NCoR dans les cellules transfectées par le RA sauvage et le RA T575A est beaucoup plus forte que celle détectée dans les cellules voisines ou dans les cellules transfectées par le plasmide contrôle. Ces données suggèrent un taux d'expression de NCoR plus important dans les cellules transfectées par les RAs (Figure 41A.).

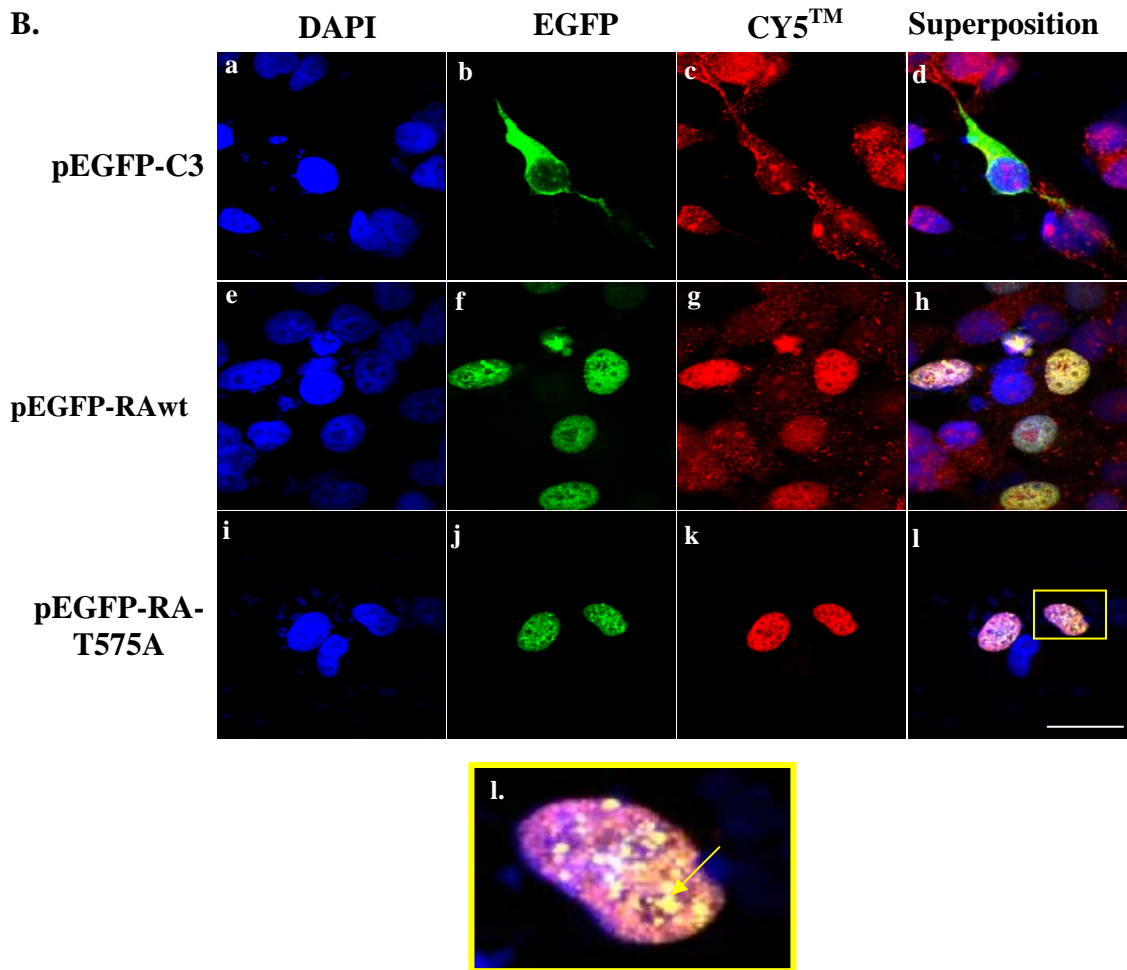
NCoR présente une localisation diffuse, semblable à celle observée pour ses homologues activateurs en présence du RA sauvage (Figure 41B e-h).

Par ailleurs, ce co-répresseur est fortement recruté au niveau des amas intranucléaires formés par le RA muté, mettant encore une fois l'accent sur une redistribution différente des co-facteurs dans les cellules transfectées par le RA muté T575A (Figure 41B i-l et l'encadré jaune).

Figure 41 : Etude du recrutement de NCoR par le récepteur des androgènes T575A.



Légende Figure 41. Les cellules LNCaP sont transfectées avec l'un des plasmides pEGFP. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. La fluorescence verte correspond à la protéine de fusion EGFP, le co-répresseur NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) est visualisé en rouge suite au marquage à l'anticorps secondaire couplé au CY5TM, et la couleur jaune correspond à la superposition des deux canaux.



A. Grossissement x20, la barre représente 112 μ M. **B.** Grossissement x100, barre= 20,2 μ M. Dans l'encadrement jaune, les images correspondant au RA T575A peuvent être observées, les flèches indiquent quelques points de colocalisation entre le cofacteur SRC-2 et le variant T575A. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV.

II. Conclusions concernant le récepteur des androgènes muté T575A

L'ensemble de ces travaux, m'a permis de mettre en évidence plusieurs conséquences directes de la substitution T575A sur les capacités de reconnaissance et de liaison à l'ADN et sur le recrutement de co-facteurs par ce RA.

Tout d'abord, par les expériences *in vitro*, test fonctionnel chez la levure, et EMSA réalisées à partir d'extraits protéiques de cellules COS-1 transfectées une faible reconnaissance des AREs spécifiques a pu être mise en évidence. Cette faible reconnaissance est accompagnée d'une faible activité transcriptionnelle à partir de

promoteurs contenant ces éléments de réponse. Par ailleurs, ce RA muté présente une affinité et une activité transcriptionnelle plus importantes à partir d'éléments non spécifiques du RA (Monge A *et al.*, 2006). Ces premiers résultats soulignent l'importance de la thréonine en position 575 au sein du DBD pour la spécificité d'action du RA.

Cependant, les expériences de CHIP conduites dans les cellules LNCaP ont montré une forte liaison du RA muté T575A au niveau du promoteur du gène *PSA* et du gène *TMPRSS2*.

Par ailleurs, toujours dans les cellules LNCaP, l'étude de la formation du complexe transcriptionnel autour du RA T575A au niveau des AREs spécifiques par la technique d'EMSA a révélé une taille différente des complexes transcriptionnels formés par le RA T575A par rapport au RA sauvage. Puis, des expériences de colocalisation par immunofluorescence en microscopie confocale entre le RA sauvage ou le RA muté et des co-facteurs ont aussi montré l'importance de cette position pour les fonctions du RA.

Le recrutement plus intense de SRC-2 et de NCoR pourrait être à l'origine de la différence de taille des complexes transcriptionnels formés par le RA muté, observé en EMSA. Ces données sont également en accord avec le modèle décrit dans la littérature, suggérant une compétition entre les co-répresseurs et les co-activateurs au niveau du RA transcriptionnellement actif. En effet, NCoR est retrouvé au niveau des complexes actifs formés par le RA lié à un ligand agoniste (Zhang X *et al.*, 1998, Yoon HG et Wong J, 2006).

D'autre part, le fort recrutement des co-facteurs tels que CBP et SRC-2 au niveau des amas intranucléaires formés par le RA T575A renforce l'hypothèse de la formation d'un complexe d'activation transcriptionnelle actif et différent de celui formé par le RA sauvage.

Ces résultats mettent en évidence les conséquences dramatiques que peut avoir une simple substitution d'acide aminé sur les fonctions d'une protéine. En effet, dans le cas du RA T575A, la substitution de la thréonine par une alanine engendre non seulement une reconnaissance différente de promoteur, mais suggère également une régulation transcriptionnelle distincte.

Tout particulièrement, l'occupation plus importante du promoteur du gène *TMPRSS2* par le RA T575A est une information intéressante, puisque les translocations *TMPRSS2/ETS* sont retrouvées dans plus de 50% de CaPs avancés. Les facteurs de transcription ERG et ETV1 étant impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire, une plus forte reconnaissance du promoteur *TMPRSS2* par le RA T575A pourrait conduire à une expression plus importante de ce gène de fusion et contribuer à la progression du CaP (Petrovics G *et al.*, 2005, Tomlins SA *et al.*, 2005).

Cependant des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'impact d'un tel RA T575A sur l'expression du gène *TMPRSS2*. Il serait ainsi intéressant de savoir si dans une même cellule cancéreuse, il y a à la fois co-existence de la translocation *TMPRSS2/ETS* et de la mutation du RA T575A.

2^{ème} PARTIE :

IMPACT DE L'INSERTION DE 23 ACIDES AMINES
ENTRE LES DEUX DOIGTS DE ZINC DU DOMAINE DE
LIAISON A L'ADN DU RECEPTEUR DES ANDROGENES

I. Caractérisation du variant du récepteur des androgènes : AR23

La variant AR23 a été isolé à partir d'une ponction médullaire réalisée chez un autre patient présentant un cancer de la prostate métastatique en échappement à la privation androgénique. La première ligne d'hormonothérapie a consisté en l'administration de la goséréline, un agoniste de la LHRH, combinée au bicalutamide, un anti-androgène. Après une réponse clinique à ce blocage androgénique complet d'une durée de 12 mois un échappement hormonal a été observé. Plusieurs lignes d'hormonothérapie combinées ou non à la chimiothérapie ont ensuite été administrées.

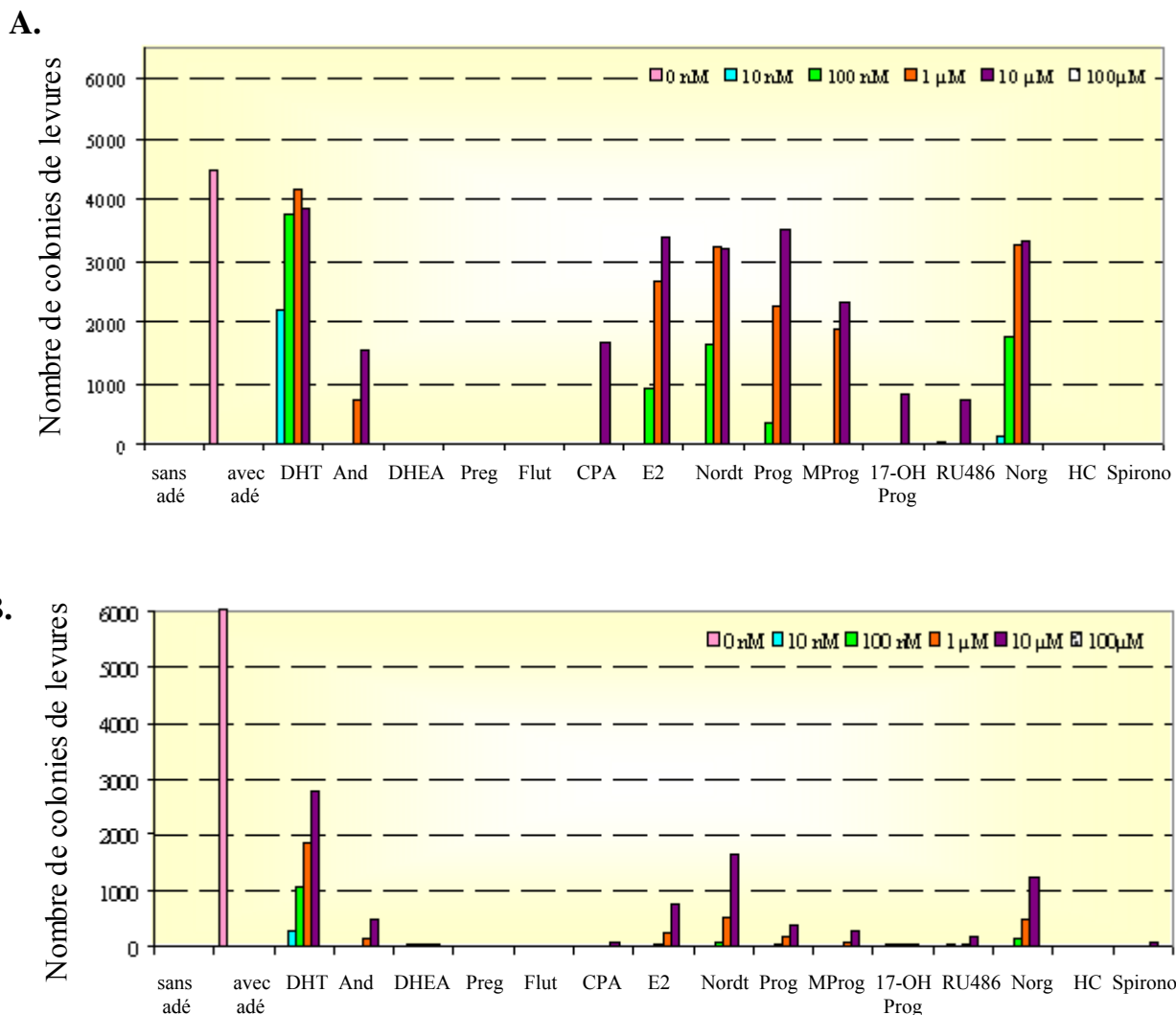
La ponction médullaire a été réalisée après échappement à la 4^{ème} ligne d'hormonothérapie, et des mutations du RA ont été recherchées dans cet échantillon à l'aide du test fonctionnel. Le patient est décédé trois années après le diagnostic de CaP métastatique.

1.) Les résultats du test fonctionnel chez la levure

Les ARN extraits de la ponction médullaire réalisée chez le patient décrit ci-dessus ont été soumis au test fonctionnel chez la levure afin de détecter une éventuelle présence de mutations au niveau du RA au sein de cet échantillon de CaP. L'hormonogramme obtenu a été comparé à celui du RA sauvage.

Le spectre de sensibilité du RA sauvage dans le test fonctionnel chez la levure a déjà été commenté plus haut (cf. pages 105 et 106). Brièvement, il se caractérise par une réponse forte dès la plus faible concentration de DHT (10nM), une faible réponse en présence de fortes concentrations (1 et 10 μ M) d'adrostènedione et de dérivés progestatifs ou oestrogéniques, puis par l'absence de réponse en présence de flutamide (Figure 42).

Figure 42 : Hormonogrammes obtenus après transformation des levures avec le récepteurs des androgènes sauvage (A) et mutés (B).



Lég

obtenues en présence au KA sauvage (A.) ou des KA issus de l'échantillon tumoral (B.). Après transformation, les levures sont étalées sur milieu sélectif sans adénine (adé) additionné d'une des molécules suivantes à la concentration indiquée : DHT, dihydrotestostérone ; And, adrostènedione ; DHEA, déhydroépiandrostérone ; Flut, flutamide ; CPA, cyprotérone acétate ; E2, β -oestradiol ; Prog, progestérone ; Mprog, médroxyprogestérone ; 17-OH-Prog, 17 α -hydroxy-progestérone ; Norg, norgesterol ; HC, hydrocotisone et spiono, la spironolactone. La gamme de concentration utilisée est de 100 nM à 100 μ M pour le Flut et de 10 nM à 10 μ M pour toutes les autres molécules. La boîte sans adé correspond au contrôle négatif, et la boîte avec adé (200 μ g/ml) correspond au contrôle positif.

L'hormonogramme obtenu à partir de notre échantillon tumoral suggère la présence de mutations qui modifient la sensibilité du RA pour les molécules testées. En effet, le profil de réponse obtenu bien que semblable à celui du RA sauvage semble atténué. Pour chacune des molécules conduisant à une réponse, le nombre de colonies

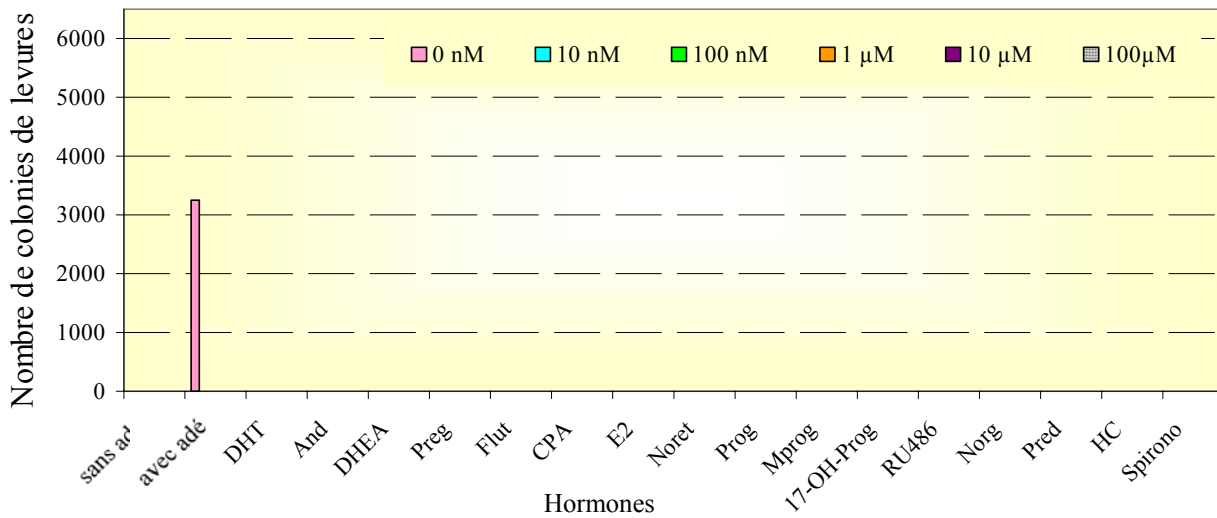
obtenu est 1,5 à 2 fois plus faible que celui obtenu en présence du RA sauvage (Figure 42B). Ces résultats sont d'autant plus intrigants qu'un très grand nombre de colonies est obtenu sur la boîte contrôle avec adénine, sur laquelle la croissance des levures ne requiert pas d'activation du RA. Dans ce test fonctionnel et comme illustré en présence du RA sauvage, le nombre de colonies poussant sur cette boîte contrôle est généralement identique à celui obtenu avec les plus fortes doses de DHT. La réponse atténuée obtenue avec l'échantillon tumoral suggère la présence au sein de cet échantillon de variants du RA incapables d'activer l'expression du gène *ADE2* suite à une stimulation hormonale.

D'après cette hypothèse, une grande fraction de colonies de la boîte avec adénine porte un RA avec une mutation affectant les capacités transcriptionnelles du récepteur.

Nous avons par la suite isolé 10 colonies de la boîte avec adénine, en vue d'une extraction du plasmide d'expression du RA et du séquençage de l'ADNc.

Le séquençage a révélé la présence d'une population très hétérogène de variants du RA au sein de cet échantillon tumoral, incluant la forme sauvage du RA, et des variants mutés comme le RA portant la mutation Q738R au niveau du LBD, et un autre variant présentant une insertion de 69 nucléotides supplémentaires entre les exons 2 et 3. Ces différents variants ont été testés pour leur capacité de transactivation. Seule l'insertion de 69 nucléotides (+69nt) au niveau du DBD semble affecter les propriétés transcriptionnelles du RA. Aucune croissance de levure n'est observée sur le milieu sélectif sans adénine quelque soit la molécule testée. Une croissance est observée uniquement sur la boîte contenant de l'adénine (Figure 43).

Figure 43 : Hormonogramme obtenu après transformation des levures avec le récepteur des androgènes présentant une insertion de 69 nucléotides



Légende Figure 43 : L'histogramme représente le nombre de colonies de levures obtenues après transformation avec le RA+69nt. Les mêmes hormones que précédemment sont testées (voir Figure 29).

Ces résultats permettent de formuler deux hypothèses, soit le RA+69nt ne reconnaît aucun des ligands testés, cette solution étant néanmoins peu probable vu les résultats du séquençage qui n'ont pas révélé de mutations au niveau du LBD. Par ailleurs, l'insertion de 69 nucléotides pourrait empêcher la reconnaissance et la fixation de ce RA au niveau du promoteur androgéno-dépendant. Cette deuxième option semble plus vraisemblable même si elle soulève la question de la sélection d'une telle mutation au sein d'une population de cellules cancéreuses, qui au premier abord ne trouve aucun intérêt dans l'expression d'un facteur de transcription déficient dans sa fonction principale d'activation de la transcription.

Ainsi, la suite de mon travail a été consacrée à la détermination de la fonction et du rôle qu'une telle mutation du RA pourrait avoir dans une cellule cancéreuse.

2.) Détermination de l'origine de la séquence insérée

a.) Criblage des banques de données

Je me suis tout d'abord intéressé à l'origine de la séquence insérée. En effet, les résultats du séquençage ont montré que les 69 nucléotides sont insérés en position 2882 (Genbank, NM_000044) de l'ARNm du RA, au niveau de la jonction entre les exons 2 et 3, codant respectivement pour le premier et le second doigt de zinc du DBD.

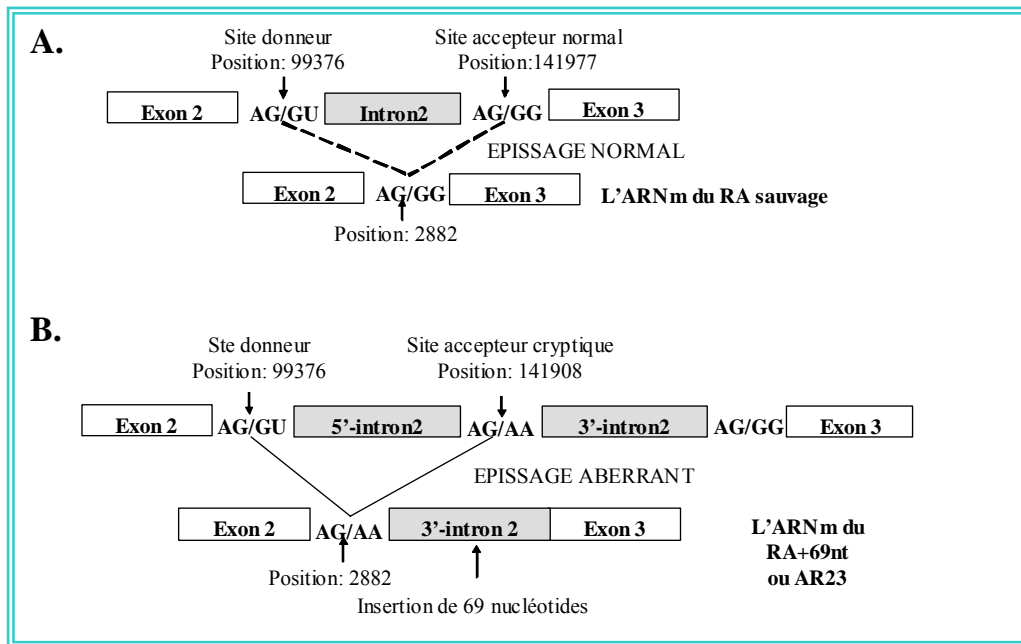
Comme nous l'avons vu, ce point de jonction a été acquis par les récepteurs stéroïdiens au cours de l'évolution (cf. Tableau 5). Il occupe une position cruciale au sein du DBD, situé juste à l'interface du motif de reconnaissance de l'ADN (Boîte P) d'une part et du motif de dimérisation du RA (Boîte D), du signal d'export (NES) et d'import nucléaires (NLS) d'autre part (Figure 45).

Les 69 nucléotides insérés correspondent à l'extrémité 3' de l'intron 2 du gène codant pour le RA humain (Genbank, M27425), suggérant la persistance d'un fragment de séquence intronique au niveau du transcrit mature. Les 69 nucléotides insérés sont issus d'un épissage aberrant, au cours duquel un site accepteur cryptique a été utilisé.

En effet, l'épissage « normal » met en jeu le site donneur 5'-AG/GU en position 99376 et le site accepteur 3'-AG/GA en position 141977, (Genbank, NC_000023), entraînant l'excision de l'intégralité de la séquence intronique (Figure 44 A).

Lors de l'épissage aberrant du variant AR23, un site cryptique 3'-AG/AA en position 141908 est utilisé durant le processus de maturation (Genbank, NC_000023). L'analyse de la séquence de l'ADNc de ce variant du RA n'a pas révélé de mutations au niveau des sites classiques d'épissage, pouvant justifier l'utilisation du site cryptique, néanmoins nous ne pouvons pas exclure l'existence de mutations au niveau de la séquence intronique de ce variant du RA (Figure 44 B).

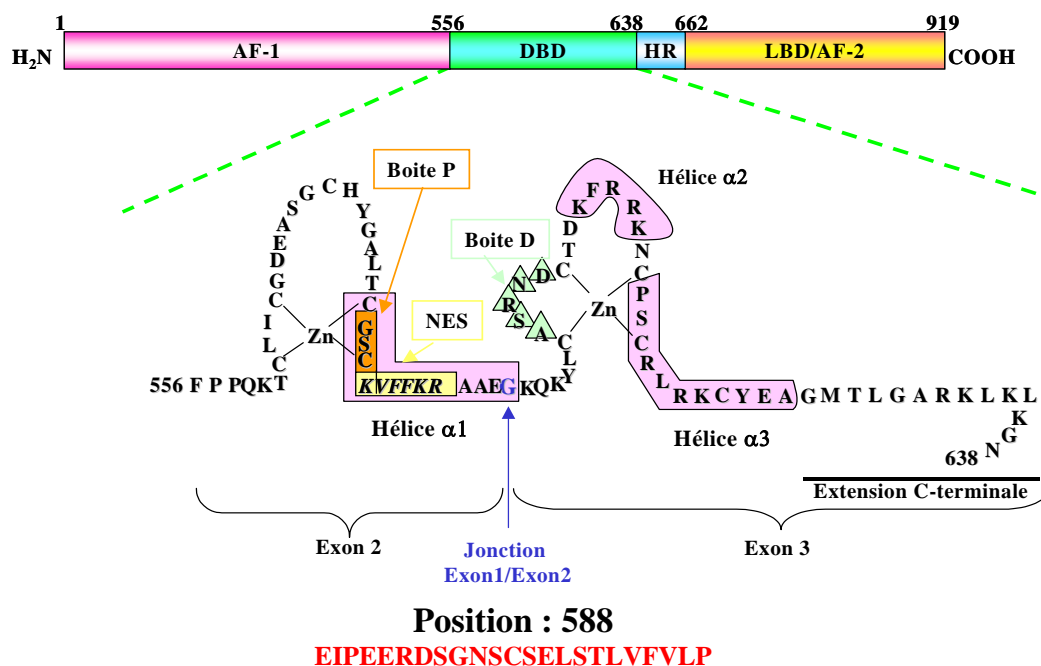
Figure 44 : Représentation schématique du processus d'épissage des ARNm de récepteur des androgènes sauvage et du récepteur des androgènes +69nt



Légende Figure 44 : A. Schéma de l'épissage de l'ARNm du RA sauvage, les sites classiques d'épissage sont représentés, 5' AG/GU et 3'AG/GG. B. L'épissage de l'ARNm du RA+69nt, impliquant l'utilisation d'un site accepteur cryptique AG/AA et aboutissant à l'insertion des 69 nucléotides au niveau du DBD du RA et au variant nommé AR23.

La séquence nucléotidique insérée ne contient pas de codon stop et résulte en la traduction d'une protéine comportant 23 acides aminés supplémentaires p[Glu588_Gly589insGluIleProGluGluArgAspSerGlyAsnSerLeuSerGlyLeuSerThrLeuValPheValLeuPro] en position 588 de la protéine, entre les deux doigts de zinc du DBD. Nous avons appelé AR23 ce variant particulier du RA (Figure 45).

Figure 45 : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes et de la séquence de 23 acides aminés insérés entre les deux doigts de zinc.



Légende Figure 45: Le DBD du RA est organisé en deux doigts de zinc constitués de trois hélices α (entourées en violet), chaque doigt de zinc renferme des séquences importantes pour les fonctions du RA. Ainsi, le premier doigt de zinc comporte la Boîte-P (orange) responsable de la reconnaissance spécifique de l'ADN, et le motif « KVVFFKR » (jaune) qui constitue le signal d'export nucléaire (NES). Le second doigt de zinc composé de deux hélices α , comporte la séquence de dimérisation ou Boîte-D et se termine par une extension C-terminale importante pour la structure tridimensionnelle du RA. Le point de jonction entre les exons 1 et 2 ainsi que l'insertion en position 588 du DBD des 23 acides aminés transcrits en codification à une lettre « **EIQPEERDSGNSCSELSTLVFVLP** » sont indiqués.

Un variant du RA similaire, avec une insertion d'acides aminés entre les deux doigts de zinc a été détecté chez un patient atteint de SIAP. Ce patient bien qu'ayant un caryotype 46XY est né avec des organes génitaux externes féminins. Chez ce patient, l'insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD résulte d'une erreur d'épissage, impliquant l'utilisation du même site accepteur cryptique au sein de l'intron 2 que celui employé lors de la maturation des ARN messagers de l'AR23. Cependant, l'épissage aberrant est dû à la présence d'une mutation ponctuelle au niveau du site accepteur classique, conduisant à l'utilisation préférentielle du site accepteur cryptique. Par ailleurs, l'extrémité C-terminale de la protéine décrite

conserve ces capacités de liaison au ligand (Jaaskelainen J *et al.*, 2006).

Ainsi, deux éléments indiquent qu'un RA avec une insertion de 23 acides aminés au sein du DBD, conserve néanmoins une activité résiduelle. Tout d'abord, cette mutation a été détectée chez un patient atteint de SIAP, indiquant que le RA présent n'est que « partiellement » inactif, et d'autre part, les capacités de liaison du ligand de ce variant demeurent inchangées par rapport à un RA sauvage (Jaaskelainen J *et al.*, 2006).

D'autres insertions d'acides aminés au sein du DBD altérant la reconnaissance de l'ADN ou les capacités transactivatrices ont été décrites au niveau de plusieurs RNs. Ainsi, une insertion de 9 acides aminés entre les deux doigts de zinc d'un récepteur des glucocorticoïdes de poisson augmentent ses capacités transactivatrices, alors qu'une insertion d'un seul acide aminé serait en revanche responsable de leur diminution (Ducouret B, *et al.*, 1995, Zhou J et Cidlowski JA. 2005) Par ailleurs, l'expression ubiquitaire d'un récepteur des minéralcorticoïdes comportant une insertion de 4 acides aminés a été décrite dans plusieurs tissus incluant la prostate, le foie et l'ovaire (Wickert L, *et al.*, 1998).

Toutes ces insertions ont lieu au niveau de la même région du DBD, à la jonction entre la partie C-terminale du premier doigt de zinc renfermant la Boîte- P et le signal d'export nucléaire et le second doigt de zinc contenant la région responsable de la dimérisation des RNs et le signal de localisation nucléaire, de plus ce comme nous l'avons vu précédemment ce point de jonction a été acquis au cours de l'évolution.

Ainsi, la présence fréquente d'insertions d'acides aminés au niveau d'un point sélectionné au cours de l'évolution doit avoir son importance dans la régulation fonctionnelle de ces récepteurs, cependant le rôle exact de telles insertions reste à préciser.

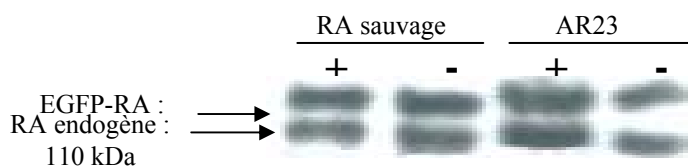
Afin de mieux appréhender comment l'insertion de 23 acides aminés affecte les fonctions du RA, des études fonctionnelles ont été réalisées dans trois lignées cellulaires distinctes, deux lignées cancéreuses prostatiques humaines, la lignée LNCaP et la lignée PC-3, puis dans les cellules de singe COS-1.

b.) Vérification de l'expression cellulaire de l'AR23

Nous avons tout d'abord étudié l'expression de la protéine mutée dans une lignée humaine de cellules cancéreuses prostatiques. Nous avons ainsi procédé à la transfection transitoire des cellules LNCaP avec un plasmide d'expression dans lequel le RA à étudier est fusionné à une étiquette fluorescente EGFP. L'utilisation des protéines étiquetées par l'EGFP va, comme nous allons le voir ultérieurement, permettre la visualisation du RA transfecté dans les cellules. L'étiquette EGFP, d'un poids moléculaire (PM) de 26kDa permet également de faire la distinction entre le RA endogène de la lignée LNCaP d'un PM de 110kDa et le RA transfecté, soit un PM de 136 kDa pour le RA sauvage et de 140 kDa pour l'AR23.

Les extraits cellulaires totaux réalisés à partir des cellules LNCaP transfectées avec les différentes constructions pEGFP-RAwt ou pEGFP-AR23 ont été déposés sur un gel polyacrylamide 7,5 % dénaturant, permettant de séparer les protéines en fonction de leur taille. Les deux protéines transfectées EGFP-RAwt et EGFP-AR23 sont exprimées dans la lignée LNCaP et leur expression est amplifiée en présence de la DHT (Figure 46).

Figure 46 : Analyse par western-blot de l'expression du récepteur des androgènes sauvage et de l'AR23 dans la lignée cellulaire LNCaP.



Légende Figure 46 : Les protéines extraites de cellules LNCaP transfectées avec le plasmide d'expression pEGFP-RAwt (sauvage) ou pEGFP-AR23 et traités (+) ou non (-) par la DHT 100nM ont été séparées par électrophorèse et transférées sur membrane de nitrocellulose pour la détection du RA. Les bandes de taille inférieure correspondent au RA égal à 110KDa. Les bandes supérieures correspondent aux EGFP-RA transfectés. Elle a un poids moléculaire de 136kDa pour l'EGFP-RAwt et de 140kDa pour l'EGFP-AR23.

L'insertion des 23 acides aminés étant localisée dans une position clé du DBD, nous nous sommes ensuite demandés si elle pouvait affecter la localisation et le trafic nucléo-cytoplasmique de la protéine.

3.) Etude de la localisation cellulaire de l'AR23

a.) Etude de la localisation cellulaire de l'AR23 par immunofluorescence et microscopie confocale

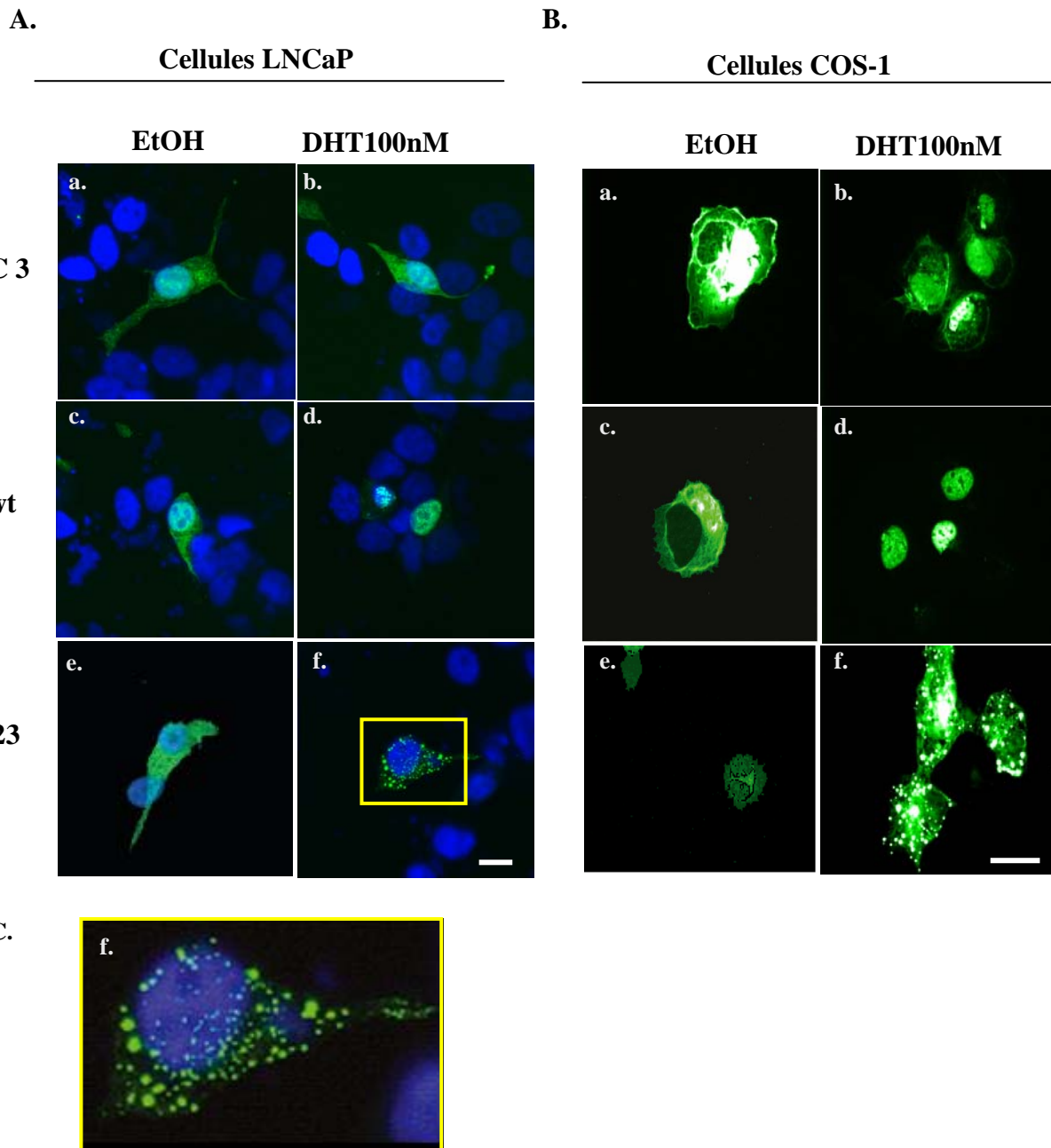
Des expériences d'immunofluorescence et de microscopie confocale ont été réalisées dans les deux lignées cellulaires COS-1 et LNCaP afin de comparer la distribution cellulaire du RA sauvage et de l'AR23.

Les cellules ont été transfectées avec le plasmide d'expression du RA sauvage ou de l'AR23 fusionnés à l'étiquette EGFP ou par le plasmide contrôle pEGFP-C3, codant pour l'EGFP seule, puis traitées ou non par 100nM de DHT (Figure 47).

La distribution cellulaire de la protéine EGFP seule représentant le contrôle négatif, est diffuse dans le cytoplasme et le noyau des deux types cellulaires et n'est pas affectée par le traitement par la DHT (Figure 47A a, b et B a, b). Comme attendu, le RA sauvage présente une localisation majoritairement cytoplasmique, en l'absence de DHT (Figure 47A.c, B.c) et nucléaire après stimulation par la DHT dans les deux lignées cellulaires (Figure 47A.d et B.d). L'AR23, quant à lui, affiche une distribution cytoplasmique que ce soit en présence ou en absence de DHT et dans les deux lignées cellulaires (Figure 47A. e, f et B e, f). De plus, la présence de la DHT induit un profil d'expression de l'AR23 atypique, caractérisé par des amas cytoplasmiques et péri-nucléaires (Figure 47A .f et B.f). Cette localisation intracellulaire est indépendante de la lignée cellulaire utilisée, mais est strictement induite par le ligand agoniste, la DHT.

Par ailleurs, j'ai réalisé des expériences supplémentaires en transfectant les cellules COS-1 avec un plasmide de type pSV-RA (sauvage ou muté) au lieu d'un plasmide pEGFP-RA (sauvage ou muté), afin de montrer que la formation des amas n'est pas due à la surexpression de l'EGFP.

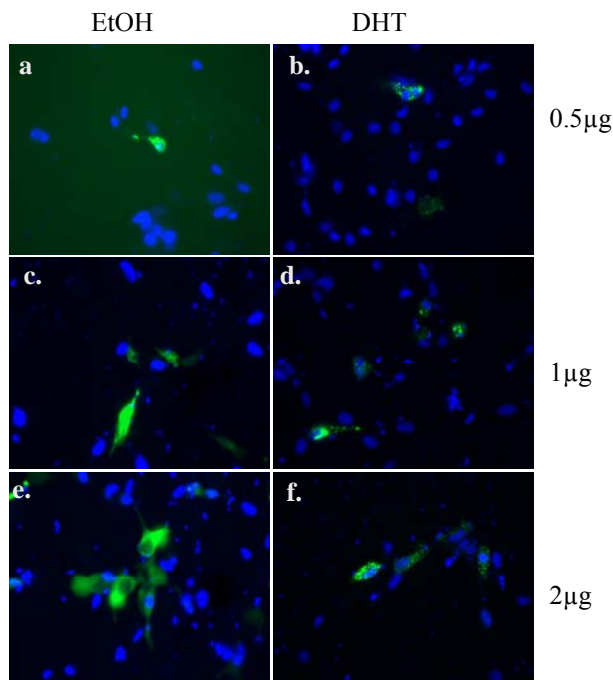
Figure 47 : Distribution intracellulaire du récepteur des androgènes sauvage et de l'AR23



Légende Figure 47 : Cellules LNCaP (A) et COS-1 (B) transfectées avec les différentes constructions plasmidiques pEGFP-C3, -RAwt ou -AR23, puis traitées ou non par 100nM de DHT ou par son diluant, l'éthanol (EtOH). La coloration au Hoeschst 33258 permet de visualiser les noyaux des cellules en bleu. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV (A), grossissement x100, les barres représentent 12,7µM, ou avec le microscope à fluorescence Nikon Eclipse E1000. (B), grossissement x100. Les barres représentent 10µM. C. Agrandissement de l'image A.f. représentant les agrégats formés par l'AR23 en présence de DHT.

Parallèlement, une gamme du plasmide EGFP-AR23 a également été réalisée pour exclure qu'une surexpression de la protéine mutée serait à l'origine des agrégats formés (Figure 48). A cet effet les cellules LNCaP ont été transfectées avec des quantités croissantes du plasmide pEGFP-AR23, de 0.5µg à 2µg et traitées ou non par la DHT.

Figure 48 : Gamme du plasmide EGFP-AR23



Légende Figure 48 : Les cellules LNCaP ont été transfectées avec des quantités croissantes de 0.5µg à 2 µg de plasmide pEGFP-AR23 et traitées ou non par la DHT ou l'EtOH. La coloration au Hoeschst permet de visualiser les noyaux. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal LeicaDMIRBE SP2-UV, grossissement x40.

Comme le montre la Figure 48, l'AR23 s'agrège uniquement en présence de la DHT et ceci dès les plus faibles concentrations de plasmide utilisées, démontrant ainsi que les agrégats formés ne sont pas dus à une surexpression de l'AR23.

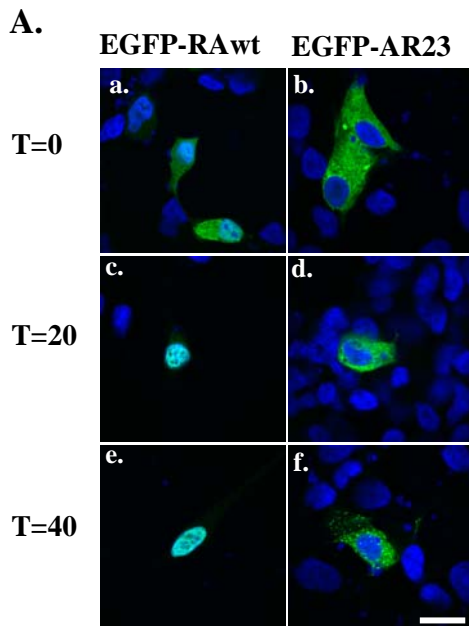
Nous avons ensuite vérifié si ce profil d'expression particulier de l'AR23 n'est pas lié à un export prématuré du noyau de la protéine. A cet effet, j'ai réalisé une cinétique de localisation et de formation d'agrégats par l'AR23 après stimulation hormonale.

b.) Cinétique de localisation cellulaire de l'AR23 après stimulation hormonale

La cinétique de formation d'agrégats a été effectuée 48 heures après transfection des cellules LNCaP avec les plasmides d'expression pEGFP-RA sauvage

ou muté, moment optimal d'expression des gènes transfectés. Les cellules ont été traitées par la DHT puis fixées à différents temps de stimulation (Figure 50).

Figure 49 : Cinétique de localisation cellulaire et de formation d'agrégats par l'AR23



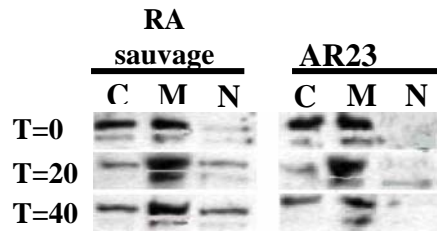
Légende Figure 49 : Les cellules LNCaP ont été transfectées avec les plasmides pEGFP-RA. A différents temps après la stimulation par 100nM de DHT (T=0 minutes, T=20 minutes et T=40 minutes) les cellules sont fixées. Une coloration des noyaux au Hoeschst est réalisée. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV, grossissement x100, la barre représente 12.7µM.

Alors que le RA sauvage décrit un profil d'expression exclusivement nucléaire vingt minutes seulement après la stimulation par la DHT (Figure 49.a, c), au même moment l'AR23 présente une localisation cytoplasmique diffuse (Figure 49 b, d). Les agrégats cytoplasmiques et périnucléaires formés par l'AR23 apparaissent quarante minutes après stimulation hormonale (Figure 49Af).

Ces données suggèrent que l'insertion des 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD empêche la translocation nucléaire de l'AR23, et insinuent que les agrégats périnucléaires ne sont pas dus à un export prématuré de l'AR23 du noyau.

Le suivi de la localisation du RA sauvage ou muté a été réalisé par fractionnement des cellules LNCaP transfectées avec les plasmides d'expression pEGFP-RA sauvage ou muté. Différentes fractions, correspondant aux compartiments nucléaires, membranaires (membrane cytoplasmique et membranes des organelles) et cytoplasmiques, avant traitement puis aux temps 20 et 40 minutes de stimulation par la DHT sont préparées. Les protéines extraites ont été ensuite déposées sur gel polyacrylamide dénaturant (Figure 50.).

Figure 50 : Détermination de la localisation intracellulaire de l'AR23 par fractionnement cellulaire



Légende Figure 50 : Le fractionnement cellulaire a permis d'extraire les protéines des compartiments cytoplasmiques (C), membranaires (M) et nucléaires (N). Ces fractions sont ensuite séparées par électrophorèse et transférées sur membrane de nitrocellulose pour la détection du RA. Les bandes de taille inférieure correspondent au RA endogène, PM=110 kDa. Les bandes supérieures correspondent aux EGFP-RA transfectés. Elles ont un poids moléculaire de 136kDa pour le RA sauvage et de 140kDa pour l'AR23.

Ainsi, les résultats obtenus en immunofluorescence et microscopie confocale sont corroborés par les expériences de fractionnement cellulaire. Ces expériences décrivent la dynamique du trafic intracellulaire des RAs dans les minutes suivant la stimulation par la DHT (Figure 50). Comme attendu, le signal correspondant au RA sauvage dépeint le cycle classique de trafic intracellulaire du RA dans les cellules LNCaP. Ainsi, avant toute stimulation hormonale, le RA sauvage présente une localisation majoritairement cytoplasmique, puis après stimulation par la DHT il se transloque dans le noyau, en passant par le compartiment membranaire. A contrario, le trafic intracellulaire de l'AR23 semble perturbé, il décrit principalement une localisation cytoplasmique et membranaire avant toute stimulation, puis après traitement par la DHT, il demeure essentiellement dans le compartiment membranaire.

En résumé, l'insertion des acides aminés « EIP EERDSGN SCS ELS TLV FVLP » au niveau du DBD de l'AR23 induit une localisation cellulaire atypique du variant, sous forme d'agrégats cytoplasmiques et périnucléaires après stimulation par la DHT. Ces agrégats ne sont pas dus au type de plasmide d'expression utilisé, ni à la surexpression de l'AR23. La formation androgéno-dépendante de ces agrégats débute précocement, 40 minutes seulement après stimulation par la DHT. Contrairement au RA sauvage l'AR23 n'est jamais nucléaire, mais s'accumule dans le compartiment cytoplasmique des cellules et plus particulièrement au niveau des membranes.

Comme précisé précédemment, un variant du RA similaire à l'AR23 a été décrit dans un cas de SIAP (Jaaskelainen J *et al.*, 2006). Ce variant conserve une affinité et une réponse au ligand identiques à celles du RA sauvage. Dans le cas de l'AR23, la liaison de la DHT semble diriger cette protéine vers des compartiments cellulaires particuliers constitués par les membranes cellulaires.

Ainsi, l'étape suivante de mon travail a consisté en la recherche d'un éventuel motif de ciblage ou d'ancrage au niveau des membranes au sein de la séquence de 23 acides aminés.

c.)Analyse *in silico* de la séquence des 23 acides aminés

L'alignement de la séquence de 23 acides aminés insérés au niveau du DBD de l'AR23 à l'ensemble de la base de données BLAST/SWISS-PROT a permis de mettre en évidence des similarités de séquences partielles avec plus d'une centaine de protéines distinctes, trois d'entre elles ont suscité notre intérêt tout particulier (Tableau 7).

Tableau 11 : Homologies entre les 23 acides aminés de l'AR23 et des protéines connues

Protéine	% de similarité	Séquences
Vpu (HIVI)	59 %	AR23 : EIPEER__ DSGNSCSEL_____STLVFVLP ER__ DSGN__SEL_____STLV Vpu : ER AE DSGNĒSDGDKDELSTLV:
Protéine activatrice 7 de la Rho-GTPase	88 %	AR23 : EIPEERDSGNNSCSELSTLVFVLP EIPE_RDSG Rho-GTPase : EIPERRDSG
Précurseur de la Protocadherin γ C3	77 %	AR23 : EI PEERDSGNNSCSELSTLVFVLP EI PEER__G ProtyC3 : EI PEERĒGG

Légende Tableau 11 : Les pourcentages de similarité entre les 23 acides aminés de l'AR23 et trois protéines pertinentes extraites des banques de données sont indiqués. Un code couleur est utilisé : les 23 acides aminés de l'AR23 sont « en noir », les séquences des protéines comparées « en violet » et les acides aminés similaires entre les protéines et les 23 acides aminés sont indiqués « en rouge »

Ainsi, une homologie de séquence de 59% a pu être trouvée entre les 23 acides aminés et le domaine cytoplasmique de la protéine Vpu du virus de

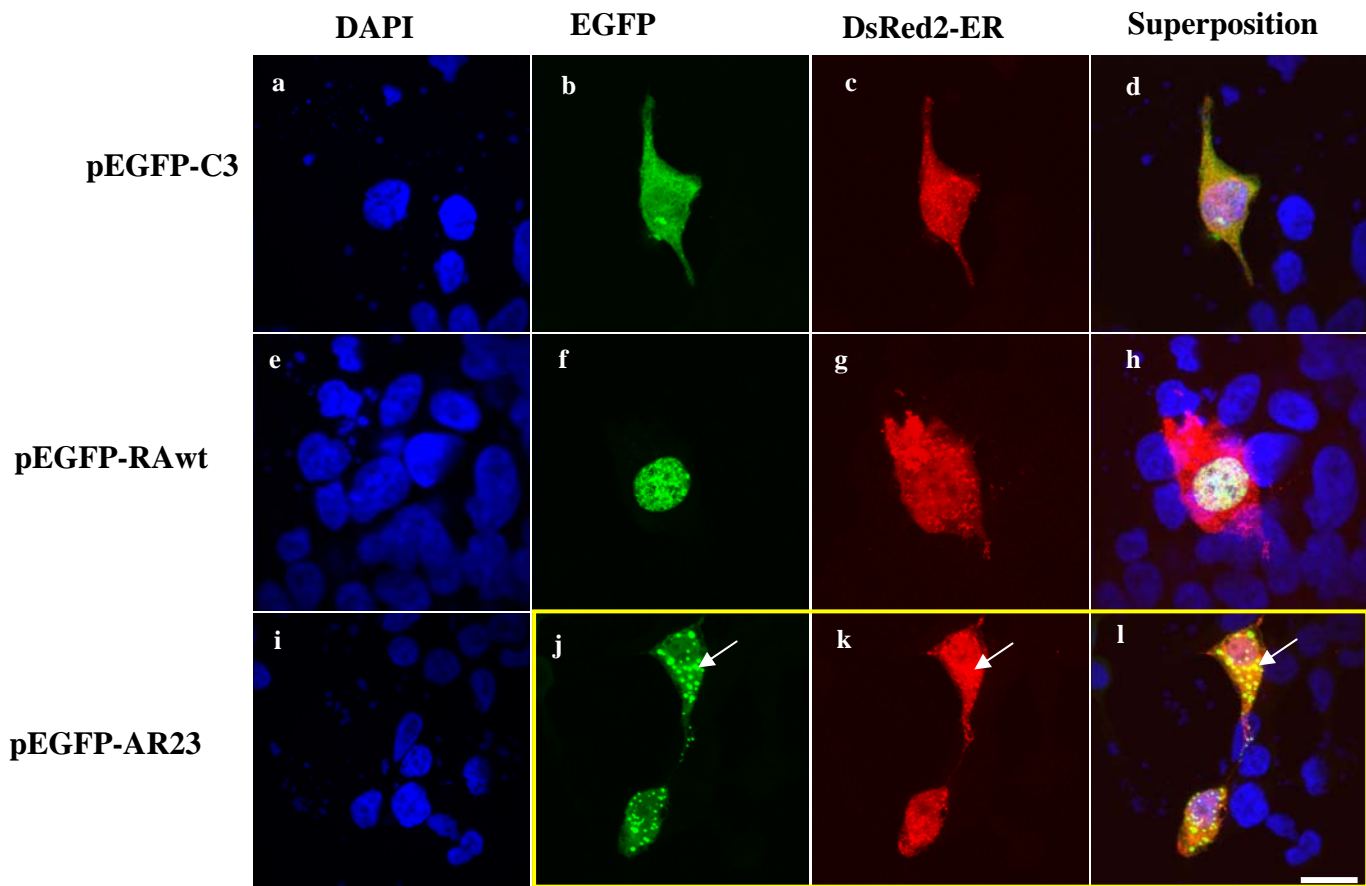
l'immunodéficiences humaines de type I (VIH-1). Le domaine cytoplasmique de Vpu est responsable du trafic intracellulaire de la protéine vers le réticulum endoplasmique rugueux (REG) et l'appareil de Golgi (Gomez LM *et al.*, 2005). De plus, des similarités de séquences de 88% et 77% ont respectivement pu être observées avec des séquences de la protéine activatrice 7 de la Rho-GTPase et du précurseur de la protocadhérine γ C3. Ces deux protéines interagissent également avec le compartiment REG/Golgi des cellules (Dubois T *et al.*, 2005, Frank M et Kemler R, 2002). Par ailleurs, la séquence « EIPEER » commune aux 23 acides aminés insérés au niveau du DBD de l'AR23 et au précurseur de la protocadhérine γ C3, appartient au motif répété « cadhérine1 » constituant le domaine de liaison au calcium (GenPept :Q9UN70). Le calcium est un messager secondaire important permettant de transmettre une multitude de signaux intracellulaires impliqués dans la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaire (Berridge MJ *et al.*, 1998, McConkey DJ et Orrenius S, 1997, Vanoverberghe K *et al.*, 2004). De plus, la majorité du calcium intracellulaire est stockée au niveau du réticulum endoplasmique.

Ainsi, la localisation au niveau des membranes des organelles de l'AR23 après stimulation par la DHT, les similarités de séquence entre les 23 acides aminés et des protéines interagissant avec le compartiment cellulaire REG/Golgi et enfin la présence concomitante d'un motif de liaison au calcium au sein des 23 acides aminés nous ont amené à suspecter une localisation de l'AR23 au niveau du réticulum endoplasmique.

4.) Etude de la localisation de l'AR23 au niveau du réticulum endoplasmique

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'AR23 serait localisé au niveau du réticulum endoplasmique, j'ai effectué des expériences de colocalisation par microscopie confocale dans les cellules LNCaP. A cet effet, les cellules LNCaP ont été co-transfectées avec le plasmide pEGFP-C3, pEGFP-RA sauvage ou pEGFP-AR23 et le plasmide DsRed2-ER. Ce plasmide code pour une protéine de fusion KDEL-DsRed2, où le peptide « KDEL » représente le motif de localisation au niveau réticulum endoplasmique (RE) (Figure 51).

Figure 51: Etude de la colocalisation entre l'AR23 et le réticulum endoplasmique



Légende Figure 51 : Les cellules LNCaP sont co-transfectées en milieu complet avec l'un des plasmides pEGFP et le plasmide pDsRed2-ER. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. Les images sont acquises à l'aide du microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV, grossissement $\times 100$, la barre représente $12.7\mu\text{M}$. La fluorescence verte correspond à la protéine de fusion EGFP, la fluorescence rouge est émise par la DsRed et la couleur jaune correspond à la superposition des deux canaux. Dans l'encadrement jaune, les images correspondant à l'AR23 peuvent être observées, les flèches indiquent quelques points de colocalisation entre le réticulum endoplasmique et l'AR23.

Le réticulum endoplasmique est un sous compartiment de la cellule. Il constitue un élément essentiel du réseau membranaire interne des cellules eucaryotes, en continuité avec l'enveloppe nucléaire et en relation avec les autres compartiments, notamment les vésicules de l'appareil de Golgi. En imagerie, comme on peut le voir sur la Figure 51 (c,g et k), il se présente sous forme d'amas cytoplasmiques plus ou moins diffus et de quelques invaginations membranaires. La protéine EGFP seule, présente aussi une localisation cytoplasmique, mais aucune colocalisation avec le RE ne peut être observée (Figure 51 b-d). Le RA sauvage en présence de DHT est

nucléaire et de ce fait, il ne peut pas colocaliser avec le RE (Figure 51 f-k). Par contre, les agrégats formés par l'AR23 colocalisent partiellement avec les amas formés par le RE (encadré jaune de la Figure 51(i-l)). Ces données suggèrent une rétention partielle de l'AR23 au niveau de cette organelle.

5.) Premières conclusions et hypothèses de travail

Comme mentionné précédemment, le RE est un lieu de stockage et de concentration de diverses molécules comme par exemple le calcium. Le calcium est un messager secondaire important permettant entre autres d'activer la PKC, kinase surexprimée dans les CaPs et directement impliquée dans la prolifération cellulaire (Griner EM et Kazanietz MG, 2007). Outre sa fonction de stockage, cette organelle produit des vésicules de transition qui engendrent l'appareil de Golgi, ce dernier produira des vésicules de sécrétion, à l'origine de l'exocytose. La membrane des ces vésicules sera en fin de compte incorporée à la membrane plasmique qui est ainsi régénérée en permanence. Enfin, c'est également au niveau du RE que certaines protéines sont glycosylées au niveau de leurs résidus arginines.

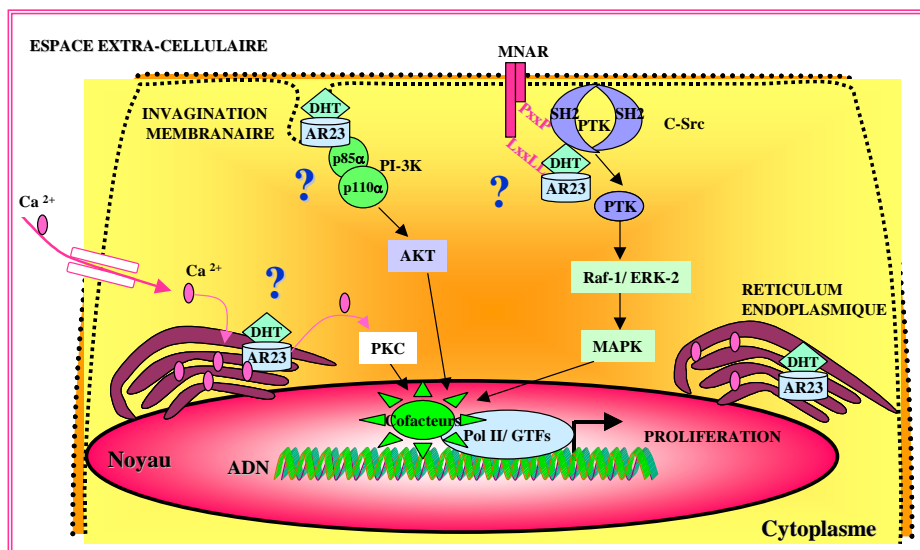
Néanmoins, la localisation de l'AR23 n'est pas exclusive au RE bien qu'elle reste principalement membranaire après induction par la DHT. De manière intéressante, une interaction entre le RA sauvage et des complexes de signalisation localisées au niveau de micro-domaines lipidiques des membranes cellulaires a été décrite (Zhuang L *et al.*, 2002, Freeman MR *et al.*, 2005). De surcroît, certains auteurs ont démontré une activation des voies de signalisation PI-3K/Akt à partir de ces micro-domaines lipidiques (Freeman MR *et al.*, 2005), alors que d'autres ont rapporté la présence d'une interaction activatrice directe entre la sous-unité p85 α de PI-3K et le RA sauvage. Cette interaction entraînerait la phosphorylation de Akt (Baron S *et al.*, 2004). La présence au sein des 23 acides aminés du motif hautement hydrophobe « LVFVL » pourrait stabiliser et ancrer l'AR23 au niveau de ces micro-domaines membranaires et faciliter les interconnexions avec les voies de signalisation.

Par ailleurs, la formation d'un complexe trimérique entre le RA sauvage, l'intégrateur MNAR (Modulator of non genomic activity of estrogen receptor) et la

kinase c-Src a également été décrit (Unni E *et al.*, 2004). MNAR interagirait avec le LBD des récepteurs aux hormones stéroïdes grâce à son domaine « LxxLL » et avec c-Src par l'intermédiaire du domaine « PxxP ». Le LBD de l'AR23 n'étant pas altéré cette interaction trimérique avec MNAR et c-Src reste tout à fait envisageable.

L'ensemble de ces données m'a permis de formuler l'hypothèse suivant laquelle l'AR23 de par sa localisation membranaire atypique agirait comme un co-intégrateur de signaux provenant du milieu cellulaire ambiant. Sa localisation au niveau des membranes et du réticulum endoplasmique le positionne au cœur de la signalisation calcique à l'interface entre la prolifération et la survie cellulaire, et de par sa position au niveau des micro-domaines lipidiques l'AR23 pourrait être impliqué dans la modulation des signaux émanant de c-Src et de PI-3K/Akt. Le mode d'action de l'AR23 serait ainsi exclusivement cytoplasmique (Figure 52).

Figure 52 : Mode d'action hypothétique de l'AR23



Légende Figure 52: Schématisation des interconnexions possibles entre l'AR23 et les voies de signalisation.

Toutefois, des expériences complémentaires sont nécessaires pour conforter ce modèle. En effet, à ce jour nous ne disposons pas de données prouvant la localisation

de l'AR23 au niveau des invaginations membranaires, ni son interaction directe avec la sous unité p85 α de PI-3K.

Avant de débiter les investigations sur les actions exclusivement cytoplasmiques de l'AR23, j'ai néanmoins voulu confirmer l'absence de ses actions génomiques. A cet effet, j'ai comparé les activités transcriptionnelles de l'AR23 sur deux promoteurs androgéno-dépendants artificiels dans les cellules LNCaP et COS-1.

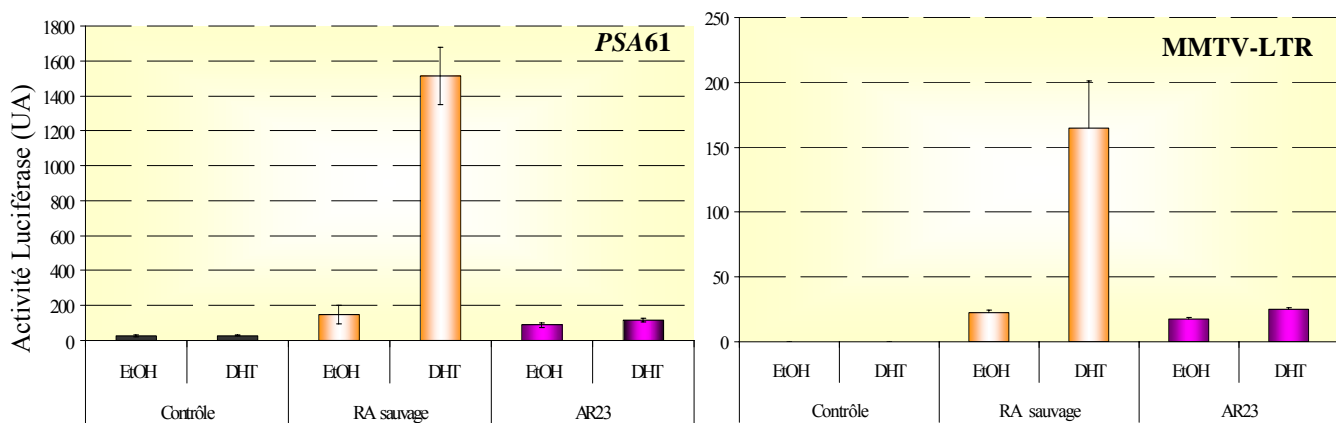
6.) Etudes des activités transcriptionnelles du variant AR23

Les activités transcriptionnelles de l'AR23 ont été étudiées en utilisant la méthode de gène rapporteur. A cet effet, nous avons utilisé des constructions plasmidiques dans lesquelles le gène de la *luciférase* est placé en aval d'un promoteur androgéno-dépendant, PSA61 ou MMTV-LTR (Mouse Mammary Tumour Virus-Long Terminal Repeat). La construction PSA61-luc contient comme promoteur androgéno-dépendant un fragment de 6 kb du promoteur du gène *PSA* humain. Ce promoteur contient trois éléments de réponse AREs répartis le long du promoteur, deux au niveau proximal et le troisième au niveau de la région activatrice en amont ou *enhancer*. Dans la construction MMTV-LTR-luc, l'expression de la luciférase est placée sous le contrôle du promoteur LTR (Long Terminal Repeat) contenant des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE).

a.) Etude des activités transcriptionnelles de l'AR23 dans les cellules COS-1

Afin de démontrer l'absence d'activité transcriptionnelle directes de l'AR23 activé par la DHT à partir des deux promoteurs décrits ci-dessus, ces expériences ont tout d'abord été réalisées dans les cellules COS-1. Les cellules sont co-transfectées avec le plasmide d'expression du RA sauvage ou muté ou avec le plasmide vide et un des plasmides rapporteurs (Figure 53).

Figure 53 : Activités transcriptionnelles directes de l'AR23 sur deux promoteurs androgéno-dépendants dans la lignée COS-1



Légende Figure 53 : Les cellules COS-1 ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur PSA61 ou MMTV-LTR-luc en combinaison avec le plasmide d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées pendant 24 h en présence de 100nM de DHT ou de son diluant l'éthanol (EtOH). Quarante-huit heures après transfection, les activités luciférase, reflétant les activités transcriptionnelles du RA transfecté sont déterminées grâce au luminomètre TD20/20, et représentées en unités arbitraire (UA). Chaque point a été réalisé en triplicata.

Comme attendu, en présence du plasmide vide contrôle, il n'y a pas d'induction d'activité luciférase dans ces cellules. Le RA sauvage stimulé par la DHT entraîne une forte augmentation de l'expression de la luciférase à partir des deux promoteurs androgéno-dépendants. En revanche, comme attendu aucune activité transcriptionnelle n'est observée sur les deux promoteurs étudiés en présence de l'AR23, démontrant que ce récepteur muté ne peut pas exercer ses activités génomiques classiques en tant que facteur de transcription.

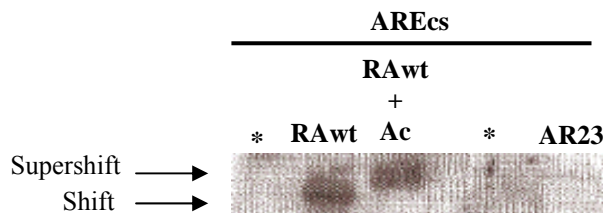
Ces données sont corroborées par des tests de retardement sur gel montrant que les 23 acides aminés suppriment les interactions du récepteur avec l'ADN (Figure 53). Notre choix s'est porté sur l'étude de la séquence AREcs (consensus) de part la forte affinité du RA sauvage pour cette séquence

Figure 54 : Expérience de retardement sur gel : Affinité des récepteurs des androgènes sauvage et muté vis-à-vis de la séquence consensus de réponse aux androgènes : AREcs

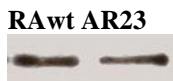
A. 5'CGCGTGCCGGTACAaggTGGTCTTGAAGG 3'

3'ACGGCCATGTcccACAAGAACTTCCTTAA 5'

B.



C.



Légende Figure 54 : A. Séquence AREcs, les extrémités cohésives avant le marquage sont représentées. La séquence consensus est marquée rouge. B. Résultats d'EMSA réalisés à partir d'extraits protéiques de cellules COS-1 transfectées avec les plasmides pSV-RA sauvage ou AR23 ont été incubés 20min avec l'élément de réponse AREcs marqué au P³². Deux contrôles ont été réalisés : le premier constitué par la sonde seule () assure de la pureté de la réaction. Le second, l'anticorps (Ac) monoclonal anti-RA témoigne de la spécificité de la réaction. C. western-blot réalisé à partir de protéines extraites des cellules COS-1 transfectées avec les vecteurs d'expression pSV-RA sauvage(wt) ou AR23, révélation avec un anticorps anti-RA.*

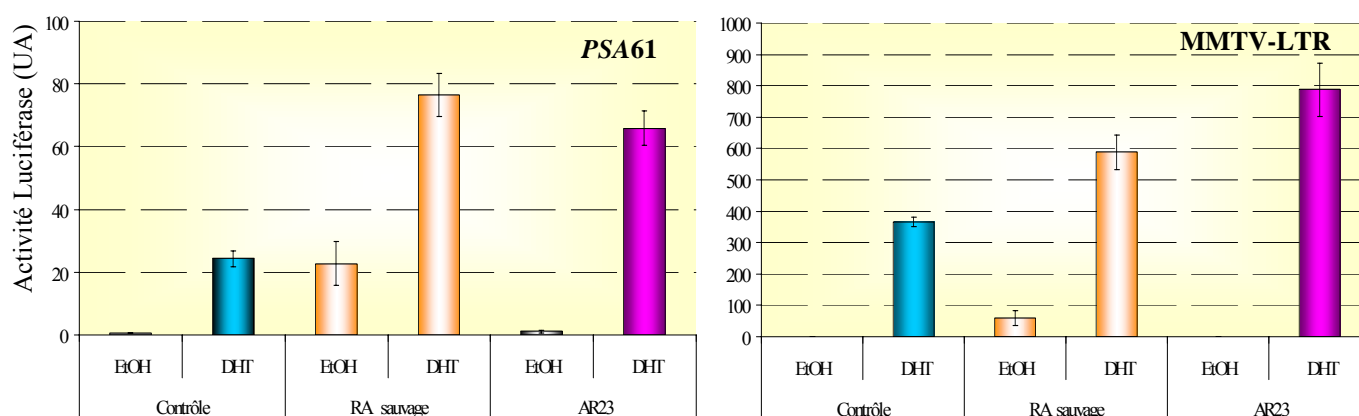
Le RA sauvage présente une forte capacité de liaison vis-à-vis de l'élément AREcs, la présence du supershift témoigne de la spécificité de la réaction. Aucune bande ne peut être visualisée en présence de l'AR23 suggérant que l'insertion de 23 acides aminés au niveau du DBD altère la reconnaissance de l'ADN par le RA muté. Ainsi, l'absence d'activités transcriptionnelles dans la lignée COS-1 en présence d'AR23 pourrait s'expliquer par son incapacité de liaison à l'ADN (Figure 54B).

Une analyse complémentaire par western-blot des extraits protéiques obtenus à partir de cellules COS-1 transfectées avec les constructions plasmidiques pSV-RAwt ou pSV-AR23 a permis de montrer que l'absence d'activités transcriptionnelles et que le défaut de liaison des séquences AREcs n'était pas dû à la sous expression de la protéine mutée dans ces cellules (Figure 54C).

b.) Etudes des activités transcriptionnelles de l'AR23 dans les cellules LNCaP

Paradoxalement, les mêmes tests d'activités transcriptionnelles reproduits dans la lignée LNCaP, possédant un RA endogène ont montré une activité transcriptionnelle augmentée à partir des promoteurs PSA61 et MMTV-LTR en présence de l'AR23 induit par la DHT (Figure 55). En effet, les activités luciférase mesurées à partir du promoteur PSA61 et MMTV-LTR, en présence de l'AR23 activé par la DHT sont respectivement similaires et supérieures à celles observées en présence du RA sauvage sur ces mêmes constructions. Les activités transcriptionnelles mesurées en présence de l'AR23 ne peuvent pas uniquement refléter les activités du RA endogène à un niveau d'expression normal dans les cellules LNCaP. En effet, les activités transcriptionnelles du RA endogène sont évaluées au niveau des contrôles correspondant aux cellules transfectées avec le plasmide vide. Ces activités sont nettement plus faibles que celles mesurées en présence de l'AR23.

Figure 55 : Impact de l'AR23 sur les activités transcriptionnelles à partir de deux promoteurs androgéno-dépendants dans la lignée LNCaP

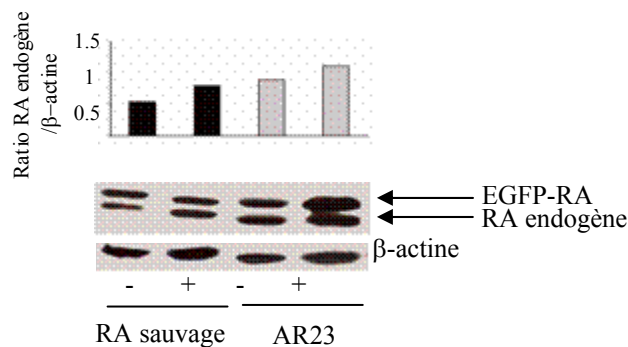


Légende Figure 55 : Les cellules LNCaP ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur PSA61 ou MMTV-LTR en combinaison avec les plasmides d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées pendant 24 h avec 100nM de DHT ou avec son diluant l'éthanol (EtOH). Quarante-huit heures après transfection, les activités transcriptionnelles ont été mesurées à l'aide d'un luminomètre TD20/20 et sont représentées en unités arbitraires (UA). Chaque point a été réalisé en triplicata. Les activités transcriptionnelles mesurées en présence du plasmide vide reflètent les activités du RA endogène des cellules LNCaP.

Afin d'évaluer l'impact de l'AR23 sur le RA endogène dans les cellules LNCaP j'ai réalisé des expériences de western-blot suivies d'une semi-quantification. Dans ce but, les cellules LNCaP ont été transfectées avec le plasmide d'expression EGFP-RA sauvage ou EGFP-AR23. Après extraction protéique des quantités équivalentes de protéines sont déposées sur un gel polyacrylamide dénaturant. Après transfert des protéines, les membranes de nitrocellulose ont été successivement incubées avec les anticorps anti-RA et anti- β -actine. Le gène β -actine est un gène dit de « ménage », exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules et est couramment utilisé comme contrôle quantitatif en biologie moléculaire. Le taux d'expression du RA endogène est évalué en présence du RA sauvage ou de l'AR23 transfecté après normalisation par la β -actine.

Ces expériences ont permis de montrer que l'AR23 stimulé par la DHT entraîne une augmentation de 1.5 fois de l'expression du RA endogène dans les LNCaP.

Figure 56 : Impact de l'AR23 sur l'expression récepteur des androgènes endogène dans les cellules LNCaP



Légende Figure 56 : L'histogramme reflète le niveau d'expression du RA endogène dans les LNCaP transfectées avec les constructions pEGFP-RA sauvage ou pEGFP-AR23, après normalisation par la β -actine. La quantification des signaux à partir du western-blot a été réalisée en utilisant le logiciel QuantityOneTM Gel Doc 2000. Les signes (+) et (-) indiquent respectivement l'ajout de DHT et d'EtOH.

Ces expériences montrent que malgré son incapacité à rentrer dans le noyau et à se lier seul à l'ADN, l'AR23 est capable d'induire dans notre modèle la transcription de gènes androgéno-dépendants en augmentant l'expression du RA endogène. Cependant ces activités nécessitent la présence d'un RA capable de remplir les fonctions de facteur de transcription.

7.) Conclusions et hypothèses concernant les activités transcriptionnelles de l'AR23

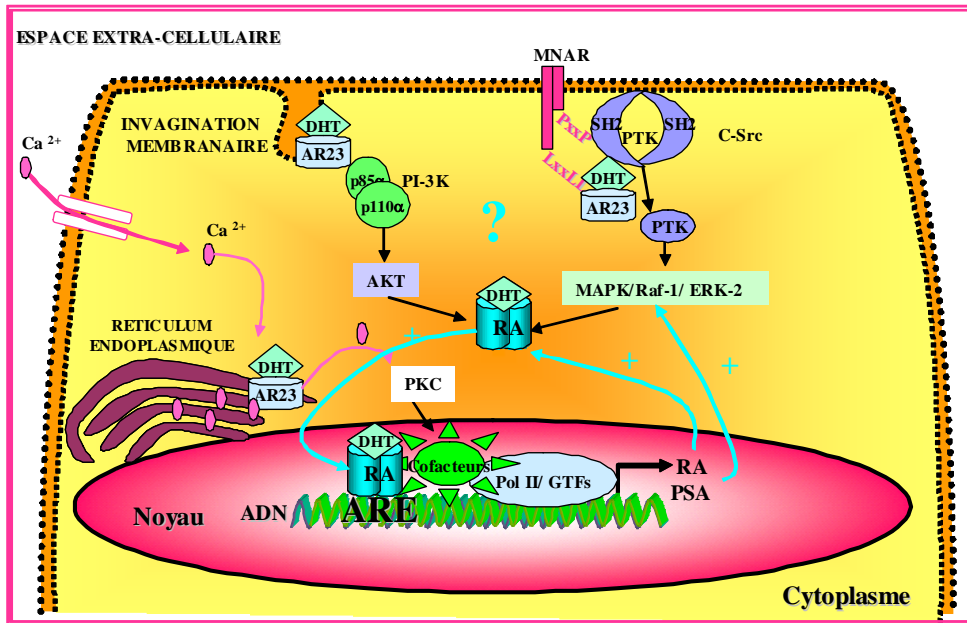
Nous avons vu que l'AR23 est incapable d'induire la transcription à partir de deux promoteurs androgéno-dépendants PSA61 et MMTV-LTR dans les cellules COS-1, n'exprimant pas de RA endogène. J'ai également montré que cette absence d'activités transcriptionnelles de l'AR23 est due à un défaut de nucléarisation et à une perte des capacités de liaison à l'ADN.

Parallèlement, les mêmes expériences réalisées dans la lignée LNCaP ont révélée de fortes activités transcriptionnelles à partir des promoteurs PSA61 et MMTV-LTR en présence de l'AR23. Les activités transcriptionnelles observées précédemment ne peuvent cependant pas être dues à la fixation directe de l'AR23 au niveau de ces promoteurs, puisque ce variant du RA ne nucléarise pas. Les activités transcriptionnelles observées impliquent certainement l'intervention d'un autre partenaire. Le taux d'expression du RA endogène est augmenté dans ces cellules en présence de l'AR23. Ces observations permettent de supposer que l'augmentation des activités transcriptionnelles à partir des promoteurs PSA61 et MMTV-LTR en présence de l'AR23, sont dues au RA endogène.

Ces résultats m'ont amené à l'élaboration d'une nouvelle hypothèse sur le mode d'action de l'AR23 dans les cellules LNCaP (Figure 57).

D'après ce modèle l'AR23 pourrait être à l'origine d'une boucle de stimulation positive dans les cellules LNCaP. Son interconnexion avec les voies de signalisation PI-3K/Akt et MAPK/ERK et PKC/Calcium, pourrait être à l'origine de la stimulation de l'expression du RA endogène dans ces cellules, et ce dernier activerait à son tour les gènes androgéno-dépendants.

Figure 57: Boucle de stimulation positive induite par l'AR23 dans les cellules LNCaP



Légende Figure 57: Modèle suivant lequel l'AR23 de par son interconnexion avec les voies de signalisation MAPK/Raf/ERK, PI-3K/Akt et PKC/calcium activerait les gènes androgéno-dépendants en induisant l'expression du RA endogène dans les cellules LNCaP. Les flèches bleues représentent la boucle de stimulation positive

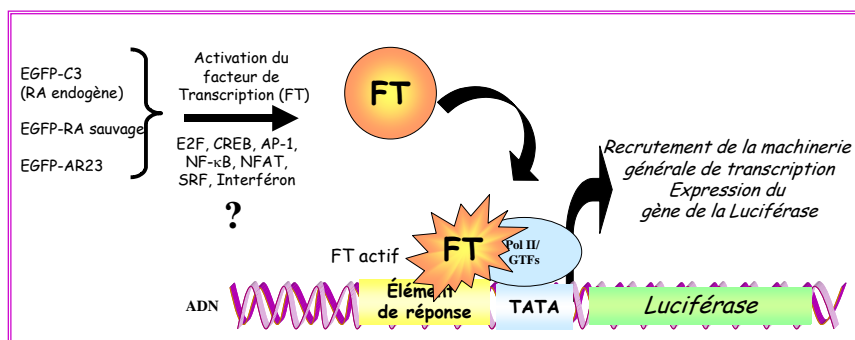
Afin, d'éclaircir un certain nombre de points abordés ci-dessus je me suis consacrée à l'étude des voies de signalisation en aval des voies MAPK/ERK et PI-3K/Akt et PKC/calcium.

7.) Impact de l'AR23 sur les activités transcriptionnelles de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire

L'impact de l'expression du RA sauvage et de l'AR23 sur les activités transcriptionnelles des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire comme AP-1 (Activating Protein 1), CREB (cAMP response element binding protein), E2F, SRF (Serum Response Factor), NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et NF-κB (Nuclear Factor κB) a été réalisée par la technique de gène rapporteur *luciférase* (Figure 58).

Dans nos expériences, l'expression du gène *luciférase* est placée sous contrôle d'un promoteur artificiel contenant la boîte TATA juxtaposée à des séquences de liaison spécifiques à chacun de ces facteurs de transcription.

Figure 58 : Principe du test utilisé pour l'étude des voies de signalisation



Légende Figure 58 : Les cellules LNCaP ou COS-1 sont co-transfectées avec un plasmide d'expression EGFP-RA sauvage ou EGFP-AR23 ou pEGFP-C3 comme contrôle et un plasmide rapporteur contenant le site de fixation pour le facteur de transcription testé. Si le facteur de transcription est activé en présence du RA, il va se fixer sur son élément de réponse et entraîner l'expression du gène luciférase. Dans les cellules LNCaP, le plasmide contrôle reflète les capacités d'activation du RA endogène.

Les plasmides pTA-AP-1-luc, pTA-CRE-luc, pTA-SRE-luc, pTA-ISRE-luc et pTA-E2F sont utilisés pour les facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, et les plasmides pTA-NF-κB-luc et pTA-NFAT-luc pour ceux intervenant dans la signalisation calcique. Le plasmide pTA-luc, contenant juste la boîte TATA est utilisé comme contrôle (Tableau 12).

Ainsi, les cellules LNCaP ou COS-1 ont été co-transfectées avec le plasmide pEGFP-C3, pEGFP-RA sauvage ou pEGFP-AR23 en combinaison avec l'un des plasmides rapporteurs. Vingt quatre heures après, les cellules sont sevrées d'hormones et de facteurs de croissance par remplacement de milieu de culture par un milieu minimum privé de sérum. Les cellules sont stimulées 24 heures plus tard par addition de DHT dans le milieu de culture et les activités luciférases sont mesurées après une nouvelle incubation de 24 heures. Parallèlement un contrôle non induit est réalisé par ajout d'EtOH.

Tableau 12: Sites de liaison utilisés dans les constructions pTA-luc

ORIGINE	SITE DE LIAISON	FACTEUR DE TRANSCRIPTION
Séquence consensus	Boîte TATA	GTF
Séquence consensus	5'TGAGCTCA-3'	AP-1
Séquence consensus	(x3) 5'-TGACGT-3'	CREB et ATF
Séquence consensus	(5x) 5'-TCAAAGTCAAAG-3'	Interferon
B-myb	(4x) 5'-CTTGGCGGGAGA-3'	E2F
Séquence consensus	(x3) 5'-CCATATTAGG-3'	SRF
Interleukine-2	(x3) 5'-GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT-3'	NFAT
Interleukine-6	(x4) 5'-CGGGATTTTCC-3'	NF-κB

Légende Tableau 12 : Les sites de liaison pour les facteurs de transcription utilisés correspondent à des séquences consensus, ou proviennent de promoteurs de gènes régulés par ces facteurs comme interleukine 2 pour NFAT, interleukine-6 pour le facteur NF-κB et b-Myb pour le facteur E2F.

Sur l'ensemble des facteurs testées, des résultats intéressants ont été obtenus pour seulement trois d'entre eux : AP-1, NF-κB et SRF. Aussi, je me limiterai dans la suite de l'exposé à la description des résultats concernant ces trois facteurs dans les deux lignées cellulaires LNCaP et COS-1 (Figure 59 à 64).

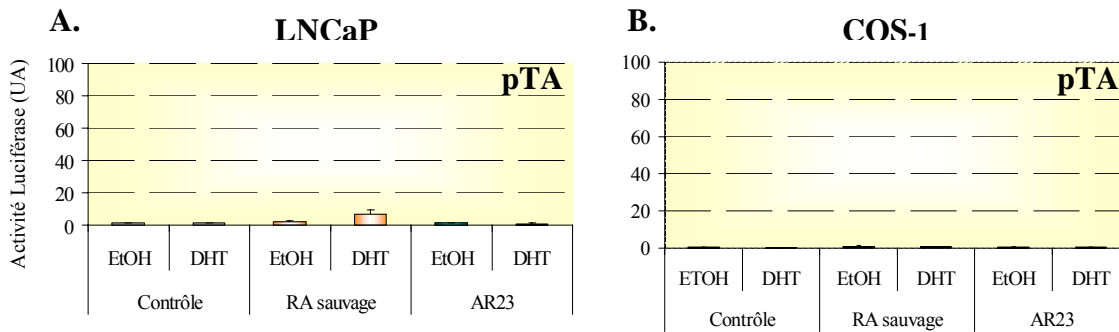
a.) Activités transcriptionnelles de l'AR23 à partir d'un promoteur minimum

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'absence d'activité transcriptionnelle des deux RAs sauvage et muté à partir du promoteur minimum de la construction pTA-luc (Figure 59).

Comme attendu, aucune activité transcriptionnelle n'est observée à partir de cette construction quelque soit le RA ou la lignée cellulaire étudiée. Deux conclusions en découlent, premièrement aucun des RAs, sauvage, AR23 ou RA endogène, ne possède la faculté d'activer la transcription à partir de cette boîte TATA. Deuxièmement, aucun de ces RAs ne peut activer de facteur transcriptionnel pouvant se fixer et activer la transcription à partir de la boîte TATA seule.

Ainsi, si une activité transcriptionnelle est observée à partir d'une construction contenant un motif de liaison pour un facteur de transcription donné, elle reflétera uniquement et spécifiquement l'activité du facteur en question.

Figure 59 : Activité transcriptionnelle à partir d'un promoteur minimum



Légende Figure 59 : Les cellules LNCaP et COS-1 sont co-transfectées avec le plasmide rapporteur pTA-luc en combinaison avec le plasmide d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Soixante-douze heures après transfection, les activités transcriptionnelles sont mesurées à l'aide du luminomètre TD20/20 et sont représentées en unités arbitraires (UA). Chaque point a été réalisé en triplicata.

b.) Etude des activités transcriptionnelles du facteur SRF

Le facteur SRF est une petite protéine de 67kDa appartenant à la famille de facteurs de transcription à boîte MADS (MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS SRF). Ces facteurs reconnaissent la séquence « 5'-CCATATTAGG-3' » appelée SRE (Serum Response Element). La régulation de la transcriptionnelle de SRF peut être médiée par les facteurs de croissance activant la cascade de signalisation MAPK/ERK ou par formation de complexes ternaires avec d'autres facteurs de transcription au niveau des SRE (Chai J et Tarnawski AS. 2002).

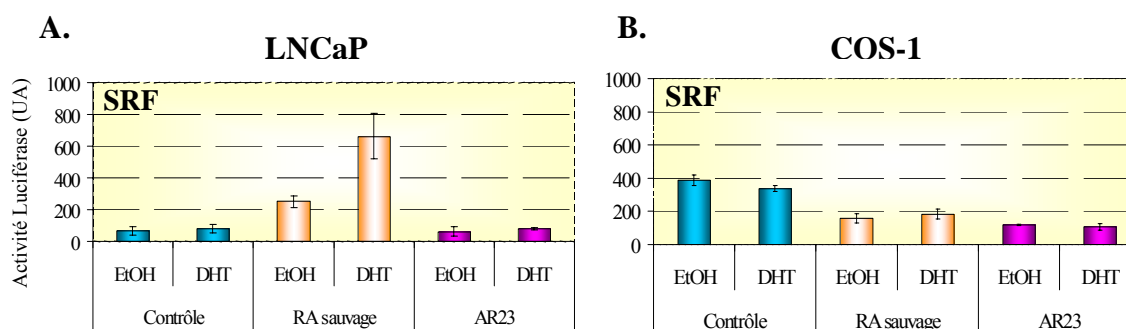
Les SREs sont situés en amont de gènes impliqués dans le développement des muscles squelettiques et cardiaques mais aussi au niveau du promoteur du gène *c-Fos* (Huet A *et al.*, 2005). La présence de la séquence « 5'-CCATATTAGG-3' » en amont de *c-Fos* est suffisante pour induire une activation rapide de ce gène suite à une stimulation par le sérum ou par les facteurs de croissance (Sealy L *et al.*, 1997).

L'étude des activités transcriptionnelles du facteur SRF a été réalisée comme décrit précédemment, en utilisant la technique du gène rapporteur *luciférase*. Les cellules LNCaP ou COS-1 sont co-transfectées avec le plasmide d'expression EGFP-RA sauvage, -AR23 ou C3 (contrôle) et le vecteur pTA-SRE-luc.

Le niveau de base de l'activité de SRF dans nos conditions expérimentales est obtenu dans les cellules LNCaP transfectées avec le plasmide contrôle (Figure 60A). En revanche, la présence du RA sauvage a pour conséquence une forte activation DHT-dépendante des activités de ce facteur de transcription. Par contre, les activités transcriptionnelles du facteur SRF ne sont pas augmentées en présence de l'AR23. Les valeurs obtenues restant équivalentes à celles obtenues en présence du plasmide contrôle.

Les résultats obtenus en présence du RA sauvage pourraient s'expliquer par le recrutement du RA activé par la DHT par le facteur SRF au niveau du promoteur SRE. En effet, SRF est connu pour coopérer avec le RA au niveau d'un promoteur contenant des séquences SRE (Vlahopoulos S. *et al.*, 2005). Cette augmentation de l'activité de SRF n'est pas retrouvée en présence de l'AR23 activé par la DHT qui reste cytoplasmique. Ces résultats illustrent les conséquences de la perte des activités génomiques par l'AR23.

Figure 60 : Activités transcriptionnelles du facteur SRF



Légende Figure 60 : Les cellules LNCaP et COS-1 sont co-transfectées avec le plasmide rapporteur pTA-SRE-luc en combinaison avec le plasmide d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Soixante-douze heures après transfection, les activités transcriptionnelles sont mesurées à l'aide du luminomètre TD20/20 et sont représentées en unités arbitraires (UA). Chaque point a été réalisé en triplicata.

Les mêmes expériences menées dans la lignée COS-1 ont conduit à des résultats différents (Figure 60B). Dans ces cellules, les plus fortes activités transcriptionnelles du facteur SRF ont été obtenues en présence du plasmide contrôle. Ces activités sont DHT-indépendantes et leur niveau est respectivement deux fois et quatre fois plus élevé que les inductions observées en présence du RA sauvage et de l'AR23.

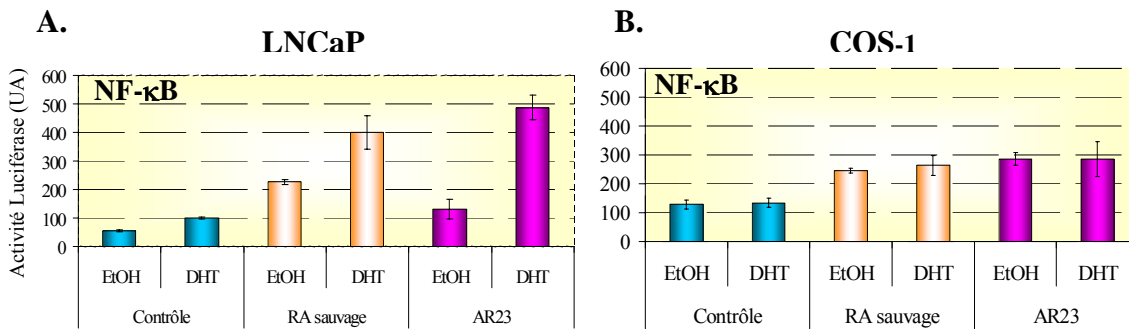
Ces résultats laissent à penser que dans les cellules COS-1, le facteur SRF et les RAs entrent en compétition pour des co-facteurs communs, et que ces derniers sont préférentiellement recrutés par les RAs.

c.) Etude des activités transcriptionnelles du facteur NF- κ B

Nous avons ensuite évalué les activités transcriptionnelles des facteurs NF- κ B. Ces facteurs de transcription régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Comme nous l'avons vu, la famille de NF- κ B est composée de cinq membres, NF- κ B2, c-Rel, RelA ou p65, RelB, et NF- κ B1 ou p50 pouvant former des homo- ou des hétérodimères pour activer la transcription de leurs gènes cibles (Suh J et Rabson AB, 2004). Le RA peut influencer les activités transcriptionnelles du facteur NF- κ B en interagissant avec la sous-unité p65 au niveau de son extrémité N-terminale dans une région située entre le résidu 297 et le DBD (Palvimo JJ *et al.*, 1996).

Dans les cellules LNCaP une induction relativement faible d'activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B a pu être observée en présence du plasmide contrôle. Cette activité légèrement augmentée en présence de DHT, reflète l'influence du RA endogène sur les activités de NF- κ B. Une activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B beaucoup plus importante est observée en présence du RA sauvage stimulé par la DHT. De façon inattendue des résultats similaires sont obtenus en présence de l'AR23 activé par la DHT (Figure 61A.). Ces résultats sont intrigants de par la localisation différente du RA sauvage et de l'AR23 après stimulation hormonale.

Figure 61 : Activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B



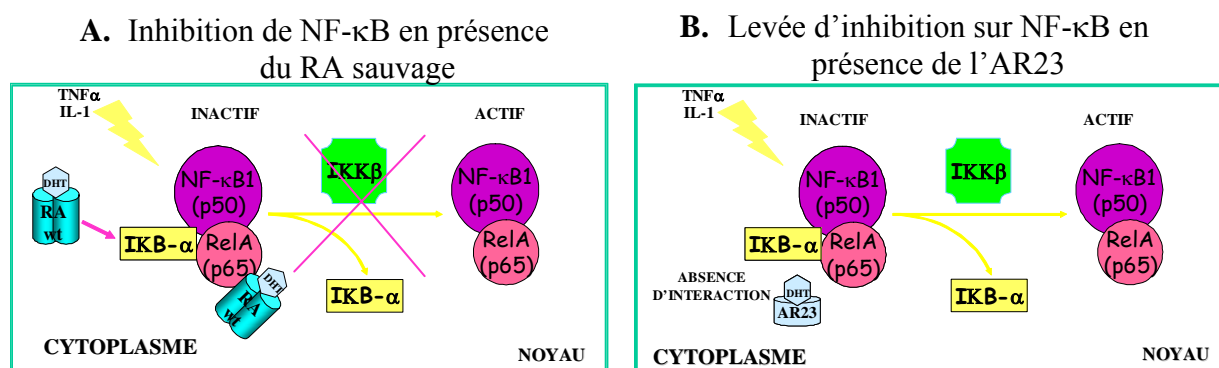
Légende Figure 61 : Les cellules LNCaP et COS-1 sont co-transfectées avec le plasmide rapporteur *pTA-NF- κ B-luc* en combinaison avec le plasmide d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Soixante-douze heures après transfection, les activités transcriptionnelles sont mesurées à l'aide du luminomètre TD20/20 et sont représentées en unités arbitraires (UA). Chaque point a été réalisé en triplicata.

Dans les cellules COS-1 des activités transcriptionnelles du facteur NF- κ B sont aussi augmentées en présence du RA sauvage ou de l'AR23 par rapport au contrôle. Cependant l'influence des deux RAs sur les activités de ce facteur n'est pas affectée par la présence de DHT (Figure 61B).

Ces données montrent que l'AR23 comme le RA sauvage, peut influencer les activités transcriptionnelles du facteur NF- κ B dans deux lignées cellulaires distinctes. Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des activités du facteur NF- κ B sont certainement différents dans les deux lignées.

Dans la littérature, les effets réciproques entre le facteur NF- κ B et le RA sont controversés. Certains auteurs rapportent des effets antagonistes des deux protéines de part l'interaction entre le RA et la sous unité p65 (Palvimo JJ *et al.*, 1996). Dans ce cas de figure on pourrait imaginer que l'insertion de 23 acides aminés au niveau du DBD du RA abolirait cette interaction et faciliterait l'assemblage de l'hétérodimère de NF- κ B, promouvant ainsi ses activités transcriptionnelles (Figure 62).

Figure 62 : Schématisation d'un mode d'action potentiel de l'AR23 sur le facteur NF-κB



Légende Figure 62 : **A.** Inhibition du facteur NF-κB exercée par le RA sauvage qui en se complexant à la sous unité p65 empêche l'interaction du facteur NF-κB avec l'ADN. **B.** Modèle proposé pour la levée d'inhibition exercée sur le facteur NF-κB par l'AR23 : les 23 acides aminés insérés au niveau du DBD de l'AR23 empêcheraient l'interaction de l'AR23 avec la sous unité p65.

Ce mode d'action bien que possible dans le cas de l'AR23, n'explique cependant pas les activités transcriptionnelles observées en présence du RA sauvage possédant un DBD fonctionnel et suggèrent l'existence d'un mécanisme alternatif de régulation de la voie NF-κB dans nos conditions expérimentales.

Ainsi, certains auteurs ont également rapporté des effets activateurs entre les deux protéines. Il a notamment été décrit, qu'en présence de DHT, le RA sauvage pouvait activer de façon non génomique la voie de signalisation PI-3K/Akt (Barons S *et al.*, 2004). Nos résultats montrant que l'AR23 et le RA sauvages influencent de manière positive les activités transcriptionnelles du facteur NF-κB, suggèrent que ces activités non génomiques décrites par Baron et ses collaborateurs seraient préservées au niveau de l'AR23 (Barons S *et al.*, 2004).

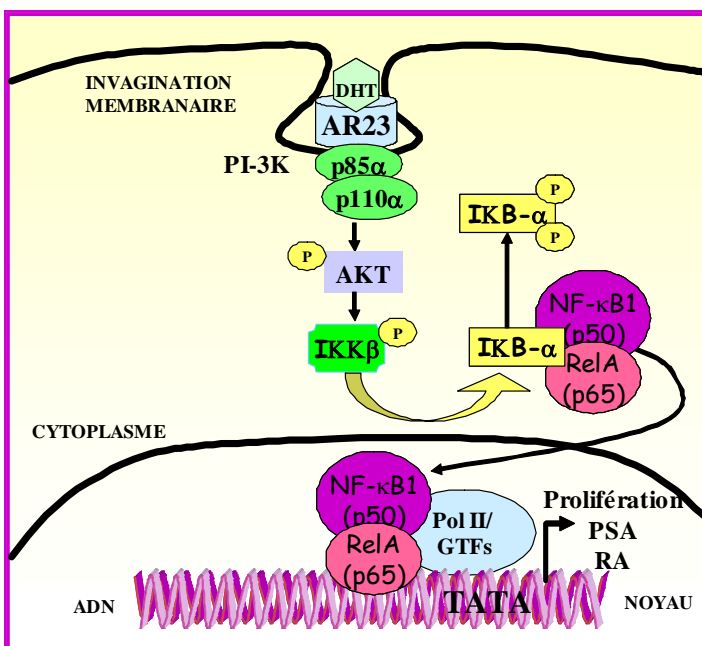
Par ailleurs, d'autres auteurs ont démontré que Akt pouvait activer la voie de signalisation de NF-κB, en phosphorylant la kinase IκBα (Lee SO *et al.*, 2005, Peant B *et al.*, 2007). Lee et ses collaborateurs ont notamment mis en évidence un effet activateur de NF-κB sur les activités transcriptionnelles du RA. Dans cette étude, l'interleukine 4 serait à l'origine d'une cascade d'induction passant par l'activation de la voie PI-3K qui activerait NF-κB qui à son tour activerait le RA. En effet, dans leurs conditions expérimentales, l'activation de NF-κB est abolie par le LY294002, un

inhibiteur spécifique de la voie de signalisation PI-3K, et l'expression du gène androgéno-dépendant *PSA* n'est pas induite en présence d'IKK α , un inhibiteur puissant de NF- κ B (Lee SO *et al.*, 2005).

Cette interconnexion entre les voies PI-3K/Akt, NF- κ B et le RA permet d'expliquer les résultats obtenus sur les promoteurs androgéno-dépendants dans la lignée LNCaP. En effet, nous avons vu que l'AR23 induit une forte activité transcriptionnelle à partir des promoteurs PSA61 et MMTV-LTR de façon androgéno-dépendante et uniquement dans la lignée cellulaire LNCaP, possédant un RA endogène. De surcroît, nous avons également démontré que l'expression du RA endogène est augmentée en présence de l'AR23.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'AR23 pourrait affecter les activités transcriptionnelles du facteur NF- κ B de deux manières. D'une part, l'insertion de 23 acides aminés au niveau du DBD de l'AR23 pourrait l'empêcher de se complexer à la sous unité p65 et de ce fait lèverait l'inhibition exercée sur le facteur NF- κ B. Alternativement, nous avons déjà émis l'hypothèse que de par sa position spécifique dans la cellule, l'AR23 pourrait interagir avec la sous unité p85 α de PI-3K entraînant son activation et de ce fait, contribuer à l'induction du facteur NF- κ B de manière similaire a celle décrite par Lee et ses collaborateurs (Lee SO *et al.*, 2005).

Figure 63 : Modèle illustrant l'implication possible de l'AR23 dans l'activation du facteur NF- κ B



Légende Figure 63 :

L'activation du facteur NF- κ B serait médiée par l'activation de la voie de signalisation PI-3K/Akt, elle-même activée par l'AR23 localisé au niveau des invaginations membranaires.

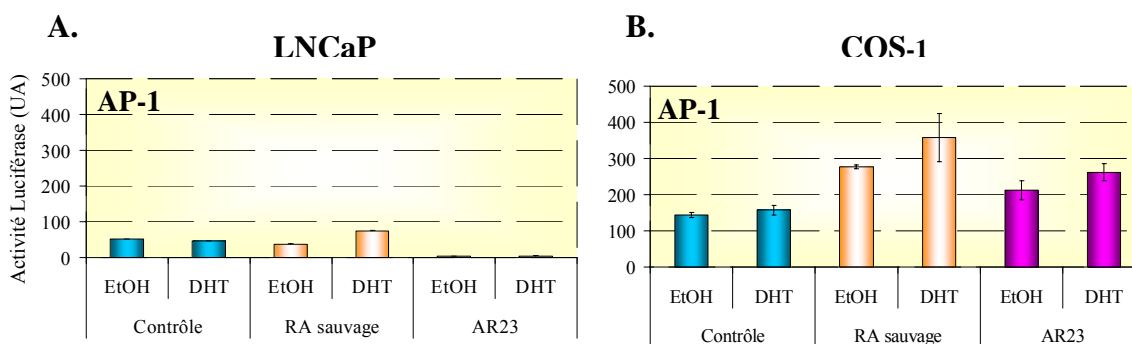
Des expériences complémentaires concernant la localisation de l'AR23 au niveau des invaginations membranaires sont requises pour appuyer notre modèle. Cependant, les résultats observés indiquent que l'activation de NF- κ B pourrait mettre en jeu cette localisation particulière de l'AR23 et l'activation de la voie de PI-3K.

d.) Etude des activités transcriptionnelles du facteur AP-1

Les facteurs de transcription AP-1 sont un groupe de protéines structurellement et fonctionnellement liées dont les membres principaux sont constitués par les protéines Fos (FosB, Fra-1, Fra-2) et Jun (JunB, JunD). La composition du facteur AP-1, le contexte cellulaire et la nature des stimuli vont être déterminants pour le choix des gènes cibles (Hess J *et al.*, 2004). Le complexe AP-1 fréquemment associé à la cancérogenèse est multifonctionnel, étant aussi bien impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques que de gènes anti-apoptotiques (Ozanne BW *et al.*, 2007).

Les expériences d'activités transcriptionnelles du facteur AP-1 conduites dans la lignée LNCaP ont révélé un niveau d'induction basal en présence du plasmide contrôle pEGFP-C3, reflétant l'influence du RA endogène de ces cellules sur les activités AP-1. Une faible activité transcriptionnelle du facteur AP-1 est également observée lorsque les cellules sont transfectées avec le vecteur d'expression du RA sauvage. Cette activité est stimulée par l'addition de DHT indiquant qu'elle est bien spécifique du RA. De manière surprenante, l'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 semble complètement abrogée en présence de l'AR23 dans les LNCaP (Figure 64A.).

Figure 64 : Activités transcriptionnelles du facteur AP-1



Légende Figure 64 : Les cellules LNCaP et COS-1 sont co-transfectées avec le plasmide rapporteur pTA-AP-1-luc en combinaison avec le plasmide d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes. Soixante-douze heures après transfection, les activités transcriptionnelles sont mesurées à l'aide du luminomètre TD20/20 et sont représentées en unités arbitraires (UA). Chaque point a été réalisé en triplicata.

Ces résultats ne sont pas retrouvés dans les cellules COS-1. En effet, une augmentation des activités AP-1 est mesurée en présence du RA sauvage ou de l'AR23 par rapport au bruit de fond observé avec le plasmide contrôle. Cette influence du RA sauvage et de l'AR23 sur les activités transcriptionnelles du facteur AP-1 semble peu sensible à l'induction hormonale. L'observation la plus intéressante est le maintien des activités transcriptionnelles de AP-1 dans ces cellules COS-1 en présence de l'AR23, alors que dans les cellules LNCaP, ces activités sont réprimées (Figure 64B).

Cette observation indique que l'impact de l'AR23 sur les activités AP-1 dépend du contexte cellulaire. Dans les cellules LNCaP, la voie de signalisation du RA est indispensable à la prolifération et à la survie cellulaire (Culig Z, 2004). Des interconnexions sont connues entre la voie du RA et les voies de signalisation de facteurs de croissance ou de survie dans ces cellules. Inversement, les cellules COS-1 étant androgéno-indépendantes, ne requièrent pas la présence du RA pour leur croissance et leur survie, l'impact du RA sur les voies de signalisation est certainement différent.

Cette observation suggère que l'insertion de 23 acides aminés au niveau du DBD de l'AR23 doit modifier la connexion avec les voies de signalisation conduisant à l'activation du facteur AP-1.

Une interaction directe entre le DBD du RA sauvage et le domaine « leucine zipper » du facteur Jun a été décrite. Dans ce modèle, de par son interaction avec Jun, le RA séquestrerait cette protéine en prévenant ainsi la formation du complexe AP-1 contenant cette protéine. Cette interaction serait mutuellement inhibitrice pour les deux partenaires (Sato N *et al.*, 1997, Wise SC *et al.*, 1997, Edwards J *et al.*, 2004).

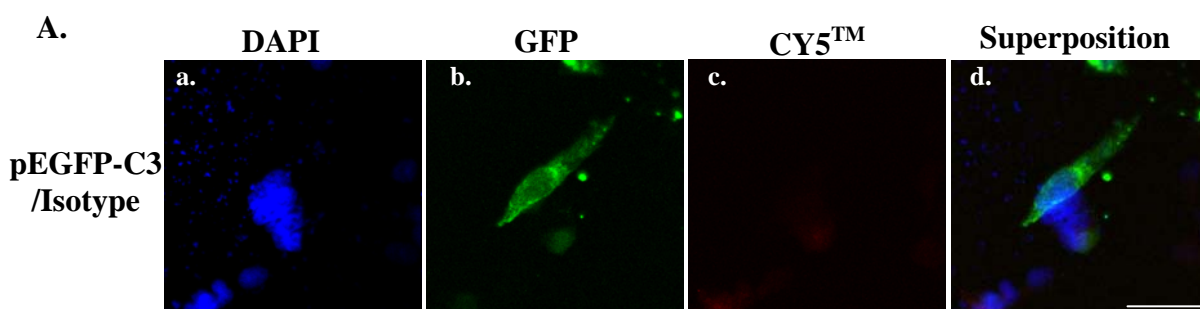
L'ensemble de ces résultats m'a permis de formuler une hypothèse, selon laquelle les 23 acides aminés insérés au niveau du DBD stabiliseraient l'interaction entre l'AR23 et Jun, conduisant à la séquestration de ce dernier au niveau des agrégats formés par l'AR23 dans le cytoplasme.

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de colocalisation entre Jun et l'AR23 par immunofluorescence en microscopie confocale.

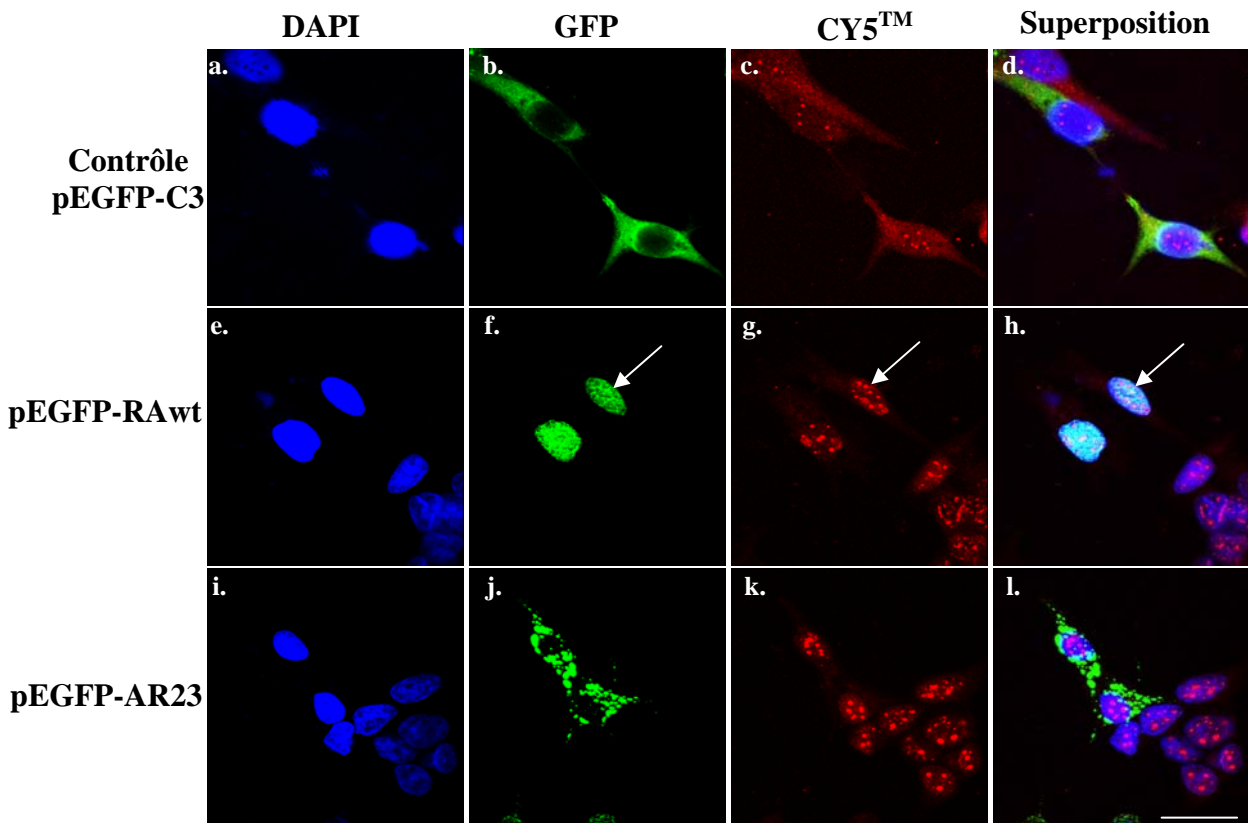
e.) Recherche d'une éventuelle colocalisation entre Jun et l'AR23

Afin de confirmer ou d'infirmer l'éventuelle rétention de Jun au niveau des agrégats formés par l'AR23, les cellules LNCaP ont été transfectées avec les plasmides d'expression EGFP-RA sauvage, EGFP-AR23 ou par le plasmide contrôle EGFP-C3. L'ensemble des expériences a été réalisé en milieu complet de façon à visualiser les agrégats formés par l'AR23. Quarante huit heures après transfection les cellules ont été fixées et traitées avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine c-Jun ou par le contrôle isotypique puis par l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome CY5TM. Afin de visualiser les noyaux j'ai également réalisé un marquage au Hoeschst 33258 (Figure 65).

Figure 65: Etude de la colocalisation entre le récepteur des androgènes et le facteur de transcription c-Jun



B.



Légende Figure 66 : Les cellules LNCaP cultivées en milieu complet sont transfectées avec les plasmides EGFP-RA sauvage ou -AR23 ou -C3 (contrôle). Quarante huit heures après transfection les cellules sont fixées et les noyaux sont marqués au Hoeschst 33258. **A.** Contrôle isotypique IgG de lapin/CY5. **B.** Etude de la colocalisation avec Jun. Les images sont acquises avec le microscope confocal Leica DMIRBE SP2-UV, grossissement x100, la barre représente 29.5µM. Les flèches indiquent quelques points de colocalisation entre c-Jun et le RA sauvage

Le choix des fluorochromes a été fait de façon que les longueurs d’ondes d’excitation soient distinctes et que les longueurs d’ondes d’émission ne se superposent pas. Par ailleurs, l’excitation des différentes combinaisons des fluorochromes et l’acquisition des données sont réalisées de manière séquentielle pour chaque fluorochrome.

L’isotype utilisé ne reconnaît pas notre protéine d’intérêt et n’est pas non plus reconnu par l’anticorps secondaire couplé au fluorochrome CY5™, aussi aucun signal ne peut être détecté suite à l’excitation dans le rouge (Figure 65A).

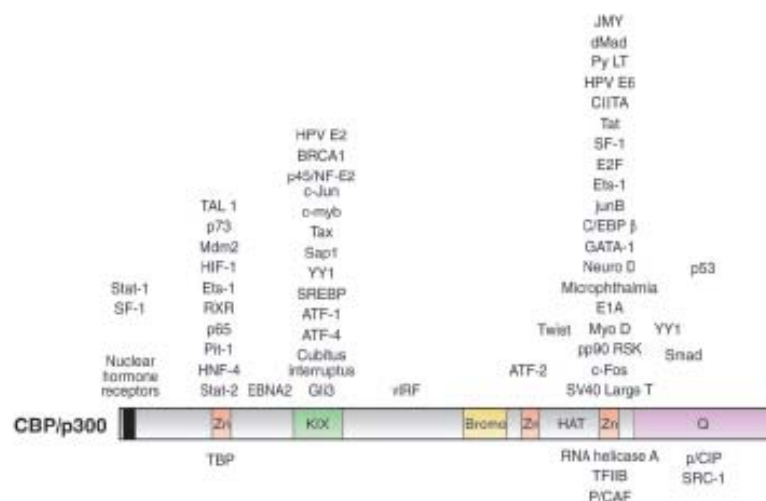
Dans les cellules LNCaP, le profil d’expression de Jun dépeint une localisation sous forme de spots nucléaires bien individualisés (Figure 65B c, g et k). D’autre part, la localisation de ces spots ne semble être altérée ni par l’expression du RA sauvage ni

par celle de l'AR23. Le profil d'expression du RA sauvage et de l'AR23 reste classique, nucléaire pour le RA sauvage (Figure 65B. f et h) et sous forme d'agrégats cytoplasmiques et péri-nucléaires pour l'AR23 (Figure 65A. j et l). Une co-localisation partielle, signalée par des flèches blanches, peut être observée entre le RA sauvage et la protéine Jun (Figure 65B).

D'après ces résultats, nous pouvons infirmer l'hypothèse selon laquelle c-Jun serait séquestré dans les agrégats formés par l'AR23 et conclure que l'inhibition de l'activité du facteur AP-1 probablement liée à un autre mécanisme.

Un des mécanismes possibles pourrait être une compétition entre le facteur transcriptionnel AP-1 et un autre facteur de transcription pour un co-activateur commun tel que CBP. Ce facteur est un co-intégrateur des activités de nombreux facteurs de transcription (Fronsdal K *et al.*, 1998, Aarnisalo P *et al.*, 1998, Bannister AJ *et al.*, 1995, Bannister AJ et Kouzarides T, 1995, Perkins ND *et al.*, 1997, Vo and Goodman, 2001). Présent en quantité limitante dans les cellules, le facteur CBP fait l'objet de compétition entre différents facteurs pour leurs activités transcriptionnelles respectives.

Figure 66. Sites d'interaction de facteurs de transcription au niveau de CBP

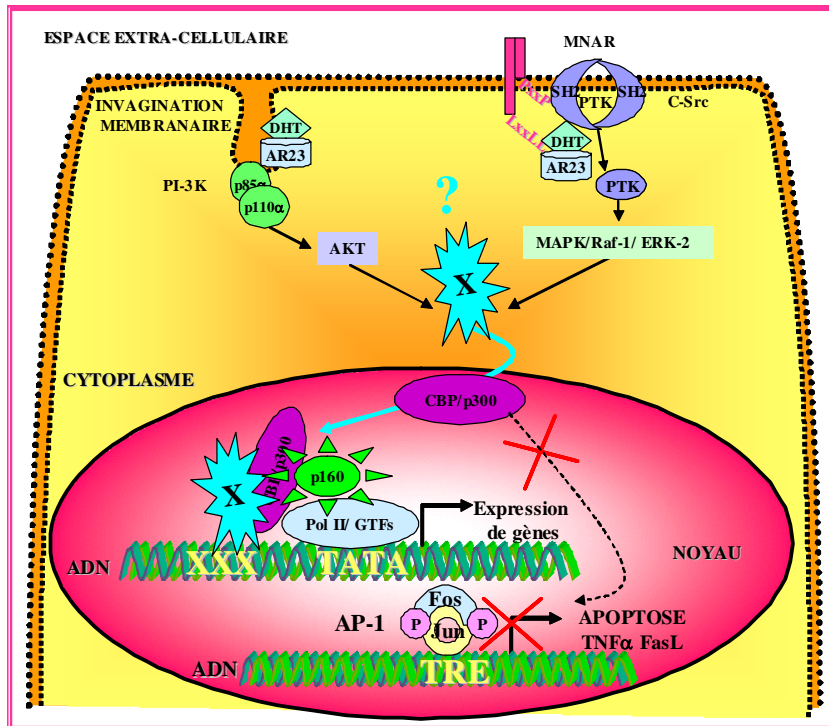


Légende Figure 66 : La protéine CBP est schématisée, les 3 doigts de zinc (Zn) le bromodomaine (Bromo), le domaine HAT composant la protéine, ainsi que les sites d'interaction avec de nombreux facteurs transcriptionnels sont représentés.

Nous avons montré que l'AR23, exclusivement cytoplasmique après stimulation par la DHT, exhibe des activités non génomiques. Toujours d'après notre modèle,

l'AR23 en activant des voies de signalisation telles que celles de PI-3K/Akt et de MAPK/ERK, pourrait favoriser le recrutement de CBP par un facteur de transcription indéterminé, limitant ainsi le CBP disponible pour AP-1.

Figure 67: Modèle de l'inhibition de l'activité du facteur AP-1 par l'AR23



Légende Figure 67: Un des mécanismes possibles responsable de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 dans les cellules LNCaP en présence de l'AR23 pourrait être la compétition pour un co-facteur commun et plus particulièrement pour CBP. Les activités non génomiques de l'AR23 conduisent à l'activation d'un facteur de transcription indéterminé (X) qui recrute CBP, limitant ainsi le pool de CBP disponible pour les activités AP-1.

Aussi, ces données permettent de penser que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 dans une lignée cellulaire prostatique pourrait avoir son importance dans la progression tumorale (Figure 67).

En effet, comme nous l'avons vu, les complexes AP-1 sont multifonctionnels et ont surtout été impliqués dans le soutien de la prolifération cellulaire (Hess J *et al.*, 2004). Cependant, de nombreuses études rapportent également le rôle de ces facteurs dans la régulation de l'apoptose (Shaulian E et Karin M, 2002). Au niveau du cancer de la prostate, AP-1 est ainsi impliqué dans la mort cellulaire en induisant l'expression

de facteurs pro-apoptotiques comme TNF α (Tumor Necrosis Factor α) et FasL (Zhang X *et al.*, 2004). Alternativement, AP-1 peut réprimer la transcription de gènes anti-apoptotiques comme c-FLIP (cellular- FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein long isoform) (Li W *et al.*, 2007).

Ainsi, le récepteur muté AR23 pourrait favoriser d'une part la survie des cellules prostatiques cancéreuses par inhibition de l'apoptose médiée par le complexe AP-1 et d'autre part par l'activation du facteur NF- κ B.

f.) Conclusions concernant les activités cytoplasmiques de l'AR23 dans les cellules LNCaP et COS-1

L'étude des actions cytoplasmiques de l'AR23 a été menée dans deux lignées cellulaires distinctes. D'une part, nous avons étudié les activités de l'AR23 dans des cellules prostatiques LNCaP demeurant androgéno-sensibles et ayant conservé la signalisation du RA, et d'autre part, ces mêmes activités ont été étudiées dans les cellules COS-1. Les COS-1 n'expriment pas de RA et sont androgéno-indépendantes.

Nous avons observé des différences significatives dans la régulation des activités transcriptionnelles des facteurs AP-1, NF- κ B et SRF en présence des RAs sauvages et muté entre les deux lignées cellulaires.

Les différences observées au niveau des activités transcriptionnelles d'un même facteur dans deux lignées cellulaires distinctes, soulignent l'importance du contexte cellulaire dans la transduction des signaux, et démontrent qu'un RA dénué d'une fonction dans un type cellulaire peut être exercer un rôle important dans d'autres cellules.

Ces résultats soulèvent la question du comportement de l'AR23 dans une lignée prostatique androgéno-indépendantes. Aussi, nous avons étudiée les activités transcriptionnelles des facteurs AP-1 et NF- κ B dans les cellules PC3 androgéno-indépendantes issues d'un adénocarcinome de la prostate et dont l'une des propriétés est le manque d'expression d'un RA fonctionnel.

9.) Etude des activités transcriptionnelles de l'AR23 dans les cellules PC-3

L'étude des activités transcriptionnelles dans les cellules PC-3 a été réalisée suivant le même protocole que dans les cellules LNCaP ou COS-1. Brièvement, nous avons co-transfecté ces cellules avec les vecteurs d'expression EGFP-RA sauvage, EGFP-AR23 ou EGFP-C3 en combinaison avec un plasmide codant pour le gène rapporteur de la *luciférase* (pTA-luc, pTA-AP-1-luc et pTA-NF- κ B-luc). Quarante-huit heures après transfection, les cellules sont stimulées ou non en présence de 100nM de DHT, et la mesure des activités luciférase est réalisée 72 heures après transfection (Figure 68A, B et C).

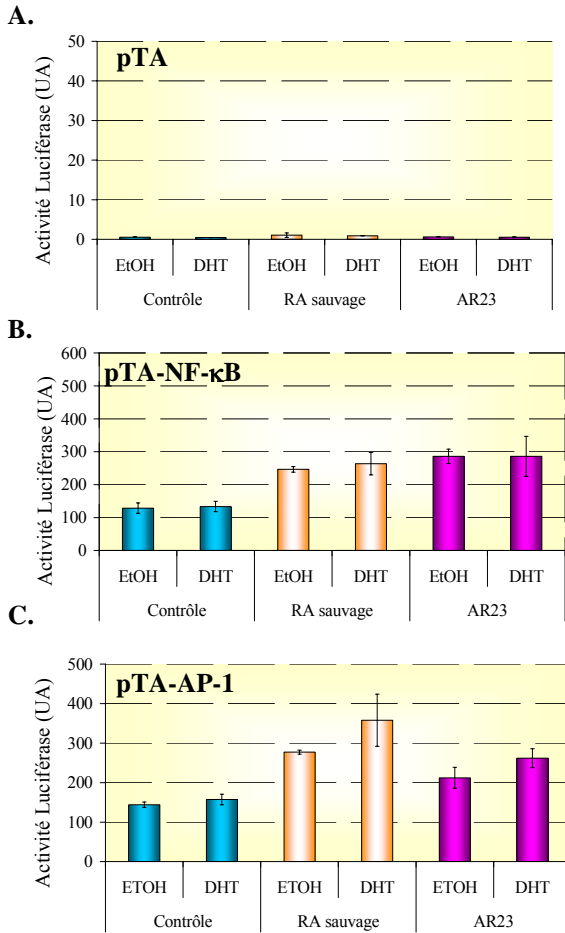
Comme attendu, aucune activité transcriptionnelle n'est observée à partir de la construction pTA-luc quelque soit le vecteur d'expression utilisé (Figure 68A).

Les activités transcriptionnelles NF- κ B dans les cellules PC-3 en absence de tout RA sont relativement élevées, cette caractéristique est liée à l'expression constitutive de ce facteur dans cette lignée (Le Page C *et al.*, 2005). Ces activités ne sont pas affectées par le traitement hormonal (Figure 69B). Malgré tout, nous avons pu observer un impact de nos RAs transfectées sur les activités transcriptionnelles du facteur NF- κ B dans cette lignée. En effet, ces activités sont augmentées respectivement de 2 et de 3 fois en présence du RA sauvage et de l'AR23 (Figure 68B).

De même, une activité de base et hormono-indépendante du facteur AP-1 est observée dans les cellules PC-3 en absence de tout RA. Ces activités transcriptionnelles du facteur AP-1 sont augmentées en présence du RA sauvage. Une légère augmentation peut également être observée au niveau des cellules exprimant l'AR23 (Figure 68C).

Figure 68 : Activités transcriptionnelles des facteurs AP-1 et NF- κ B dans la lignée

PC3



Légende Figure 68 : Les cellules PC3 ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteurs pTA-luc (A.), pTA-NF- κ B-luc (B.) et pTA-AP-1-luc (C.) en combinaison avec les plasmides d'expression du RA sauvage, de l'AR23 ou avec le plasmide vide (contrôle) et incubées pendant 24 h avec 100 nM de DHT ou avec son diluant, l'éthanol (EtOH). Soixante-douze heures après transfection, les activités transcriptionnelles ont été mesurées en unités arbitraires (UA) grâce au luminomètre TD20/20. Chaque point a été réalisé en triplicata.

Dans l'ensemble, les activités transcriptionnelles des facteurs AP-1 et NF- κ B en présence du RA sauvage ou de l'AR23 sont distinctes de celles observées dans les cellules LNCaP. Ces différences sont surtout frappantes pour l'AR23, qui d'une part dans la lignée LNCaP abroge les activités du facteur AP-1, et d'autre part semble les soutenir dans la lignée PC-3. Ces résultats indiquent un impact différent de l'AR23 sur les voies de régulation des activités AP-1 dans les cellules PC-3. Aussi, ces données laissent à penser que les actions de l'AR23 varient en fonction du contexte cellulaire et dépendent du statut d'androgéno-sensibilité des cellules.

II. Conclusions générales sur les activités du variant AR23

1.) Résumé des résultats obtenus

Le variant AR23 a été détecté à partir d'un prélèvement de moelle osseuse effectué chez un patient atteint d'un CaP métastatique en échappement hormonal. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique par le biais d'un test fonctionnel chez la levure mis au point au laboratoire (Céraline J *et al.*, 2003). Cette étude avait pour but de corrélérer les mutations du RA détectées, ainsi que leur fréquence dans les échantillons de CaP à une information clinique incluant les caractéristiques anatomopathologiques et le profil évolutif de la tumeur du patient ainsi que la réponse aux traitements administrés.

Le séquençage de l'ADNc de ce variant a dévoilé la présence de 69 nucléotides supplémentaires entre l'exon 2 et l'exon 3.

Au cours du test fonctionnel, cette insertion a pour conséquence l'absence d'une croissance de levures sur un milieu sélectif.

Une comparaison de séquences de l'ADN génomique du RA à celle de l'ADNc du variant AR23 a révélé que les 69 nucléotides insérés proviennent d'un épissage aberrant lors duquel un site accepteur cryptique a été utilisé. Cet épissage aberrant aboutit à la conservation des 69 derniers nucléotides de l'intron 2.

Cependant, ne disposant pas d'ADN génomique du patient, nous ne sommes pas en état d'affirmer si cet épissage aberrant est dû à la présence d'une mutation au niveau de l'ADN génomique ou s'il s'agit d'une erreur d'épissage isolée.

Cette insertion de 69 nucléotides ne conduit pas à un codon stop prématuré mais aboutit à l'insertion de 23 acides aminés additionnels entre les deux doigts de zinc du DBD. Nous avons appelé ce variant particulier AR23.

Les techniques de western blot et de retardement sur gel, nous ont permis de démontrer que les 23 acides aminés n'empêchent pas l'expression de l'AR23 dans les lignées cellulaires LNCaP et COS-1, mais abrogent ses capacités de liaison à l'ADN.

Par immunofluorescence en microscopie confocale et par fractionnement cellulaire suivi de western blot, j'ai montré que l'AR23 n'est pas capable de nucléariser. En effet, la stimulation hormonale a pour conséquence l'accumulation de ce variant sous forme d'agrégats dans le compartiment cytoplasmique et membranaire des cellules et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique. La formation d'agrégats n'est pas due à la surexpression de l'AR23 mais est spécifiquement induite par la DHT.

L'étude des activités transcriptionnelles de ce variant par la technique de gène rapporteur a démontré que la localisation atypique de l'AR23 activé par la DHT dans les cellules se traduit par l'absence d'activités transcriptionnelles directes au niveau des promoteurs PSA61 et MMTV-LTR dans les cellules COS-1. Curieusement, l'expression de ce variant dans les cellules LNCaP conduit à l'augmentation des activités transcriptionnelles à partir de ces mêmes promoteurs.

Par western blot suivi d'une étude quantitative, j'ai également montré que l'expression de l'AR23 dans les cellules LNCaP a pour effet une augmentation de l'expression du RA endogène.

Ces résultats m'ont permis d'établir un modèle d'après lequel l'AR23 pourrait être à l'origine d'une boucle de stimulation positive dans les cellules LNCaP. Sa position atypique au niveau des membranes favoriserait son interconnexion avec les voies de signalisation PI-3K/Akt et MAPK/ERK et PKC/Calcium, dont l'implication dans la régulation des activités du RA a amplement été décrite (Kousteni S *et al.*, 2001, Baron S *et al.*, 2004, Freeman MR *et al.*, 2005). Selon ce modèle, l'AR23 activerait les cascades de signalisation PI-3K/Akt et MAPK/ERK qui stimuleraient l'expression du RA endogène et ce dernier permettrait l'activation de la transcription à partir des promoteurs androgéno-dépendants dans les cellules LNCaP.

Je me suis ensuite intéressée à l'étude des facteurs de transcription en aval des voies MAPK/ERK, PI-3K/Akt et PKC/calcium et plus particulièrement des facteurs transcriptionnels AP-1 et NF- κ B.

Cette étude a été réalisée par la technique du gène rapporteur dans trois lignées cellulaires distinctes, deux lignées issues d'un adénocarcinome prostatique, LNCaP et PC3 et dans les cellules COS-1 dérivées du rein de singe. Les cellules LNCaP sont

androgéno-sensibles et ont conservé la voie de signalisation du RA, alors que les cellules COS-1 et PC3 n'expriment pas de RA et sont androgéno-indépendantes.

Dans les cellules LNCaP en présence de l'AR23 activée par la DHT l'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 est abrogée, alors que celle du facteur NF- κ B est fortement stimulée. Dans les cellules COS-1 et PC-3, la présence d'un bruit de fond élevé en absence de tout RA et de stimulation par la DHT laisse à penser que les activités des facteurs AP-1 et NF- κ B sont régulées différemment dans ces deux lignées cellulaires. Aussi, l'impact de deux RAs est également différent sur les voies de régulation des activités AP-1 et NF- κ B que celui observé dans les cellules androgéno-sensibles LNCaP.

Les résultats obtenus mettent en évidence deux caractéristiques de l'AR23, d'une part une action distincte de ce récepteur en fonction du contexte cellulaire, et d'autre part que ces activités sont fortement liées au caractère androgéno-sensible des cellules.

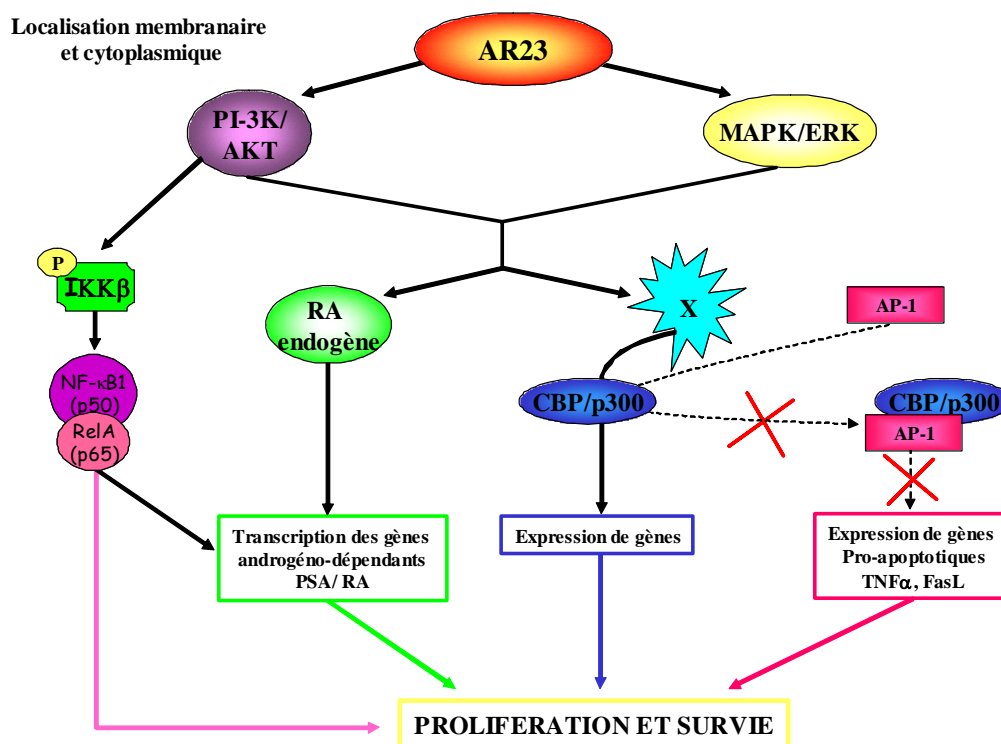
2) Modèle d'action du variant AR23 dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Ce variant du RA est issu d'un CaP métastatique ayant échappé à la privation androgénique, nous ne disposons pas de données concernant son contexte cellulaire naturel.

Cependant, dans les cellules LNCaP ce RA semble avoir un rôle d'intégrateur de signaux cytoplasmiques visant à favoriser les activités d'un facteur de transcription inconnu, ou alternativement influencer sur les activités d'un RA transcriptionnellement fonctionnel.

En me basant sur ces résultats, j'ai établi un modèle de l'action possible d'un tel variant du RA dans les cellules prostatiques.

Figure 69 : Modèle d'action de l'AR23 dans les cellules prostatiques



Légende Figure 69 : Ce modèle décrit les activités exclusivement cytoplasmiques de l'AR23. La localisation atypique cytoplasmique et membranaire de l'AR23 activé par la DHT, lui permettrait d'activer les voies de signalisation PI-3K/AKT et MAPK/ERK. L'activation de la voie PI-3K/AKT par l'AR23 entraînerait la phosphorylation de IKK β et la libération concomitante du facteur NF- κ B ainsi activé. L'influence de l'AR23 sur ces voies de signalisation lui permettrait d'autre part d'activer la voie de signalisation du RA endogène et celle d'un facteur de transcription inconnu (X). L'activation soutenue du RA endogène autoriserait ainsi l'expression de gènes androgéno-dépendants. D'autre part, le facteur X en réquisitionnant pour ses propres activités transcriptionnelles, le co-facteur CBP présent en quantité limitante dans les cellules, rendrait CBP indisponible pour le facteur AP-1. En absence de CBP les activités transcriptionnelles du facteur AP-1 seraient abrogées.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'insertion des 23 acides aminés abolit les activités génomiques du RA tout en promouvant de nouvelles actions cytoplasmiques. Ces nouvelles fonctions pourraient expliquer l'activité résiduelle de ces variants d'épissage détectés chez des individus présentant le syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes (SIAP) (Bruggenwirth HT *et al.*, 1997, Jaaskelainen J *et al.*, 2006). Il convient de considérer que dans le SIAP, le gène du RA muté est porté par le chromosome X et est monoallélique chez le garçons, aussi,

l'activité résiduelle de ce variant d'épissage peut témoigner que des activités cytoplasmiques du variant AR23. Au contraire, dans les CaPs, le gène du RA peut être amplifié et le variant AR23 pourrait comme nous l'avons vu augmenter les activités transcriptionnelles d'un autre RA co-exprimé dans les cellules tumorales. Aussi, ces nouvelles actions exclusivement cytoplasmiques ouvrent une nouvelle voie d'investigation des actions non génomiques du RA dans la progression du cancer de la prostate.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les objectifs principaux de mon travail de thèse ont été de relier deux mutations au niveau du domaine de liaison à l'ADN du RA à une information fonctionnelle et structurale. Ceci afin de mieux comprendre les conséquences d'une telle altération génétique sur les fonctions des variants mutés de RA dans les cellules de CaP.

La première mutation consiste en une substitution de la thréonine en position 575 du DBD par une alanine. Cette position n'est pas directement impliquée dans les contacts avec l'ADN. En effet, la thréonine 575 enfouie à l'intérieur de la structure globulaire du DBD permet l'établissement de nombreuses liaisons de Van der Waals avec les acides aminés voisins, mais également avec certains résidus du second doigt de zinc. Les liaisons de Van der Waals assurant la cohésion de la structure du DBD, la perte du groupement hydroxyle apporté par la thréonine lors de sa substitution par l'alanine pourrait aboutir à un relâchement de cette structure. Cette caractéristique pourrait expliquer les différences observées dans la reconnaissance de l'ADN par le RA T575A. Des études structurales visant à déterminer l'impact réel de la mutation sur la structure du DBD sont en cours actuellement, en collaboration avec le Département de Biologie et de Génomique Structurales du Dr. Dino Moras à l'IGBMC, Illkirch. Des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) réalisées à partir de protéines recombinantes purifiées et correspondant au DBD du RA sauvage ou du RA T575A. Ces expériences visent à comparer les caractéristiques dynamiques des deux DBDs en solution non lié à l'ADN, mais aussi leur cinétique de liaison à l'ADN en testant des éléments de réponse aux hormones spécifiques et des éléments de réponse non spécifiques. En parallèle, des études comparatives de l'affinité du DBD sauvage ou muté vis-à-vis de différents éléments de réponse aux hormones sont en cours. Enfin, une détermination par cristallographie par rayon X de la structure du DBD du RA muté lié à l'ADN permettra de mieux comprendre l'impact de la mutation sur les interactions du RA avec l'ADN et sur l'organisation tridimensionnelle du DBD et sur la reconnaissance de l'ADN.

Mes études ont aussi montré que la substitution de la thréonine en position 575 par une alanine avait aussi des conséquences sur les interactions du RA avec certains de

ses partenaires, modifiant ainsi la composition des complexes d'activation transcriptionnelle formés autour de certains promoteurs. Des études complémentaires par co-immunoprécipitation sont requises pour déterminer l'impact de la mutation sur les interactions du RA avec les co-activateurs et les co-répresseurs. Jusqu'à présent, nos essais de co-immunoprécipitation se sont révélés infructueux. En effet, le faible taux de transfection des cellules par la technique de JetPEI que nous utilisons, ainsi que les protocoles classiques de co-immunoprécipitation souvent trop stringents ne nous ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre le RA transfecté et un co-facteur cellulaire. Des essais de co-immunoprécipitation utilisant une autre approche que celles utilisées jusqu'ici sont actuellement en cours au laboratoire. De même, une analyse plus poussée des complexes d'activation transcriptionnelle formés par le RA T575A par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse permettra de déterminer les partenaires privilégiés du RA T575A.

J'ai également démontré que, le variant T575A activé par la DHT forme des amas intranucléaires. Une telle propriété est souvent attribuée à des protéines transcriptionnellement actives et résulte de l'association entre le RA et ses co-activateurs (Wu Y *et al.*, 2006). Ces données sont corroborées par les résultats obtenus par immunofluorescence en microscopie confocale montrant un recrutement important de co-facteurs au niveau de ces amas et plus particulièrement du co-activateur SRC-2. Une étude parallèle réalisée par Mlle Audrey Monge montre que l'expression du gène de la *luciférase* à partir du promoteur androgéno-dépendant PSA61-luc est augmentée dans les cellules LNCaP en présence du variant T575A. Ces résultats sont soutenus par les données de RT PCR qui montrent une augmentation de 1.7 du taux d'expression du gène *PSA* endogène dans les cellules LNCaP transfectées par ce même RA muté.

Aussi, des études comparatives du transcriptome en présence du RA sauvage ou du RA T575A permettront de mieux appréhender les conséquences de la mutation sur les activités transcriptionnelles du RA.

Par l'approche d'immunoprécipitation de la chromatine, j'ai démontré que l'occupation de l'ARE du promoteur du gène *TMPRSS2* est plus importante en présence du RA T575A qu'en présence du RA sauvage. Aussi, une perspective immédiate de ce travail serait l'évaluation du taux d'expression du gène *TMPRSS2* endogène dans les

cellules LNCaP en présence du variant T575A par la technique de RT PCR ou par western-blot. Si ces futures expériences mettent en évidence une expression plus forte du gène *TMPRSS2* en présence du RA T575A, il serait intéressant de rechercher les translocations *TMPRSS2/ETV* ou *TMPRSS2/ERG* au niveau de l'échantillon tumoral à partir duquel la mutation T575A a été détectée, même s'il n'est pas possible de mettre en évidence à l'échelle de la cellule cancéreuse la co-existence de ces deux altérations génétiques.

L'ensemble de ces résultats, décrit les conséquences dramatiques d'une mutation touchant un résidu au sein d'un domaine aussi conservé que le DBD. Ainsi, la substitution d'un seul acide aminé au niveau du DBD peut avoir un impact non seulement sur la reconnaissance de l'ADN mais également sur le recrutement de co-facteurs et sur la formation de complexe transcriptionnel.

Le deuxième chapitre de ma thèse a été consacré à l'étude de l'insertion de 23 acides aminés au niveau du DBD du RA. J'ai démontré que ce variant particulier du RA, malgré son incapacité de se transloquer dans le noyau, exhibe des nouvelles activités exclusivement cytoplasmiques. Ces activités cytoplasmiques seraient liées à la position atypique de ce variant du RA au niveau du compartiment membranaire des cellules.

Nous avons précisé la localisation partielle de ce variant du RA au niveau du réticulum endoplasmique des cellules. Nous avons également suggéré qu'une autre localisation intracellulaire de l'AR23, de par la présence de motif hydrophobe « LVFVL » au sein des 23 acides aminés, pourrait se situer au niveau des micro-domaines lipidiques. L'ensemble de ces résultats m'a permis de proposer un modèle d'action de l'AR23 dans les cellules prostatiques (Figure 69, page 175).

Pour confirmer ce modèle, des expériences de colocalisation en microscopie confocale seront entreprises afin de montrer une localisation de l'AR23 au niveau des micro-domaines lipidiques en utilisant un marqueur spécifique de ces domaines comme le ganglioside GM1. Ainsi, apporter la preuve de la localisation de l'AR23 au niveau de ces micro-domaines placerait ce variant du RA au cœur de la signalisation non génomique (Freeman MR *et al.*, 2005).

En parallèle, des expériences de co-immunoprécipitation seront également réalisées dans le but de vérifier l'interaction de l'AR23 avec le récepteur membranaire MNAR (Modulator of non genomic activity of estrogen receptor) d'une part, et avec la sous-unité p85 α de PI-3K (Phosphoinositide-3 kinase) d'autre part. L'influence de l'AR23 sur les voies de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou de PI3K sera également évaluée en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces kinases.

Par ailleurs, par cette étude, nous apportons pour la première fois la preuve qu'un RA dénué de ses activités génomiques reste fonctionnel et, de surcroît, exhibe de nouvelles activités cytoplasmiques. Aussi, il serait intéressant d'évaluer l'impact de cette signalisation exclusivement cytoplasmique engendrée par un tel RA sur le profil d'expression des gènes dans une lignée cellulaire cancéreuse comme les LNCaP.

Nous avons vu que les limites majeures de notre étude sont constituées par la co-expression d'un autre RA dans ces mêmes cellules. L'étude du mode d'action de l'AR23 dans des cellules n'exprimant pas de RA fonctionnel telles que les COS-1 ou les PC-3 s'est avérée infructueuse. En effet, les voies de signalisation suscitant notre intérêt, comme celles des facteurs de transcription AP-1 (Activator protein-1), NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) y sont soumises à une régulation différente, indépendante de la stimulation hormonale.

Nous avons démontré que le variant AR23 agit de manière distincte en fonction du contexte cellulaire et de l'androgéno-sensibilité des cellules. Aussi, le modèle cellulaire idéal pour les activités propres à l'AR23 serait constitué par des cellules n'exprimant pas de RA mais demeurant androgéno-sensibles. Cette constatation m'a permis d'envisager deux modèles cellulaires, tout d'abord les cellules LNCaP dans lesquelles l'expression du RA endogènes serait inhibée par l'ARN interférence (siRNA), et d'autre part, des cellules dérivées d'un patient atteint de SIAP.

Comme mentionné au début de cette étude, la dépendance des cellules LNCaP des voies de signalisation du RA est une caractéristique critique pour la survie de ces cellules. Aussi, nos essais de l'inhibition du RA endogène se sont soldés par une mortalité cellulaire importante. Afin de palier à cette mortalité induite par le manque de RA fonctionnel, des essais de siRNA avec une co-transfection concomitante d'un

vecteur d'expression du RA sauvage ou muté sont actuellement en cours au laboratoire.

Ensuite, cette étude rapporte pour la première fois l'existence d'un tel variant du RA dans les cellules cancéreuses prostatiques alors que la description d'une telle mutation n'a été réalisée jusqu'à présent que dans le cadre d'un SIAP (Bruggenwirth HT *et al.*, 1997, Jaaskelainen J *et al.*, 2006). Les formes de SIA peuvent être plus ou moins sévères, allant de perturbations partielles de la différenciation sexuelle à un phénotype entièrement féminin chez les individus 46 XY présentant cependant des taux sériques d'androgènes normaux voire élevés (Quigley CA *et al.*, 1995). Cette variation du spectre d'insensibilité s'explique essentiellement par la présence de mutations affectant de manière plus ou moins importante la fonction du RA. La détection d'un variant du RA comme l'AR23 chez des patients atteints de SIAP et non de SIAC est une information importante car elle apporte la preuve d'une activité partielle d'un tel variant du RA. Aussi, il serait extrêmement intéressant d'étudier les propriétés fonctionnelles de l'AR23 dans des cellules dérivées d'un cas de SIAP.

L'investigation de ces actions cytoplasmiques offre de nouvelles perspectives dans l'étude de la progression du CaP vers l'androgène-indépendance et permettra peut-être une meilleure compréhension des altérations génétiques rencontrées dans les SIAPs.

Cette étude portant sur deux mutations détectées dans des CaPs métastatiques au niveau du DBD du RA, décrit l'impact de telles mutations sur les fonctions primaires d'une cellule cancéreuse. Cette étude apporte la preuve qu'une simple substitution d'acide aminé peut avoir des conséquences dramatiques sur la formation d'un complexe transcriptionnel et la régulation des gènes. Je démontre également qu'une insertion de 23 acides aminés au niveau d'un domaine aussi conservé que le DBD n'abroge pas entièrement les activités d'un tel RA mais au contraire lui confère de nouvelles propriétés. L'ensemble de ces travaux souligne l'importance des mutations naturelles au niveau du DBD et montre, qu'en dehors de mutations du domaine LBD/AF-2, dont on connaît aujourd'hui toute l'importance dans les CaP, les mutations du DBD du RA peuvent également jouer un rôle primordial dans les mécanismes impliqués dans la progression des CaP.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Aarnisalo P, Palvimo JJ, Janne OA. CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**, 95(5):2122-7.

Aarnisalo P, Santti H, Poukka H, Palvimo JJ, Janne OA. Transcription activating and repressing functions of the androgen receptor are differentially influenced by mutations in the deoxyribonucleic acid-binding domain. *Endocrinology.* **1999**, 140(7):3097-105.

Albin RJ, Soanes WA, Bronson BJ. Tissues and species specific antigens of normal human prostatic tissue. *Jimmunol.* **1970**, 104: 1329-39

Ali K, Gunnar A, Jan-Erik D, Hans L, Par L, Jonas H. PSA doubling time predicts the outcome after active surveillance in screening-detected prostate cancer: results from the European randomized study of screening for prostate cancer, Sweden section. *Int J Cancer.* **2007**, 120(1):170-4.

Bannister AJ, Kouzarides T. CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1AEMBO J. **1995**, 14(19):4758-62

Bannister AJ, Oehler T, Wilhelm D, Angel P, Kouzarides T. Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene.* **1995**, 11(12):2509-14.

Barbulescu K, Geserick C, Schuttke I, Schleuning WD, Haendler B. New androgen response elements in the murine pem promoter mediate selective transactivation. *Mol Endocrinol.* **2001**, 15(10):1803-16.

Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veysièrè G, Morel L. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem.* **2004**, 279(15):14579-86.

Beato M, Herrlich P, Schutz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* **1995**, 83(6):851-7. Review.

Beitel LK, Prior L, Vasiliou DM, Gottlieb B, Kaufman M, Lumbroso R, Alvarado C, McGillivray B, Trifiro M, Pinsky L. Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable alpha-helical segments of the DNA-binding domain in the human androgen receptor. *Hum Mol Genet.* **1994**, 3(1):21-7.

Berridge MJ, Bootman MD, and Lipp P Calcium-a life and death signal. *Nature*, **1998**, 395:645-48.

Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wöhr G, Latil A, Millasseau P, Mellah I, Cohen N, Blanche H, Bellane-Chantelot C, Demenais F, Teillac P, Le Duc A, de Petriconi R, Hautmann R, Chumakov I, Bachner L, Maitland NJ, Lidereau R, Vogel W, Fournier G, Mangin P, Cussenot O, et al. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet.* **1998**, 62(6):1416-24.

Betney R, McEwan IJ. Role of conserved hydrophobic amino acids in androgen receptor AF 1 function. *J Mol Endocrinol.* **2003**, 31(3):427-39.

Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K. Progesterone receptor expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression. *Prostate.* **2001**, 48(4):285-91.

Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell.* **2001**, 8(2):269-80.

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature.* **1995**, 375(6530):377-82.

Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell.* **2000**, 5(2):289-98.

Bradford TJ, Tomlins SA, Wang X, Chinnaiyan AM. Molecular markers of prostate cancer. *Urol Oncol.* **2006**, 24(6):538-51. Review

Bruggenwirth HT, Boehmer AL, Ramnarain S, Verleun-Mooijman MC, Satijn DP, Trapman J, Grootegoed JA, Brinkmann AO. Molecular analysis of the androgen-receptor gene in a family with receptor-positive partial androgen insensitivity: an unusual type of intronic mutation. *Am J Hum Genet.* **1997**, 61(5):1067-77.

Bubley GJ, Carducci M, Dahut W, Dawson N, Daliani D, Eisenberger M, Figg WD, Freidlin B, Halabi S, Hudes G, Hussain M, Kaplan R, Myers C, Oh W, Petrylak DP, Reed E, Roth B, Sartor O, Scher H, Simons J, Sinibaldi V, Small EJ, Smith MR, Trump DL, Wilding G, et al. Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J Clin Oncol.* **1999**, 17(11):3461-7

Burd CJ, Morey LM, Knudsen KE. Androgen receptor corepressors and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* **2006** 13(4):979-94. Review.

Calabro F, Sternberg CN. Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients. *Eur Urol.* **2007**, 51(1):17-26. Review.

Cardozo CP, Michaud C, Ost MC, Fliss AE, Yang E, Patterson C, Hall SJ, Caplan AJ. C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. *Arch Biochem Biophys.* **2003**, 410(1):134-40.

Ceraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz JE, Duclos B, Jacqmin D, Chopin D, Bergerat JP. Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer.* **2004**, 108(1):152-7

Ceraline J, Erdmann E, Erbs P, Deslandres-Cruchant M, Jacqmin D, Duclos B, Klein-Soyer C, Dufour P, Bergerat JP. A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol.* **2003**, 148(1):99-110.

Chai J, Tarnawski AS. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol.* **2002**, 53(2):147-57. Review.

Chamberlain NL, Whitacre DC, Miesfeld RL. Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain. *J Biol Chem.* **1996**, 271(43):26772-8.

Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol.* **2005**, 23(32):8152-60. Review.

Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science.* **1999**, 284(5423):2174-7.

Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* **1995**, 377(6548):454-7.

Choong CS, Wilson EM. Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. *J Mol Endocrinol.* **1998**, (3):235-57. Review

Claessens F, Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W. Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2001** 76(1-5):23-30. Review.

Cleutjens KB, van der Korput HA, Ehren-van Eekelen CC, Sikes RA, Fasciana C, Chung LW, Trapman J. A 6-kb promoter fragment mimics in transgenic mice the prostate-specific and androgen-regulated expression of the

endogenous prostate-specific antigen gene in humans. *Mol Endocrinol.* **1997**, 1(9):1256-65

Correa-Cerro L, Wohr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Mangin P, Fournier G, Cussenot O, Kraus P, Just W, Paiss T, Cantu JM, Vogel W. CAG)nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German population. *Eur J Hum Genet.* **1999** 7(3):357-62.

Cosma MP. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell.* **2002**, 10(2):227-36. Review.

Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.* **1996**, 3(11):895-904. Review.

Cramer P. Structure and function of RNA polymerase II. *Adv Protein Chem.* **2004**;67:1-42. Review.

Culig Z. Androgen receptor cross-talk with cell signalling pathways. *Growth Factors.* **2004**, 22(3):179-84. Review.

Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol.* **2004**, 67(5):417-34. Review.

De Bellis A, Quigley CA, Marschke KB, el-Awady MK, Lane MV, Smith EP, Sar M, Wilson EM, French FS. Characterization of mutant androgen receptors causing partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **1994**, 78(3):513-22

Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem.* **2000**, 275(46):35848-56.

De Vos P, Claessens F, Winderickx J, Van Dijck P, Celis L, Peeters B, Rombauts W, Heyns W, Verhoeven G. Interaction of androgen response elements with the DNA-binding domain of the rat androgen receptor expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **1991**, 266(6):3439-43.

Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi YI, Shoelson SE. Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem.* **2002**, 277(41):37973-6.

Dedhar S, Rennie PS, Shago M, Hagesteijn CY, Yang H, Filmus J, Hawley RG, Bruchofsky N, Cheng H, Matusik RJ, et al. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature.* **1994**, 367(6462):480-3.

Ding VD, Moller DE, Feeney WP, Didolkar V, Nakhla AM, Rhodes L, Rosner W, Smith RG. Sex hormone-binding globulin mediates prostate androgen receptor action via a novel signaling pathway. *Endocrinology*. **1998**, 139(1):213-8.

Dondi D, Maggi R, Scaccianoce E, Martini L, Motta M, Poletti A. Expression and role of functional glucocorticoid receptors in the human androgen-independent prostate cancer cell line, DU145. *J Mol Endocrinol*. **2001**, 26(3):185-91

Dubois T, Paleotti O, Mironov AA, Fraissier V, Stradal TE, De Matteis MA, Franco M, Chavrier P Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nat Cell Biol*. **2005**, 7: 353-64.

Ducouret B, Tujague M, Ashraf J, Mouchel N, Servel N, Valotaire Y, Thompson EB. Cloning of a teleost fish glucocorticoid receptor shows that it contains a deoxyribonucleic acid-binding domain different from that of mammals. **1995**, *Endocrinology* 136: 3774-83.

Duff J, Davies P, Watt K, McEwan IJ. Structural dynamics of the human androgen receptor: implications for prostate cancer and neurodegenerative disease. *Biochem Soc Trans*. **2006**, 34(Pt 6):1098-102.

Edwards J, Bartlett JM. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor. *BJU Int*. **2005**, 95(9):1320-6. Review.

Edwards J, Krishna NS, Mukherjee R, Bartlett JM. The role of c-Jun and c-Fos expression in androgen-independent prostate cancer. *J Pathol*. **2004**, 4(2):153-8.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. **2003**, 3(11):859-68. Review.

Eisenberger MA. A multi-institutional pilot study of adjuvant docetaxel for patients with prostate cancer at high risk for relapse after radical prostatectomy. *Rev Urol*. **2003**, Suppl 2:S42-7.

Escriva H, Delaunay F, Laudet V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays*. **2000**, 22(8):717-27. Review.

Escriva H, Safi R, Hanni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**, 94(13):6803-8.

Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988, 240(4854):889-95. Review.

Faus H, Haendler B. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother.* **2006**, 60(9):520-8. Review

Farla P, Hersmus R, Trapman J, Houtsmuller AB. Antiandrogens prevent stable DNA-binding of the androgen receptor. *J Cell Sci.* **2005**, 118(Pt 18):4187-98.

Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* **2001**, 1(1):34-45. Review.

Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O. Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology. *Ann Urol (Paris).* **2004**, 38(5):187-206. Review. French

Frank M, Kemler R. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol.* **2002**, 14:557-62.

Freeman MR, Cinar B, Lu ML. Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab.* **2005** 16: 273-79.

Fronsdal K, Engedal N, Slagsvold T, Saatcioglu F. CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor and mediates cross-talk with AP-1. *J Biol Chem.* **1998**, 273(48):31853-9

Fu M, Rao M, Wu K, Wang C, Zhang X, Hessien M, Yeung YG, Gioeli D, Weber MJ, Pestell RG. The androgen receptor acetylation site regulates cAMP and AKT but not ERK-induced activity. *J Biol Chem.* **2004**, 279(28):29436-49.

Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantaggiati ML, Pestell RG. p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J Biol Chem.* **2000**, 275(27):20853-60.

Gao J, Arnold JT, Isaacs JT. Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* **2001**, 61(13):5038-44.

Garraway LA, Lin D, Signoretti S, Waltregny D, Dilks J, Bhattacharya N, Loda M. Intermediate basal cells of the prostate: in vitro and in vivo characterization. *Prostate.* **2003**, 55(3):206-18

Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem.* **2002**, 277(29):25904-13.

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* **2006**, 58(4):685-704. Review.

Giguere V, McBroom LD, Flock G. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol.* **1995**, 15(5):2517-26.

Gomez LM, Pacyniak E, Flick M, Hout DR, Gomez ML, Nerrienet E, Ayouba A, Santiago ML, Hahn BH, Stephens EB Vpu-mediated CD4 down-regulation and degradation is conserved among highly divergent SIV(cpz) strains. *Virology.* **2005**, 335:46-60.

Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat.* **2004**, 23(6):527-33.

Gottlieb B, Lombroso R, Beitel LK, Trifiro MA. Molecular pathology of the androgen receptor in male (in)fertility. *Reprod Biomed Online.* **2005**, 10(1):42-8. Review.

Green S, Kumar V, Theulaz I, Wahli W, Chambon P. The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* **1988**, 7(10):3037-44.

Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem.* **1986**, 24(1):77-83.

Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer.* **2007**, 7(4):281-94. Review.

Gronberg H, Xu J, Smith JR, Carpten JD, Isaacs SD, Freije D, Bova GS, Danber JE, Bergh A, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer Res.* **1997**, 1;57(21):4707-9.

Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* **2004**, 3(11):950-64. Review.

Haelens A, Verrijdt G, Schoenmakers E, Alen P, Peeters B, Rombauts W, Claessens F. The first exon of the human sc gene contains an androgen responsive unit and an interferon regulatory factor element. *Mol Cell Endocrinol.* **1999**, 153(1-2):91-102.

Hartman HB, Yu J, Alenghat T, Ishizuka T, Lazar MA. The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep.* **2005**, 6(5):445-51.

Hermans KG, van Marion R, van Dekken H, Jenster G, van Weerden WM, Trapman J. TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is

highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res.* **2006**, 66(22):10658-63.

He B, Kemppainen JA, Wilson EM. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem.* **2000**, 275(30):22986-94

He B, Wilson EM. The NH₂-terminal and carboxyl-terminal interaction in the human androgen receptor. *Mol Genet Metab.* **2002**, 75(4):293-8. Review.

Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* **2004**, 25(2):276-308. Review.

Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol.* **2002**, 16(10):2181-7. Review.

Hellwinkel OJ, Holterhus PM, Struve D, Marschke C, Homburg N, Hiort O. A unique exonic splicing mutation in the human androgen receptor gene indicates a physiologic relevance of regular androgen receptor transcript variants. *J Clin Endocrinol Metab.* **2001**, 86(6):2569-75.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. **2004** *J Cell Sci* 117: 5965-73.

Hisamoto K, Ohmichi M, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, Hayakawa J, Mabuchi S, Takahashi K, Tasaka K, Miyamoto Y, Taniguchi N, Murata Y. Induction of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by the raloxifene analog LY117018 is differentially mediated by Akt and extracellular signal-regulated protein kinase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **2001** 14;276(50):47642-9.

Hoedemaeker RF, Vis AN, Van Der Kwast TH. Staging prostate cancer. *Microsc Res Tech.* **2000**, 51(5):423-9. Review.

Hodgson MC, Astapova I, Cheng S, Lee LJ, Verhoeven MC, Choi E, Balk SP, Hollenberg AN. The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *J Biol Chem.* **2005** 280(8):6511-9.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* **1985**, 318(6047):635-41.

Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. **1995**, 377(6548):397-404.

Huet A, Parlakian A, Arnaud MC, Glandieres JM, Valat P, Fermandjian S, Paulin D, Alpert B, Zentz C. Mechanism of binding of serum response factor to serum response element. *FEBS J*. **2005**, 272(12):3105-19

Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. **1941**. *J Urol*. 2002 Jul;168(1):9-12.

Ikonen T, Palvimo JJ, Janne OA. Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem*. **1997**, 272(47):29821-8.

Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA. The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res*. **1995** May 55(9):1937-40.

Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, Vidal M, Friend SH, Schmidt S, Iggo R. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet*. **1993**, 5(2):124-9

Ishizawa R, Parsons SJ. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*. **2004**, 6(3):209-14. Review.

Jaaskelainen J, Mongan NP, Harland S, Hughes IA. Five novel androgen receptor gene mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome. *Hum Mutat*. **2006**, 27(3):291.

Jagla M, Fève M, Kessler P, Lapouge G, Erdmann E, Bergerat J-P, Céraline J. A splicing variant of the androgen receptor exhibits exclusively cytoplasmic actions. *Endocrinology* **2007**, In Press

Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, Chang C, Herman JG, Isaacs WB, Nassif N. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res* 58:5310-5314

Jensen EV. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med*, **1998** 1962;6:47-59.

Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, Brinkmann AO. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J Biol Chem.* **1995**, 270(13):7341-6.

Karami S, Li Y, Hughes DS, Hursthouse MB, Russell AE, Threlfall TL, Claybourn M, Kasper S, Matusik RJ. Rat probasin: structure and function of an outlier lipocalin. *Biochim Biophys Acta.* **2000**, 18;1482(1-2):249-58.

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell.* **2001**, 104(5):719-30.

Koutsilieris M, Reyes-Moreno C, Sourla A, Dimitriadou V, Choki I. Growth factors mediate glucocorticoid receptor function and dexamethasone-induced regression of osteoblastic lesions in hormone refractory prostate cancer. *Anticancer Res.* **1997**, 17(3A):1461-5. Review.

Kim J, Coetzee GA. Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J Cell Biochem.* **2004**, 93(2):233-41. Review.

Kumar R, Johnson BH, Thompson EB. Overview of the structural basis for transcription regulation by nuclear hormone receptors. *Essays Biochem.* **2004**;40:27-39. Review.

Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P. Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J.* **1986**, 5(9):2231-6.

Lam JS, Reiter RE. Stem cells in prostate and prostate cancer development. *Urol Oncol.* **2006**, 24(2):131-40. Review.

Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, Jagla M, Monge A, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP and Céraline J. Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harbouring a new class of androgen receptor mutation – A new paradigm for cooperation among prostate tumour cells. *International Journal of Cancer.* **2007**, In Press

Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol.* **1997**, 19(3):207-26.

Lavery DN, McEwan IJ. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J.* **2005** 391(Pt 3):449-64. Review.

Lee DK, Chang C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **2003**, 84(1):41-9. Review.

Lee SO, Lou W, Nadiminty N, Lin X, Gao AC. Requirement for NF-(kappa)B in interleukin-4-induced androgen receptor activation in prostate cancer cells. *Prostate.* **2005**, 64(2):160-7.

Le Page C, Koumakpayi IH, Lessard L, Saad F, Mes-Masson AM. Independent role of phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and casein kinase II (CK-2) in EGFR and Her-2-mediated constitutive NF-kappaB activation in prostate cancer cells. *Prostate.* **2005** 65(4):306-15.

Li W, Zhang X, Olumi AF MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). **2007**, *Cancer Res.* 67(5):2247-55.

Liu GZ, Wang H, Wang Z. Identification of a highly conserved domain in the androgen receptor that suppresses the DNA-binding domain-DNA interactions. *J Biol Chem.* **2003**, 278(17):14956-60.

Lu W, Luo Y, Kan M, McKeehan WL. Fibroblast growth factor-10. A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J Biol Chem.* 1999, 274(18):12827-34. Erratum in: *J Biol Chem* **1999**, 274(39):28058.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* **1995**, 83(6):835-9. Review.

Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, Sutherland R, Nigam R, Murthy L, Zhao Y, DiConcini D, Puxeddu E, Esen A, Eastham J, Weigel NL, Lamb DJ. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* **2000**, 15;60(4):944-9.

Masiello D, Cheng S, Bublely GJ, Lu ML, Balk SP. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem.* **2002**, 19;277(29):26321-6.

Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomaz M, Peixoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Scholz P, Wegg A, Basler S, Schafer M, Egner U, Carrondo MA. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem.* **2000** 275(34):26164-71.

McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 239:357-66.

McEwan IJ, Gustafsson J. Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997**, 94(16):8485-90.

McEwan IJ. Structural and functional alterations in the androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy. *Biochem Soc Trans.* 2001, 29(Pt 2):222-7. Review. Erratum in: *Biochem Soc Trans* **2001**, 29(Pt 4):627.

McKenna NJ, O'Malley BW. Minireview: nuclear receptor coactivators an update. *Endocrinology.* **2002**,143(7):2461-5. Review.

McLellan DL, Norman RW. Hereditary aspects of prostate cancer. *CMAJ.* **1995**, 153(7):895-900. Review.

Mendiratta P, Armstrong AJ, George DJ. Current standard and investigational approaches to the management of hormone-refractory prostate cancer. *Rev Urol.* **2007**;9 Suppl 1:S9-S19.

Monge A, Jagla M, Lapouge G, Sasorith S, Cruchant M, Wurtz JM, Jacqmin D, Bergerat JP, Ceraline J. Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer. *Cell Mol Life Sci.* **2006**, 63(4):487-97

MORGANTI G, GIANFERRARI L, CRESSERI A, ARRIGONI G, LOVATI G. Clinico-statistical and genetic research on neoplasms of the prostate.] *Acta Genet Stat Med.* **1956-1957**;6(2):304-5. French.

Mosquera JM, Perner S, Demichelis F, Kim R, Hofer M, Mertz K, Paris P, Simko J, Collins C, Bismar T, Chinnaiyan A, Rubin M. Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer. *J Pathol.* **2007**, 212(1):91-101

Muller F, Tora L. The multicoloured world of promoter recognition complexes. *EMBO J.* **2004** 23(1):2-8. Review.

Necela BM, Cidlowski JA. A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. *J Biol Chem.* **2004**, 279(38):39279-88.

Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99(18):11890-5.

Oh WK, Manola J, Babcic V, Harnam N, Kantoff PW. Response to second-line chemotherapy in patients with hormone refractory prostate cancer receiving two sequences of mitoxantrone and taxanes. *Urology.* **2006**, 67(6):1235-40

Ohlson N, Bergh A, Stattin P, Wikstrom P. Castration-induced epithelial cell death in human prostate tissue is related to locally reduced IGF-1 levels. *Prostate*. **2007**, 67(1):32-40.

Ordentlich P, Downes M, Xie W, Genin A, Spinner NB, Evans RM. Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**, 96(6):2639-44.

Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene*. **2007**, 26(1):1-10

Ozers MS, Marks BD, Gowda K, Kupcho KR, Ervin KM, De Rosier T, Qadir N, Eliason HC, Riddle SM, Shekhani MS. The androgen receptor T877A mutant recruits LXXLL and FXXLF peptides differently than wild-type androgen receptor in a time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *Biochemistry*. **2007**, 46(3):683-95.

Pajares MJ, Ezponda T, Catena R, Calvo A, Pio R, Montuenga LM. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol*. **2007**, 8(4):349-57. Review.

Palvimo JJ, Reinikainen P, Ikonen T, Kallio PJ, Moilanen A, Janne OA. Mutual transcriptional interference between RelA and androgen receptor. *J Biol Chem*. **1996**, 271(39):24151-6.

Penta KJ. Advances in Prostate Cancer Chemotherapy : A New Era Begins. *A Cancer Journal for Clinicians*. **2005**, 55 :300-318

Peant B, Diallo JS, Lessard L, Delvoe N, Le Page C, Saad F, Mes-Masson AM. Regulation of IkappaB kinase epsilon expression by the androgen receptor and the nuclear factor-kappaB transcription factor in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. **2007**, 5(1):87-94.

Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ. Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*. **1997**, 275(5299):523-7.

Perlmann T, Jansson L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev*. **1995**, 9(7):769-82.

Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furasato B, Sun C, Chen Y, Nau M, Ravindranath L, Chen Y, Dobi A, Srikantan V, Sesterhenn IA, McLeod DG, Vahey M, Moul JW, Srivastava S. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*. **2005**, 24

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* **2004** 351(15):1513-20.

Poujol N, Wurtz JM, Tahiri B, Lumbroso S, Nicolas JC, Moras D, Sultan C. Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-function study. *J Biol Chem.* **2000**, 275(31):24022-31.

Poukka H, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**, 97(26):14145-50.

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* **1997**, 18(3):306-60.

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* **1995**, 16(3):271-321. Review.

Rao AV, Demark-Wahnefried W. The older cancer survivor. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2006**, 60(2):131-43. Review.

Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature.* **1995**, 375(6528):203-11.

Reid J, Kelly SM, Watt K, Price NC, McEwan IJ. Conformational analysis of the androgen receptor amino-terminal domain involved in transactivation. Influence of structure-stabilizing solutes and protein-protein interactions. *J Biol Chem.* **2002**, 277(22):20079-86.

Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* **2004**, 117(Pt 16):3539-45.

Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci.* **1996** 21(9):327-35. Review.

Santillo VM, Lowe FC. Role of vitamins, minerals and supplements in the prevention and management of prostate cancer. *Int Braz J Urol.* **2006**, 32(1):3-14. Review.

Sartor O, Scher H, Simons J, Sinibaldi V, Small EJ, Smith MR, Trump DL, Wilding G, et al. Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in

androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J Clin Oncol.* **1999**, 17(11):3461-7.

Sartor O. Overview of samarium sm 153 lexidronam in the treatment of painful metastatic bone disease. *Rev Urol.* **2004**, 6 Suppl 10:S3-S12.

Sato N, Sadar MD, Bruchovsky N, Saatcioglu F, Rennie PS, Sato S, Lange PH, Gleave ME Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. **1997**, *J Biol Chem* 272:17485-94.

Schalken JA, van Leenders G. Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology. *Urology.* **2003**, 62(5 Suppl 1):11-20. Review.

Scher HI, Kelly WM, Zhang ZF, Ouyang P, Sun M, Schwartz M, Ding C, Wang W, Horak ID, Kremer AB. Post-therapy serum prostate-specific antigen level and survival in patients with androgen-independent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* **1999**, 91(3):244-51.

Schoenmakers E, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, Claessens F. Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses. *J Biol Chem.* **2000**, 275(16):12290-7.

Schwartz GG, Skinner HG. Vitamin D status and cancer: new insights. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **2007**, 10(1):6-11. Review.

Sealy L, Malone D, Pawlak M. Regulation of the cfos serum response element by C/EBPbeta. *Mol Cell Biol.* **1997** 17(3):1744-55.

Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem.* **2004**, 93(1):57-67. Review.

Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, 101(14):4758-63.

Shaneyfelt T, Husein R, Bublely G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol.* **2000**, 18(4):847-53.

Shang Y, Myers M, Brown M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell.* **2002**, 9(3):601-10

Shaulian E, Karin M AP-1 as a regulator of cell life and death. **2002**, *Nat Cell Bio* 14: E131-6.

Steketee K, Timmerman L, Ziel-van der Made AC, Doesburg P, Brinkmann AO, Trapman J. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int J Cancer.* **2002**,100(3):309-17.

Suh J, Payvandi F, Edelstein LC, Amenta PS, Zong WX, Gelinas C, Rabson AB. Mechanisms of constitutive NF-kappaB activation in human prostate cancer cells. *Prostate.* **2002**, 52(3):183-200.

Suh J, Rabson AB. NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem.* **2004**, 91(1):100-17. Review.

Tan J, Sharief Y, Hamil KG, Gregory CW, Zang DY, Sar M, Gumerlock PH, deVere White RW, Pretlow TG, Harris SE, Wilson EM, Mohler JL, French FS. Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol.* **1997**, 11(4):450-9.

Tan WW. Novel agents and targets in managing patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Control.* **2006**, 13(3):194-8. Review.

Tanner T, Claessens F, Haelens A. The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation. *Ann N Y Acad Sci.* **2004**, 1030:587-92.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA. TAX 327 Investigators. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* **2004**, 351(15):1502-12.

Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol.* **1996**, 14(6):1756-64.

Theobald S. Nutrition and prostate cancer-what is the scientific evidence? *Med Monatsschr Pharm.* **2006**, 29(10):371-7. Review. German.

Thomas M, Dadgar N, Aphale A, Harrell JM, Kunkel R, Pratt WB, Lieberman AP. Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts. *J Biol Chem.* **2004**, 279(9):8389-95

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB,

Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. **2005**, 310(5748):644-8.

Turner KJ, Morley M, MacPherson S, Millar MR, Wilson JA, Sharpe RM, Saunders PT. Modulation of gene expression by androgen and oestrogens in the testis and prostate of the adult rat following androgen withdrawal. *Mol Cell Endocrinol*. **2001**, 178(1-2):73-87.

Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*. **1989**, 57(7):1139-46.

Unni E, Sun S, Nan B, McPhaul MJ, Cheskis B, Mancini MA, Marcelli M. Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res*. **2004**, 64(19):7156-68.

Uzgare AR, Xu Y, Isaacs JT. In vitro culturing and characteristics of transit amplifying epithelial cells from human prostate tissue. *J Cell Biochem*. **2004**, 91(1):196-205

van Laar JH, Bolt-de Vries J, Zegers ND, Trapman J, Brinkmann AO. Androgen receptor heterogeneity and phosphorylation in human LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **1990**, 166(1):193-200.

Vanoverberghe K, Vanden F, Abeele Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, **2004**, 11: 321-30

Verrijdt G, Haelens A, Claessens F. Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol Genet Metab*. **2003**, 78(3):175-85. Review.

Verrijdt G, Tanner T, Moehren U, Callewaert L, Haelens A, Claessens F. The androgen receptor DNA-binding domain determines androgen selectivity of transcriptional response. *Biochem Soc Trans*. **2006**, 34(Pt 6):1089-94.

Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, Lanz RB, Zoumpourlis VC, Schwartz RJ. Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *J Biol Chem*. **2005**, 280(9):7786-92.

Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem*. **2001**, 276(17):13505-8. Review.

Waltregny D, Leav I, Signoretti S, Soung P, Lin D, Merk F, Adams JY, Bhattacharya N, Cirenei N, Loda M. Androgen-driven prostate epithelial cell

proliferation and differentiation in vivo involve the regulation of p27. *Mol Endocrinol.* **2001**, 15(5):765-82.

Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem.* **1999**, 32-33:110-22. Review.

Wickert L, Selbig J. Structural analysis of the DNA-binding domain of alternatively spliced steroid receptors. *J Endocrinol.* **2002**, 173(3):429-36.

Wickert L, Watzka M, Bolkenius U, Bidlingmaier F, Ludwig M. Mineralocorticoid receptor splice variants in different human tissues. **1998**, *Eur. J. Endocrinol* 138 :702-04.

Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol.* **1993**, 13(9):5794-804.

Winquist E, Waldron T, Berry S, Ernst DS, Hotte S, Lukka H. Non-hormonal systemic therapy in men with hormone-refractory prostate cancer and metastases: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in Evidence-based Care's Genitourinary Cancer Disease Site Group. *BMC Cancer.* **2006**, 6:112. Review

Wise SC, Burmeister LA, Zhou XF, Bubulya A, Oberfield JL, Birrer MJ, Shemshedini L. Identification of domains of c-Jun mediating androgen receptor transactivation. *Oncogene.* **1998**, 16(15):2001-9

Wu Y, Kawate H, Ohnaka K, Nawata H, Takayanagi R. Nuclear compartmentalization of N-CoR and its interactions with steroid receptors. *Mol Cell Biol.* **2006**, 26(17):6633-55.

Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, Ewing C, Wilkens E, Bujnovszky P, Bova GS, Walsh P, Isaacs W, Schleutker J, Matikainen M, Tammela T, Visakorpi T, Kallioniemi OP, Berry R, Schaid D, French A, McDonnell S, Schroeder J, Blute M, Thibodeau S, Gronberg H, Emanuelsson M, Damber JE, Bergh A, Jonsson BA, Smith J, Bailey-Wilson J, Carpten J, Stephan D, Gillanders E, Amundson I, Kainu T, Freas-Lutz D, Baffoe-Bonnie A, Van Aucken A, Sood R, Collins F, Brownstein M, Trent J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet.* **1998**, 20(2):175-9.

Xu J. Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *Am J Hum Genet.* **2000**, 66(3):945-57

Yagoda A, Petrylak D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer*. **1993** 1;71(3 Suppl):1098-109. Review.

Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulos S, Wang F, McKeehan WL. Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Mol Endocrinol*. **1992**, 6(12):2123-8.

Yoon HG, Wong J. The corepressors silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor are involved in agonist- and antagonist-regulated transcription by androgen receptor. *Mol Endocrinol*. 2006 20(5):1048-60.

Zhang L, Charron M, Wright WW, Chatterjee B, Song CS, Roy AK, Brown TR Nuclear factor-kappaB activates transcription of the androgen receptor gene in Sertoli cells isolated from testes of adult rats. *Endocrinology*. **2004**, 145(2):781-9.

Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol*. **1998**, 12(4):513-24.

Zhang X, Jin TG, Yang H, DeWolf WC, Khosravi-Far R, Olumi AF Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. **2004**, *Cancer Res*. 64(19):7086-91.

Zhao XY, Boyle B, Krishnan AV, Navone NM, Peehl DM, Feldman D. Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol*. **1999**, 162(6):2192-9.

Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. **2005**, *Steroids* 70: 407-17.

Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, Wilson EM. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH₂-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem*. **1994**, 269(18):13115-23.

Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR, Freeman MR Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Rest*. **2002**,15;62: 2227-31

PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS
PERSONNELLES

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

I. PUBLICATIONS

1.) Publications résumant le travail de thèse

Jagla M, Fève M, Kessler P, Lapouge G, Erdmann E, Bergerat J-P, Céraline J. A splicing variant of the androgen receptor exhibits exclusively cytoplasmic actions. (2007) *Endocrinology*. In Press

Jagla M, Monge A, Céraline J, and Bergerat J-P. The T575A AR mutation by altering interactions with cofactors modifies AR transcriptional activities. (2007). En cours de rédaction.

Monge A, **Jagla M**, Lapouge G, Sasorith S, Cruchant M, Wurtz JM, Jacqmin D, Bergerat JP and Céraline J. Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer. (2006). *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (4) : 487-497.

2.) Autres publications

Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, **Jagla M**, Monge A, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP and Céraline J. Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harbouring a new class of androgen receptor mutation – A new paradigm for cooperation among prostate tumour cells. (2007). *International Journal of Cancer*. In Press

Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, **Jagla M**, Monge A, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP and Céraline J. A new class of androgen receptor mutations may contribute to prostate cancer progression (2007). Soumis à *Molecular Endocrinology*

II. Communications “posters”

Jagla M, Monge A, Lobstein J, Kessler P, Bergerat J-P, and Céraline J. The T575A AR mutation by altering interactions with cofactors modifies AR transcriptional activities. Cambridge, Androgens 2006.

Jagla M, Lapouge G, Orbillot C, Erdmann E, Monge A, Bergerat JP, and Céraline J Etude d'un récepteur des androgènes muté pourvu d'activités exclusivement non-génotropique. Implication dans la progression des cancers de la prostate et dans l'échappement hormonal. Paris, Forum de Cancérologie 2006.

Jagla M, Monge A, Lapouge G, Sasorith S, Klein-Soyer C, Cruchant M, Wurtz J-M, Jacqmin D, Moras D, Bergerat J-P and Céraline J. Structural and functional consequences of the double T575A/T877A mutation in the androgen receptor. Berlin, Androgens 2004.

Lapouge G, Erdmann E, **Jagla M**, Monge A, Klein-Soyer C, Bergerat JP and Céraline J. Specific transcriptional activities of c-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. FEBS-IUBMB Conference, Budapest 2005.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

FIGURES

Figure 1 : Représentation de l'appareil génital masculin _____	2
Figure 2 : Coopération cellulaire au sein d'un tissu prostatique normal _____	4
Figure 3 : Marqueurs de l'épithélium prostatique _____	5
Figure 4 : Coupe axiale de la glande prostatique _____	9
Figure 5 : Représentation schématique des événements clés de la carcinogenèse prostatique _____	10
Figure 6 : Portrait de Charles Huggins _____	18
Figure 7 : Contrôle hormonal de la prostate _____	19
Figure 8 : Biosynthèse des hormones stéroïdes au niveau des gonades et de la glande surrénale _____	21
Figure 9 : Blocage androgénique complet _____	22
Figure 10 : Illustration de la réponse aux différentes tentatives d'hormonothérapie d'un patient atteint de CaP métastatique en échappement hormonal _____	24
Figure 11 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires _____	33
Figure 12 : Structure du récepteur des androgènes _____	37
Figure 13 : Représentation schématisée du récepteur des androgènes et de son domaine de liaison à l'ADN _____	42
Figure 14 : Représentation des homodimères du récepteur des androgènes et du récepteur de la vitamine D dans leur configuration respective « head-to-head » et « head-to-tail » au niveau des répétitions directes de l'ADN _____	45
Figure 15 : Représentation de la structure du domaine de liaison au ligand du récepteur des androgènes ainsi que des différentes mutations détectées dans les cancers de la prostate _____	49
Figure 16 : Mode d'activation génomique du récepteur des androgènes _____	50
Figure 17 : Modifications post-traductionnelles du récepteur des androgènes _____	51
Figure 18 : Formation du complexe transcriptionnel autour du récepteur des androgènes _____	55
Figure 19 : Représentation schématique du récepteur des androgènes et de ses différents partenaires d'interaction _____	56
Figure 20 : Régulation transcriptionnelle du gène <i>PSA</i> _____	61
Figure 21 : Représentation schématique des fusions de gènes <i>TMPRSS2 :ERG</i> et <i>TMPRSS2 :ETV1</i> _____	62

TABLEAUX ET FIGURES

Figure 22: Actions non génomiques du récepteur des androgènes et des androgènes	65
Figure 23 : Mode d'action des facteurs AP-1	67
Figure 24 : Mode d'action des facteurs NF- κ B	68
Figure 25 : Positions des mutations localisées au niveau du récepteur des androgènes	70
Figure 26 : Positions des mutations au niveau du DBD du récepteur des androgènes retrouvées dans les cancers de la prostate et dans les syndromes d'insensibilité aux androgènes	72
Figure 27 : Schéma de l'organisation des jonctions intron-exon-intron et du mécanisme d'épissage	73
Figure 28 : Différentes formes de syndrome d'insensibilité aux androgènes	75
Figure 29 : Test fonctionnel chez la levure EJ250	80
Figure 30 : Principe d'expression du récepteur des androgènes du patient chez la levure lors du test fonctionnel	81
Figure 31 : Construction plasmidique conduisant à une expression androgéno-dépendante du gène <i>ADE2</i> dans la souche de levure EJ250	105
Figure 32 : Test fonctionnel chez la levure : détection du variant RA T575A	106
Figure 33 : Représentation schématique du DBD du récepteur des androgènes et position de la mutation T575A	107
Figure 34: Alignement de séquences soulignant la conservation du résidu thréonine au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires	109
Figure 35 : Modélisation du DBD du récepteur des androgènes sauvage sur un élément ADR3	110
Figure 36 : Comparaison de l'affinité des récepteurs des androgènes sauvages et mutés pour les éléments de réponse aux hormones	114
Figure 37 : Occupation des promoteurs <i>in vivo</i> par le récepteur des androgènes sauvage et le récepteur des androgènes T575A	116
Figure 38 : Etude des complexes formés autour des récepteurs des androgènes sauvages et T575A	120
Figure 39 : Etude du recrutement de CBP par le récepteur des androgènes T575A	122
Figure 40 : Etude du recrutement de SRC-2 par le récepteur des androgènes T575A	123
Figure 41 : Etude de recrutement de NCoR par le récepteur des androgènes T575A	125
Figure 42 : Hormonogrammes obtenus après transformation des levures avec le récepteur des androgènes sauvage et muté	131

TABLEAUX ET FIGURES

Figure 43: Hormonogramme obtenu après transformation des levures avec le récepteur des androgènes présentant une insertion des 69 nucléotides _____	133
Figure 44 : Représentation schématique du processus d'épissage des ARNm du récepteur des androgènes sauvage et du récepteur des androgènes +69 nucléotides _	135
Figure 45 : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes et de la séquence de 23 acides aminés insérés entre les deux doigts de zinc _____	136
Figure 46 : Analyse par western-blot de l'expression du récepteur des androgènes sauvage et de l'AR23 dans la lignée cellulaire LNCaP _____	138
Figure 47 : Distribution intracellulaire du récepteur des androgènes sauvage et de l'AR23 _____	140
Figure 48 : Gamme des plasmides EGFP-AR23 _____	141
Figure 49 : Cinétique de localisation cellulaire et de formation d'agrégats par l'AR23 _ _____	142
Figure 50 : Détermination de la localisation intracellulaire de l'AR23 par fractionnement cellulaire _____	143
Figure 51 : Etude de la colocalisation entre l'AR23 et le réticulum endoplasmique _____ _____	146
Figure 52: Mode d'action hypothétique de l'AR23 _____	148
Figure 53 : Activités transcriptionnelles directes de l'AR23 sur deux promoteurs androgéno-dépendants dans la lignée COS-1 _____	150
Figure 54 : Expérience de retardement sur gel : Affinité des récepteurs des androgènes sauvage et muté vis-à-vis de la séquence consensus de réponse aux androgènes : AREcs _____	151
Figure 55 : Impact de l'AR23 sur les activités transcriptionnelles à partir de deux promoteurs androgéno-dépendants dans la lignée LNCaP _____	152
Figure 56 : Impact de l'AR23 sur l'expression du récepteur des androgènes endogène dans les cellules LNCaP _____	154
Figure 57 : Boucle de stimulation positive induite par l'AR23 dans les cellules LNCaP _____ _____	155
Figure 58 : Principe du test utilisé pour l'étude des voies de signalisation _____	156
Figure 59 : Activité transcriptionnelle à partir d'un promoteur minimum _____	158
Figure 60 : Activité transcriptionnelle du facteur SRF _____	159
Figure 61 : Activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B _____	161
Figure 62 : Schématisation d'un mode d'action potentiel de l'AR23 sur le facteur NF- κ B _____	162
Figure 63 : Modèle illustrant l'implication possible de l'AR23 dans l'activation du facteur NF- κ B _____	163

TABLEAUX ET FIGURES

Figure 64 : Activités transcriptionnelles du facteur AP-1 _____	165
Figure 65 : Etude de la colocalisation entre le récepteur des androgènes et le facteur de transcription c-Jun _____	166
Figure 66 : Sites d'interaction de facteurs de transcription au niveau de CBP _____	168
Figure 67 : Modèle d'inhibition de l'activité du facteur AP-1 par l'AR23 _____	169
Figure 68 : Activités transcriptionnelles des facteurs AP-1 et NF- κ B dans la lignée PC-3 _____	172
Figure 69 : Modèle d'action de l'AR23 dans les cellules prostatiques _____	176

TABLEAUX

Tableau 1: Les biomarqueurs candidats pour la détection de CaP _____	13
Tableau 2: Mécanismes de développement des cancers de la prostate androgéno-indépendants _____	29
Tableau 3: Classification des récepteurs nucléaires humains _____	31
Tableau 4: Classification des récepteurs nucléaires en fonction de leur mode de dimérisation et de la reconnaissance des séquences spécifiques _____	41
Tableau 5: Evolution du point de jonction entre les deux doigts de zinc du DBD au sein de la famille des récepteurs nucléaires _____	43
Tableau 6: Principaux gènes régulés par le récepteur des androgènes _____	59
Tableau 7: Exemples de mutations détectées par le test fonctionnel chez la levure au sein du laboratoire _____	82
Tableau 8: Séquences des éléments de réponse utilisés lors du retardement sur gel _____	88
Tableau 9: Amorces utilisées pour amplifier les motifs AREs du promoteur des gènes PSA et TMPRSS2 _____	90
Tableau 10 : Spectre de fluorescence des fluorochromes utilisés pour les études de microscopie confocale _____	93
Tableau 11 : Homologies entre les 23 acides de l'AR23 et des protéines connues _____	144
Tableau 12 : Sites de liaison utilisés dans les constructions pTA-luc _____	157

ANNEXE 1 : PUBLICATION 1

“Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer”.

Research Article

Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer

A. Monge^a, M. Jagla^a, G. Lapouge^a, S. Sasorith^b, M. Cruchant^c, J.-M. Wurtz^b, D. Jacqmin^d, J.-P. Bergerat^{a,c} and J. Céraline^{a,c,*}

^a Laboratoire de Cancérologie Expérimentale et de Radiobiologie, EA 3430, Université Louis Pasteur de Strasbourg, IRCAD, BP426 Strasbourg Cedex, 67091 (France), Fax +33 3 8811 9097, e-mail: jocelyn.ceraline@ircad.u-strasbg.fr

^b Département de Biologie et Génomique Structurales, IGBMC, Illkirch (France)

^c Département d'Hématologie et d'Oncologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

^d Service de Chirurgie Urologique, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg (France)

Received 6 October 2005; received after revision 16 November 2005; accepted 8 December 2005

Abstract. Missense mutations in the androgen receptor (AR) contribute to the failure of hormonal therapy for prostate cancer (PCa), but the underlying molecular bases remain uncharacterized. Here, we describe a new AR variant found in a hormone-refractory metastatic PCa, in which threonine 575 in the DNA binding domain, and threonine 877 in the ligand-binding domain, were both replaced by an alanine. Using gene reporter assays, we demonstrate that the T575A mutation weakened transcriptional activity from promoters containing AR-spe-

cific responsive elements, while activity from promoters with AR-non-specific elements was enhanced. Data from gel shift experiments revealed a preferential binding of the T575A mutant to AR-non-specific motifs. We demonstrate that the two mutations T575A and T877A cooperate to confer new functional properties on the AR, and that the mutant AR functions simultaneously as a promiscuous AR due to the T877A mutation, and an unfaithful AR due to the T575A mutation.

Key words. Androgen receptor; hormone-refractory prostate cancer; mutation; DNA binding specificity; transcriptional activity.

The biological actions of the male sexual hormone dihydrotestosterone (DHT) are mediated by the androgen receptor (AR), a member of the steroid-thyroid-retinoid-vitamin D superfamily of nuclear receptors, which function as ligand-activated transcription factors [1]. Like other members of the nuclear receptor family, the AR is structured in different domains and motifs reflecting its activation and function through ligand binding, phosphorylation, nuclear translocation, dimerization, DNA binding to cognate androgen response elements (AREs) present in the promoter of target genes, cofactor recruitment by protein-protein interactions, and transcriptional activation [2].

The AR modulates the rate of transcriptional initiation through association with the basal transcription machinery and alterations in the state of chromatin organization at the promoter of target genes. This is achieved by a specific recruitment of members of the p160 family of histone acetyltransferase coactivators including steroid receptor coactivator (SRC)-1, SRC-2, SRC-3, p300/CREB-binding protein (CBP), and pCAF [3], or by the recruitment of corepressors like nuclear receptor corepressor (NCoR) and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor (SMRT) with their associated histone deacetylases [4]. This genotropic pathway is well documented for the control of the expression of the human *prostate-specific antigen (hPSA)* gene, a target of the AR

* Corresponding author.

in prostate tissue [5]. The *hPSA* promoter contains three putative AREs, AREI (−170 pb) and AREII (−394 bp) within the proximal region, and AREIII (−4.2 kb) in the distal enhancer region [5, 6]. In this model, agonist-bound ARs are recruited to both the proximal promoter (AREII) and the enhancer element (AREIII), followed by a coordinated and ordered recruitment of p160 proteins, p300/CBP and RNA polymerase II holoenzyme. On the other hand, the formation of an antagonist-bound AR corepressor complex involves only AREI in the proximal promoter.

As the three androgen-responsive motifs in the *hPSA* promoter differ in their DNA sequence [6], an intriguing question is how the selectivity of AR DNA binding is achieved. This study of the formation of the AR transcription complex on the *hPSA* promoter and previous data suggest that the DNA binding should be determined by the type of ligand bound to the AR, but also by its interaction with either coactivators or corepressors [5–7].

Similarly, the way the specificity of DHT action mediated by the AR is obtained remains unclear. Indeed, the class I subgroup of the nuclear receptor (NR) superfamily, including the AR, the glucocorticoid receptor (GR), the mineralocorticoid receptor (MR), and the progesterone receptor (PR), can recognize the same three-nucleotide spaced inverted repeats (IR3) of the 5'-TGTTCT-3'-like monomer-binding motif present in the promoter of target genes [8]. The relative balance of receptors, coactivators, and corepressors has been suggested to be a critical determinant to initiate a specific response. Additionally, recent studies suggest that the specificity of the androgen signalling pathway relies on an alternative DNA-dependent dimerization of the AR on direct repeats of the monomer-binding motif rather than inverted repeats, and an active role of sequences flanking these response elements [9]. However, our understanding of how the AR selectively regulates the expression of genes at the transcriptional level is still incomplete.

Androgens are involved in prostate cancer (PCa) cell growth and survival, and androgen ablation therapy remains the mainstay of treatment for patients with advanced PCa. Despite the initial repressive effects, all PCas will switch from an androgen-dependent to an androgen-independent state in which the AR continues to play a crucial role by allowing tumour cell growth in an androgen-depleted environment [10, 11].

AR mutations are one of the proposed mechanisms to explain how PCa can escape androgen deprivation [12]. To date, 85 AR mutations have been found in PCas, almost all being single-base substitutions due to somatic mutations [13]. Nearly 45% of these mutations occur in the ligand-binding domain (LBD) of the receptor, where they can modify the sensitivity of the AR for steroid hormones other than androgens, or for non-steroid molecules such

as antiandrogens [14, 15]. Mutations in the LBD by affecting the ligand-induced AR conformation might also decrease the recruitment of corepressors [16]. These naturally occurring mutations in the AR undoubtedly provide precious information for a better understanding of AR-specific transcriptional activation.

In the present study, we describe a novel AR variant carrying the T575A/T877A double mutation, isolated from a hormone-refractory metastatic PCa.

The T877A mutation is currently described in the literature. This mutation is known to lead to promiscuous ligand activation of the AR. Indeed, the replacement of the threonine in position 877 by an alanine enlarges the ligand-binding pocket allowing the binding of the antiandrogen, hydroxyflutamide, as an agonist. Similarly, the binding of steroid molecules with a larger substitution at carbon 17 in the D ring, like cortisol and 17 α -hydroxyprogesterone (17 α -OH-Prog) is favoured [14, 15]. More recently, the T877A mutation was discovered to affect the ligand-induced conformational change of the AR, and to considerably reduce the repressive action of the corepressor NCoR. This lack of NCoR action would allow antiandrogens to act as strong agonists [16].

The single T575A AR mutation has already been reported in another metastatic PCa but the functional consequences of this mutation on AR activity have not been investigated so far [17]. The T575A mutation is localized in the first zinc finger of the DNA-binding domain (DBD), just before the P-box, which intervenes in ARE recognition.

To define the consequences of the T575A mutation on AR functions, a comprehensive analysis of AR transcriptional activities from different hormone-responsive promoters was conducted. The present study found that the T575A mutation decreased AR transcriptional activities from promoters containing AR-specific hormone-responsive elements (HREs) and increased AR activities from promoters containing AR-non-specific HREs. Data from gel shift experiments showed that AR DNA binding to non-specific HREs was also enhanced in the presence of the T575A mutation. These findings suggest that threonine in position 575 probably orientates AR DNA binding to specific HREs. Furthermore, we demonstrate that in the T575A/T877A mutant AR, the effects of the two mutations combine, and give rise to an AR that functions simultaneously as a promiscuous AR due to the T877A mutation, and an unfaithful AR due to the replacement of threonine in position 575 by alanine.

Materials and methods

Materials. All steroids, flutamide, yeast medium components, phenol-red-free Dulbecco's modified Eagle's medium, mycoplasma-screened fetal calf serum (FCS)

were from Sigma Aldrich. Primers were from MWG Biotech.

Plasmids. The plasmids pAR_{WT} and pAR_{T877A} for expression of the wild-type (wt) AR and the T877A mutant AR in yeast have already been described [18]. The plasmid pAR_{T575A/T877A} was rescued from yeast clones expressing the T575A/T877A double-mutant AR as previously described [19]. The pAR_{T575A} single mutant AR was obtained from pAR_{T575A/T877A} by exchanging the *EcoRI*–*EcoRI* fragment (NM_000044: nt 3521–4015) with the wt counterpart. For cell transfections, the expression vector for the full-length human AR (pSV-AR₀), a gift from Dr. A. O. Brinkmann (Erasmus University, Rotterdam), was used. To generate pSV-AR_{MUT} constructs, the following forward 5′-TGCGGCGGCGCAGTGCCGCTAT-3′ (NM_000044: nt 2311–2332) and reverse 5′-TAGGGATCCAATGCTTCACTGGG-3′ (NM_000044: nt 3867–3890) primers were used to amplify a *BstEII*–*BamHI* fragment from pAR_{T575A}, pAR_{T877A}, and pAR_{T575A/T877A}, which was thereafter exchanged with the corresponding fragment in pSV-AR₀, yielding pSV-AR_{T575A}, pSV-AR_{T877A}, and pSV-AR_{T575A/T877A}, respectively. The underlined sequence in the reverse primer refers to the *BamH* I site. The GREc plasmid was constructed by inserting the consensus glucocorticoid responsive element (GRE) sequence, 5′-TG-TACAggaTGTTCT-3′, in the multiple cloning site of the pTAL-Luc plasmid (BD Clontech) between *MluI* and *EcoRI* restriction sites. All constructs were checked by sequencing. The MMTV-Luc reporter plasmid containing GREs was a gift from Prof. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France). The PSA-61-Luc reporter plasmid containing a 6-kb *PSA* promoter fragment with the three AREs (AREI, AREII, and AREIII) was from Dr. Trapman (Erasmus University, Rotterdam). *sc*-ARE1.2, *slp*-HRE2, and C3(1) ARE luciferase reporter plasmids were from Dr. F. Claessens and Dr. G. Verrijdt (Faculty of Medicine, University of Leuven, Belgium). pEGFP-C3 was purchased from BD Clontech.

Tissue acquisition. The patient was diagnosed with T3NxMo PCa and was first treated with leuporelin and flutamide. The patient responded to this complete androgen blockade for 17 months and relapsed thereafter. After informed consent, 3 ml of bone marrow was aspirated from the right posterior iliac crest, 5 years after the initial diagnosis. Cytologic examination showed the presence of numerous metastatic PCa cells in the bone marrow aspirate.

ADE2 reporter assay. The assay was performed in the EJ250 yeast strain in which the expression of the *ADE2* gene, required for adenine biosynthesis, was androgen dependent [18]. The *ADE2* reporter gene was placed under the tight control of a yeast minimal promoter linked

to three repeats of the sequence 5′-AGAACAgcaAGT-GCT-3′, corresponding to AREI (–170 bp) of the human *PSA* gene. Yeast cells were transformed by the LiAc/PEG method with 1 µg expression plasmid encoding either wt AR or the indicated mutant AR. Transformed yeast cells were then plated on selective medium depleted in adenine and containing increasing concentrations of a panel of steroid or non-steroid ligands, or the vehicle ethanol as the negative control. Colonies obtained on each plate were scored, reflecting the transcriptional activity of the AR in response to the ligand tested. In the positive control (+ ade), transformed yeast were plated on selective medium, which did not contain any ligand, but was supplemented with 200 µg/ml adenine. In such conditions, the androgen-dependent expression of the *ADE2* gene was not required for yeast growth.

Cell lines. The monkey kidney cell lines CV-1 and COS-1, obtained from Prof. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France), were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplied with 10% FCS, 2 mM glutamine, 10 U/ml penicillin, and 10 U/ml streptomycin (all Sigma-Aldrich).

Luciferase reporter assays. Transient transfections were performed in CV-1 cells using a JetPEI reagent (PolyPlus Transfection) according to the instructions provided by the manufacturer. For luciferase assays using pMMTV-Luc or PSA-61-Luc as reporter plasmids, CV-1 cells were seeded into 12-well plates, and transfected with 1 µg of AR expression constructs in combination with 2 µg of reporter plasmid and 50 ng of pEGFP-C3 as the internal control. For luciferase assays using *sc*-ARE1.2, *slp*-HRE2, or C3(1)-ARE as reporter plasmids, CV-1 cells were into 24-well plates, and transfected with 200 ng of AR expression constructs in combination with 400 ng of the indicated reporter plasmid and 200 ng of pEGFP-C3 as the internal control. All transfections were performed in phenol-red-free medium containing 10% dextran-coated charcoal-stripped FCS, DHT or 17- α -OH-Prog at the indicated concentration, or vehicle (ethanol). Forty-eight hours after transfection, cell lysates were harvested and analysed for firefly luciferase activity with reagents from the Luciferase Reporter Assay System (Promega) using the TD-20/20 luminometer (Turner Designs).

Preparation of cell extracts. COS-1 cells were plated at 2×10^6 cells/10-cm dish and transfected with 15 µg of AR expression plasmid and JetPEI reagent (PolyPlus Transfection), and incubated in phenol-red-free medium containing 10% dextran-coated charcoal-stripped FCS and 100 nM DHT for 48 h. Cells were then washed twice with ice-cold 1×PBS containing 1× protease inhibitor cocktail from Sigma, scraped into 1 ml of chilled PBS with 1× protease inhibitor cocktail, and were pelleted by centrifu-

gation at 1700 g for 5 min at 4 °C. Cell pellets were resuspended in 400 µl of ice-cold buffer A [10 mM Hepes KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), and 1× protease inhibitor cocktail] by gently flicking the tube, and left on ice for 10 min. Cell lysates were vortexed briefly, and centrifuged at 10,000 g for 30 s. Pellets were resuspended in 50 µl of ice-cold buffer C (20 mM Hepes KOH pH 7.9, 420 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 25% glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 0.2 mM PMSF, and 1× protease inhibitor cocktail), and incubated on ice for 30 min. Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 g for 2 min at 4 °C, and supernatants were stored at –80 °C.

Electrophoretic gel mobility assay. Electrophoretic gel mobility assays (EMSA) were performed essentially according to De Vos et al. [20]. Oligonucleotides (table 1) were hybridized and ³²P-labelled in a fill-in reaction carried out in 20 µl of buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 7.5 mM dithiothreitol, 0.15 mM of each dTTP, dATP and dGTP, 0.2 µM of double-stranded oligonucleotides, 1 µCi/µl of [α -³²P]dCTP (Amersham Pharmacia Biotech), and 0.25 U/µl of the Klenow fragment of DNA polymerase I (BioLabs) for 30 min at 37 °C. The reaction was then stopped by adding EDTA to a final concentration of 10 mM, and unincorporated [α -³²P]dCTP was removed from the labelled probes by purification on MicroSpin G-25 Columns (Amersham Biosciences). Constant amounts (120,000 cpm) of labelled probes were incubated for 15 min on ice with nuclear extracts from transfected COS-1 cells, in 40 µl of binding buffer [20 mM Hepes KOH pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 17% glycerol, 100 mM NaCl, 0.05% Triton X-100, 50 ng poly(dI-dC), and 1 mM dithiothreitol]. Subsequently, free or bound probes were separated by electrophoresis on a 5% (w/v) acrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, w/w) containing 0.25× Tris/borate/EDTA, and 0.05% Triton X 100 (Sigma-Aldrich) for 5 h at 120 V, and at room temperature. The percentage of retarded probe was determined by scanning dried gels with

a PhosphoImager (Molecular Dynamics) and by densitometric studies using the Quantity One software (Bio-Rad).

Immunoblotting. Protein extracts were prepared from yeast cells as described previously [18]. Equal amounts of protein were loaded on a 7.5% SDS PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting. Blots were probed with the rabbit polyclonal IgG antibody sc-13062 against human AR (Santa Cruz Biotechnology) and peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit PO; Bio-Rad). Detection was carried out with the chemiluminescence Western blotting kit (Amersham Biosciences).

Homology modelling. The *in silico* modelling of DNA-bound wt AR DBD was realized based on the structure of the human GR DBD (pdb entry 1GLU) [21], using the Modeller software and default parameters [22], the Turbo-Frodo software, and the lsq-man option in the O package software. The quality of the models was evaluated with both Procheck [23] and ProsaII [24], and was compared with the recently published structure of the AR-DBD2-DNA crystal (pdb entry 1R4I) [25].

Results

Transcriptional activities of a new AR variant with the T575A/T877A double mutation isolated from a hormone-refractory PCa. We have developed a yeast functional assay to screen PCa samples for AR mutations, and to analyse the transcriptional activities of the mutant ARs in the presence of a panel of agonists or antagonists [18]. By applying this assay to study AR status in a hormone-refractory metastatic PCa as previously described [19], we detected a novel mutant AR variant carrying the T575A and T877A substitutions. This is the first description of this T575A/T877A AR variant. The T877A mutant AR has been described in hormone-refractory prostate cancer, but little is known about the effect of the T575A mutation on AR activities, or about the consequences of the two mutations within the same AR molecule.

We first evaluated transcriptional activities of this T575A/T877A AR variant in our yeast functional assay. As controls, the wt AR and the AR variant carrying the T575A or the T877A mutation alone were also assayed. While wt AR transcriptional activity in the presence of low concentrations of DHT (0.01–0.1 µM), and higher doses (1–10 µM) of androstenedione, β -estradiol, progesterone, medroxyprogesterone, and 17 α -OH-Prog was strong as expected (fig. 1A) [18, 19], no transcriptional activity was observed with the T575A/T877A mutant AR, whatever the ligand added into the medium, and the concentrations tested (fig. 1B). Yeast colonies were only observed on the

Table 1. Comparison of AR-non-specific and AR-specific HREs.

Name	Sequence	Specificity
C3(1) ARE	5'-AGTACGtgaTGTTCCT-3'	non-specific
GRE consensus	5'-TGTACAggaTGTTCCT-3'	non-specific
<i>sc</i> -ARE1.2	5'-GGCTCTttcAGTTCT-3'	AR specific
<i>slp</i> -HRE2	5'-TGGTCAGccAGTTCT-3'	AR specific
PSA-AREI	5'-AGAACAgcaAGTGCT-3'	AR specific
ARE consensus	5'-GGTACAgggTGTTCCT-3'	AR specific
	-7 0 7	

Numbering is relative to the central nucleotide of the three-nucleotide spacer.

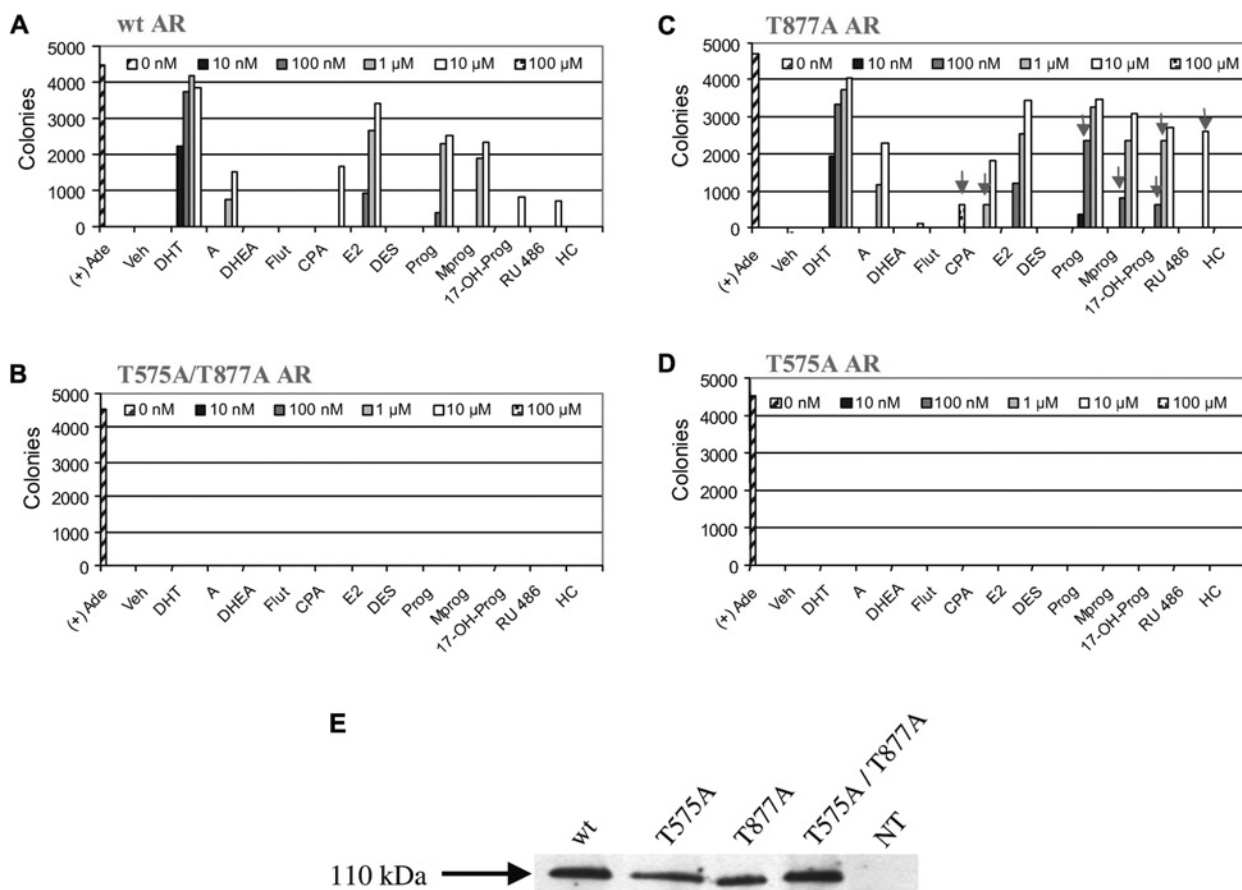


Figure 1. Activation of transcription from an ADE2 gene reporter assay by the wt and mutants ARs. Yeast cells were transformed as described in Material and methods with the expression plasmid encoding the wt AR (A), the T575A/T877A (B), the T877A (C) or the T575A (D) mutant ARs, and were plated on selective media containing one of the following steroid or non-steroid ligands: DHT, dihydrotestosterone; A, androstenedione; DHEA; Flut, flutamide; CPA, cyproterone acetate; E2, β -estradiol; DES, diethylstilbestrol; Prog, progesterone; Mprog, medroxyprogesterone; 17-OH-Prog, 17 α -OH-progesterone; RU486, mifepristone; HC, cortisol. Histograms represent the number of colonies obtained with each concentration of ligand (10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M). Flut was tested at 0.1–100 μ M. Data represent one experiment performed three times. Mutation-induced changes in hormone response are depicted by arrow. (E) Western blot analysis of AR expression in yeast cells. Protein extracts from yeast cells expressing either the wt AR, the T877A, the T575A/T877A, the T575A mutant ARs or from non-transfected yeast cells were separated on 7.5% SDS PAGE. Blots were revealed with the rabbit polyclonal IgG sc-13062 against AR (110 kDa).

positive control plate (fig. 1B, + Ade), which was supplemented with adenine. In these conditions, AR transcriptional activity was not required for yeast growth.

The impaired transcriptional activity observed with the T575A/T877A mutant AR cannot be attributed to the sole T877A mutation in the LBD as this mutation is known, on the contrary, to broaden the response of the AR to antiandrogens and to several other steroid hormones. Indeed, AR transcriptional activity in the presence of the T877A mutation alone was observed, as expected, from a lower concentration (100 nM) of progesterone, medroxyprogesterone, and 17 α -OH-Prog compared with the wt AR (fig. 1C) [19]. The T877A mutant AR also responded to the full antagonist flutamide, and to the partial agonist CPA and RU486.

We next tested whether the T575A mutation alone in the DBD might explain the impaired transcriptional activities observed with the T575A/T877A mutant AR. The AR

with the single T575A mutation was created by mutagenesis from the wt AR and assayed in the yeast system. As expected, the T575A mutant AR was unable to up-regulate the expression of the ADE2 reporter gene in response to hormone stimulation in our yeast model (fig. 1D).

Western immunoblotting was performed to exclude the possibility that the absence of transcriptional activities observed with the T575A and T575A/T877A mutant ARs was due to a decrease in AR protein levels. As shown in Figure 1E, no AR expression was observed in non-transfected yeast cells, while the expression of the T575A and T575A/T877A mutant ARs in yeast cells was comparable with that of the wt or T877A mutant AR. Collectively, these results indicate that the T575A mutation within the AR DBD should impair AR transcriptional activities from our ADE2 gene reporter construct. The presence of the T575 mutation should affect somehow the recognition of the responsive element that has been inserted in this artificial

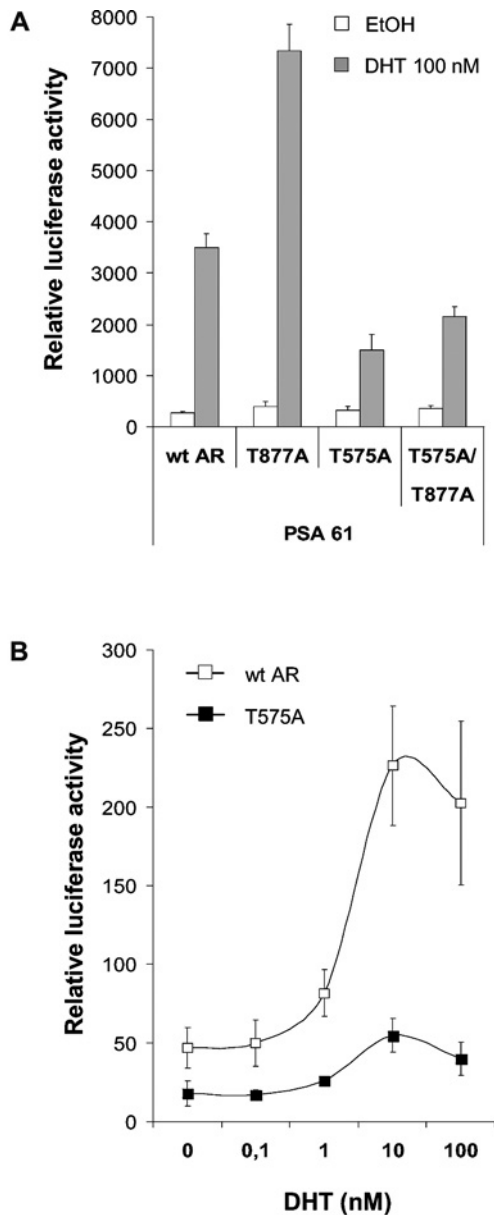


Figure 2. The T575A mutation attenuates AR transcriptional activity from the human *PSA* promoter. CV-1 cells were cotransfected with expression vectors for wt or mutant AR and PSA-61-Luc. Transfected cells were treated with either DHT, or vehicle (ethanol) in steroid-depleted medium for 48 h. Cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. (A) Transcriptional activities of the wt, the T877A, the T575A, and the T575A/T877A mutant ARs in response to 100 nM DHT. (B) Dose-dependent response of wt and T575A mutant ARs to DHT stimulation. Values are given as arbitrary units. Data represent the mean of assays performed in triplicate \pm SE.

promoter, and that corresponded to AREI (–170 pb) of the *hPSA* gene. To test this hypothesis, a comprehensive analysis of different hormone-responsive promoter constructs, in which the luciferase reporter gene was placed under the control of identified steroid HREs, was performed in CV-1 cells.

Effect of the T575A mutation on AR transcriptional activities in CV-1 cells. The transcriptional activities of the wt AR, the T575A, T877A, and T575A/T877A mutant ARs were first evaluated on the PSA-61-luciferase construct. This complex promoter corresponds to a 6-kb-long fragment of the human *PSA* gene, and contains three AREs, AREI (–170 pb), AREII (–394 pb), and AREIII (–4.2 kb) [6]. Cotransfected CV-1 cells were incubated in the presence of either 100 nM DHT or vehicle. The wt AR and the T877A AR led to a strong up-regulation of luciferase activity after DHT treatment (10- and 22-fold, respectively) (fig. 2A). As expected, both the T575A and the T575A/T877A mutant ARs led to a weak induction of luciferase activity (4.5- and 6.4-fold, respectively) from this *PSA* gene promoter. Dose response curves were also performed in CV-1 cells to confirm that the weak response of the AR with the T575A mutation from the PSA-61 promoter was independent of the concentration of DHT (fig. 2B). These data supported the results obtained in our yeast-based reporter system, in which ARs with the T575A mutation were less responsive.

To investigate whether the T575A mutation affects the recognition of a different complex promoter, we next tested the MMTV-LTR-luciferase reporter construct, which contains GREs instead of AREs. The wt AR like the other members of class I nuclear receptors such as the GR, the MR, and the PR is known to be transcriptionally active from this promoter. The T575A mutant AR led to an unexpected strong up-regulation of luciferase activity after DHT stimulation, compared with the wt AR (244- and 70-fold, respectively) (fig. 3A). Similarly, the T575A/T877A mutant AR had a strong activity from the mouse mammary tumour virus (MMTV) promoter after DHT stimulation compared with the T877A mutant AR (240- and 91-fold, respectively). Similar results were obtained with the simple GRE-TATA-luciferase reporter construct. The T575A mutant AR activity in the presence of DHT was strongly increased when compared with the wt AR and the T877A mutant AR (fig. 3B).

We next extended the analysis of T575A mutant AR transcriptional activities to two other AR-specific AREs, the *slp*-HRE2 from the mouse *sex-limited protein* (*Slp*) gene and the *sc*-ARE1.2 from the *human secretory component* (*SC*) gene, and to another AR-non-specific HRE, the C3(1)-ARE from the rat C3(1) gene [8, 20]. Compared with the wt AR, the T575A mutant AR was, as expected, less active on the *sc*-ARE1.2 and the *slp*-HRE2 promoter (fig. 4A), and more active upon the C3(1)-ARE promoter (fig. 4B).

Together, these results indicate that the T575A mutation impairs AR transcriptional activities from promoter constructs containing AR-specific HREs, but increases AR activities from promoters containing AR-non-specific HREs.

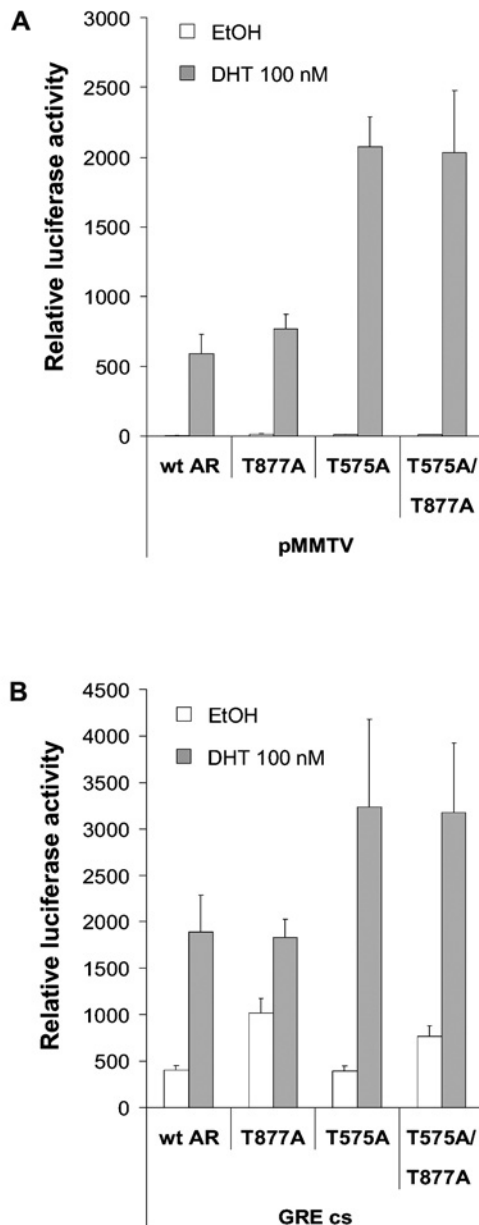


Figure 3. The T575A mutation increases AR transcriptional activity from the MMTV-Luc and GRE-Luc promoter constructs. CV-1 cells were cotransfected with expression vectors for wt or mutant AR and MMTV-Luc (A) or GRE-Luc (B) promoter constructs. Transfected cells were treated with either 100 nM DHT or vehicle in steroid-depleted medium for 48 h. Cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. Values are given as arbitrary units. Data represent the mean of assays performed in triplicate \pm SE.

Effects of the T575A mutation on AR DNA binding.

An EMSA was further performed in COS-1 cells to investigate whether the T575A mutation affects AR DNA binding. The oligonucleotides used corresponded to two AR-specific AREs, the AREI of the *hPSA* gene (AREI-PSA), and the consensus ARE (AREcs), and to two AR-non-specific HREs, the C3(1)-ARE, and the consensus

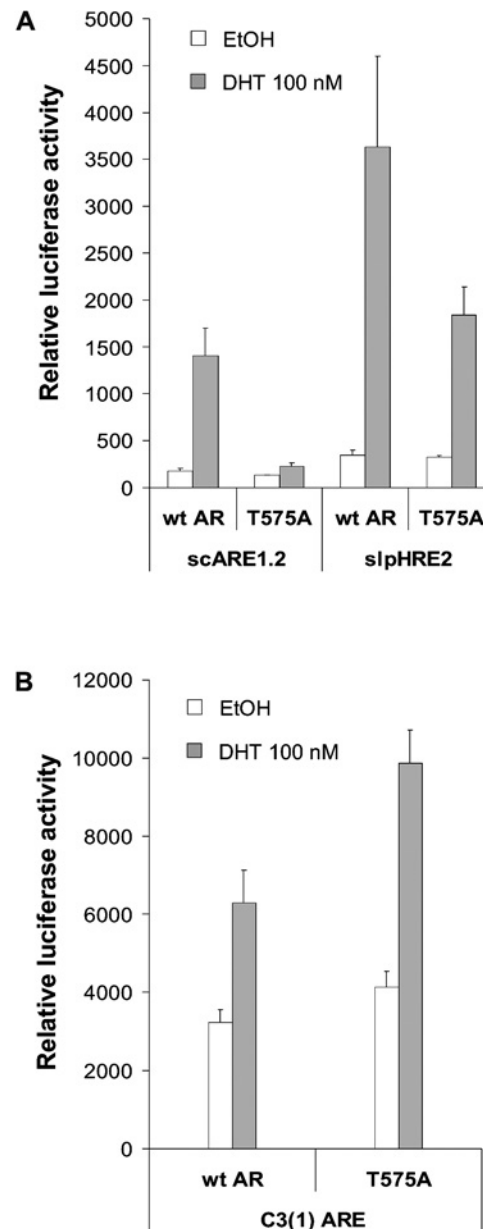


Figure 4. The T575A mutation affects the specific recognition of HREs by the AR. CV-1 cells were transfected with expression vectors for wt or mutant AR and the high-affinity and AR-non-specific C3(1)-ARE-Luc (A), or the high-affinity and AR-specific scARE1.2 and *slp*-HRE2 (B), as well as pEGFP-C3. Cells were treated with 100 nM DHT in steroid-depleted medium for 48 h. Cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. Values are given as arbitrary units. Data represent the mean of assays performed in triplicate \pm SE.

GRE (GREcs) (table 1) [9]. Nuclear extracts from transfected COS-1 cells expressing either the wt AR or the T575A AR were incubated with 32 P-labelled oligonucleotides, and AR-DNA complexes were resolved. The binding of T575A mutant AR to the AREI-PSA and to AREcs was significantly lower compared to that of the wt AR (fig. 5). On the other hand, the T575A mutation

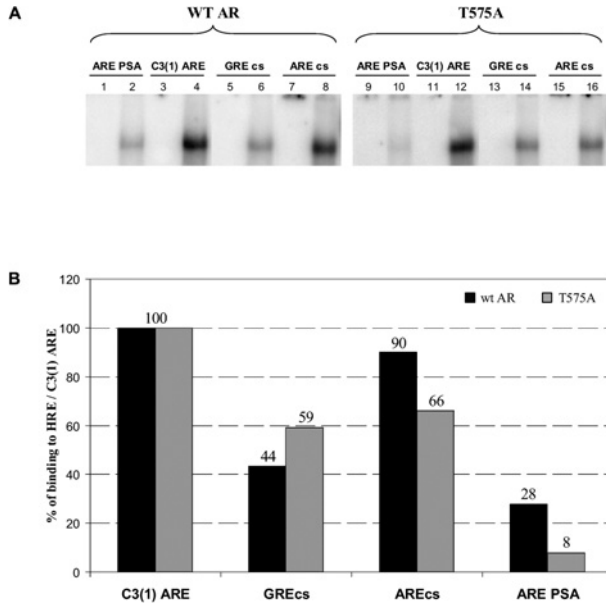


Figure 5. DNA binding activity of the wt and mutant ARs as determined by EMSA. Nuclear extracts from COS-1 cells transfected with the expression vectors for wt and mutant ARs were prepared as described in Materials and methods. (A) Aliquot of each sample (30 μ g protein) incubated with the indicated 32 P-labelled HRE (even numbers), or free probes (odd numbers) were loaded on a 5% polyacrylamide gel. Identical results were obtained in repeated experiments. (B) Comparative analysis of AR affinity for HREs. wt and mutant ARs binding to the C3(1)-ARE was set at 100%.

enhanced AR DNA binding to the non-specific GREcs and C3(1)-ARE. Similar data were obtained with the T575A/T877A mutant AR (data not shown). These data show collectively that the T575A mutant AR displays altered DNA binding to an AR-specific ARE, but a higher DNA binding to the AR-non-canonical HREs, reflecting the transcriptional activities observed with this mutant AR.

Synergetic effects of the double T575A/T877A mutation on AR transcriptional activities. We have demonstrated that the T575A mutant AR exhibits higher DNA binding to AR-non-specific HREs and increased transcriptional activities from promoters containing such HREs. Moreover, as previously described [15, 18] and as illustrated in figure 1C, the AR response to several endogenous steroid hormones and non-steroid molecules is markedly changed in the presence of the T877A mutation in the LBD. We next tested the combined effects of the two T575A and T877A mutations on AR activity. CV-1 cells were cotransfected with either wt, T575A, T877A, or T575A/T877A mutant AR together with the MMTV-luciferase reporter plasmid and were incubated in the presence of 17α -OH-Prog or cortisol. The wt and T575A ARs, which do not contain any mutation in the LBD, remained unresponsive to 17α -OH-Prog or cortisol stimulation. As expected, transcriptional activities of the AR

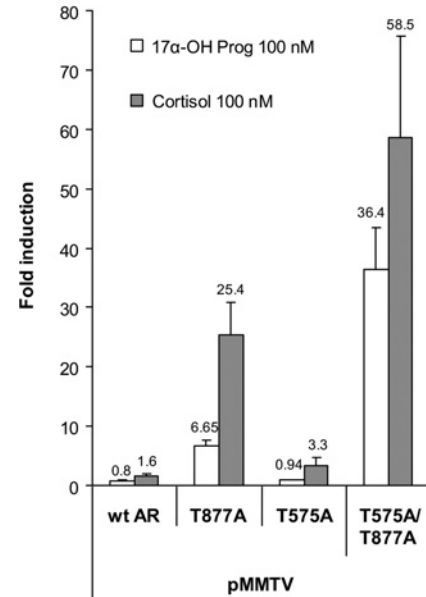


Figure 6. The T575A/T877A mutant AR is an unfaithful and promiscuous AR. CV-1 cells were cotransfected with expression vectors for wt or mutant AR and the MMTV-Luc as well as pEGFP-C3. Cells were treated with 100 nM 17α -OH-Prog or 100 nM cortisol in steroid-depleted medium for 48 h. Cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. Values are given as fold induction over activity found in control cells treated with ethanol. Data represent the mean of assays performed in triplicate \pm SE.

T877A mutant after 17α -OH-Prog or cortisol stimulation were increased (6.7- and 25.4-fold, respectively). In the T575A/T877A mutant AR, the effects of the two mutations combined to give rise to a receptor with stronger transcriptional activities from the MMTV promoter (fig. 6). Together these results indicate that the two mutations T575A and T877A cooperate to confer new properties on the T575A/T877A mutant AR: the T877A mutation by enlarging the sensitivity to hormones other than androgens, and the T575A mutation by modifying the affinity of the AR for HREs.

Discussion

We report here the characterization of a T575A/T877A mutant AR detected in a hormone-refractory metastatic PCa. An AR variant with the single T575A mutation has already been described in a metastatic PCa, but the functional consequences of this mutation on AR activity have not been investigated so far [17]. In this report we have evaluated the molecular consequences of the T575A/T877A double mutation on AR activity. We showed that the T575A mutation affects AR transcriptional activities upon hormonal stimulation in a promoter-dependent manner. In an *ADE2* reporter assay performed in yeast, in which the reporter gene was placed downstream of a min-

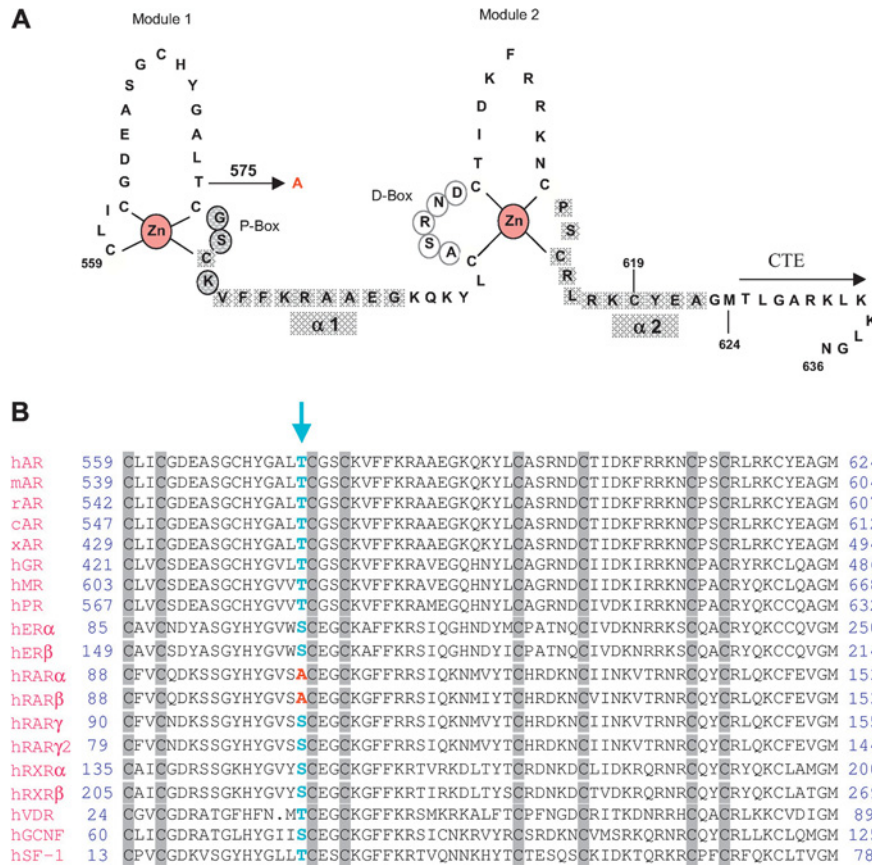


Figure 7. The hydroxyl group in position 575 in the AR DBD is well conserved among the NR family. (A) Schematic view of the human AR DBD with the T575A mutation. The T→A mutation is located at position 575 in the first zinc module, near the P-box (circled amino acid residues). The hatched amino acid residues indicate the two helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$. The D-box, which is involved in dimerization is indicated by open circles. The C-terminal extension (CTE) contains amino acids that are required for high-affinity binding of the AR to AREs. (B) Sequence comparison of NR DBDs. The sequence alignment of the DBD of different NRs was performed using the Clustal program. The grey boxes indicate the zinc-coordinating cysteines. Position T575 in the AR is indicated by the arrow. Note the high conservation of a hydroxyl group from threonine or serine in this position. The organism abbreviations are: h, *Homo sapiens*; m, *Mus musculus*; r, *Rattus norvegicus*; c, *Canis familiaris*; x, *Xenopus laevis*.

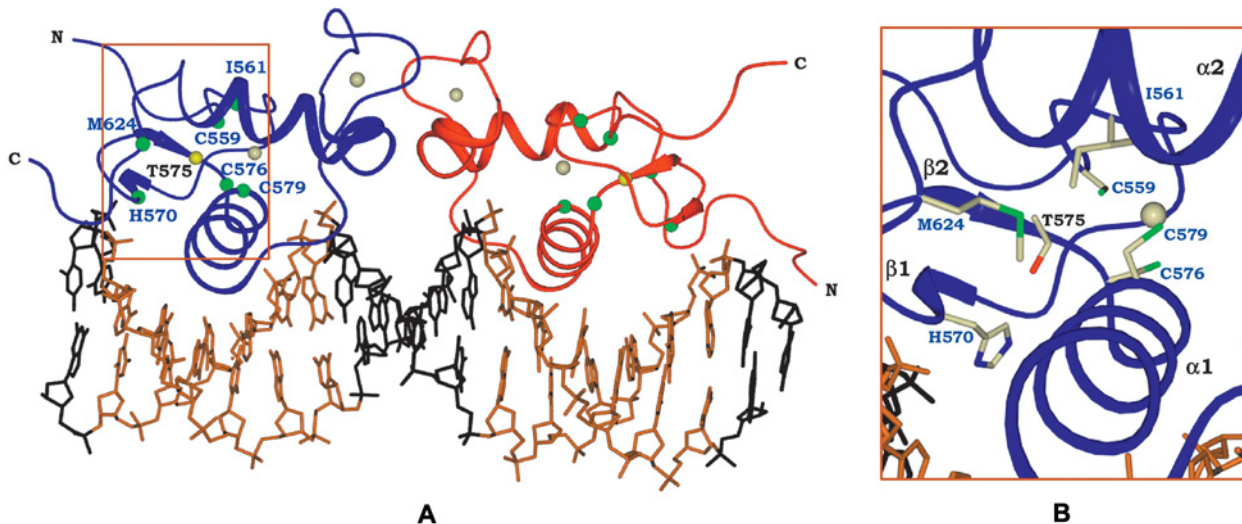


Figure 8. The human wt AR DBD-ADR3 complex model. (A) We performed this *in silico* modelling of the DNA-bound wt AR DBD based on the structure of the human GR DBD (pdb entry 1GLU). The two monomers are in blue and in red, the DNA half site is in brown and zinc atoms are colored in ivory. The protein is depicted as a backbone Ca trace. T575 is represented in yellow. Residues participating in the interactions with T575 are labelled in green. (B) Magnification of box in (A).

imal promoter construct with three repeats of the *cis*-acting element AGAACAgcaAGTGCT (ARE1 of *hPSA*, position -170), both the T575A and T575A/T877A mutant ARs were transcriptionally inactive in response to the different ligands studied. In luciferase assays performed in CV-1 cells, both the T575A and T575A/T877A mutant ARs were transcriptionally active on promoter constructs containing AR non-canonical HREs such as MMTV-Luc, GRE-Luc, and C3(1)-Luc, but were less active on promoters containing AR-specific HREs like *sc*-ARE1.2 and *slp*-HRE2. These differences in AR transcriptional activities could be explained by a weakened AR binding to specific HREs in the presence of the T575A mutation, while binding to non-canonical HREs was enhanced compared to the wt AR.

Thus, the T575A mutant AR raises the question of how AR specificity of action is obtained. The AR DBD may be considered as two interdependent modules that differ both structurally and functionally, and an amphipathic helix (fig. 7A). The helix of the first module (H1) is mainly involved in site-specific recognition based on its interaction with some bases in the cognate HRE [26, 27]. Also, within this helix are the amino acids that are responsible for site-specific discrimination of binding. These three to four amino acids have been termed the P-box. A loop formed in the second module provides the DBD homodimerization interface, and the helical region (H2) is involved in less-specific DNA interactions [28]. The T575A mutation is present in the first zinc finger module (fig. 7A), just upstream from the P-box.

It is clear that nucleotide determinants within the HRE play an important role [26, 27], like the amino acids within the P-box (fig. 7A). However, our data suggest that other amino acids within this first zinc finger module could also be important for AR-specific DNA binding. Moreover, the recent observation that position 437 within the GR, outside the P-box, also plays an important role in GR-specific DNA binding supports our data [29].

NR DBD sequence alignments (fig. 7B) show that T575 is remarkably conserved within the AR subfamily. T575 is also highly conserved among the NR superfamily, with the exception of RAR α and RAR β , which exhibit an alanine residue in this position. The high degree of conservation of the hydroxyl group in this position suggests that the corresponding amino acid should be involved somehow in HRE recognition.

How the T575A mutation could affect the binding of the mutant AR to cognate HREs is not clear. Molecular modelling analyses indicate that T575 is not located at the surface of the DBD globular structure, but is completely buried (fig. 8) [25]. Indeed, T575 cannot really interact with the DNA or with the other AR monomer. In fact, T575 may play a crucial role in the AR DBD, as numerous van der Waals contacts with neighbouring amino acids are possible. These van der Waals interactions can

be established with amino acids located in different helices forming the DBD, including residues C559, I561 and H570 in the first module, and residues C576 and C579 of DNA recognition helix H1 (fig. 8B). T575 may also interact with residue M624 between H2 and the C-terminal extension. Most of these contacts may be lost in the T575A mutant AR, disturbing the normal binding of the AR to the cognate DNA.

We cannot exclude the possibility that the change of threonine in position 575 to alanine affects somehow an interaction with coactivators or corepressors, and allows the AR to bind to non-specific HREs, as the AR DBD is known to interact with several coactivators and corepressors.

A detailed understanding of how these HREs are discriminated by the wt AR and the T575A mutant AR will have significant biological relevance, since the discriminating mechanisms are likely to be applicable to the entire steroid hormone receptor family.

The replacement of the threonine in position 877 by an alanine is known to enlarge the ligand-binding pocket allowing the binding of hydroxyflutamide as an agonist, but also the binding of steroid molecules with a larger substitution at C17 in the D-ring, like cortisol and 17 α -OH-Prog (figs. 1C, 6), [14, 15]. Recent studies suggest that the T877A mutation affects the ligand-induced conformational change of the AR, and considerably reduces the repressive action of the corepressor NcoR. This lack of NcoR action allows antiandrogens to act as strong agonists [16]. In the light of our present data, it is tempting to postulate that the T575A/T877A mutant AR functions simultaneously as a promiscuous and unfaithful receptor, with a greater response to glucocorticoids and hydroxyflutamide due to the T877A mutation, and higher binding capacities to some AR non-canonical HREs due to the T575A mutation. Thus, a hypothesis to be tested further is that this promiscuous and unfaithful AR, by enhancing transcription from promoters containing AR-non-specific HREs, may lead to the expression of genes which usually do not depend on the AR signalling axis.

The study of the structural and functional features of these naturally occurring AR mutations can help to clarify the molecular bases of the development of hormone-refractory PCa, as well as the molecular mechanisms of AR action.

Acknowledgments. We are grateful to E. Erdmann, C. Orbillot and E. Bour for technical assistance, to Dr. A. O. Brinkmann (Department of Reproduction and Development, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands.) for the gift of the human AR expression vector (pSV-AR₀), to Dr. J. Trapman (Department of Pathology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands) for the generous gift of the PSA-61-Luc reporter plasmid, and to Drs. F. Claessens and G. Verridjt (Division of Biochemistry, Faculty of Medicine, Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium) for the generous gift of *sc*-ARE1.2, *slp*-HRE2, and C3(1)-ARE luciferase reporter plasmids. This work is part of a clinical study managed by the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg and supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2002, the ARTP, the

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, the associations ARECOH and ATGC, the Faculté de Médecine of the Université Louis Pasteur – Strasbourg, the Ligue Nationale contre le Cancer, and the IRCAD. This study is approved by the Ethic Committee, CCPPRB-Alsace 1.

- 1 Culig Z. (2003) Role of the androgen receptor axis in prostate cancer. *Urology* **62**: 21–26
- 2 Lee H. J. and Chang C. (2003) Recent advances in androgen receptor action. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 1613–1622
- 3 Heinlein C. A. and Chang C. (2002) Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr. Rev.* **23**: 175–200
- 4 Hu X. and Lazar M. A. (2000) Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends. Endocrinol. Metab.* **11**: 6–10
- 5 Burke L. J. and Baniahmad A. (2000) Corepressors 2000. *FASEB J.* **14**: 1876–1888
- 6 Shang Y., Myers M. and Brown M. (2002) Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell.* **9**: 601–610
- 7 Cleutjens K. B., Korput H. A. van der, Eekelen C. C. van, Rooij H. C. van, Faber P. W. and Trapman J. (1997) An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol. Endocrinol.* **11**: 148–161
- 8 Haelens A., Verrijdt G., Callewaert L., Christiaens V., Schauwaers K., Peeters B. et al. (2003) DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation. *Biochem. J.* **369**: 141–151
- 9 Verrijdt G., Haelens A. and Claessens F. (2003) Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol. Genet. Metab.* **78**: 175–185
- 10 Feldman B. and Feldman D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 34–45
- 11 Culig Z., Klocker H., Bartsch G., Steiner H. and Hobisch A. (2003) Androgen receptors in prostate cancer. *J. Urol.* **170**: 1363–1369
- 12 Heinlein C. A. and Chang C. (2004) Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr. Rev.* **25**: 276–308
- 13 Gottlieb B., Beitel L. K., Wu J. H. and Trifiro M. (2004) The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum. Mutat.* **23**: 527–533
- 14 Sack J. S., Kish K. F., Wang C., Attar R. M., Kiefer S. E., An Y. et al. (2001) Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4904–4909
- 15 Krishnan A. V., Zhao X. Y., Swami S., Brive L., Peehl D. M., Ely K. R. et al. (2002) A glucocorticoid-responsive mutant androgen receptor exhibits unique ligand specificity: therapeutic implications for androgen-independent prostate cancer. *Endocrinology* **143**: 1889–1900
- 16 Berrevoets C. A., Umar A., Trapman J. and Brinkmann A. O. (2004) Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor corepressor (N-CoR). *Biochem. J.* **379**: 731–738
- 17 Marcelli M., Ittmann M., Mariani S., Sutherland R., Nigam R., Murthy L. et al. (2000) Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* **60**: 944–949
- 18 Ceraline J., Erdmann E., Erbs P., Cruchant M., Jacqmin D., Duclos B. et al. (2003) A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur. J. Endocrinol.* **148**: 99–110
- 19 Ceraline J., Cruchant M. D., Erdmann E., Erbs P., Kurtz J. E., Duclos B. et al. (2004) Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **108**: 152–157
- 20 De Vos P., Claessens F., Winderickx J., Van Dijck P., Celis L., Peeters B. et al. (1991) Interaction of androgen response elements with the DNA binding domain of the rat androgen receptor expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**: 3439–3443
- 21 Luisi B. F., Xu W. X., Otwinowski Z., Freedman L. P., Yamamoto K. R. and Sigler P. B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**: 497–505
- 22 Sali A. and Blundell T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**: 779–815
- 23 Laskowski R. A., Moss D. S. and Thornton J. M. (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231**: 1049–1067
- 24 Hendlich M., Lackner P., Weitckus S., Floeckner H., Froschauer R., Gottsbacher K. et al. (1990) Identification of native protein folds amongst a large number of incorrect models: the calculation of low energy conformations from potentials of mean force. *J. Mol. Biol.* **216**: 167–180
- 25 Shaffer P. L., Jivan A., Dollins D. E., Claessens F. and Gewirth D. T. (2004) Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4758–4763
- 26 Verrijdt G., Schoenmakers E., Haelens A., Peeters B., Verhoeven G., Rombauts W. et al. (2000) Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers: evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **275**: 12298–12305
- 27 Roche P. J., Hoare S. A. and Parker M. G. (1992) A consensus DNA binding site for the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* **6**: 2229–2235
- 28 Kumar R. and Thompson E. B. (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* **64**: 310–319
- 29 Necela B. M. and Cidlowski J. A. (2004) A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. *J. Biol. Chem.* **279**: 39279–39288



The original publication is available at www.springerlink.com

ANNEXE 2 : PUBLICATION 2

“A splicing variant of the androgen receptor exhibits exclusively cytoplasmic actions.”.

**A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits
exclusively cytoplasmic actions**

Abbreviated Title: Cytoplasmic actions of an AR splice variant

Monika Jagla¹, Marie Fève¹, Pascal Kessler², Gaëlle Lapouge¹, Eva Erdmann¹, Sebastian Serra³, Jean-Pierre Bergerat^{1,3}, and Jocelyn Céraline^{1,3}

¹Université Strasbourg - Fac de Médecine/ Signalisation et Cancer de la Prostate/EA 3430, STRASBOURG-67000 France

²Plate-forme technologique d'Imagerie, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1, rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

³CHRU Strasbourg, hôpital de Hautepierre, Département d'Hématologie et d'Oncologie, Strasbourg, F-67000 France.

Disclosure Statement : The Authors have nothing to declare

Correspondence to:

Dr Jocelyn Céraline, Université Strasbourg - Fac de Médecine/Signalisation et Cancer de la Prostate/ EA 3430, Médicale A/CHRU, STRASBOURG F-67091 France; Phone: +33 3 9024 5452; Fax: +33 3 9024 5451; E-mail: jocelyn.ceraline@medecine.u-strasbg.fr

Key words:

Androgen receptor aggregates; Splice variant; Cytoplasmic activities

Grants

This study was supported by the Faculté de Médecine of the Université Strasbourg, and grants from the associations ARECOH/ATGC, ARTP, the Ligue Nationale contre le Cancer, and the Association pour la Recherche sur le Cancer.

ABSTRACT

The androgen receptor (AR) is a ligand-activated transcription factor that displays genomic actions characterized by binding to androgen-response elements in the promoter of target genes, and non-genomic actions, which do not require nuclear translocation and DNA-binding. In this study, we report exclusive cytoplasmic actions of a splicing variant of the AR detected in a metastatic prostate cancer (PCa). This AR variant, named AR23, results from an aberrant splicing of intron 2, wherein the last 69 nucleotides of the intronic sequence are retained, conducting to the insertion of 23-amino acids between the two zinc fingers in the DNA-binding domain. We show that the nuclear entry of AR23 upon dihydrotestosterone (DHT) stimulation is impaired. Alternatively, DHT-activated AR23 forms cytoplasmic and perinuclear aggregates that partially colocalize with the endoplasmic reticulum and are devoid of genomic actions. However, in LNCaP cells, this cytoplasmic DHT-activated AR23 remains partially active as evidenced by the activation of transcription from androgen responsive promoters, the stimulation of NF- κ B transcriptional activity, and by the decrease of AP-1 transcriptional activity. Our data reveal novel cytoplasmic actions for this splicing AR variant suggesting a contribution in PCa progression.

INTRODUCTION

During the last decade, increasing data implicated the androgen receptor (AR) in the progression of PCa to androgen independence, and finally in hormone therapy failure. It is well established that during PCa progression mutant AR variants with altered activities emerge to support tumor cells growth in an androgen-depleted environment (1). Nevertheless, the exact function of these mutant ARs, and their impact on androgen signaling pathways remain to be explored. As a member of the superfamily of nuclear receptors, AR is a ligand-activated transcription factor controlling the expression of specific genes in target tissues (2, 3). In the absence of androgens, AR is localized in the cytoplasm and is associated with heat shock proteins (HSPs). Upon stimulation by the agonist 5 α -dihydrotestosterone (DHT), AR dissociates from HSPs, translocates into the nucleus, and binds to androgen-response elements (AREs) present in the promoter of AR target genes (4,5).

These genomic actions of AR are modulated by coregulators, including coactivators and corepressors (6-7). The coactivator p300 and its functional homolog CREB-binding protein (CBP) bridge the transcriptional machinery to AR, while members of the p160 family of coactivators modify locally the chromatin structure through their histone acetyltransferase or ATP-dependent

chromatin-remodeling activities. On the other side, a number of corepressors that associate with AR have been shown to affect AR transactivation. The SMRT/NCoR corepressor recruits histone deacetylases to transcriptional initiation sites. Other factors like Cyclin D1 or Filamin A can interrupt the interaction between AR and its coactivators, or the interaction between the N-terminus and the C-terminus of AR. Corepressors like calreticulin by interacting with the KVFFKR motif located in AR DBD could inhibit the nuclear translocation of AR (8).

Recent reports suggest that AR can also mediate androgen non genomic signaling, which does not require AR nuclear translocation and DNA-binding (9). AR and other steroid hormone nuclear receptors are able to activate the MAPK/ERK signaling pathway through a mechanism independent of their transcriptional activities (10). Moreover, AR mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) in androgen-sensitive epithelial cells, which results in the phosphorylation of the downstream AKT/protein kinase B. This activation of the PI3K/AKT pathway by AR acts as an anti-apoptotic stimulus (11).

AR mutations are a recurrent event during the progression of PCa on androgen ablation therapy. These mutations are supposed to confer to the AR new functional properties allowing the AR to support PCa cell growth and survival despite the low levels of androgens

resulting from the ablation therapy. A previously described yeast-based functional assay (12, 13) is used to screen PCa specimen for AR mutations. In the present study, we report the detection of a splicing AR variant, named AR23, with an insertion of 23 amino acids between the two zinc fingers of the DBD in a hormone refractory metastatic PCa. We present data demonstrating that this splicing AR variant exhibits exclusively cytoplasmic activities, affecting the activity of transcription factors such as NF- κ B and AP-1. The potential role of such splicing AR variant in PCa progression will be discussed. Also, as this splicing AR variant has been described in two cases of partial androgen insensitivity syndrome, its residual functions are worth to be taken into account (14, 15).

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

All steroids, phenol red free Dulbecco's modified Eagle's and RPMI 1640 media, and mycoplasma screened fetal calf serum (FCS) were from Sigma Aldrich (Saint-Fallavier, France). Primers were from MWG (MWG Biotech France SA, Courtaboeuf, France).

METHODS

Clinical report

The patient was diagnosed with a metastatic prostate cancer and was first treated with Goserelin and bicalutamide. A clinical response to this complete androgen blockade was obtained for 12 months, and the PCa relapsed thereafter. Different secondary lines of hormone therapy associating successively Goserelin with estramustine, cortisol or etoposide were performed thereafter and gave only short responses. Two years after the first line of hormone therapy and after informed consent a bone marrow aspirate at a scintigraphic-indicated bone metastasis site was obtained. Microscopic observations from an aliquot of the sample confirmed the presence of metastatic PCa. The sample was assayed for AR mutations with the previously described yeast functional assay (13).

Plasmids

The MMTV-LTR-luciferase reporter

plasmid containing glucocorticoid responsive elements (GREs) was a gift from Pr. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France). The PSA-61-luciferase reporter plasmid containing a 6-kb fragment of the human *PSA* gene promoter was from Dr. Trapman (Erasmus University, Rotterdam). Luciferase reporter plasmids for cell proliferation and differentiation (pTA-luc, pTA-AP-1-luc, pTA-CRE-luc, pTA-SRE-luc, and pTA-ISRE-luc) and for PKC and calcium signaling pathways (pTA-NF- κ B-luc and pTA-NFAT-luc), the pEGFP-C3 plasmids, and the pDsRed2-ER plasmid designed for the fluorescent labeling of the endoplasmic reticulum, were purchased from BD Clontech (Ozyme, St Quentin Yvelines, France). The yeast plasmid pAR23 expressing the mutant AR23 was derived from the yeast functional assay used to screen the tumor sample for AR mutations (13). The pEGFP-AR_{WT} and the pEGFP-AR23 were constructed as follows: The full-length human AR cDNA was amplified from pSV-AR0 with the 5'-primer with *Xho* I linker, 5'-GCCAAGCTCGAGAGGATGGAAG T-3' and the 3'-primer with *Bam*H I linker, 5'-TAGGGATCCAATGCTTCACTGGG-3'. The amplified *Xho* I - *Bam*H I AR fragment was inserted into the corresponding cloning site in the pEGFP-C3 vector, yielding the pEGFP-AR_{WT}. Exchanging the *Eco*R I - *Bam*H I fragment of the pEGFP-AR_{WT} with the mutant counterpart obtained from the yeast expression vector pAR23 generated the pEGFP-AR23 plasmid.

Cell lines and cell cultures

AR negative COS-1 cells (SV40-transformed African Green Monkey kidney fibroblasts), obtained from Pr. P. Chambon (IGBMC, Illkirch, France), and were cultured in phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10 % FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. The human androgen sensitive prostate carcinoma cell line LNCaP clone FCG (ECACC, Salisbury, UK) was cultured in RPMI 1640 medium supplied with 10 % FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, pH 7.3, and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Luciferase reporter assays

Transient transfections were performed in both cell lines, using JetPEI transfection reagent (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. To analyze AR specific transcriptional activities, LNCaP and COS-1 cells were seeded in 12-well plates (8×10^4 cells/well) in complete medium. Twenty-four hours after seeding, cells were transfected with 2 μ g of reporter plasmid pMMTV-LTR-luc or PSA-61-luc in combination with 1 μ g of pEGFP-C3, pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23. Twenty-four hours after transfection, 100 nM DHT or vehicle was added. Luciferase activities were assayed 24 hours later using the Luciferase Assay System purchased from Promega (Promega, Charbonnières, France) and a TD-20/20 luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA). To evaluate non-genomic transcription factors activities, LNCaP cells were seeded in 24-well plates (5×10^4 cells) in complete medium, and were cotransfected with 0.5 μ g of the corresponding pTA-luciferase vector together with 0.5 μ g of pEGFP-C3, pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23. Cells were allowed to recover 24 hours in the presence of 10 % FCS medium, and then were cultured for additional 24 hours in serum-free medium. Thereafter, cells were treated with 100 nM DHT or vehicle, and luciferase activities were assayed 24 hours later. The induction of luciferase activity is indicated in arbitrary units (AU).

Subcellular localization

LNCaP cells (8×10^4 cells) were seeded on Labteck slides (Nalge Nunc Int. Corp., Naperville, IL, USA) in complete medium and transfected 48 hours later using the JetPEI transfection reagent (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) and 2 μ g of pEGFP-C3, pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23. Twenty-four hours after transfection, complete medium was replaced by fresh medium without FCS and containing 100 nM DHT or vehicle. At the indicated time after hormone stimulation, slides were rinsed with PBS, and fixed in 2 % paraformaldehyde. For the dose-response study, LNCaP cells were seeded in 12-well plates (8×10^4 cells/well) in complete medium, and transfected with 0.5, 1, or 2 μ g of EGFP-AR23

construct. Twenty-four hours after transfection, complete medium was replaced by fresh medium without FCS and containing 100 nM DHT or vehicle. Then, cells were rinsed with PBS 24h after hormone stimulation, and fixed in 2 % paraformaldehyde. Nuclei were stained with Hoechst 33258 solution, and slides were mounted for visualization with a confocal microscope (Leica confocal SP2 UV inverted DMIRBE microscope) using the 40x or the 100x oil immersion objective. For cellular fractionation, LNCaP cells were cultured in 100 mm dishes (2×10^6 cells) in phenol red complete medium, and were transfected with 15 μ g of pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23 and JetPEI transfection reagent. Twenty-four hours after transfection, cells were treated or not with 100nM DHT. Then, cellular fractionation was performed at indicated times after DHT stimulation with the ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Protein extracts were thereafter loaded on 7.5 % SDS-PAGE, and blotted onto nitrocellulose membranes. AR was revealed with mouse IgG2a monoclonal antibody G122-434 (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France), and visualized by chemiluminescence detection (GE Healthcare Life Sciences, Saclay, France). The EGFP tag was detected with rabbit IgG polyclonal anti-GFP (FL) antibody (sc8334, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, USA) and peroxidase-conjugated goat-anti-rabbit IgG (170-6515, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), and visualized as for AR.

Immunoblotting

Protein extracts were prepared from transfected LNCaP cells, and loaded on a 7.5 % SDS PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting. Blots were probed with the mouse IgG2a mAb G122-434 against human AR (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France) or after stripping, with the mouse IgG_{1 κ} mAb C4 against β -actin (Chemicon International, Hampshire, UK). Blots were incubated with peroxidase-

conjugated secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, BD Biosciences Pharmingen) and detection was carried out with the chemiluminescence Western blotting kit (GE Healthcare, Saclay, France). Signals were quantified using the Gel Doc 2000 imaging system and the QuantityOne™ software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), and normalized with the signal corresponding to β -actin.

Colocalization studies

LNCaP cells (8×10^4 cells) were seeded on Labteck slides (Nalge Nunc Int. Corp., Naperville, IL, USA) in complete medium, and transfected 48 hours later using the JetPEI transfection reagent and 2 μ g of pEGFP-C3, pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23. Endoplasmic reticulum colocalization experiments were done by cotransfecting cells with 1 μ g of one of the pEGFP plasmids in combination with 1 μ g of pDsRed2-ER vector. Twenty-four hours after hormone stimulation, slides were rinsed with PBS, and fixed in 2 % paraformaldehyde. Nuclei were stained using Hoechst solution (1 μ g/ml) and slides were mounted for visualization with a confocal microscope (Leica confocal SP2 UV inverted DMIRBE microscope) using the 100x oil immersion objective.

RESULTS

A new AR variant detected in a hormone-refractory metastatic PCa results from an aberrant exon/intron splicing

A new AR variant with an insertion of 69 nucleotides in position 2882 (Genbank, NM_000044) was detected in a patient with a hormone refractory metastatic PCa, by using a previously described yeast functional assay (13). The 69-nucleotides insertion was corresponding to the 3'-part of intron 2 of the human AR gene (Genbank, M27425), suggesting the persistence of an intronic sequence in the mature AR transcript. The insertion occurred at the junction of exon 2 and exon 3, which encode respectively for the first and the second zinc finger. The normal splicing of the intron 2 in AR pre-mRNA implies the 5'- splice donor site AG/GU in position 99376 and the 3'- splice acceptor site AG/GG in position 141977 (Genbank,

NC_000023) (FIG.1A). For this AR variant, an alternative cryptic 3'- splice acceptor site AG/AA present in position 141908 (Genbank, NC_000023) was used during the maturation process. The analysis of this new AR variant cDNA sequence did not reveal any mutation in the classical donor or acceptor splice sites. As a result of this aberrant splicing, the last 69 nucleotides of intron 2 persist in AR transcripts and give rise to a mutant protein p.[Glu588_Gly589insGluIleProGluGluArgAspSerGlyAsnSerLeuSerGlyLeuSerThrLeuValPheValLeuPro] named AR23 (FIG. 1B). These supplementary nucleotides do not lead to a premature termination codon, but to the insertion of 23 amino acids in position 588 between the two zinc fingers of AR23 DBD (FIG. 1C).

The 23 amino acids insertion affects the AR intracellular trafficking

In order to check whether this insertion could influence the nuclear translocation of AR23, we further analyzed the cellular localization of this mutant AR after DHT stimulation in the LNCaP cell line. Cells were transfected with pEGFP-C3, pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23 expression vectors, and were treated with 100 nM DHT or vehicle. The localization of fluorescent protein was examined by confocal microscopy twenty-four hours after hormone treatment. The intracellular distribution of the EGFP-C3 alone (control) was not affected by the hormone treatment (FIG. 2A. a, b). As expected the EGFP-AR_{WT} was translocated in the nucleus after DHT stimulation and presented a cytosolic pattern in vehicle-treated cells (FIG. 2A. c, d). On the contrary, the DHT-activated AR23 was unable to enter in the nucleus, but formed rather cytosolic and perinuclear aggregates (FIG. 2A. e, f, and insert 2A f). The formation of these aggregates was DHT-dependent as in vehicle-treated cells AR23 presented a similar expression pattern to that of wild type AR. Similar results were obtained in PC-3 cells, an AR negative PCa cell line, and in COS-1 cells, an AR negative and non prostatic cell line (data not shown). This particular intracellular distribution of DHT-activated AR23 was not due to the EGFP tag as aggregates were also evidenced by AR23 immunoassaying in COS-1 cells (data not

shown). Furthermore, a dose-response study using increasing amounts of EGFP-AR23 construct was conducted to check whether the aggregates formation was not due to an overexpression of the mutant AR. The formation of AR23 aggregates was independent of the quantity of AR23 expression plasmid used (FIG. 2B), suggesting that aggregates did not result from an overexpression of AR23.

Next, a time course experiment was performed in LNCaP cells to follow the intracellular trafficking of AR23 before the formation of aggregates. While, the DHT-activated wild type AR, was completely translocated into the nucleus twenty minutes after stimulation (FIG. 2C. a, c), the AR23 still exhibited a diffuse cytoplasmic expression pattern (FIG. 2C. b, d). The perinuclear aggregates formed by AR23 was noticeable forty minutes after DHT stimulation (FIG. 2C. f). By this time, AR23 depicted any nuclear distribution (FIG. 2C. f). These data indicate that the 23 amino acids insertion between the two zinc fingers impairs AR23 nuclear entry after hormone stimulation, and suggest also, that perinuclear aggregates are unlikely due to a nuclear export process of the AR23.

These data were supported by subcellular fractionation followed by western-blot analysis performed in transfected LNCaP cells at different times after DHT stimulation. In these experiments, intracellular movement dynamics of EGFP-AR_{WT} and EGFP-AR23 could be followed. As expected, the evolution of the signal corresponding to the wild type AR in the cytosolic (F1), membranes (F2) and nuclear (F3) fractions was reflecting normal dynamics of intracellular movement of AR in LNCaP cells after DHT stimulation (FIG. 2D). Besides, the intranuclear trafficking of the AR23 seemed to be altered. Indeed, the AR23 was never retrieved in the nuclear fraction (F3) after DHT stimulation, whatever the time of observation, but seemed rather to accumulate in the cytosolic and in the membranes fractions (FIG. 2D).

Altogether, these results suggest that the insertion of 23 amino acids between the two zinc fingers in the DBD leads to the cytoplasmic retention of AR after DHT treatment, and that this DHT-activated

AR23 forms aggregates in the cytoplasm and in a perinuclear membrane compartment.

AR23 localizes partially in endoplasmic reticulum after DHT stimulation

As the insertion of the following 23 amino acids p.[Glu588_Gly589insGluIleProGluGluArgAspSerGlyAsnSerLeuSerGlyLeuSerThrLeuValPheValLeuPro] between the two zinc fingers of the AR DBD seems to retain the AR in a perinuclear membrane compartment upon DHT stimulation, we next screened this peptide sequence for any similarity with known targeting signal in databases. Sequence alignments and standard dynamic programming-based alignments methods (BLAST over SWISS-PROT) were used to identify any functional motif or membrane-targeted signal within the 23 amino acids insertion. A canonical casein kinase II (CK-II) phosphorylation site was present within the 23 amino acids insertion. Potential relatedness (59% of identity) was found with the cytoplasmic domain of the Vpu protein of human immunodeficiency virus type I (HIV-I). This cytoplasmic domain is known to be responsible for the transport of Vpu to the rough endoplasmic reticulum/Golgi cellular compartment. Similarly, identities were also observed with a short peptide within the Rho-GTPase activating protein (88% of identity) and the Protocadherin gamma C3 precursor (77% of identity). These two proteins are also known to interact with the Golgi/rough endoplasmic reticulum thus, suggesting that AR23 could carry an endoplasmic reticulum (ER) interaction domain.

In order to determine if the DHT-activated AR23 colocalized with the ER, LNCaP cells were cotransfected with a plasmid encoding the fluorescent protein DsRed2 tagged with the KDEL peptide, an ER localization motif, in combination with the indicated EGFP-AR fusion construct. A similar distribution pattern could be observed between AR23 aggregates and the ER marker. Indeed, the cytoplasmic and perinuclear aggregates formed by the AR23 partially colocalized with the small dots formed by the DsRed2-ER fusion protein in the cytoplasm and in nuclear invaginations (FIG. 3 a-d). Such co-distribution pattern was not

observed with the EGFP-AR_{wt} construct or the control (FIG.3, e-l). Together, all these data suggest that the DHT-activated AR23 was partially retained in the endoplasmic reticulum.

The AR23 loses its genotropic actions but remains partially active in prostate cancer cells

Due to the particular intracellular distribution of the AR23 upon DHT stimulation, classical genomic activities of the AR are expected to be completely abolished. To verify this possibility, AR23 transcriptional activities were analyzed by *Luciferase* reporter assays performed in COS-1 cells. Cells were co-transfected with the PSA-61-luc or the MMTV-LTR-luc promoter constructs in combination with the indicated pEGFP plasmid. Both PSA-61 and the MMTV-LTR promoters are known to be AR responsive. Basal levels of MMTV-LTR and PSA promoters activities were obtained in the presence of pEGFP-C3 negative control plasmid (FIG. 4A and 4B). As expected, a strong and ligand-dependent up-regulation of these two promoters was observed in the presence of the wild type AR upon DHT stimulation. Indeed, an 8-fold increase of transcriptional activities was obtained from the two promoters in the presence of DHT-activated wild type AR. Besides, upon DHT stimulation, AR23 failed to induce transcription from these two promoters (FIG. 4A and 4B). These data could not be explained by a lower expression of AR23 in transfected COS-1 cells compared with wild type AR, as western blot analyses showed that the two ARs depicted identical expression levels in transfected cells (FIG. 4C). These data are in agreement with the cytosolic retention of DHT-activated AR23.

To confirm these results, AR23 transcriptional activities were investigated in a PCa cell line. The AR-positive LNCaP cells were co-transfected with the PSA-61-luc or the MMTV-LTR-luc promoter constructs in combination with the pEGFP-AR_{WT}, the pEGFP-AR23 or the pEGFP-C3 expression plasmid as control. In the presence of the pEGFP-C3 control plasmid, transcriptional activities measured in LNCaP cells, referred to the endogenous AR. As expected, a weak and DHT-dependant up-regulation of the two promoters by the endogenous AR could be observed (FIG. 4D

and 4E). In the presence of the wild type AR, transcriptional activities from the two promoters were further increased after DHT treatment. In these conditions, the transcriptional activity observed in the presence of the wild type AR was 3-times (PSA-61) and 1.5-times (MMTV-LTR) higher than that observed in the presence of the control plasmid alone and results from the combined transcriptional activities of the endogenous and the wild type ARs. Unexpectedly, a DHT-dependent augmentation of transcriptional activities from the two promoters, reaching a similar magnitude to that observed in the presence of the wild type AR, was obtained with the AR23 (FIG. 4D and 4E), despite the impaired nuclear localization of this AR variant (FIG. 2A, insert f). These data revealed unexpected actions of the AR23 in a PCa cell line, despite its exclusively cytoplasmic localization. As a consequence of the cytoplasmic retention of the DHT-activated AR23, the up-regulation of the two androgen-responsive promoters in the presence of this receptor should involve a second intermediate factor, which could be the endogenous AR present in LNCaP cells.

Next, we wondered whether the AR23 could influence the level of expression of the endogenous AR. A western blot analysis was performed on protein extracts prepared from LNCaP cells transfected with pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23 expression plasmid. Cells were treated with 100 nM DHT or left untreated. As expected, the intensity of the signal corresponding to endogenous AR significantly increased after DHT treatment. Moreover, the intensity of the signal corresponding to the endogenous AR was 1.5-fold higher in the presence of DHT activated AR23 than in the presence of the wild type AR (FIG.4F). These data indicate a potential effect of the AR23 on the level of expression or on the stability of the endogenous AR in transfected LNCaP cells.

The cytoplasmic AR23 affects transcriptional activities of NF- κ B and AP-1

Transcription factors involved in cell proliferation and differentiation like cAMP Response Element Binding Protein (CREB), E2F, Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT1/STAT2), Serum

Response Factor (SRF), Activating Protein 1 (AP-1), and those implicated in PKC and calcium signaling pathways like Nuclear Factor kappa B (NF- κ B), Nuclear Factor Activated T-cells (NFAT), could be regulated from the cytoplasm. Thus, in order to investigate whether the cytoplasmic AR23 is able to influence the activity of these transcription factors, we performed different *luciferase* gene reporter assays, in which the *luciferase* gene was placed under the tight control of a minimal promoter containing a TATA-box (pTA-luc) alone or linked to known transcription factors binding sites. Thus, LNCaP cells were transiently co-transfected with one of the EGFP-AR constructs together with the indicated luciferase reporter plasmid, and luciferase activities were measured 24 hours after DHT treatment. Luciferase activities measured were reflected the level of activity of the corresponding transcription factor studied. By co-transfected LNCaP cells with an AR expression plasmid, our intention was to determine the impact of the expressed AR on the activity of the transcription factors present in this cell line (FIG.5A).

Transcriptional activities from the pTA-luc construct were extremely low, whatever the pEGFP construct used. These activities correspond to the negative control and indicate that further regulatory elements are necessary to conduct transcription from this minimal promoter (FIG.5B). In our experimental conditions, the use of regulatory elements corresponding to CRE, E2F, ISRE, and NFAT-luciferase constructs did not enhance any further this basal transcriptional activity (data not shown).

On the contrary, transcriptional activity from the SRE construct was enhanced in the presence of the DHT-activated wild type AR (FIG.5C). Besides, only a basal transcriptional activity, similar to that obtained in the presence of the endogenous AR was observed in AR23 transfected cells. These data indicate that contrary to the wild type AR, the AR23 variant was unable to stimulate activities of the Serum Response Factor (SRF) transcription factor.

A weak NF- κ B transcriptional activity was observed when LNCaP cells were co-transfected with pEGFP-C3 and pTA-NF- κ B-luc (FIG. 5D). This basal activity was enhanced by

DHT treatment, and could result from the activation of the endogenous AR in LNCaP cells. The NF- κ B transcriptional activity was further increased in the presence of EGFP-AR_{WT} and amplified again by DHT treatment. Similarly, NF- κ B transcriptional activity was also induced in the presence of DHT-stimulated AR23.

Also, AR23 seemed to have an effect on AP-1 activities. Indeed, an unexpected decrease of AP-1 transcriptional activity was obtained in the presence of AR23 (FIG. 5E). In this experiment, basal AP-1 transcriptional activities were observed in LNCaP cells cotransfected with pEGFP-C3 and pTA-AP-1-luc construct. These basal AP-1 activities were not affected by hormone treatment. A moderate increase of AP-1 activity (1.9-fold) was observed in LNCaP cells in the presence of DHT-activated EGFP-AR_{WT} compared with the vehicle-treated cells. However, in the presence of AR23, AP-1 activity was below the basal level measured in LNCaP cells transfected with the control plasmid (FIG. 5E).

Together, our findings indicate that AR23 could affect transcriptional activities of AP-1 and NF- κ B transcription factors in LNCaP cells.

DISCUSSION

It is well established that during PCa progression mutant ARs with distinguished transcriptional activities emerge to support tumor cells growth in an androgen-depleted environment (16). In this study, we described new functional properties of AR23, an AR splicing variant detected in a hormone refractory metastatic PCa.

Transcripts of this particular AR variant are characterized by a 69-nucleotides insertion between exon 2 and exon 3. The inserted sequence results from an aberrant splicing using a cryptic acceptor site in intron 2, and corresponds to the last 69 nucleotides of intron 2. Actually, according to the AR23 cDNA sequencing, we could not explain this aberrant splicing by the presence of a mutation. Nevertheless, we can not exclude a mutation relating to the donor or to the acceptor splicing site in the intronic sequence.

Androgen receptor splicing variants

resulting from the use of the same cryptic acceptor site within the intron 2 have already been reported in two cases of partial androgen insensitivity syndrome (PAIS) (14, 15). Moreover, other splicing errors at different exon/intron junctions have already been described in patients with androgen insensitivity (17-19). In addition, naturally occurring or pathologic splice variants are common in other members of the nuclear receptor superfamily (20). However, to our knowledge, the present study is the first report of an AR splicing variant isolated from PCa.

The 69-nucleotides insertion between the two zinc fingers of the DBD does not lead to a premature termination codon, but to the addition of 23 amino acids: p.[Glu588_Gly589insGluIleProGluAspSerGlyAsnSerLeuSerGlyLeuSerThrLeuValPheValLeuPro]. As this peptide sequence is similar to that detected in two cases of PAIS previously described, we can predict that the AR23 displays also normal ligand binding capacities (14, 15).

This particular AR variant being detected in both PAIS, wherever the AR conserves a residual activity, and in PCa, suggests that the AR23 retains some function. In this regard, little is known about how the inserted peptide affects AR activities.

Importantly, the 23-amino acids insertion occurs in a key region of the DBD, between the carboxyl-terminal part of the first zinc finger, which contains the P-box responsible for specific DNA-binding and the nuclear export signal, and the second zinc finger that contains the dimerization domain and a nuclear localization signal. We demonstrated that the addition of 23 amino acids in this key region of the DBD influences the subcellular compartmentalization of the AR by impairing its translocation from the cytoplasm to the nucleus after ligand binding. The DHT-activated AR23 forms rather cytoplasmic and perinuclear aggregates that are unrelated to an overexpression of the mutant AR. These cytoplasmic aggregates should not be confused with the androgen-induced nuclear aggregation of ARs that contain an expanded glutamine tract in spinal and bulbar muscular atrophy (21). In our study, the AR23 is unable to be translocated into the nucleus. In the case of the wild type AR,

androgen binding induces a conformational change that reveals the bipartite nuclear-localization signal (NLS) that overlaps the DBD and hinge region (22). Once exposed, the NLS can be recognized by import receptors such as importin- α and importin- β , which mediate translocation of the AR through the nuclear-pore complex (23). The conformation adopted by the 23 amino acids may impair these interactions with importins, and affects the normal nucleocytoplasmic shuttling of the receptor. Consequently, the DHT-activated AR23, which cannot be translocated into the nucleus, should aggregate in the cytoplasm or within a particular organelle. Another possibility could be the presence of an additional targeting signal within the amino acids insertion, which targets the mutant AR to a special subcellular compartment.

By the use of subcellular fractionation, we determined that the DHT-activated AR23 was predominantly in the membranes fraction, and confocal microscopy analyses indicate a partial colocalization with the endoplasmic reticulum (ER). This is in agreement with the homology between the 23 amino acids insertion and short peptides from proteins known to interact with the ER such as the Vpu of HIV-1 (24), the Rho-GTPase activating protein, and the protocadherin gamma C3 precursor (25, 26). Indeed, within protocadherin gamma C3, six amino acids (EIPEER) out of the 23 were identical to a part of the cadherin repeat domain 1, a calcium-binding motif (26). Thus, the 23 amino acids insertion could contain a signal motif for targeting intracellular organelles such as the endoplasmic reticulum. Nevertheless, the determination of the exact localization of the DHT-activated AR23 requires further investigations. In the light of these preliminary results, we wonder what could be the functional consequences of such localization of an AR variant.

The ER is an important and dynamic organelle that represents the storage compartment for the majority of intracellular calcium (27). Calcium has been shown to be a critical factor for regulating cell proliferation, cell adhesion and cell migration (28-30). It remains to be determined whether or not the mutant AR could interfere with these calcium-

mediated signaling pathways. Moreover, it has been reported that membrane micro-domains commonly called “lipid rafts” are implicated in several signal-transduction mechanisms by serving as platforms for assembling signaling complexes. It has also been demonstrated that wild type AR is able to form complexes with other signaling complexes in rafts that were isolated from LNCaP cells (31, 32). Besides, the 23 amino-acids insertion tail, which is enriched in hydrophobic amino acids as the LVFVL motif, could stabilize the anchoring of the AR23 in those “lipid rafts” (FIG. 1.C).

Thus, it seems possible that the AR23 is at a crucial position to trigger signals from the cytoplasm. This observation is confirmed by data obtained from functional analyses performed in LNCaP cells. We demonstrated that the coexpression of the AR23 in this cell line, which expresses an endogenous AR, leads to an increase of transcriptional activities from the MMTV-LTR and the human *PSA* gene promoters, two AR-responsive promoters, after DHT stimulation. These activities could not be attributed to a direct action of the AR23, as this mutant AR could not be translocated into the nucleus after DHT binding. Furthermore, the AR23 has no effect on these two promoters in an AR negative COS-1 cells. The presence of the endogenous AR in LNCaP cells seems to be a prerequisite for AR23 activities on androgen-responsive promoters. Thus, the cytoplasmic DHT-activated AR23 was still functional in AR positive PCa cells, and could trigger a signal to the nucleus to enhance transcription from androgen-responsive promoters. Nevertheless, this model supposes the coexpression of AR23 together with a normal AR in PCa cells.

As these data highlight possible cytoplasmic actions of the AR23, we further investigated whether AR23 could also affect from the cytoplasm the signaling pathway of transcription factors involved in cell proliferation and survival. In this report, we demonstrated that luciferase activity measured from the SRE-luc construct increased in a DHT-dependent manner in the presence of the wild-type AR. This correlates with the observation that the DHT-activated AR can be recruited by SRF to activate SRE-containing promoters (33). On the contrary, luciferase activity was not enhanced from this

SRE-luc reporter construct in the presence of AR23, due to the inability of this mutant AR to translocate into the nucleus. These results illustrate one of the consequences of the loss of genomic activities of AR23.

On the contrary, data obtained with the NF- κ B-luc and AP-1-luc constructs showed that despite this lack of genomic actions, the AR23 could affect transcriptional activities of NF- κ B and AP-1. Therefore, we demonstrated that the AR23 was able to increase NF- κ B activity in PCa cells. The NF- κ B family of transcription factors is known to regulate the expression of adhesion molecules that promote cell migration and cell-cell interactions (34). Another function of NF- κ B is to induce expression of genes that contribute to tumor progression such as anti-apoptotic genes and genes that regulate cell growth (34, 35). We demonstrated that in transfected LNCaP cells, NF- κ B transcriptional activity was enhanced in the presence of AR23 at a similar level to that observed in the presence of the wild type AR. These effects could not be attributed to a direct action of the wild type or mutant AR on the promoter construct used in these assays, as this promoter does not contain androgen responsive elements, but three NF- κ B binding sites juxtaposed to a TATA box to control the expression of the luciferase gene.

Although the relationship between the AR expression and NF- κ B activation is still poorly understood (35), our results suggest that the cytoplasmic mutant AR23 could influence the activity of NF- κ B in PCa cells. Therefore, the DHT-activated AR is also known to activate in a non genomic way the PI3K/Akt signaling pathway (11), and Akt can activate NF- κ B pathway by phosphorylation of I κ B α kinases (IKKs) (36, 37). It remains to know whether this AR non genomic pathway contributes to NF- κ B activities measured in our experiments in the presence of the wild-type or the mutant AR.

The decrease of AP-1 activity observed in the presence of AR23 is intriguing. AP-1 is a complex transcription factor composed of members of the Jun family associated with related proteins of the Fos or ATF family (38, 39). Interactions between c-Jun and the DBD/hinge region of the wild-type AR have been reported to modulate reciprocally both AP-

1 and AR transcriptional activities (40, 41). To explain the loss of AP-1 activity in the presence of AR23, it remains to know whether these interactions are affected by the 23 amino acids insertion within the DBD. Nevertheless, as demonstrated by confocal microscopy performed in transfected LNCaP cells, the endogenous c-Jun is not sequestered in AR23 cytoplasmic aggregates, suggesting a different mechanism than c-Jun sequestration to explain the loss of AP-1 activity (unpublished data).

The transcription factor AP-1 has been implicated in cell growth, differentiation, and development by mediating gene regulation in response to a various range of physiological and pathological stimuli (39). Also, AP-1 is involved in PCa cell death by enhancing the expression of pro-apoptotic factors such as TNF α (Tumor Necrosis Factor α) and FasL, or by repressing the transcription of the anti-apoptotic factor c-FLIP (cellular- FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE)- inhibitory protein long isoform) in prostate cancer (39,42-44). These studies together with our data indicating a decrease in AP-1 activity in the presence of AR23 suggest that AR23 may contribute to tumor progression by protecting PCa cells from apoptosis. However, further studies are required to evaluate consequences of this loss of AP-1 activity on cell proliferation or survival.

These cytoplasmic activities should be distinguished from classical non-genomic activities. Indeed, non-genomic activities are measured within minutes after hormone stimulation and not after several hours as observed with AR23 (9-11).

Taken together, our data demonstrate that the 23 amino acids insertion abolishes genomic actions of the AR and promotes novel cytoplasmic actions. These novel functions are worth to be taken into account for residual activity of the AR splicing variant in PAIS. Also, our results suggest that an exclusively cytoplasmic AR could play an important role in PCa progression and open up a new field of investigation in non-genomic AR functions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Serra (Département d'Oncologie Hôpital Civil, Strasbourg, France) and V. Lindner (Service d'Anatomo-Pathologie, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France) for clinical sample acquisition. We are grateful to P. Kessler, J. Vonesch and D. Hentsch from the imagery unit at IGBMC (IGBMC, Illkirch, France) for rendering possible the confocal microscopy studies.

This work is part of a clinical study managed by the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg approved by the Ethic Committee, CCPPRB – Alsace1, and supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2002. These studies were supported by the Faculté de Médecine of the Université Strasbourg, and grants from the associations ARECOH/ATGC, ARTP, the Ligue Nationale contre le Cancer and the Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

1. **Lee HJ, Chang C** 2003 Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci* 67:1613-1622
2. **Evans RM** 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895
3. **Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM** 1988 Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 240:327-330
4. **Haelens A, Verrijdt G, Callewaert L, Christiaens V, Schauwaers K, Peeters B, Rombauts W, and Claessens F** 2003 DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation. *Biochem J* 369:141-151
5. **Wickert L, Selbig J** 2002 Structural analysis of the DNA-binding domain of alternatively spliced steroid receptors. *J Endocrinol* 173:429-436

6. **Edwards J, Bartlett JM** 2005 The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int* 95:1327-1335
7. **Culig Z, Comuzzi B, Steiner H, Barsch G, Hobisch A** 2004 Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92:265-271
8. **Wang L, Hsu CL, Chang C** 2005 Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* 63:117-130
9. **Kousteni S, Han L, Chen J-R, Almeida M, Plotkin L, Bellido T, Manolagas SC** 2003 Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 111:1651-1664
10. **Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC** 2001 Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 104:719-730
11. **Baron S, Manin M, Baudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veysiére G, Morel L** 2004 Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem* 279:14579-14586
12. **C eraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz JE, Duclos B, Jacqmin D, Chopin DK, Bergerat JP** 2004 Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer* 108:152-157
13. **C eraline J, Erdmann E, Erbs P, Cruchant M., Jacqmin, D, Duclos B, Klein Soyer C, Dufour P, Bergerat JP** 2003 A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol* 148:99-110
14. **Br uggenwirth HT, Boehmer AL, Ramnarain S, Verleun-Mooijman MC, Satijn DP, Trapman J, Grootegoed JA, Brinkmann AO** 1997 Molecular analysis of the androgen-receptor gene in a family with receptor-positive partial androgen insensitivity: an unusual type of intronic mutation. *Am J Hum Genet* 61:1067-1077
15. **Jaaskelainen J, Mongan NP, Harland S, Hughes IA** 2006 Five novel androgen receptor gene mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome. *Hum Mutat* 27(3):291.
16. **Taplin ME, Balk SP** 2004 Androgen Receptor: A Key Molecule in the Progression of Prostate Cancer to Hormone Independence. *J Cell Biochem* 91: 483-490
17. **Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Faber PW, Schweikert HU, van Rooij HC, Zegers ND, Hodgins MB, Degenhart HJ, Trapman J, Brinkmann AO** 1990 Aberrant splicing of androgen receptor mRNA results in synthesis of a nonfunctional receptor protein in a patient with androgen insensitivity. *Proc Natl Acad Sci* 87: 7866-7870
18. **Hellwinkel OJ, Bull K, Holterhus PM, Homburg N, Struve D, Hiort O** 1999 Complete androgen insensitivity caused by a splice donor site mutation in intron 2 of the human androgen receptor gene resulting in an exon 2-lacking transcript with premature stop-codon and reduced expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 68: 1-9
19. **Sammarco I, Grimaldi P, Rossi P, Cappa M, Moretti C, Frajese G, Geremia R** 2000 Novel point mutation in the splice donor site of exon-intron junction 6 of the androgen receptor gene in a patient with partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3256-3261
20. **Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K** 2003 Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab* 14:124-129
21. **Katsuno M, Adachi H, Tanaka F, Sobue G** 2004 Spinal and bulbar muscular atrophy: ligand-dependent pathogenesis and therapeutic perspectives. *J Mol Med* 82:298-307
22. **Black BE, Paschal, BM** 2004 Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends Endocrinol Metab* 15:411-417
23. **Paschal BM** 2002 Translocation through the nuclear pore complex. *Trends Biochem. Sci.* 27:593-596

24. **Gomez LM, Pacyniak E, Flick M, Hout DR, Gomez ML, Nerrienet E, Ayouba A, Santiago ML, Hahn BH, Stephens EB** 2005 Vpu-mediated CD4 down-regulation and degradation is conserved among highly divergent SIV(cpz) strains. *Virology* 335:46-60
25. **Dubois T, Paleotti O, Mironov AA, Fraasier V, Stradal TE, De Matteis MA, Franco M, Chavrier P** 2005 Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nat Cell Biol* 7: 353-364
26. **Frank M, Kemler R** 2002 Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* 14:557-562
27. **Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y** 2004 Ca²⁺ homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1326-1335
28. **Berridge MJ, Bootman MD, and Lipp P** 1998 Calcium-a life and death signal. *Nature* 395:645-648
29. **McConkey DJ, Orrenius S** 1997 The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239:357-366
30. **Vanoverberghe K, Vanden F, Abeele Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N** 2004 Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 11: 321-330
31. **Freeman MR, Cinar B, Lu ML** 2005 Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 16: 273-279
32. **Zhuang L, Lin J, Lu ML, Solomon KR, Freeman MR** 2002 Cholesterol-rich lipid rafts mediate akt-regulated survival in prostate cancer cells. *Cancer Res* 15;62: 2227-2231
33. **Vlahopoulos S, Zimmer WE, Jenster G, Belaguli NS, Balk SP, Brinkmann AO, Lanz RB, Zoumpourlis VC, Schwartz RJ** 2005 Recruitment of the androgen receptor via serum response factor facilitates expression of a myogenic gene. *J Biol Chem* 280:7786-7792
34. **Suh J, Rabson AB** 2004 NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J. Cell Biochem* 91:100-117
35. **McKay LI, Cidlowski JA** 1999 Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20:435-459
36. **Lee SO, Lou W, Nadiminty N, Lin X, Gao AC** 2005 Requirement for NF-(kappa)B in interleukin-4-induced androgen receptor activation in prostate cancer cells. *Prostate* 64:160-167
37. **Peant B, Diallo JS, Lessard L, Delvoe N, Le Page C, Saad F, Mes-Masson AM** 2007 Regulation of IkappaB kinase epsilon expression by the androgen receptor and the nuclear factor-kappaB transcription factor in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 5:87-94
38. **Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M** 2004 AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117: 5965-5973
39. **Shaulian E, Karin M** 2002 AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131-6.
40. **Bubulya A, Wise SC, Shen XQ, Burmeister LA, Shemshedini L** 1996 c-Jun can mediate androgen receptor-induced transactivation. *J Biol Chem* 271: 24583-24589
41. **Sato N, Sadar MD, Bruchovsky N, Saatcioglu F, Rennie PS, Sato S, Lange PH, Gleave ME** 1997 Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. *J Biol Chem* 272:17485-17494
42. **Zhang X, Jin TG, Yang H, DeWolf WC, Khosravi-Far R, Olumi AF** 2004 Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. *Cancer Res* 64:7086-7091
43. **Gonzalez-Guerrico AM, Meshki J, Xiao L, Benavides F, Conti CJ, Kazanietz MG** 2005 Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells. *J Biochem Mol Biol* 38(6):639-645
44. **Li W, Zhang X, Olumi AF** 2007 MG-132 sensitizes TRAIL-resistant prostate cancer cells by activating c-Fos/c-Jun heterodimers and repressing c-FLIP(L). *Cancer Res* 67:2247-2255

LEGENDS

Figure 1

The 69 nucleotides insertion in AR23 results from an exon/intron splicing error. (A). Representation of the region between exon 2 and exon 3 of the human AR gene (Genbank, NC_000023) indicating the normal splicing of intron 2. Positions corresponding to the normal 5'-splice donor (99376) and 3'- splice acceptor (141977) sites are represented. (B) Representation of the cryptic splice acceptor site at the 3'-end of intron 2 (position: 141908) was used to generate a transcript with an additional 69-nucleotides upstream exon 3. (C). Schematic representation of the human AR DBD showing the two zinc fingers, the P- and D-boxes, the nuclear export signal (NES), and the 23 amino acids inserted in position 588 (Genbank NM_000044).

Figure 2

The 23 amino acids insertion affects the AR intracellular trafficking. LNCaP cells were transfected as described in Materials and Methods with the indicated pEGFP construct, and the intracellular localization of the EGFP, EGFP-AR_{WT} or EGFP-AR23 was followed by confocal microscopy. (A). Localization of EGFP as a control (a, b), and EGFP-AR_{WT} (c, d) or EGFP-AR23 (e, f) fusion proteins, 24 h after DHT treatment. Vertical panels represent vehicle (a, c, e) or 100 nM DHT (b, d, f) treated cells. AR 23 was unable to enter in the nucleus upon DHT stimulation, but formed rather cytoplasmic and perinuclear aggregates (compare d and f, and see insert f). (B). Dose response study indicating that the formation of aggregates was not due to an overexpression of AR23. LNCaP cells were transfected with increasing amounts of pEGFP-AR23 construct, 0.5 μ g (a, b), 1 μ g (c, d) and 2 μ g (e, f) and were treated (b, d and f) or not (a, c and e) with 100nM DHT. Images were collected with a Leica SP2 (UV) inverted DMIRBE confocal microscope, using a 40x objective. Plasmid dose influences only the percentage of transfected cells and not the formation of aggregates. (C). Kinetics experiments revealing the formation of aggregates forty minutes after DHT treatment (compare e and f). Confocal microscopy was used to realize a time course experiment in order to evaluate the formation of aggregates by AR23 upon DHT 100 nM stimulation. Results for pEGFP-AR_{WT} (a, c and e) or pEGFP-AR23 (b, d and f) are shown. Scale bar indicates 12.7 μ M. Confocal images were collected with a Leica SP2 (UV) inverted DMIRBE confocal microscope, using a 100x oil immersion objective. (D). Intracellular movement dynamics of EGFP-AR_{WT} and EGFP-AR23 were studied by cellular fractionation of LNCaP cells and western-blot analysis. The wild type AR exhibited a cytoplasmic expression pattern (F1) in the absence of DHT. Within 40 min after DHT addition, the wild type AR was redistributed in membranes and nuclear fractions (F2 and F3), while the mutant AR23 was not detected in the nuclear fraction (F3), but remained in the cytosolic and membranes fractions (F1 and F2).

Figure 3

AR23 localizes partially in endoplasmic reticulum after DHT stimulation. Confocal microscopy showing partial AR23 colocalization with endoplasmic reticulum (ER). LNCaP cells were transiently transfected with pEGFP-AR23 (a-d) pEGFP-AR_{WT} (e-h) or pEGFP-C3 as a control: (i-l), in combination with pDsRed2-ER expression plasmid in complete medium. Vertical panels represent separate channels, DAPI, EGFP, DsRed2-ER and merged images. The EGFP-AR23 partially colocalized with ER-marker in the cytoplasm and in nuclear invaginations (a-d). This co-distribution pattern was not observed with the EGFP-AR_{WT} construct or the control (e-l). Scale bar indicates 12.7 μ M. Confocal images were collected with a Leica SP2 (UV) inverted DMIRBE confocal microscope, using a 100x oil immersion objective.

Figure 4

The AR23 losses its genomic actions but remains partially active in prostate cancer cells. Transcriptional activities of wild type AR or of the mutant AR23 were measured in COS-1 (A, B) or in LNCaP (D, E). Cells were transfected with pEGFP-C3 as a control, pEGFP-AR_{WT} or pEGFP-AR23 plasmids in combination with pPSA61-Luc (A, C) or the pMMTV-Luc (B, E) luciferase reporter vectors.

Cells were treated with DHT (+) or vehicle (-) for 48 h. Cells extracts were subsequently assayed for luciferase activity. In the AR negative COS-1 cells, the wild type AR exhibited genotropic actions from the two androgen-responsive promoters whereas the AR23 was unable to directly activate transcription from these two promoters. (C.) Western-blot analysis representing the expression level of EGFP-AR_{WT} and EGFP-AR23 in COS-1 cells. Similar expression pattern could be observed for the two receptors. (D, E) Transcriptional activities of the wild type AR or AR23 from PSA61 (D) and MMTV-LTR (E) were measured in androgen sensitive LNCaP cell line. Both, the wild type AR and AR23 enhance transcription the two androgen-responsive promoters in a DHT-dependent manner. Values are given in arbitrary units (AU). Data represented the mean assays performed in triplicate +/- SEM. (F.) Western-blot analysis representing the evaluation of expression level of the endogenous AR in LNCaP cells transfected with the EGFP-AR_{WT} or the EGFP-AR23. The histogram represents ratio of quantified signals corresponding to the transfected and endogenous ARs normalized with the signal corresponding to β -actin. The expression level of the endogenous AR is 1.5-fold increased in the presence of the DHT-activated AR23 that in the presence of the wild type AR.

Figure 5

Effects of wild type AR and AR23 on AP-1 and NF- κ B transcriptional activities.

(A). Schematic representation of the study conducted to determine the impact of AR23 on the activities of different transcription factors (TF): cAMP Response Element Binding Protein (CREB), E2F, Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT1/STAT2), Serum Response Factor (SRF), Activating Protein 1 (AP-1), Nuclear Factor kappa B (NF- κ B), Nuclear Factor Activated T-cells (NFAT) in LNCaP transfected cells. If the expressed AR influences the activity of a TF, the *luciferase* gene expression from the promoter construct containing the binding site for this TF will be affected. (B-E). Histograms representing luciferase activities obtained respectively from pTA-Luc (B), pTA-SRE-Luc (C), pTA-NF- κ B-Luc (D) and pTA-AP-1-Luc (E) in LNCaP cells cotransfected with the pEGFP-C3 as control or the pEGFP-AR expression plasmid and with the indicated reporter plasmid. Cells were thereafter treated with 100nM DHT (+) or left untreated (-). Luciferase activities were recorded 24 h after DHT stimulation. The cytoplasmic DHT-activated AR23 influences AP-1 and NF- κ B transcriptional activities. Values are indicated in arbitrary units (AU). Data represent the mean of assays performed in triplicate +/- SEM.

Figure 1

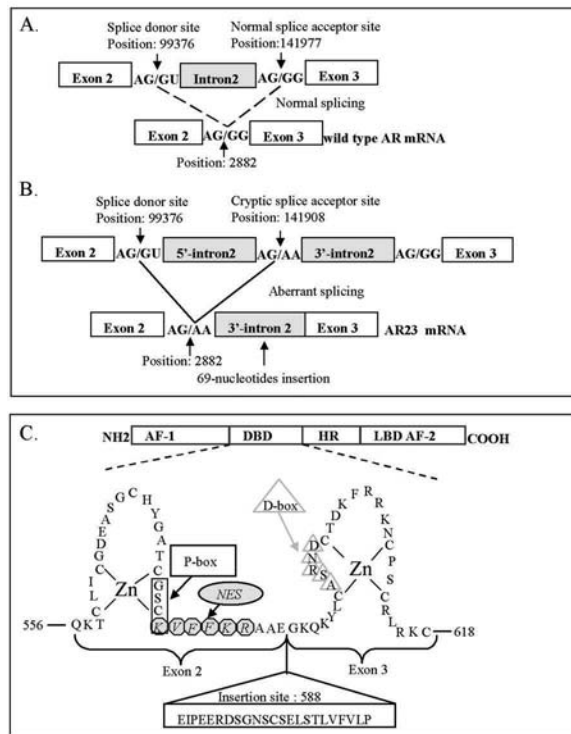


Figure 2

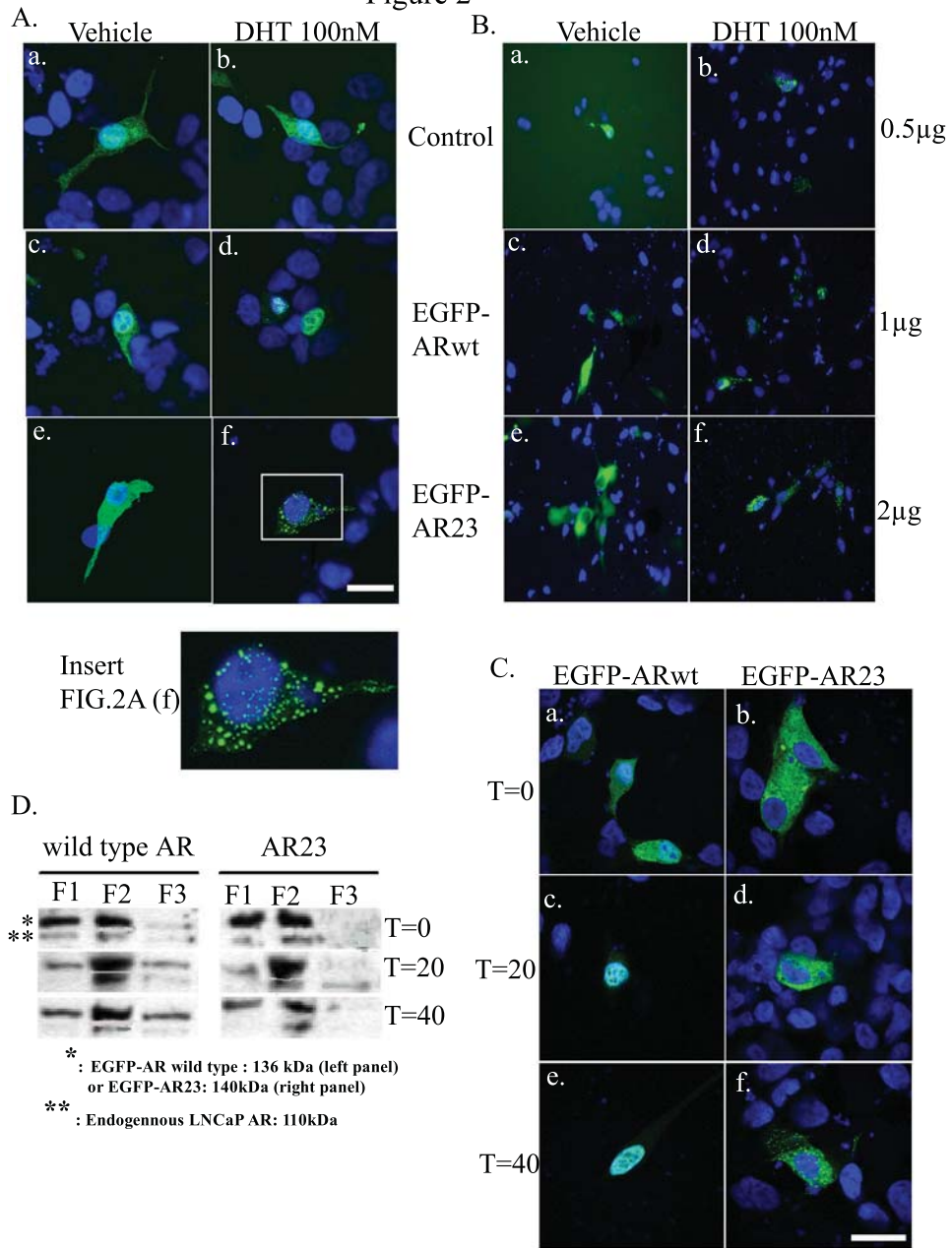


Figure 3

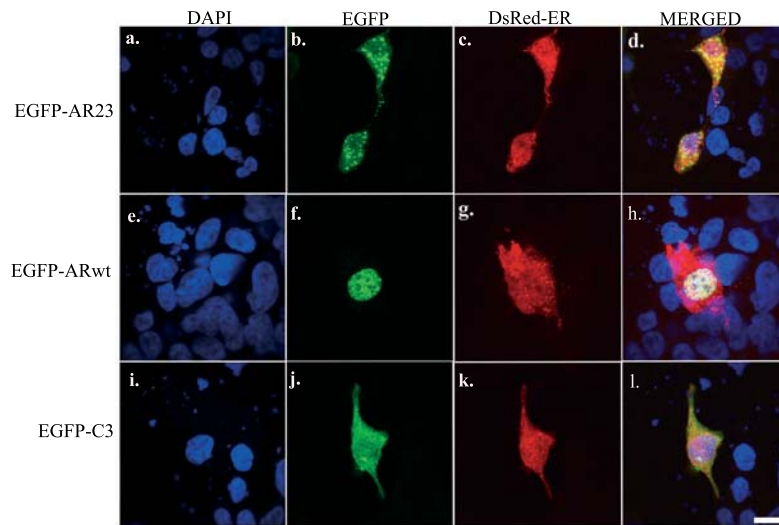


Figure 4

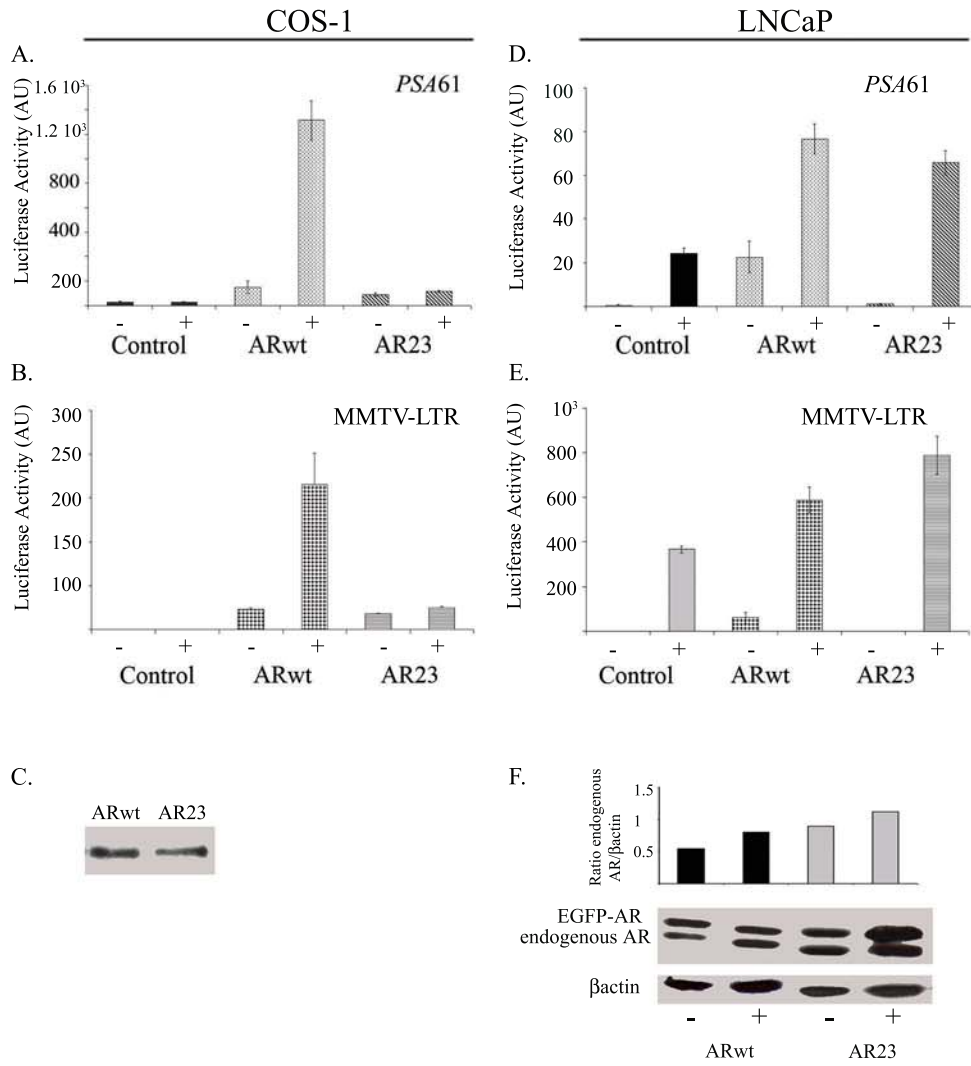
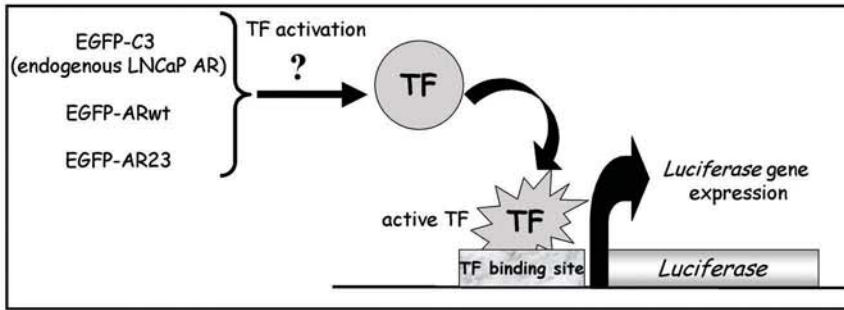
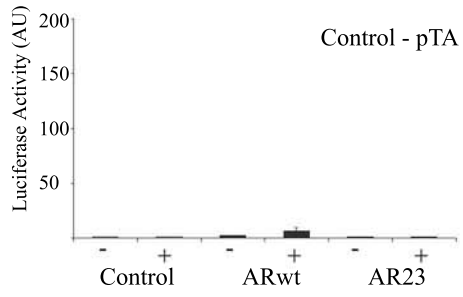


Figure 5

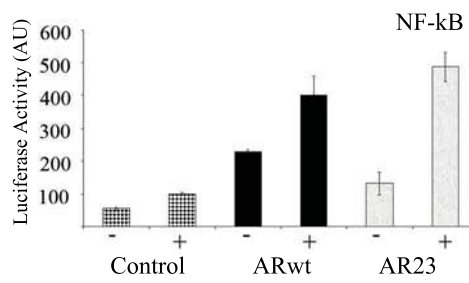
A.



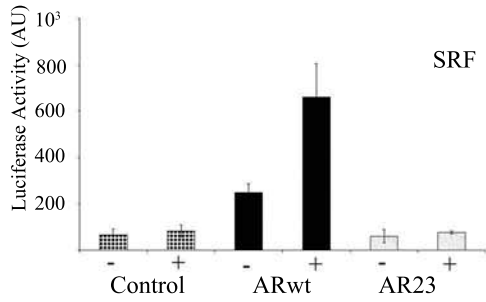
B.



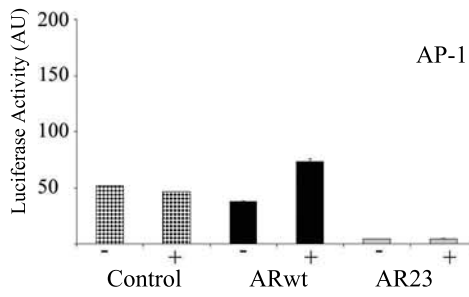
D.



C.



E.



Résumé en français :

Les objectifs de ma thèse ont été d'étudier deux mutations du domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur des androgènes (RA) détectées dans le cancer de la prostate (CaP). La mutation T575A affecte la liaison à l'ADN du RA muté et le recrutement de co-régulateurs, conduisant probablement à la formation d'un complexe d'activation transcriptionnelle distinct de celui formé par le RA sauvage. D'autre part, une insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD, provoque un défaut de localisation nucléaire du récepteur muté (AR23) et lui confère de nouvelles propriétés cytoplasmiques. Sa localisation atypique sous forme d'agrégats au niveau des membranes le placerait au cœur de la signalisation cellulaire à l'interface entre l'apoptose et la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces résultats montre les différentes fonctions qui peuvent être affectées par une mutation au niveau du DBD du RA et l'impact potentiel de telles mutations sur l'évolution de CaP.

Abstract in English

The objectives of my thesis were to study two mutations naturally occurring in the DNA binding domain (DBD) of the androgen receptor (AR). These two mutations were detected in prostate cancer (PCa). The T575A mutation modifies the binding of the receptor to the DNA and the recruitment of Co-regulators, probably leading to the formation of a distinct transcription complex from that formed by wild AR. The second mutation, an insertion of 23 amino acids between the two zinc fingers of the DBD, causes a defect of nuclear localization of the mutated receptor (AR23). Instead, the AR23 forms cytoplasmic aggregates that localize in the membrane compartment of the cell. This atypical localization confers to the AR23 new cytoplasmic properties and places AR23 at the interface between apoptosis and cellular proliferation. These results show various functions which can be affected by a single mutation in the DBD of the AR and the potential impact that such mutation may have on the PCa progression.