

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

Discipline : Sciences du vivant

par Audrey MONGE

CONSEQUENCES FONCTIONNELLES ET
STRUCTURALES DE L'ASSOCIATION
DE DEUX MUTATIONS DU
RECEPTEUR DES ANDROGENES DANS LE
CANCER DE LA PROSTATE

Soutenue publiquement le 24 septembre 2008

Membres du jury

<i>Directeur de thèse :</i>	Dr. Jocelyn CERALINE, ULP/EA3430, Strasbourg
<i>Rapporteur Interne :</i>	Dr. Daniel METZGER, IGBMC, Illkirch
<i>Rapporteur Externe :</i>	Pr. Bernard MALAVAUD, CHU de Rangueil, Toulouse
<i>Rapporteur Externe :</i>	Dr. Mohamed BENAHMED, INSERM U895, Nice
<i>Examineur :</i>	Pr. Bruno KIEFFER, ESBS, Illkirch

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse. Soyez assurés de ma reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Jean-Pierre Bergerat de m'avoir permis de rejoindre cette équipe pour réaliser mon DEA puis ma thèse.

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse le Docteur Jocelyn Céraline pour son enthousiasme, son aide et son soutien durant ces années.

Je tiens à remercier les deux organismes qui m'ont permis d'en arriver là. Merci à l'Alsace Thérapie Génique et Cancer (ATGC) et merci à l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP) pour leur soutien financier.

Je remercie beaucoup toute l'équipe de résonance magnétique nucléaire pour leur aide précieuse sur ce projet.

Merci à Eva Erdmann pour ton aide et ta gentillesse durant toutes ces années passées au laboratoire.

Merci à Christelle Siebert pour ton amitié ô combien précieuse, surtout dans les moments difficiles.

Merci également aux autres membres de l'équipe.

Un grand merci à mes parents sans qui je n'en serai pas là, merci pour votre présence, pour votre aide, pour votre amour. Je ne trouverai jamais les mots pour vous exprimer ma reconnaissance et mon amour. Merci pour tout.

Merci à ma sœur pour tous les moments de joie passés, et pour ceux à venir.

Et enfin, en dernier mais pas le moindre, un énorme merci à Fred pour ton soutien pendant toutes ces années. Il n'existe pas de mots pour t'exprimer mes sentiments, alors tout simplement merci pour ta présence, tes conseils et ton soutien....

ABREVIATIONS

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- AF-1 : Activation Fonction 1 ; Fonction d'activation 1
- AF-2 : Activation Fonction 2 ; Fonction d'activation 2
- AJCC : American Joint Committee on Cancer
- Akt : Oncogène du rétrovirus AKT (Acutely transforming retrovirus)
- ARE : Androgen Responsive Elements ; Elément de réponse aux androgènes
- ARN : Acide ribonucléique
- AP-1 : Activating protein 1
- β -Gal : β -galactosidase
- BAC : Blocage Androgénique Complet
- BET : Bromure d'éthidium
- BSA : Bovine Serum Albumine
- C(3)1 : Component
- CaP : Cancer de la prostate
- ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine
- CRE : cAMP Responsive Element
- CTE : C-terminal extension ; Extension C-terminale
- DBD : DNA Binding Domain ; Domaine de liaison à l'ADN
- DHT: Dihydrotestostérone
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DR : Direct Repeat ; Répétition Directe
- DTT : Dithiothréitol
- ECACC : European Collection of Cell Cultures
- EDTA : Ethylène Diamine Tetra-Acetate de sodium
- EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein
- ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ABREVIATIONS

- EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay
- ERE : Estrogen Responsive Elements ; Élément de réponse aux Estrogènes
- ERG : V-ETS Avian Erythroblastic Virus E26 Oncogen Related
- ETS : E26 Transformation-specific oncogen
- ETV : E26 Transformation-specific oncogen (ETS) variant gene
- FDA : Food and Drug Administration
- FGC : Fast Growth Cells
- FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
- FSH : Follicle-Stimulating Hormone ; Hormone Folliculo-Stimulante
- GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone
- GPD : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- GST : Glutathione-S-Transferase
- GTA : General Transcription Apparatus
- GRE : Glucocorticoid Responsive Elements ; Élément de réponse aux glucocorticoïdes
- HAT : Histone Acetyl-transferase
- HBP : Hyperplasie bénigne de la prostate
- HDAC : Histone DéAcétylase
- HMG1 : High Mobility Group protein 1
- HMG2 : High Mobility Group protein 2
- HRE : Hormone Responsive Elements ; Éléments de réponse aux hormones
- HSP : Heat Shock Protein ; Protéine de choc thermique
- HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
- IκK : IκB Kinase
- IL-6: Interleukine-6
- IPTG : Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
- IR : Inverted Repeat ; Répétition Inversée
- kb : Kilobase
- LB : Luria-Bertani
- LBD : Ligand Binding Domain
- LH : Luteinizing Hormone ; Hormone Lutéinisante

ABREVIATIONS

- LH-RH : Luteinising Hormone Releasing Hormone
- LNCaP : Lymph Node Cancer Prostate
- LTR : Long Terminal Repeat ; Longue repetition terminale
- MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus ; Virus de la tumeur mammaire de la souris
- MSS : Milieu sans sérum
- MST : Milieu sérum traité
- NCoR : Nuclear receptor CoRepressor
- NES : Nuclear Export Signal ; Signal d'export nucléaire
- NF- κ B : Nuclear Factor κ B
- NGF1-B : Nerve Growth Factor 1
- NL-1 : Nuclear Localisation 1
- NL-2 : Nuclear Localisation 2
- NLS : Nuclear Localisation Signal ; Signal de localisation nucléaire
- NTD : N-Terminal Domain ; Domaine N-Terminal
- ONPG : Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside
- PAP : Prostatic Acid Phosphatase ; Phosphatase acide prostatique
- pb : Probasine
- pb : Paire de bases
- PBS : Phosphate Buffered Saline
- p/CAF : p300/CBP-Associated Factor
- PDB : Protein Data Bank
- PES : Polyethersulfone
- PEI : Polyéthylènimine
- PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique
- PI3K : Phosphoinositol-3-kinase
- PIAS1 : Protein Inhibitor of Activated STAT1 ; Protéine inhibitrice de STAT-1 activé
- PIN : Néoplasie intra-épithéliale prostatique
- PKB : Protein Kinase B
- PSA : Prostate-Specific Antigen ; Antigène Spécifique de la Prostate
- RA : Récepteur des Androgènes

ABREVIATIONS

- RAC3 : Receptor Associated Coactivator 3
- RARE : Retinoic Acid Response Element ; Élément de réponse à l'acide Rétinoïque
- RE : Récepteur des œstrogènes
- RG : Récepteur des Glucocorticoïdes
- RM : Récepteur des Minéralocorticoïdes
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- RP : Récepteur à la Progestérone
- rpm : Rotation Par Minute
- RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
- sc : Secretory Component
- Ser : Sérine
- SHBG : Sex Hormone Binding Globulin ; Protéine de transport des stéroïdes sexuels
- SLA : Syndrome d'insensibilité aux androgènes
- slp : Sex Limited Protein
- SMRT : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors
- SRC-2 / SRC-3 : Steroid Receptor Coactivator 2 / Steroid Receptor Coactivator 3
- SRM : Molécules modulatrices spécifiques des récepteurs nucléaires
- StAR : Steroïdogenesis activator protein ; Protéine activatrice de la stéroïdogénèse
- STAT 3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
- SVF : Sérum de veau foetal
- SWI / SNF : Switching / sucrose nonfermenting
- TBP : TATA-Binding Protein ; Protéine de liaison à la boîte TATA
- TIF2 : Transcriptional Intermediary Factor 2
- TMPRSS2 : TransMembrane Proteases Serine2
- TNM : Tumeur Ganglion Métastase
- TRE : Thyroid Hormone Response Element ; Element de réponse pour l'hormone thyroïde
- TRP : Tryptophane
- UA : Unités Arbitraires
- 3'UTR : Untranslated Terminal Region 3' ; Région 3' non traduite

ABREVIATIONS

- VDR : Récepteur de la vitamine D
- wt : wild-type ; sauvage

- Acides Aminés :

A : Alanine (Ala)

R : Arginine (Arg)

N : Asparagine (Asn)

D : Acide Aspartique (Asp)

C : Cystéine (Cys)

E : Acide Glutamique (Glu)

Q : Glutamine (Gln)

G : Glycine (Gly)

H : Histidine (His)

I : Isoleucine (Ile)

L : Leucine (Leu)

K : Lysine (Lys)

M : Méthionine (Met)

F : Phénylalanine (Phe)

P : Proline (Pro)

S : Sérine (Ser)

T : Thréonine (Thr)

W : Tryptophane (Trp)

Y : Tyrosine (Tyr)

V : Valine (Val)

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1 :</u>	Biosynthèse des hormones stéroïdes dans les gonades	3
<u>Figure 2 :</u>	Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire	4
<u>Figure 3 :</u>	Conversion de la testostérone en dihydrotestostérone par l'enzyme 5 α -réductase	5
<u>Figure 4 :</u>	Organisation génique et principaux domaines fonctionnels du récepteur des androgènes	8
<u>Figure 5 :</u>	Classification de la superfamille des récepteurs nucléaires	10
<u>Figure 6 :</u>	Représentation schématique du récepteur des androgènes	11
<u>Figure 7 :</u>	Région amino-terminale des récepteurs stéroïdes	11
<u>Figure 8 :</u>	Représentation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes	15
<u>Figure 9 :</u>	Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN	16
<u>Figure 10 :</u>	Complexes formés par le récepteur des androgènes (A) et le récepteur de la vitamine D (B) avec des éléments de réponse en répétition directe	18
<u>Figure 11 :</u>	Structure du domaine de liaison au ligand du récepteur des Androgènes	20
<u>Figure 12 :</u>	Mode d'action des androgènes	22
<u>Figure 13 :</u>	Modèle de formation du complexe de transcription du récepteur des androgènes	24
<u>Figure 14 :</u>	Lieu d'interaction des cofacteurs du récepteur des androgènes	25
<u>Figure 15 :</u>	Modèle de contribution des co-activateurs et co-répresseurs dans la détermination de l'activité agoniste / antagoniste des molécules modulatrices spécifiques des récepteurs nucléaires (SRM)	27
<u>Figure 16 :</u>	Liste de différents facteurs de transcription interagissant avec le récepteur des androgènes	31
<u>Figure 17 :</u>	Promoteur du gène PSA	34
<u>Figure 18 :</u>	Représentation schématique de la région régulatrice du gène TMPRSS2	35
<u>Figure 19 :</u>	Représentation de la prostate	38

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 20</u> :	Zones anatomiques de la prostate	39
<u>Figure 21</u> :	Relation entre les différents types cellulaires de la prostate	42
<u>Figure 22</u> :	Origine du cancer	45
<u>Figure 23</u> :	Biomarqueurs candidats pour la détection de cancers de la prostate	50
<u>Figure 24</u> :	Représentation schématique des stades T de la classification TNM du cancer de la prostate (AJCC de 2002)	52
<u>Figure 25</u> :	Système de classement des tumeurs réalisé par D. Gleason en 1974	54
<u>Figure 26</u> :	Caractère de différenciation des tumeurs	55
<u>Figure 27</u> :	Incidence du nombre de cancer de la prostate en fonction de l'âge des hommes	56
<u>Figure 28</u> :	Incidence standardisée pour le cancer de la prostate en fonction de l'origine ethnique	58
<u>Figure 29</u> :	Portraits de Charles B. Huggins	64
<u>Figure 30</u> :	Traitement du cancer de la prostate par les agonistes de la LH-RH	67
<u>Figure 31</u> :	Réponse d'un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique à différentes tentatives d'hormonothérapie	70
<u>Figure 32</u> :	Mutations du gène du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate	77
<u>Figure 33</u> :	Récapitulatif des origines de l'échappement hormonal dues au récepteur des androgènes	81
<u>Figure 34</u> :	Vecteur d'expression du récepteur des androgènes Gap Repair	83
<u>Figure 35</u> :	Principe du test fonctionnel du récepteur des androgènes chez la levure	84
<u>Figure 36</u> :	Résultats du test fonctionnel du récepteur des androgènes chez la levure	86
<u>Figure 37</u> :	Exemple de mutations détectées par le test fonctionnel chez la levure au sein du laboratoire	88
<u>Figure 38</u> :	Classification des différents éléments de réponse aux androgènes utilisés dans cette étude, en fonction de leur affinité et de leur spécificité vis-à-vis du récepteur des androgènes	93
<u>Figure 39</u> :	Conditions de transfection employées lors des tests luciférase	98
<u>Figure 40</u> :	Spectre de fluorescence des fluorochromes utilisés pour les études de microscopie confocale	103

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 41</u> :	Amorces utilisées pour les études du niveau d'expression des gènes PSA, RA endogène, EGFP et β -actine	105
<u>Figure 42</u> :	Représentation des séquences des domaines de liaison à l'ADN utilisés lors des études structurales	107
<u>Figure 43</u> :	Carte de restriction du plasmide pETM30-DBD	108
<u>Figure 44</u> :	Fractions d'élution obtenues suite à la gel filtration	110
<u>Figure 45</u> :	Hormonogramme obtenu chez un patient du protocole clinique	112
<u>Figure 46</u> :	Hormonogrammes du récepteur des androgènes sauvage, T877A, T575A et T575A/T877A	115
<u>Figure 47</u> :	Le niveau d'expression des récepteurs des androgènes sauvage ou mutants chez la levure est équivalent	116
<u>Figure 48</u> :	Localisation des récepteurs des androgènes sauvage et mutants T575A, T877A et T575A/T877A	118
<u>Figure 49</u> :	La mutation T575A dans le domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes affecte son activité transcriptionnelle	120
<u>Figure 50</u> :	La mutation T575A modifie la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse aux hormones du récepteur des androgènes	123
<u>Figure 51</u> :	La double mutation T575A/T877A confère de nouvelles propriétés au récepteur des androgènes double mutant	125
<u>Figure 52</u> :	La mutation T575A dans le domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes augmente son activité transcriptionnelle dans une lignée cellulaire prostatique	127
<u>Figure 53</u> :	La mutation T575A n'influence pas l'activation transcriptionnelle du récepteur des androgènes à partir de promoteurs minimum	128
<u>Figure 54</u> :	Les deux mutations T575A et T877A ne coopèrent pas dans la lignée prostatique LNCaP	131
<u>Figure 55</u> :	Le gène PSA est sur-exprimé en présence du récepteur des androgènes T575A	134
<u>Figure 56</u> :	Le niveau d'expression du gène TMPRSS2 n'est pas augmenté par la mutation T575A	136
<u>Figure 57</u> :	Etude de la co-localisation de SRC-2 par le récepteur des androgènes sauvage ou mutant T575A	141
<u>Figure 58</u> :	Etude de la co-localisation de SRC-3 par le récepteur des androgènes	

LISTE DES FIGURES

	sauvage ou mutant T575A	142
<u>Figure 59 :</u>	Etude de la co-localisation de NCoR par le récepteur des androgènes sauvages ou mutant T575A	143
<u>Figure 60 :</u>	Activité transcriptionnelle des récepteurs des androgènes sauvages et mutant T575A en présence de trois cofacteurs	146
<u>Figure 61 :</u>	Comparaison de séquence des domaines de liaison à l'ADN de différents récepteurs nucléaires	149
<u>Figure 62 :</u>	Arbre de regroupement des séquences du domaine de liaison à l'ADN de différents récepteurs nucléaires chez l'Homme	150
<u>Figure 63 :</u>	Modélisation du complexe RA (DBD) – ADN	152
<u>Figure 64 :</u>	Représentation schématique des séquences du domaine de liaison à l'ADN employés lors des études structurales	154
<u>Figure 65 :</u>	Affinité des domaines de liaison à l'ADN sauvages et mutant T575A de forme courte	156
<u>Figure 66 :</u>	Affinité des domaines de liaison à l'ADN sauvages et mutant T575A de forme longue	158
<u>Figure 67 :</u>	Structure des domaines de liaison à l'ADN des récepteurs des androgènes sauvages et mutant T575A	160
<u>Figure 68 :</u>	Etat de protonation de l'histidine en position 570 du récepteur des androgènes sauvages et mutant T575A	161
<u>Figure 69 :</u>	Représentation des mutations de l'histidine en position 570 du domaine de liaison à l'ADN	163
<u>Figure 70 :</u>	Effet de deux mutations de l'histidine en position 570 du récepteur des androgènes sauvages et mutant T575A sur leurs activités transcriptionnelles dans les cellules LNCaP	165
<u>Figure 71 :</u>	Effet de deux mutations de l'histidine en position 570 du récepteur des androgènes sauvages et mutant T575A sur leurs activités transcriptionnelles dans les cellules CV-1	167
<u>Figure 72 :</u>	Mécanisme d'activation du RA ligand-indépendant par l'intermédiaire de SRC-3	173

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
I. Les androgènes et le récepteur des androgènes	1
A. Les androgènes	1
1. Biosynthèse des androgènes	2
2. Régulation de la biosynthèse des androgènes	3
3. Transport des androgènes.....	5
4. Métabolisme de la testostérone	5
5. Catabolisme de la testostérone	6
B. Le récepteur des androgènes	7
1. Les récepteurs nucléaires	9
2. Structure du récepteur des androgènes	10
a. Région amino-terminale	11
b. Domaine de liaison à l'ADN.....	14
c. Région charnière	19
d. Région carboxy-terminale	19
3. Mode d'action du récepteur des androgènes	21
4. Interaction avec les cofacteurs.....	24
a. Composants de la machinerie de transcription	28
b. Co-régulateurs du RA	29
c. Facteurs de transcription spécifiques	30
5. Interaction endogène du récepteur des androgènes : interaction N-C....	32
6. Exemple de gènes cibles du récepteur des androgènes.....	33
a. Le gène PSA	33
b. Le gène TMPRSS2	34
II. La prostate et le cancer de la prostate	37
A. Anatomie et fonction de la prostate	37

TABLE DES MATIERES

B. Composition tissulaire de la prostate	39
1. Epithélium prostatique.....	40
2. Stroma prostatique.....	41
C. Histoire du cancer	42
D. Le cancer	43
E. Le Cancer de la Prostate	46
F. Origine du Cancer de la Prostate	47
G. Diagnostic du Cancer de la Prostate	48
H. Dépistage du Cancer de la Prostate	48
1. Dosage de l'Antigène Spécifique de la Prostate.....	48
2. Toucher rectal	51
I. Classification du Cancer de la Prostate	51
1. Classification TNM	51
2. Grade et score de Gleason	53
J. Facteurs de risque du Cancer de la Prostate	55
1. Age	56
2. Facteurs familiaux et hérédité	56
3. Facteurs ethniques, géographiques et environnementaux.....	58
4. Facteurs hormonaux et autres facteurs de croissance	59
a. Les androgènes	59
b. Le récepteur des androgènes.....	60
c. Enzyme 5 α -réductase	60
d. Facteurs de croissance.....	61
5. Facteurs provenant de l'alimentation.....	61
K. Traitements du Cancer de la Prostate	62
1. La prostatectomie radicale	62
2. La radiothérapie.....	63
a. La radiothérapie externe	63
b. La curiethérapie	64

TABLE DES MATIERES

3.	Traitement hormonal.....	64
a.	<i>Analogues de la LH-RH.....</i>	66
b.	<i>Antagoniste de la LH-RH.....</i>	67
c.	<i>Anti-androgènes.....</i>	68
d.	<i>Les œstrogènes.....</i>	69
e.	<i>Castration chirurgicale.....</i>	69
f.	<i>Conclusion sur le traitement hormonal.....</i>	69
4.	Chimiothérapie.....	71
5.	Surveillance (traitement différé).....	72
6.	Traitement de la douleur.....	72
7.	Traitements expérimentaux.....	72
 <i>L. Mécanismes de l'échappement hormonal.....</i>		73
1.	Amplification du récepteur des androgènes.....	74
2.	Augmentation de la sensibilité du récepteur des androgènes.....	74
3.	Augmentation des concentrations d'androgènes.....	74
4.	Activation du récepteur des androgènes indépendamment d'un ligand.....	75
5.	Activation des gènes de survie cellulaire.....	75
6.	Les mutations du RA.....	76
a.	<i>Mutations dans le domaine de liaison au ligand.....</i>	79
b.	<i>Mutations dans le domaine de liaison à l'ADN.....</i>	80
 <i>M. Détection des mutations du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate.....</i>		82
1.	Principe du test fonctionnel.....	82
2.	Résultats du test fonctionnel.....	85
 MATERIELS ET METHODES.....		90
 I. Les hormones.....		90
 II. Culture cellulaire.....		90
 III. Plasmides.....		91
1.	Plasmides d'expression du récepteur des androgènes.....	91
2.	Plasmides rapporteurs luciférase.....	92

TABLE DES MATIERES

3.	Plasmides d'expression des cofacteurs du récepteur des androgènes.....	93
IV.	Séquences des éléments de réponse aux androgènes.....	93
V.	Préparation d'ADN plasmidique	94
VI.	Quantification d'ADN plasmidique, contrôle de qualité.....	94
VII.	Origine des cellules cancéreuses prostatiques présentant la mutation T575A/T877A	95
VIII.	Transfections	96
1.	Préparation du sérum de veau fœtal traité au charbon dextran	96
a.	<i>Charbon dextran</i>	96
b.	<i>Sérum traité au charbon dextran</i>	97
2.	Transfections	97
IX.	Tests luciférase	99
1.	Principe.....	99
2.	Mesure de l'activité luciférase	99
3.	Exploitation des résultats.....	100
X.	Western blot chez la levure	100
XI.	Immunofluorescence.....	101
XII.	Microscopie confocale à balayage laser	101
1.	Principe.....	101
2.	Fluorochromes utilisés.....	102
3.	Expériences de co-localisation cellulaire entre le récepteur des androgènes sauvage ou le récepteur des androgènes muté T575A avec différents cofacteurs	103
XIII.	Extraction d'ARN et RT-PCR.....	104
XIV.	Test ELISA.....	106

XV. Modélisation et comparaison de séquences.....	106
XVI. Production des domaines de liaison à l'ADN sauvage et mutant T575A.....	107
XVII. Retardement sur gel	110
XVIII. Mutagénèse dirigée de l'histidine en position 570	111
RESULTATS ET DISCUSSION.....	112
<i>A. Analyse fonctionnelle du récepteur des androgènes T575A/T877A.....</i>	<i>114</i>
1. Test fonctionnel chez la levure.....	114
2. Localisation intracellulaire des récepteurs mutants.....	117
<i>B. Analyse des capacités d'activation transcriptionnelle des récepteurs mutants dans la lignée cellulaire CV-1.....</i>	<i>119</i>
1. Etude de la mutation T575A.....	119
2. Impact de la double mutation T575A/T877A sur les activités transcriptionnelles du récepteur des androgènes	124
<i>C. Etude des mutations T575A et T575A/T877A dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate</i>	<i>126</i>
1. Effet de la mutation T575A sur les activités transcriptionnelles du RA.	126
2. Effet de la double mutation T575A/T877A sur les activités transcriptionnelles du RA.....	130
3. Effet de la mutation T575A sur l'expression de deux gènes cibles du récepteur des androgènes.....	132
a. Gène PSA	132
b. Gène <i>TMPRSS2</i>	135
4. Impact de la mutation T575A sur le recrutement de cofacteurs par le récepteur des androgènes.....	138
5. Conclusion des études fonctionnelles	147

TABLE DES MATIERES

<i>D. Etude structurale de la mutation T575A</i>	148
1. Alignement de séquences et modélisation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes	148
2. Analyse de la liaison à l'ADN du récepteur des androgènes T575A par retardement sur gel	153
a. Principe	153
b. Résultats	154
3. Analyse structurale du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes par résonance magnétique nucléaire.....	159
4. Conséquences des mutations de l'histidine en position 570 sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs des androgènes sauvage et mutant T575A.....	162
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	169
BIBLIOGRAPHIE	179
<i>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES</i>	200
ANNEXE	203

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. Les androgènes et le récepteur des androgènes

A. Les androgènes

Les androgènes sont des hormones stéroïdes découvertes en 1936. Elles interviennent dans la régulation de nombreux aspects du développement masculin incluant le développement des organes sexuels, la croissance de la pilosité faciale, corporelle et pubienne, l'élargissement des cordes vocales, la perte des cheveux, la production de sperme, le développement musculaire et la croissance de la prostate.

La testostérone est le principal androgène circulant. Cette hormone masculine intervient notamment au niveau embryonnaire pour obtenir un phénotype masculin des embryons mâles. Elle est produite de façon quasi-exclusive (plus de 95%) par les cellules de Leydig du testicule, situées autour et entre les tubes séminifères, et qui représentent 5% du volume de la glande. La sécrétion globale de testostérone est de 5 à 7,5 mg/jour chez un homme adulte normal. Elle exerce une action quasi-ubiquitaire dans l'organisme de l'homme, directement ou par l'intermédiaire de sa bioconversion en un androgène plus puissant, la dihydrotestostérone (DHT) ou en un œstrogène puissant, l'œstradiol (E2). Des précurseurs des androgènes sont également synthétisés en plus faibles quantités par la glande surrénale et en quantités infinitésimales par le cerveau où l'action locale pourrait cependant être importante. Le contenu en testostérone du testicule de l'homme adulte est d'environ 1 µg/g de testicule, ce qui montre que la quasi-totalité de la testostérone sécrétée est libérée dans la circulation (Tostain *et al*, 2004).

1. Biosynthèse des androgènes

Le cholestérol est le précurseur de tous les androgènes. Les cellules de Leydig peuvent en assurer la synthèse à partir de l'acétate, mais elles utilisent surtout le cholestérol extrait des lipoprotéines plasmatiques ou des membranes cellulaires.

Le cholestérol contenant 27 carbones (C27) est transporté vers les mitochondries par un mécanisme dépendant de l'hormone lutéinisante (LH), régulé par une protéine de transfert dite protéine activatrice de la stéroïdogénèse (StAR ou Steroidogenic Acute Regulatory protein) (Stocco, 1997). Son rôle essentiel a également été décrit dans la surrénale et l'ovaire ainsi que dans le cerveau. Ce transfert intra-mitochondrial du cholestérol est l'étape limitante de la stéroïdogénèse. Cette dernière démarre dans la mitochondrie où le cholestérol est clivé en prégnénolone (C21) par le cytochrome P450_{scc} (side chain clivage), codé par le gène CYP11A. Deux facteurs contrôlent donc le taux de cette conversion : la disponibilité du précurseur cholestérol, et la quantité de P450_{scc}.

La prégnénolone, biologiquement inactive, est éjectée dans le réticulum endoplasmique où elle est convertie en une variété de stéroïdes C19 (figure 1). La prégnénolone peut alors être convertie en progestérone ou en 17 α -hydroxyprégnénolone. La voie préférentielle dans le testicule est la voie où la protéine P450_{c17} codée par le gène CYP17 hydroxyle le carbone 17 de la prégnénolone créant ainsi le premier composé intermédiaire, le 17 α -hydroxyprégnénolone (C21). Le clivage de la chaîne latérale par la P450_{c17} fait apparaître le premier stéroïde C19, la déhydroépiandrostérone (ou DHEA). L'action du complexe 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD) la transforme en 5-androstènediol, et l'action de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) convertie cette dernière en testostérone.

La deuxième voie de synthèse fait intervenir tout d'abord la 3 β -HSD pour former à partir de la prégnénolone la progestérone. Elle est par la suite hydroxylée par la P450_{c17} en 17 α -hydroxyprogestérone. Son clivage par la P450_{c17} aboutit à l'androstènedione (C19). Enfin, la testostérone est formée par l'action de la 17 β -HSD.

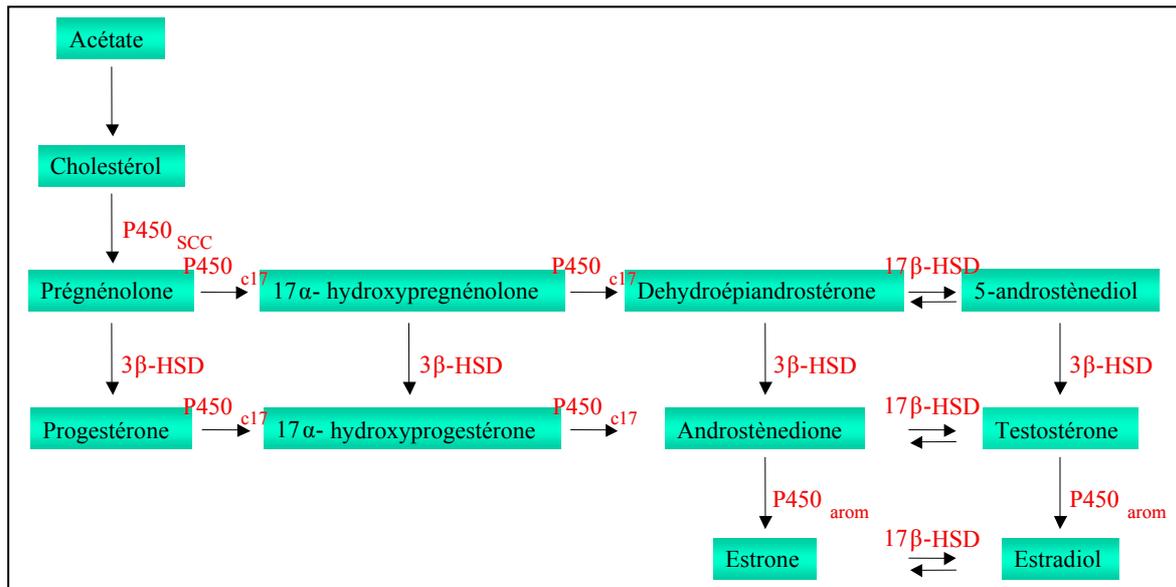


Figure 1 : Biosynthèse des hormones stéroïdes dans les gonades.

La testostérone peut être produite par deux voies, mais le précurseur est toujours le cholestérol, obtenu à partir de l'acétate ou à partir de l'alimentation. Les œstrogènes sont produits à partir de la testostérone ou de l'androsténedione. D'après Stanczyk et Bretsky, 2003.

La capacité du système enzymatique ne lui permettant pas de transformer la totalité de la prégnénolone en testostérone, la cellule de Leydig élimine des composés intermédiaires : DHEA, progéstérone, 17α-hydroxyprogéstérone et androsténedione.

2. Régulation de la biosynthèse des androgènes

La quantité d'androgènes présent dans le sérum et utilisable par les tissus est principalement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'intermédiaire de l'action de l'hormone lutéinisante (LH, luteinizing hormone) sur les cellules de Leydig. L'hypothalamus siège à la base du cerveau juste au-dessus de l'hypophyse, et possède des liens très fournis avec les autres régions cérébrales utiles aux fonctions viscérales, autonomes et comportementales. La partie antérieure de l'hypophyse (antéhypophyse ou adénohypophyse) sécrète plusieurs hormones dont les gonadotrophines, constituées de la FSH (hormone folliculo-stimulante ou follicle-

stimulating hormone) et de la LH. Ces dernières sont des glycoprotéines qui interviennent dans la régulation de la production d'androgènes. Schématiquement, la FSH favorise la spermatogénèse alors que la LH stimule la sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig.

La sécrétion de LH implique une boucle de contrôle complexe équilibrant les actions stimulantes des sécrétions hypothalamiques et l'action frénatrice des stéroïdes sexuels (figure 2). L'hypothalamus sécrète la LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) également nommée GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) qui va stimuler les cellules gonadotropes hypophysaires par l'intermédiaire de son récepteur GnRH-R. La fixation de l'hormone sur son récepteur permet la sécrétion de LH et à un degré moindre, de FSH. De l'autre côté, l'action frénatrice des stéroïdes sexuels, appelé couramment « feedback négatif » s'exerce au niveau hypothalamique et hypophysaire. En effet, la testostérone produite en trop grande quantité aura comme conséquence non seulement de diminuer l'expression de la LH mais aussi de ralentir sa libération.

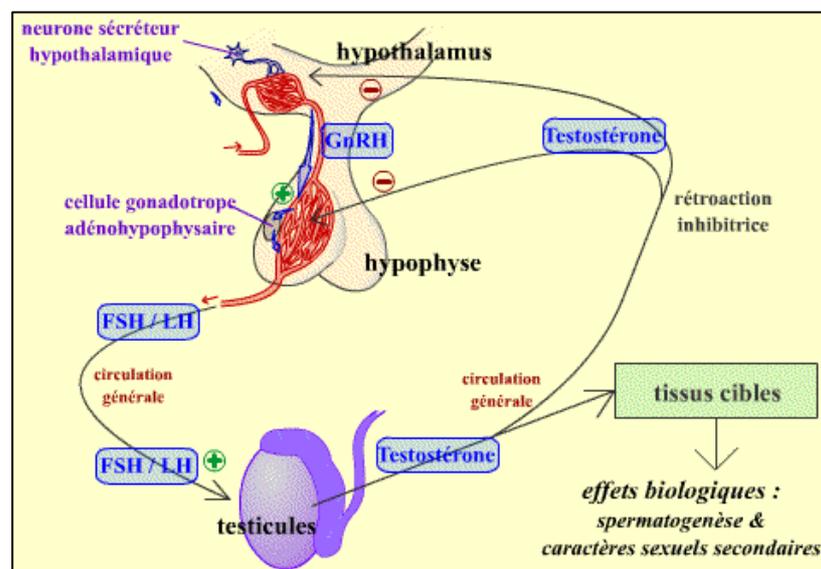


Figure 2 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

L'hypophyse sécrète la LH et la FSH, qui vont stimuler les testicules pour une production de testostérone. Cette dernière, lorsqu'elle est produite en trop grande quantité, exerce une rétroaction inhibitrice sur les neurones sécréteurs hypothalamiques et sur les cellules endocrines adénohypophysaires.

D'après <http://jeanzin.fr/index.php?2008/04/27/133-la-degenerescence-de-l-homme>

3. Transport des androgènes

Les stéroïdes comme la testostérone diffusent librement à travers la membrane des cellules de Leydig. Dans le plasma, la testostérone circule sous trois formes : 2% sous forme libre, seule forme utilisable directement par les tissus, 45 à 75% sont liés à la protéine de transport des stéroïdes sexuels SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), et 30 à 55% sous forme liée à l'albumine. La testostérone liée à la SHBG, à l'inverse de la fraction liée à l'albumine, se dissocie difficilement et n'est pas disponible pour l'utilisation tissulaire. La testostérone disponible représente donc la somme de la testostérone libre et de celle liée à l'albumine, soit 40 à 50% de la testostérone totale. Les protéines de liaison servent de réserve de stéroïdes, qui autrement seraient rapidement métabolisés par le foie. Lorsque le taux de testostérone libre baisse, une partie de la fraction liée se dissocie de l'albumine et de la SHBG afin de maintenir un taux constant de testostérone libre.

4. Métabolisme de la testostérone

La testostérone libre, après son passage transmembranaire, peut agir directement sur le récepteur des androgènes (RA). C'est le cas dans certains tissus dépourvu de 5 α -réductase comme le muscle. Elle a aussi des effets indirects par le biais de métabolites actifs qui augmentent et diversifient ses effets biologiques. Elle joue alors le rôle de pro-hormone et doit être métabolisée en un androgène plus puissant, la dihydrotestostérone (DHT) qui activera le RA (figure 3).

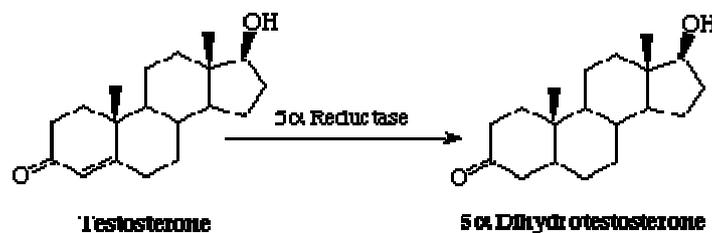


Figure 3 : Conversion de la testostérone en dihydrotestostérone par l'enzyme 5 α -réductase.

Cette transformation de la testostérone en DHT se fait par les enzymes 5 α -réductase 1 et 2 (Mowszowicz *et al*, 1995). Le type 2 prédomine au niveau des organes génitaux, la prostate en particulier. Le type 1 est présent dans la peau avec une activité enzymatique variable suivant la zone considérée. La testostérone peut également être transformée pour être éliminée. La stabilité du taux de testostérone dépend donc de l'équilibre entre les systèmes de synthèse, de transformation et de dégradation.

5. Catabolisme de la testostérone

La majorité des réactions cataboliques se font dans le foie, mais aussi dans la peau et la prostate, pour aboutir à une élimination dans l'urine ou par la peau. C'est la testostérone elle-même qui induit les enzymes hépatiques responsables de son propre catabolisme. Elle est convertie en androgènes faibles et inactifs : la DHEA, l'androstérone et l'étiocholanolone éliminés dans l'urine et la bile, les deux derniers étant les plus abondants dans l'urine.

Cet ensemble métabolique est très actif puisque la demi-vie de la testostérone est de 12 minutes, ce qui implique une fabrication permanente par le testicule.

Comme nous l'avons vu précédemment, les stéroïdes libres peuvent diffuser aisément jusqu'au noyau des cellules, mais seules certaines cellules sont capables de les retenir grâce à des récepteurs spécifiques. La testostérone et son métabolite actif la DHT, qui assurent l'essentiel de l'action androgénique chez l'homme, peuvent ainsi activer des gènes spécifiquement sensibles, qui augmentent l'expression de certaines protéines sous le contrôle des androgènes.

Bien que la testostérone soit l'androgène prédominant dans la circulation périphérique avec une concentration 10 à 12 fois supérieure à la DHT, la concentration tissulaire locale de DHT, dont l'action androgénique est plus forte, est souvent plus élevée.

L'action des androgènes sur l'expression génomique passe par un capteur spécifique unique : le récepteur des androgènes (RA).

B. Le récepteur des androgènes

Le RA est largement distribué dans l'organisme. Il présente toutefois un degré d'expression très variable selon les tissus, et pour un tissu donné selon son stade de développement, et selon le degré de différenciation cellulaire. Les niveaux d'expression du RA les plus élevées sont présents dans les organes sexuels (prostate, testicules, ovaires) mais aussi dans le cœur, le muscle et le foie, alors que les niveaux d'expression du RA dans les autres tissus androgéno-sensibles, comme l'os par exemple, sont beaucoup plus faibles.

Le gène du RA est localisé sur le bras long du chromosome X en position q11-q12 (Lubahn *et al*, 1988), et s'étend sur environ 90 kb (figure 4). Son expression est donc monoallélique chez l'homme. Le cadre ouvert de lecture s'étend sur 2,7 kb, comprend 8 exons et code pour une protéine de 919 acides aminés ayant une masse moléculaire de 110 kilodaltons (kDa). Deux espèces d'ARN messagers (ARNm) de 8,5 kb et de 11 kb ont été identifiées dans différentes lignées cellulaires, et l'on présage que des facteurs tissulaires spécifiques déterminent lequel est préférentiellement utilisé dans un tissu donné. Dans la prostate, c'est le transcrit de 11 kb qui est principalement exprimé.

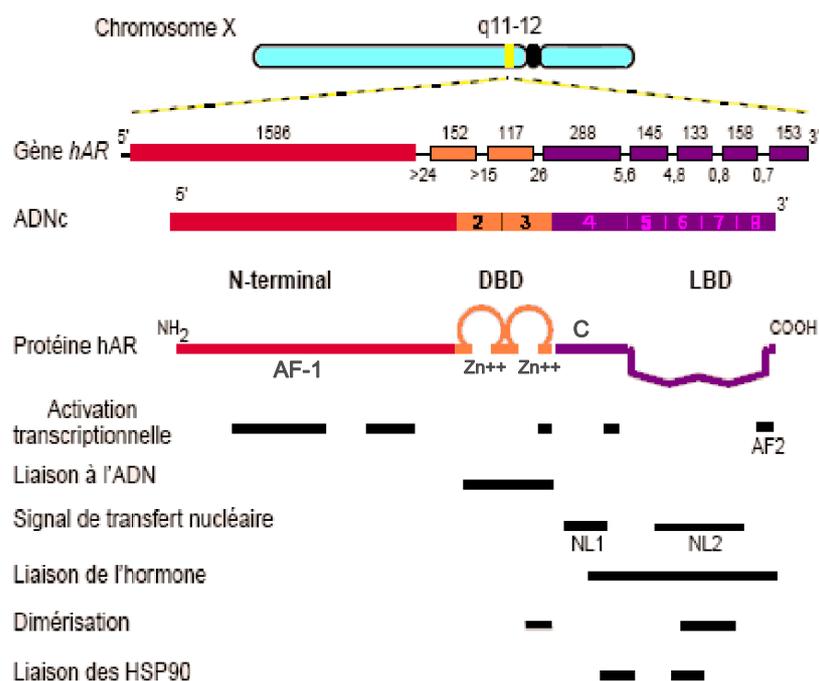


Figure 4 : Organisation génique et principaux domaines fonctionnels du récepteur des androgènes.

Le gène du RA est situé sur le bras long du chromosome X, proche du centromère en position q11-q12. Il s'étend sur 90 kb de l'ADN génomique, la partie codante est répartie sur 8 exons séparés par des introns de tailles différentes (de 0,7 kb à plus de 26 kb). L'ADN complémentaire (ADNc) s'étend sur 2760 pb. L'exon 1 code pour le domaine N-terminal contenant la fonction d'activation 1 (AF-1), les exons 2 et 3 codent pour le domaine de fixation à l'ADN (DBD), la portion 5' de l'exon 4 pour la région charnière (RC), et la portion 3' de l'exon 4 ainsi que les exons 5 à 8 codent pour le domaine de liaison au ligand (LBD).

Pour médier son action, le RA se fixe sur l'ADN au niveau de séquences spécifiques localisées dans le promoteur de ses gènes cibles. En effet, il existe le long du génome des séquences de liaison du RA (séquences ARE) localisées en amont du promoteur de certains gènes. Cependant, malgré leur présence, peu de ces sites sont activés par le RA en présence d'androgènes (Wang *et al*, 2007). Ces séquences correspondant à deux hexamères séparés par trois nucléotides, seront analysées plus en détail par la suite.

Le RA est un récepteur des hormones stéroïdes qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires.

1. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont une des classes les plus abondantes de régulateurs transcriptionnels chez les animaux (et plus exactement chez les métazoaires). Ils régulent diverses fonctions telles que l'homéostasie, la reproduction, le développement et le métabolisme (Robinson-Rechavi *et al*, 2003). Plus de 300 récepteurs nucléaires ont été décrits. Il s'agit de facteurs de transcription régulés pour la plupart par des ligands.

La superfamille des récepteurs nucléaires comprend en effet non seulement des récepteurs dont le ligand est connu, mais également des récepteurs orphelins pour lesquels les ligands n'existent pas ou n'ont pas encore été identifiés. Une hypothèse d'évolution a été suggérée en 2000 dans laquelle le récepteur nucléaire ancestral était orphelin, le gain de la liaison d'un ligand ayant été acquis par la suite pour certains récepteurs (Escriva *et al*, 2000).

A l'heure actuelle, la moitié des récepteurs nucléaires connus sont dépendants d'un ligand. De part leur origine commune, tous les récepteurs nucléaires partagent une structure commune que nous détaillerons par la suite pour le RA.

Une analyse phylogénétique a permis de définir sept sous-familles de taille inégales au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires. Cette classification tient compte du mode de dimérisation des récepteurs et de leurs propriétés de fixation à l'ADN. Les différentes classes de récepteurs nucléaires sont indiquées dans la figure 5, ainsi que certains des récepteurs appartenant à ces classes. Le récepteur des androgènes, qui nous intéresse plus particulièrement, appartient à la classe III des récepteurs nucléaires, avec les autres récepteurs des hormones stéroïdes comme le récepteur des glucocorticoïdes (RG).

	Abréviation du récepteur	Sous-type	Nom complet du récepteur	Ligand
Classe I	TR	α, β	Récepteur des hormones thyroïdes	Thyroïdes
	RAR	α, β, γ	Récepteur de l'acide rétinoïque	Acide rétinoïque
	VDR		Récepteur à la vitamine D	Vitamine D Dihydroxy-vitamine D ₃
	PPAR	α, β, γ	Récepteur des peroxyosomes proliférateurs activés	Prostaglandine
Classe II	RXR	α, β, γ	Récepteur rétinoïde X	Acide 9-Cis-retinoïque
	TR2	α, β	Récepteur des testicules	Inconnu
Classe III	RG		Récepteur des glucocorticoïdes	Glucocorticoïdes
	RA		Récepteur des androgènes	Androgènes
	RP		Récepteur de la progestérone	Progestérone
	RE	α, β	Récepteur des oestrogènes	Oestrogènes
	RM		Récepteur des minéralocorticoïdes	Minéralocorticoïdes
Classe IV	NGFI-B	α, β, γ	Clone B induit par le NGF	Inconnu
Classe V	SF-1/FTZ-F1	α, β	Facteur I stéroïdogénique	Oxystérols
Classe VI	GCNF		Facteur nucléaire des cellules germinales	Inconnu
Classe O	SHP		Petit partenaire hétérodimérique (DSS-AHC critical region on the X gene 1)	Inconnu
	DAX-1		Dosage-sensitive sex reversal	Inconnu

Figure 5 : Classification de la superfamille des récepteurs nucléaires.
 Ne sont représentés ici que les membres les plus importants des différentes classes.
 D'après Germain et al, 2006.

2. Structure du récepteur des androgènes

Le RA est constitué de quatre régions fonctionnelles majeures (Mangelsdorf *et al*, 1995 ; Evans, 1988) communs à tous les récepteurs nucléaires (Chambon, 2004). Chaque région possède des sites d'interaction avec des co-répresseurs et des co-activateurs du RA (figure 6).

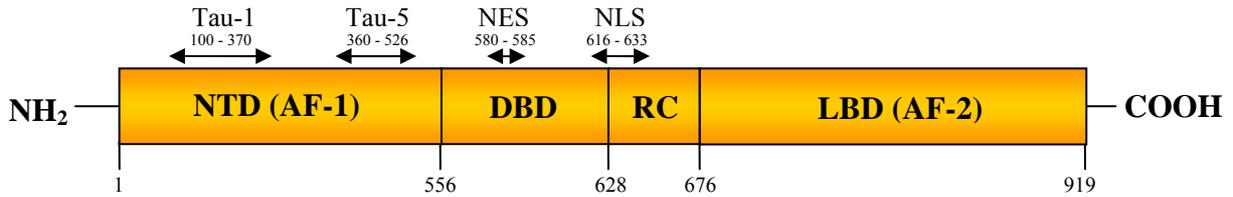


Figure 6 : Représentation schématique du récepteur des androgènes.

Les quatre régions constituant le récepteur des androgènes sont représentées : la région amino-terminale (NTD), contenant la fonction de transactivation de la transcription AF-1 (activation fonction 1) indépendante du ligand ; les domaines de liaison à l'ADN (DBD) et au ligand (LBD) séparés par la région charnière (RC) abritant le signal de localisation nucléaire NLS. Le LBD contient un site d'activation de la transcription dépendant de la liaison du ligand, AF-2 (Activation Fonction 2). Les localisations de Tau-1, Tau-5, NES (signal d'exportation nucléaire) et NLS sont représentées.

a. Région amino-terminale

Cette région est la moins conservée au sein des récepteurs nucléaires. Elle présente une longueur et une séquence variables en fonction des récepteurs (figure 7), le récepteur des minéralocorticoïdes possédant la région la plus longue au sein des récepteurs nucléaires.

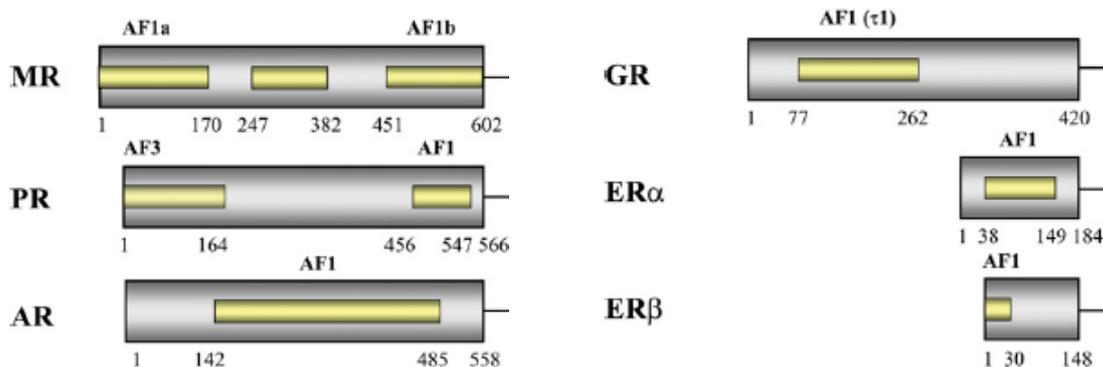


Figure 7 : Région amino-terminale des récepteurs stéroïdes.

La région N-terminale du récepteur des minéralocorticoïdes (MR), du récepteur de la progestérone (PR), du récepteur des androgènes (AR), du récepteur des glucocorticoïdes (GR), et des récepteurs des estrogènes α et β sont représentés, ainsi que leur fonction AF-1. D'après Lavery et MCEwan, 2005.

La région amino-terminale est le support de l'activité AF-1 (Fonction d'activation 1 ou Activation Fonction 1) qui est impliquée dans la transactivation de la transcription (indépendante du ligand). Cette transactivation est médiée par deux domaines majeurs d'activation de la transcription : Tau-1 localisé entre les acides aminés 100 et 370 ; et Tau-5 qui est localisé entre les acides aminés 360 et 526 (figure 6) (Callewaert *et al*, 2006). Tau-1 supporte l'activité transcriptionnelle du RA après stimulation par un ligand agoniste, et Tau-5 confère une activité constitutive au RA en absence d'un domaine de liaison au ligand (Jenster *et al*, 1995).

De plus, il s'agit de la région majeure de phosphorylation du RA. La phosphorylation du RA est nécessaire pour sa localisation nucléaire et pour ses activités transcriptionnelles (Wang *et al*, 1999). Le RA, qui est une phosphoprotéine, présente plusieurs sites de phosphorylation. Les résidus sérine en position 16, 81, 256, 308, 424, et 650 montrent une augmentation de la phosphorylation en présence d'androgènes (Gioeli *et al*, 2002). La sérine en position 94 est quant à elle constitutivement phosphorylée. Ces phosphorylations sont réalisées par les voies de signalisation des kinases comme PI3K/Akt, Ras/MAPK ou ERK.

L'activation des cascades de signalisation des kinases régule l'activité du RA. En effet, les cascades de kinases sont capables d'activer le RA en absence de ligand, ou de le rendre plus sensible à de faibles doses de ligands. La capacité des cascades de signalisation à influencer la fonction du RA doit jouer un rôle significatif dans le développement et la progression du cancer de la prostate où une augmentation de l'activité des signaux de transduction a été associée à l'acquisition de l'androgéno-indépendance (Lorenzo *et al*, 2003). Malgré cette observation, aucune analyse *in vivo* des sites de phosphorylations du RA n'est réalisée.

D'autre part, le domaine de transactivation du RA contient deux régions hautement polymorphiques au sein des différentes populations. Il y a tout d'abord les répétitions polyglycines, codées par la séquence GGC, avec des répétitions allant de 8 à 18, les plus couramment retrouvées étant de l'ordre de 16 à 18 (Salinas *et al*, 2005). Les effets de la longueur des répétitions GGC sur l'activité transcriptionnelle du RA ne sont pas bien connus, les études réalisées étant divergentes.

Des extensions polyglutamines sont également retrouvées et sont codées par la séquence CAG. Le nombre de répétitions CAG varie chez les individus entre 9 et 29, 22 répétitions étant le plus courant chez les hommes caucasiens. La longueur de l'allèle CAG est inversement reliée à l'activité transcriptionnelle du RA. Cependant, bien qu'il soit connu que les répétitions d'extensions polyglutamines inhibent la fonction de transactivation du RA (Chamberlain *et al*, 1994), les mécanismes précis impliqués ne sont pas connus. D'autre part, des études indiquent que le nombre de répétitions CAG influe sur les interactions avec certains cofacteurs tels que c-jun (Grierson *et al*, 1999).

Lorsque le triplet CAG est répété plus de 40 fois, on observe chez les individus porteurs le syndrome neurodégénératif de l'atrophie musculaire spino-bulbaire (SBMA), également appelé maladie de Kennedy. Dans cette maladie, le RA produit est anormal car il contient une expansion de polyglutamine (on le nomme alors RA-polyQ). Dans ces conditions, il ne peut pas être dégradé et s'accumule dans le noyau en se liant à d'autres molécules normalement chargées de réguler son fonctionnement (les co-régulateurs). Cet ensemble forme des agrégats nucléaires toxiques pour la cellule.

Bien que la structure tridimensionnelle du domaine AF-1 ne soit pas encore résolue, des études ont tout de même révélées que le domaine AF-1 n'a pas de structure secondaire stable en solution. Il serait néanmoins composé d'hélices α (de 13 à 16%), de feuillets β (20 %) et de structures non ordonnées (entre 24 et 36 %). (Lavery et MCEwan, 2005).

Ce domaine est aussi le siège de nombreuses interactions avec les cofacteurs. En effet, le RA interagit directement avec le facteur général de transcription TFIIF par le biais de la sa région N-terminale (MCEwan et Gustafsson, 1997). De plus, d'autres co-facteurs tels que SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptors) et p160 montrent une préférence pour l'interaction avec ce domaine du RA.

b. Domaine de liaison à l'ADN

Le domaine central du RA contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD) ainsi qu'un signal d'export nucléaire. Le DBD, constitué d'environ 80 acides aminés, est conservé à plus de 90 % au sein de la famille des récepteurs nucléaires.

Le DBD joue un rôle très important au sein du RA puisque c'est lui qui va déterminer les séquences à reconnaître pour induire l'expression des gènes cibles.

Le DBD est composé de deux doigts de zinc, et dans chaque doigt un atome de zinc central stabilise cette structure secondaire en établissant quatre liaisons avec quatre cystéines (figure 8).

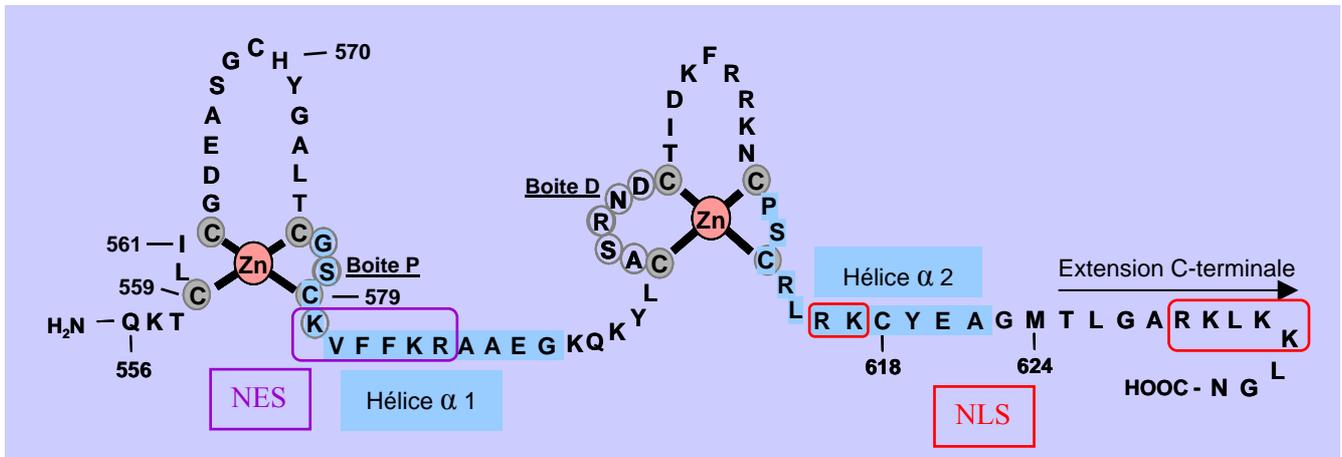


Figure 8 : Représentation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes.

Représentation de la séquence du DBD du RA. Les acides aminés de la boîte P (impliquée dans la liaison à l'ADN) et de la boîte D (impliquée dans la dimérisation du RA) sont représentés encadrés. Sont également représentés les deux hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (en bleu), ainsi que la région d'extension C-terminale, nécessaire pour une grande affinité de liaison du RA à ses éléments de réponse ainsi que le signal de localisation nucléaire (NLS) en deux parties encadrées en rouge, et le signal d'export nucléaire (NES) encadré en violet.

Afin de connaître la structure tridimensionnelle du DBD, des études de résonance magnétique nucléaire et des études cristallographiques ont été réalisées pour différents DBD de récepteurs nucléaires complexés ou non à l'ADN. Les premières structures 3D à être reportées étaient celles des homodimères du récepteur des glucocorticoïdes (RG) et du récepteur des estrogènes (RE) complexés à leur séquence d'ADN cible (figure 9) (Luisi *et al*, 1991 ; Schwabe *et al*, 1993).

Ainsi, le DBD est formé de deux hélices α . La première, l'hélice de reconnaissance, est située au niveau des troisième et quatrième cystéines du premier doigt de zinc. La seconde, située au niveau de la partie C-terminale du second doigt de zinc, forme un angle droit avec l'hélice de reconnaissance pour stabiliser la structure et l'orientation du DBD (Renaud et Moras, 2000).

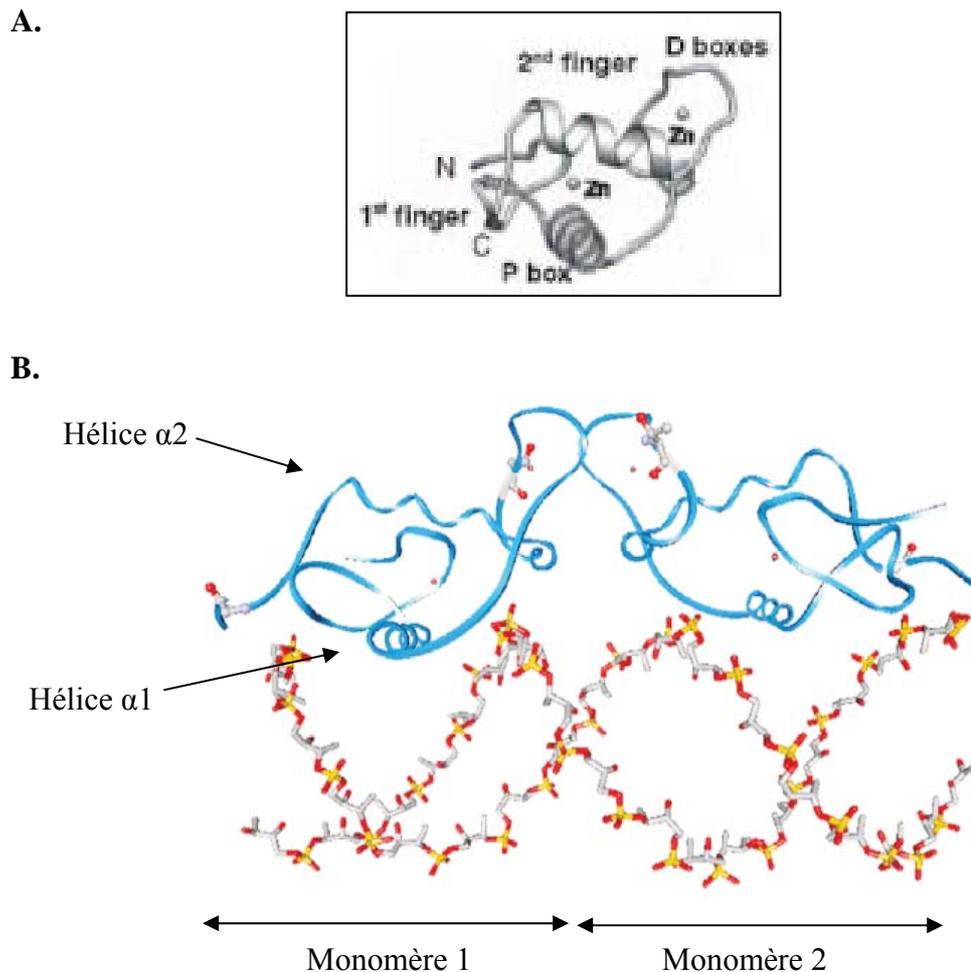


Figure 9 : Structure tridimensionnelle du domaine de liaison à l'ADN.

A. Représentation tridimensionnelle du DBD du RERE. D'après Germain et al, 2006.

B. Modèle tri-dimensionnel du DBD du RARA lié à l'ADN au niveau des ses éléments de réponse présentant une répétition directe. Les deux hélices sont indiquées par des flèches, ainsi que chaque monomère de RARA. D'après Verrijdt et al, 2006.

Une extension C-terminale existe à la fin du DBD. Elle est nécessaire pour une interaction spécifique et de grande affinité avec l'ADN (Schoenmakers *et al*, 1999). De plus, au sein du DBD, il existe deux courtes séquences nommées boîte P et boîte D, impliquées respectivement dans la reconnaissance spécifique de l'ADN et dans la dimérisation du RARA.

Le DBD est la cible de modifications post-traductionnelles, et est également impliqué dans l'exportation nucléaire de part le signal d'export nucléaire localisé à la

fin de premier doigt de zinc (séquence 5'-KVFFKR-3'). Le DBD du RA interagit également avec des facteurs de transcription et des cofacteurs. Par exemple, il interagit avec la protéine inhibitrice de STAT-1 activé (PIAS1, Protein Inhibitor of Activated STAT1), ce qui augmente l'activation des gènes médiée par le RA (Tan *et al*, 2002).

Comme énoncé précédemment, les récepteurs nucléaires se fixent aux éléments de réponse mettant en jeu deux séquences consensus caractéristiques. Ces séquences consensus sont divisées en deux catégories ; une séquence pour les récepteurs des hormones stéroïdes de classe III, 5'- AGAACA - 3', et une séquence pour le reste de la famille des récepteurs nucléaires, 5'- AG(G/T)TCA - 3'. Les récepteurs des hormones stéroïdes forment des homodimères où chacun des monomères se fixe sur un demi-site du ARE. Les ARE consistent en la répétition inversée de la séquence 5'-AGAACA-3' séparée par trois nucléotides : 5'-AGAACA_{nnn}TGTTCT- 3', on les note ainsi IR₃ (Inverted Repeat 3).

Bien que les séquences des éléments de réponse des récepteurs stéroïdes soient similaires, les récepteurs reconnaissent avec une spécificité différente ces séquences. Ainsi, pendant longtemps la question de la spécificité de la régulation des gènes cibles par les différents récepteurs stéroïdiens a été soulevée.

Pour chaque type de récepteur, la spécificité de liaison à l'ADN est déterminée d'une part par l'orientation et l'espacement de ces courtes séquences nucléotidiques, mais aussi par les séquences primaires de ces éléments de réponse, à la fois à l'intérieur et autour de ces séquences répétées. Mais cette spécificité et cette reconnaissance avec une grande affinité de ces séquences résident aussi en partie dans la présence de l'extension C-terminale située à la fin du DBD (Schoenmakers *et al*, 1999).

Comme indiqué précédemment, il est acquis que les récepteurs stéroïdes se lient en dimères aux éléments de réponse contenant des répétitions inversées de deux demi-sites hexamériques séparés par trois paires de bases (IR₃). Cependant le RA possède également la capacité de se lier à des séquences présentant des répétitions directes de type 5' -TGTTCT_{nnn}TGTTCT- 3', nommées ADR₃ (Claessens *et al*, 1996 ; Verrijdt *et al*, 1999 ; Verrijdt G *et al*, 2003).

Des études cristallographiques du récepteur de la vitamine D (VDR), reconnaissant des répétitions directes de type DR3, similaires à celles reconnues par le RA, ont révélé une conformation « tête à queue » appelée également « head-to-tail » du dimère. En revanche, la même étude réalisée avec le RA a indiqué que ce dernier se fixe dans une conformation « tête à tête » ou « head-to-head » à la fois sur les éléments communs IR3 que sur les séquences spécifiques ADR3 (figure 10). Cette conformation spécifique du RA contribuerait ainsi à la spécificité de son mode d'action (Shaffer *et al*, 2004 ; Verrijdt *et al*, 2003).

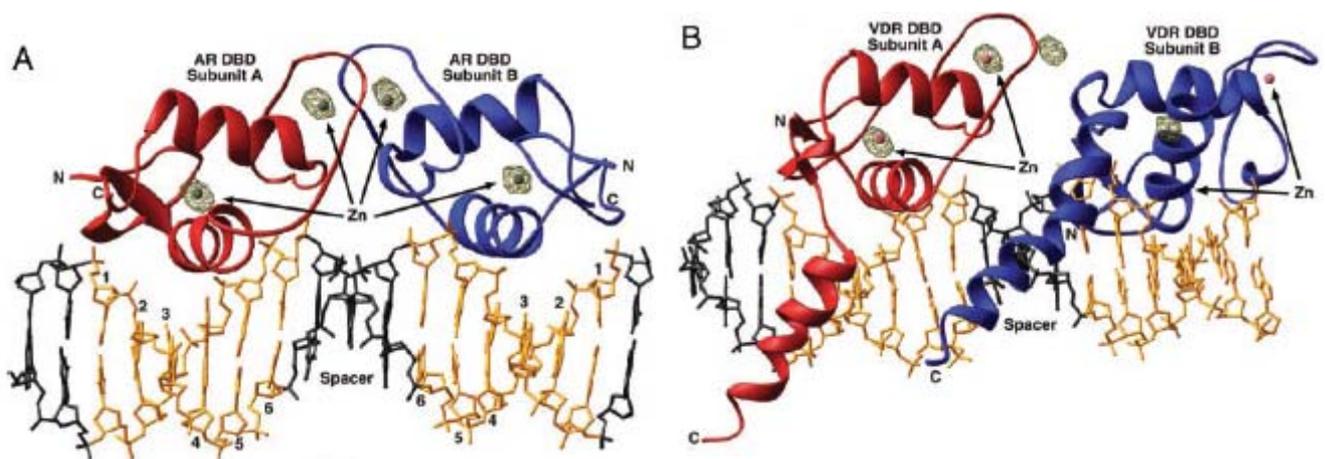


Figure 10 : Complexes formés par le récepteur des androgènes (A) et le récepteur de la vitamine D (B) avec des éléments de réponse en répétition directe.

Le RA se lie en conformation « tête à tête » sur la séquence DR3 alors que le VDR y adopte une conformation « tête à queue ».

Les deux monomères sont représentés en rouge et en bleu. Les atomes de zinc sont indiqués par les flèches. Les deux demi-sites sont représentés en jaune alors que les nucléotides espaçant les hexamères et ceux les entourant sont en noir.

D'après Shaffer et al, 2004.

De plus, l'étude de mutations et de délétions effectuée par Schoenmakers *et al* en 2000 a permis d'établir les acides aminés au sein du DBD importants pour la différence de reconnaissance spécifique de l'ADN entre le RA et le RG. Il s'agit de la thréonine en position 602 dans la surface de dimérisation, de la Glycine 627 et ainsi

que de la Leucine 634 localisées dans l'extension C-terminale du DBD. Ces acides aminés permettent aux deux monomères du RA d'établir des contacts favorisant la conformation « tête à tête » (Schoenmakers *et al*, 2000).

c. Région charnière

La région charnière, située entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (LBD), est peu conservée au sein des récepteurs nucléaires.

Pendant longtemps ce domaine était considéré sans fonction. En réalité, il est reconnu à l'heure actuelle qu'il sert de pont entre le DBD et le LBD afin de permettre une certaine flexibilité du RA.

Ce domaine abrite un signal de localisation nucléaire (NLS-1) ainsi qu'un site de phosphorylation au niveau de la sérine 650 (Gioeli *et al*, 2002). Il a été montré en 2007 que cette région est impliquée dans plusieurs fonctions du RA, à savoir sa localisation nucléaire, la liaison à l'ADN, le recrutement des cofacteurs et l'interaction entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal du RA (Haelens *et al*, 2007), interaction dont nous parlerons par la suite. Tout ceci indique l'importance de cette région au sein du RA.

d. Région carboxy-terminale

Bien que la séquence de cette région soit moins bien conservée que celle du DBD au sein des récepteurs nucléaires, sa structure tridimensionnelle est similaire pour les récepteurs nucléaires, suggérant l'importance du repliement tridimensionnel de ce domaine.

La région carboxy-terminale abrite le domaine de liaison au ligand (LBD) (Sack *et al*, 2001) et un signal de localisation nucléaire hormono-dépendant (NLS-2). Le LBD contient lui-même une surface d'interaction avec les protéines chaperonnes HSP (protéines de choc thermique); une fonction de transactivation (AF-2) dépendante de la liaison au ligand (Kumar *et al*, 1986); une surface impliquée dans le processus de dimérisation, qui médie l'interaction avec des partenaires du LBD;

une poche de liaison du ligand, qui interagit avec diverses petites molécules lipophiliques ; une surface d'interaction avec des co-régulateurs qui permettent de moduler positivement ou négativement l'activité transcriptionnelle du RA.

Enfin, le LBD a une influence sur le DBD en stabilisant sa liaison à l'ADN (Farla *et al*, 2004).

Les structures du LBD des récepteurs nucléaires seuls ou en présence d'un agoniste ou d'un antagoniste ont été résolues. En revanche, la plupart des structures cristallographiques des récepteurs orphelins ne sont pas encore connues. La première résolution de la structure cristallographique d'un LBD a indiqué que ce domaine est hautement structuré (Bourguet *et al*, 1995). Le LBD du RA est constitué de 11 hélices α et d'un court feuillet β , arrangés en trois couches pour former un sandwich antiparallèle formant ainsi une poche hydrophobique (figure 11). Les autres récepteurs nucléaires sont composés de 12 hélices α , mais l'hélice 2 n'existe pas chez le RA.

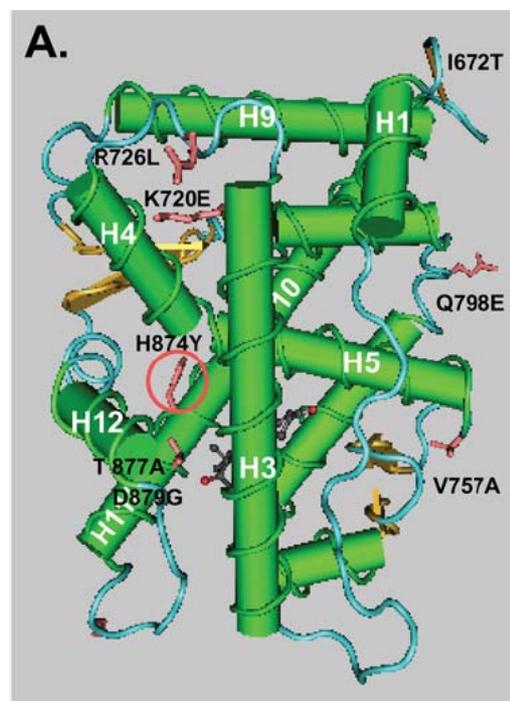


Figure 11: Structure du domaine de liaison au ligand du récepteur des androgènes.

Le LBD du RA est formé de 11 hélices α représentées par les cylindres verts, agencées en sandwich tri-lamellaire. Quelques mutations ponctuelles décrites dans les CaP et ayant un impact sur la liaison du ligand sont représentées en rose.

D'après Duff *et al*, 2006.

Les hélices 1 à 3 forment une face du LBD, les hélices 4, 5, 8 et 9 ainsi que le feuillet β correspondent à la couche centrale du LBD, et les hélices 6, 7 et 10 forment la troisième face du « sandwich ». L'hélice 12 permet au LBD de réguler la transcription. Les ligands sont reconnus grâce à deux types de contact : des liaisons hydrogènes aux extrémités et des liaisons hydrophobes de type van der Waals pour tout le corps du ligand. Suite à la liaison du ligand, le LBD subit un réarrangement structural où l'hélice 12 va changer de position afin de fermer la poche de liaison du ligand, ce qui conduit à la formation d'une surface d'interaction protéine-protéine hautement conservée appelée fonction d'activation 2 (AF-2). Le domaine AF-2 est alors capable d'interagir avec des co-activateurs et ainsi de promouvoir la transcription des gènes cibles (Warnmark *et al*, 2003).

3. Mode d'action du récepteur des androgènes

Le RA sous sa forme inactive, donc non lié au ligand, est situé dans le cytoplasme (figure 12). Il y est maintenu dans un état conformationnel favorable à la liaison avec un androgène par des protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique HSP90, HSP70 et FKBP52 (HSP56). La fraction libre de testostérone entre dans la cellule cible des androgènes par diffusion, où elle se lie au RA après sa conversion en DHT (métabolite plus actif) par la 5 α -réductase (isoforme de type 2).

La liaison du ligand naturel du RA, la dihydrotestostérone (DHT) au récepteur entraîne une modification conformationnelle (Chang *et al*, 1995), suivie de la libération des protéines chaperonnes qui démasquent les sites de dimérisation et le signal de localisation nucléaire. Suite à cette fixation, Le RA s'homodimérise et il est phosphorylé au niveau des résidus sérine précédemment décrits.

Par la suite, il y a translocation dans le noyau, suivie de la fixation du dimère à l'ADN au niveau du promoteur de gènes cibles. Le RA se fixe à l'ADN au niveau de séquences spécifiques décrites auparavant appelées éléments de réponse aux

androgènes (ARE). Cette fixation a pour conséquence d'entraîner la transcription des gènes cibles, suite au recrutement de co-activateurs ; ou au contraire d'en inhiber la transcription par le recrutement de co-répresseurs.

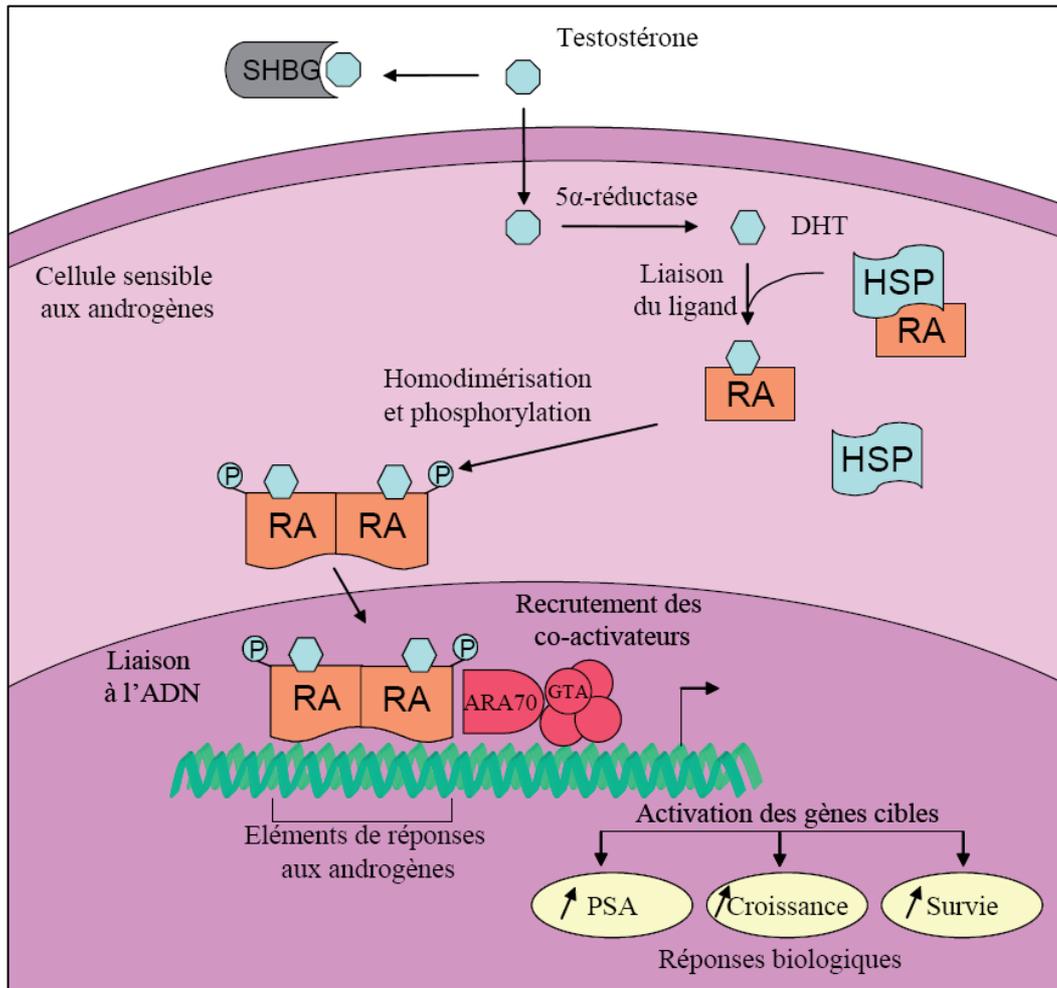


Figure 12 : Mode d'action des androgènes.

La testostérone libre, non liée à l'albumine ou au sex hormone binding globulin (SHBG), entre dans les cellules prostatiques où elle est convertie en dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5α-réductase. La liaison de la DHT au RA induit la dissociation des protéines chaperonnes, la phosphorylation du RA, son homodimérisation suivie de sa translocation nucléaire. Dans le noyau, le complexe DHT/RA se lie aux éléments de réponse des androgènes (ARE) au niveau du promoteur de gènes cibles du RA.

Des co-activateurs (comme ARA70) ou des corépresseurs (non illustrés) se lient aussi à ce complexe DHT/RA, facilitant ou inhibant, respectivement, son interaction avec l'appareil de transcription (GTA). L'activation (ou la répression) de gènes cibles conduit à des réponses biologiques comme la croissance, la survie et la production de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA).

D'après Feldman et Feldman, 2001.

La translocation nucléaire du RA est cruciale pour sa fonction. Elle est médiée par les protéines importines α et β (Görlich et Kutay, 1999 ; Cutress *et al*, 2008). La séquence de localisation nucléaire (NLS) du RA, chargée positivement, est constituée de deux parties qui recouvrent le DBD et la région charnière (figure 8) (Zhou *et al*, 1994). Cette séquence NLS est reconnue dans le cytoplasme par l'importine α , qui sert d'adaptateur au facteur de transport nucléaire importine β . Ce complexe cargo importine α / importine β se déplace ensuite à travers les pores nucléaires dans le noyau où il est dissocié par l'intermédiaire de la GTPase Ran de la famille Ras, libérant ainsi le RA. Les importines sont ensuite recyclées dans le cytoplasme afin d'effectuer d'autres cycles de transport nucléaire.

L'exportation du RA du noyau est réalisée à l'aide des protéines exportines (Cook *et al*, 2007), grâce au signal d'export nucléaire (NES) localisé au niveau du premier doigt de zinc du DBD. L'exportine lie la protéine à exporter, ici le RA, avec du RanGTP. Suite à l'exportation nucléaire du complexe, la conversion de la RanGTP en RanGDP permet la libération cytoplasmique du RA.

Les gènes dont l'expression est contrôlée par le RA possèdent toujours des ARE dans leur région promotrice et/ou au niveau des séquences activatrices distales (« enhancer »). La formation d'un complexe d'activation de la transcription implique la liaison du RA au niveau de ces deux régions promotrice et activatrice, suivie du recrutement de co-activateurs incluant des histones acétylases, de facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II, comme décrit par Shang *et al* en 2002 pour le gène *PSA* humain. A l'inverse, la formation du complexe de répression du RA n'implique que des facteurs liés au promoteur, mais pas au niveau des séquences distales. Ceci suggère un modèle de complexe de transcription du RA dans lequel les co-activateurs servent de pont liant les séquences activatrices au promoteur comme indiqué dans la figure 13.

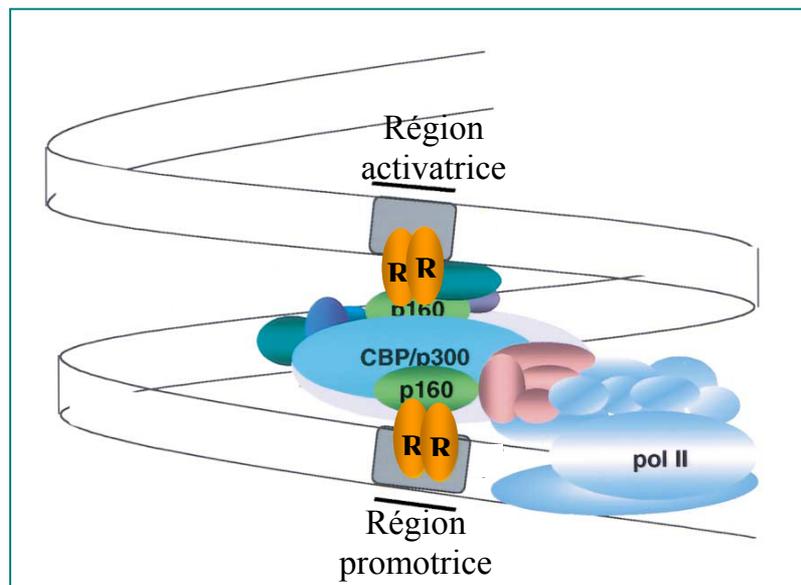


Figure 13 : Modèle de formation du complexe de transcription du récepteur des androgènes.

Les homodimères de RA sont recrutés au niveau des deux régions promotrice et activatrice du gène PSA humain, contenant chacune des éléments de réponse aux androgènes (ARE). Ceci est suivi d'un recrutement ordonné et coordonné des protéines p160, CBP, p300, et de la RNA polymérase II, afin de former le complexe de transcription du RA. D'après Shang et al, 2002.

4. Interaction avec les cofacteurs

Comme vous pouvez le voir sur la figure 14, de nombreuses protéines sont capables de se lier au RA et ce sur tous les domaines du récepteur. Par exemple, la protéine ARA70 (AR-Associated protein de 70kDa) joue le rôle de co-activateur du RA et a pour effet d'augmenter la transcription (Yeh et Chang, 1996). Ou encore la β -caténine qui augmente l'activité androgénique en présence de différents ligands comme l'œstradiol ou les androgènes surrénaliens, cette molécule pouvant être mutée dans les cancers de la prostate (Chesire et al, 2000).

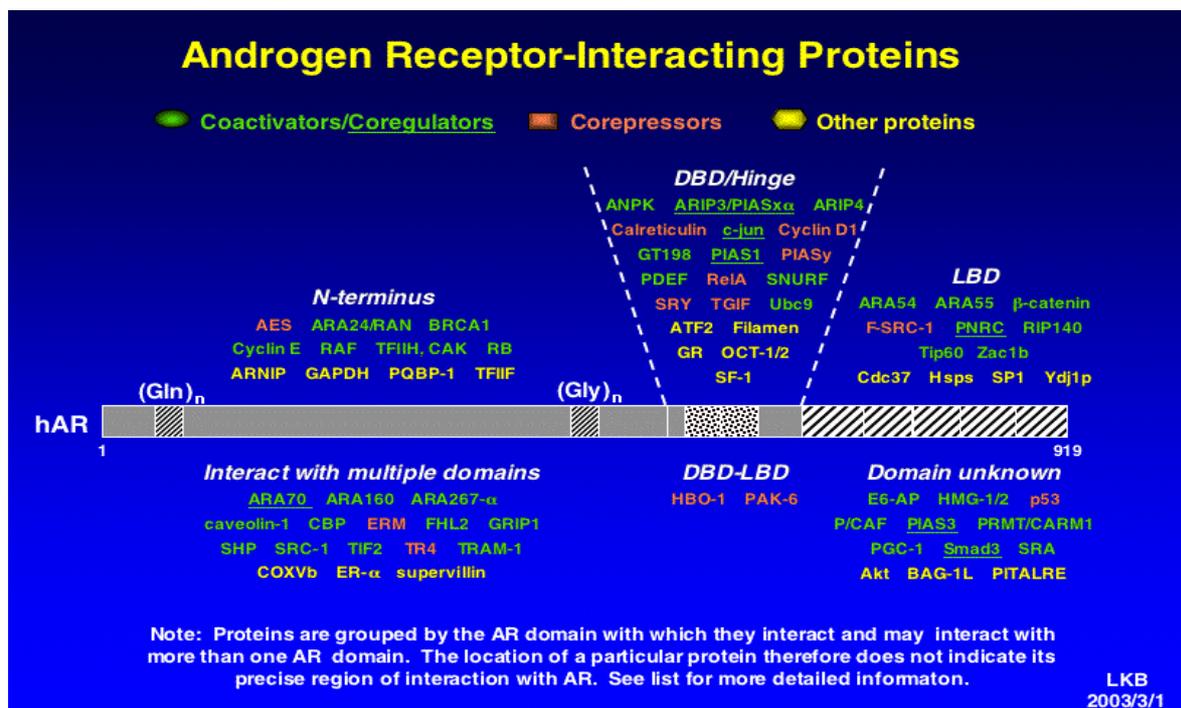


Figure 14 : Lieu d'interaction des cofacteurs du récepteur des androgènes.
 Les co-activateurs du RA sont représentés vert, les co-répresseurs en rouge et les autres protéines qui interagissent avec le RA sont en jaune. Toutes ces protéines sont notées au niveau du domaine du RA avec lequel elles interagissent, celles qui interagissent avec plusieurs domaines où dont le domaine est inconnu sont indiquées en bas.
 D'après <http://androgendb.mcgill.ca/>

On compte à ce jour plus de 70 molécules qui interagissent avec le RA. Beaucoup d'entre elles interagissent avec plusieurs classes de récepteurs (récepteurs des œstrogènes, des progestatifs et des glucocorticoïdes) tels que HMG1 et HMG2 (High Mobility Group protein 1 et 2).

Ainsi, le changement conformationnel résultant de la liaison d'un ligand agoniste autorise des interactions du RA avec les molécules co-activatrices du RA, le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, et l'activation spécifique de l'ensemble des gènes cibles.

En présence d'un ligand antagoniste (anti-androgène pur), le RA adopte une conformation spatiale permettant une interaction préférentielle avec les molécules co-répressives avec pour conséquence la répression de la transcription des gènes cibles.

Cependant, il existe une troisième classe de ligands, dénommés molécules modulatrices spécifiques des récepteurs nucléaires (SRM). La présence d'une de ces molécules au niveau du site de liaison entraîne une conformation intermédiaire du RA entre la forme active et la forme inactive (figure 15). L'activité du RA lié aux SRM dépend donc essentiellement de l'expression tissulaire des co-activateurs ou co-répresseurs (Smith et O'Malley, 2004). L'expression et la localisation des molécules co-activatrices ou co-répressives conditionnent en cascade les changements d'activités cellulaires dépendants du RA.

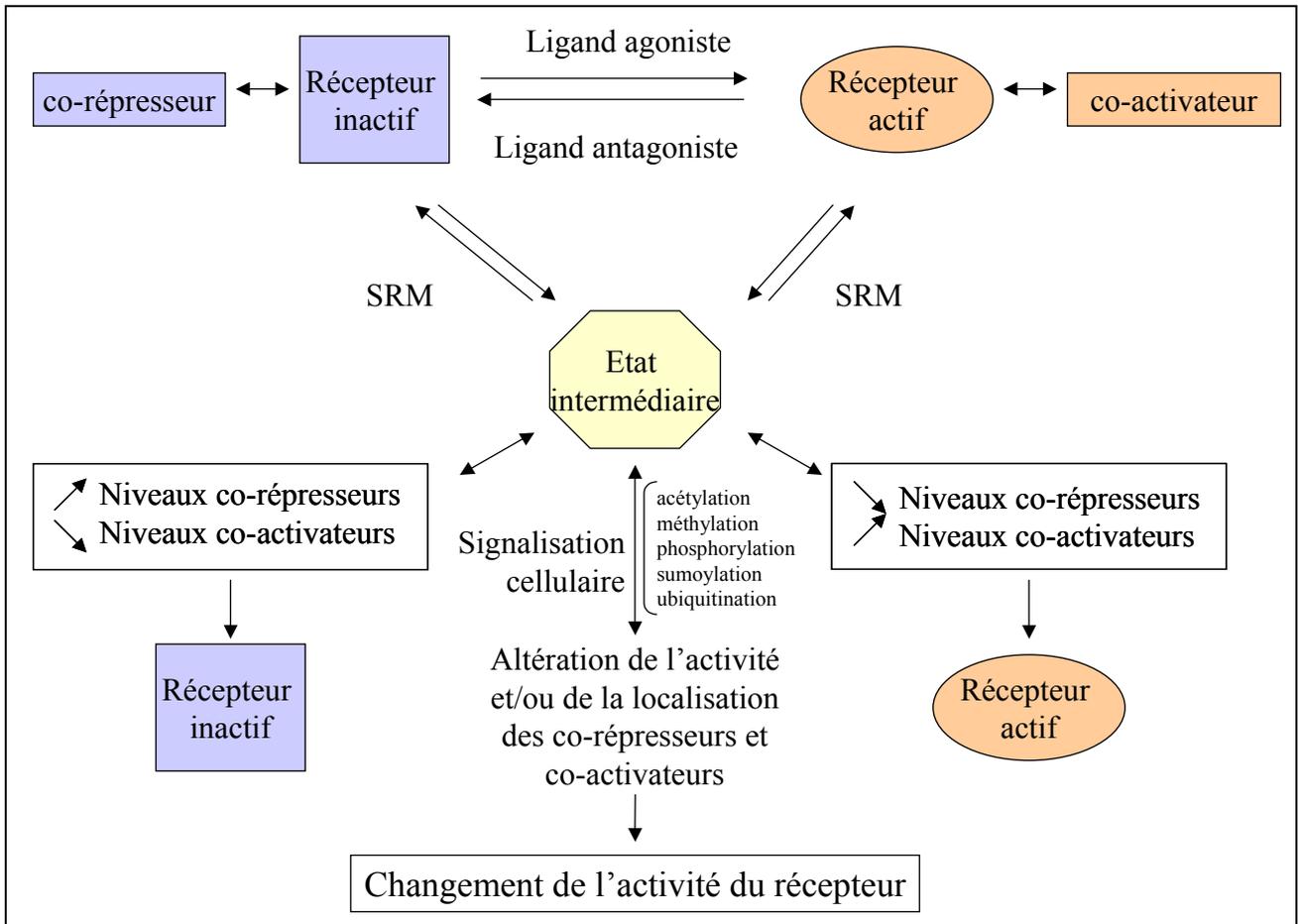


Figure 15 : Modèle de contribution des co-activateurs et co-répresseurs dans la détermination de l'activité agoniste / antagoniste des molécules modulatrices spécifiques des récepteurs nucléaires (SRM).

En fonction de la concentration des cofacteurs, les SRM agissent comme co-activateurs ou bien en tant que co-répresseurs du RA. Ainsi, lorsque la concentration de co-activateurs au sein du tissu est forte, les SRM permettront l'activation du RA.

D'après Smith et O'Malley, 2004.

Les co-activateurs interagissent avec le RA grâce à leur motif «LxxLL», où « L » désigne une leucine et « x » tout autre acide aminé (Dubink *et al*, 2006). Ce motif permet aux co-activateurs d'interagir physiquement avec la poche hydrophobe présente au niveau du LBD. Cette interaction est suivie d'un recrutement de facteurs remodelant la chromatine, puis d'une dissociation de p160 et du recrutement concomitant de l'ARN polymérase II.

Les co-régulateurs du RA sont des protéines recrutées par le RA pour augmenter (co-activateurs) ou réprimer (co-répresseurs) sa transactivation. Cependant, ces co-régulateurs n'altèrent pas significativement le taux basal de transcription et ne possèdent pas de capacité de liaison à l'ADN. En revanche, ils influent sur la transactivation médiée par le RA en agissant au niveau du promoteur de gènes cibles, en facilitant l'occupation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, et / ou en permettant le recrutement des facteurs généraux de transcription associés à l'ARN polymérase II.

Les protéines qui interagissent avec le RA peuvent être divisées en trois classes : les composants de la machinerie générale de transcription, des protéines diverses possédant des propriétés de co-activation ou de co-répression pour le RA, et des facteurs de transcription spécifiques (Heemers et Tindall, 2007).

a. Composants de la machinerie de transcription

La transcription due au RA dépend du recrutement de l'ARN polymérase II au niveau des promoteurs des gènes cibles. Brièvement, la mise en place du complexe de pré-initiation est accompagnée de la liaison à proximité du site de démarrage de la transcription du facteur TFIID, qui est composé de la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP, pour TATA-binding protein), et de facteurs associés à TBP. Par la suite TFIIB vient se lier sur TBP et recrute l'ARN polymérase II et le facteur TFIIF, qui assure l'interaction spécifique de l'ARN polymérase II avec le promoteur. TFIIE et TFIIH sont ensuite recrutés par l'ARN polymérase II pour faciliter la séparation des brins de l'ADN, ce qui permet l'initiation de la transcription (Hahn, 2004).

Le RA interagit directement avec des composants de la machinerie transcriptionnelle basale. Par exemple, le RA interagit par sa partie N-terminale avec RAP74, la grande sous-unité de TFIIF. Cela facilite par la suite l'interaction entre le RA et le co-activateur SRC-1. Une interaction plus modeste a aussi été décrite avec la sous-unité RAP30 de TFIIF et avec TBP (McEwan et Gustafsson, 1997). Le RA interagit aussi avec TFIIH ce qui entraîne une augmentation de la phosphorylation de l'extrémité carboxy-terminale de l'ARN polymérase, évènement nécessaire pour la transition de l'initiation de la transcription à son élongation (Lee *et al*, 2000). De

plus, en accord avec cela, une interaction entre le RA et le facteur d'élongation de la transcription p-TEFb a été décrite (Lee *et al*, 2001). Cette interaction entraîne de la même façon une phosphorylation de la polymérase, mais celle-ci intervient à un stade différent de la transcription (Lee et Chang, 2003).

En plus d'interagir avec les facteurs de la machinerie transcriptionnelle, le RA interagit également avec l'ARN polymérase II par une association avec sa sous-unité RPB2.

Toutes ces données confondues indiquent que le RA peut réguler la transcription de ses gènes cibles en agissant à la fois au niveau de l'initiation de la transcription mais aussi au niveau de son élongation.

b. Co-régulateurs du RA

Le premier co-activateur des récepteurs nucléaires décrit fut SRC-1 en 1995 (Oñate *et al*, 1995). Depuis lors, plus de 200 co-régulateurs des récepteurs nucléaires ont été identifiés, 169 d'entre eux étant de potentiels co-régulateurs du RA. Ces co-régulateurs ont différentes fonctions qui ne seront pas détaillées ici (pour revue voir Heemers et Tindall, 2007).

Certains d'entre eux sont des composants du complexe de remodelage de la chromatine. Une ATPase nucléaire, ARIP4 (AR-Interacting Protein 4), appartenant à la famille de protéine SNF2-like et remodelant la chromatine, stimule la transactivation dépendante du RA en interagissant avec le DBD du RA (Rouleau *et al*, 2002). De plus, plusieurs composants du complexe de remodelage de la chromatine SWI / SNF (switching / sucrose nonfermenting) améliorent la transactivation due au RA (Heemers et Tindall, 2007). Parmi eux, on peut citer deux ATPases nécessaires pour le repositionnement du nucléosome, BRG1 (Brahma-related gene) et hBRM (human homolog of *Drosophila* brm gene) qui sont capables de stimuler l'activité du RA (Marshall *et al*, 2003).

D'autres co-régulateurs sont des modificateurs d'histones. Il s'agit d'acetyltransférases (HAT) dans le cas de co-activateurs, et de déacétylases (HDAC) pour les co-répresseurs. C'est le cas des membres de la famille p160, SRC-1 et SRC-3 qui possèdent une activité HAT. Ils interagissent directement avec le RA de façon

ligand-dépendante pour améliorer la transcription médiée par le RA (Heinlein et Chang, 2002 ; Alen *et al*, 1999 ; Bevan *et al*, 1999). Les protéines SRC recrutent p300, un homologue CBP, et p/CAF (p300/CBP Associated Factors). Une interaction indépendante de SRC existe entre le RA, p300, CBP et p/CAF (Fu *et al*, 2000). D'autres protéines arborant des activités HAT interagissent avec le RA. C'est le cas de Tip60 (Tat interactive protein 60 kDa) qui interagit au niveau du LBD du RA et qui joue un rôle de co-activateur en acétylant les histones ainsi que le RA. HBO1 (Human origin recognition complex interacting protein) interagit également au niveau du LBD et du DBD du RA mais présente un rôle de co-répresseur du RA.

Des protéines ayant une activité méthyltransférase ou déméthylase interagissent également avec le RA pour moduler sa transactivation. C'est le cas notamment de ARA267 (AR-Associated protein 267 α) qui interagit au niveau de la région DBD-LBD du RA et qui possède une activité méthyltransférase (Wang *et al*, 2001).

De nombreuses autres protéines impliquées dans diverses voies interagissent avec le RA. Ces voies sont notamment celles de l'ubiquitination et du protéasome (comme E6-AP (Khan *et al*, 2006) ou Mdm2) et de la sumoylation (SUMO-3 (Zheng *et al*, 2006) ou Ubc9).

Comme cela a été indiqué auparavant, des protéines chaperonnes interagissent avec le RA dans sa conformation inactive (comme Hsp90 et Hsp70). Des protéines impliquées dans l'épissage (comme PSF, PSP1), dans le métabolisme de l'ARN (p54nrb, p44/MEP50) et dans la réparation de l'ADN (Ku70, DNA-PKc), des protéines du cytosquelette (Actine, Supervilline), d'autres impliquées dans l'endocytose (HIP1, APPL) ou encore des régulateurs du cycle cellulaire (Cycline D1, Cycline E) ou de l'apoptose (Caspase 8, Par-4) sont aussi impliquées dans la régulation de la transactivation du RA.

c. Facteurs de transcription spécifiques

De nombreux facteurs de transcription interagissent physiquement avec le RA. Une partie de ces facteurs sont répertoriés dans la figure suivante (figure 16). Leur régulation se fait par différents mécanismes. Certains, comme DAX-1, affectent la

capacité du RA à interagir avec ses ARE sans se lier eux-mêmes à l'ADN. En effet, DAX-1 interfère dans la dimérisation du RA et dans sa communication inter-domaine, ce qui a pour conséquence de prévenir la translocation nucléaire du RA en absence de ligand, et de réprimer le RA en présence de ligand par la dissociation du dimère (Holter *et al*, 2002 ; Iyer et McCabe, 2004).

D'autres comme le facteur AP-1, entrent en compétitions avec le RA pour des co-régulateurs présents en quantité limitée dans la cellule comme CBP. D'autres facteurs de transcription encore se lient à l'ADN à proximité des ARE permettant la coopération pour la transcription des gènes cibles (c'est le cas de Foxa2) (Yu *et al*, 2006).

Transcription factor	A/R	Direct/indirect
AML3/CBF α 1	A	Direct
AP-1	R	Direct-NTD, LBD
ATF2	R	Direct-DBD
Brn-1	A/R	Direct
c-Jun	A/R	Direct-DBDh, DBD-LBD
c-rel	R	Direct
c/EBP α	R	Direct-NTD, DBDh
Dax1	R	Direct-LBD
EGR1	A	Direct-NTD
ER α	R	Direct-NTD
FKHR	R	Direct-NTD, LBD
Foxa1	A	Direct-DBDh
Foxa2	A/R	Direct-DBD
FoxH1	R	Direct-NTD-DBD
GATA-2	A	ND
GATA-3	A	ND
GR	R	Direct-DBD
HoxB13	R	Direct
NF1	A	ND
Oct-1	A/R	Direct-DBD
Oct-2	ND	Direct-DBD
Pod-1	R	Direct-DBDh
p53	R	Indirect
PDEF	A	Direct-DBD
RelA	R	Direct-NTD-DBD
RXR	A/R	Direct-LBD
Sox9	A/R	Direct-DBD
Sp1	A	Direct
SRY	R	Direct-DBD
SHP	R	Direct-NTD, LBD
SF1	A	Direct-DBD
TR2	R	Direct
TR4	R	Direct-NTD, DBD, LBD
USF2	A	Direct

Figure 16 : Liste de différents facteurs de transcription interagissant avec le récepteur des androgènes.

Sont représentés dans ce tableau les facteurs de transcription qui activent (A) ou qui répriment (R) la fonction du RA, et cela de façon directe (Direct), indirecte (Indirect) ou l'annotation ND si cela n'est pas déterminé. Leur lieu d'interaction, domaine N-terminal (NTD), DBD ou la région DBD associée à la région charnière (DBDh) est également indiqué. D'après Heemers et Tindall, 2007.

5. Interaction endogène du récepteur des androgènes : interaction N-C.

Lors de l'activation de ses gènes cibles, le RA voit son domaine amino-terminal (NTD) interagir avec sa partie carboxy-terminale contenant le LBD formant ce que l'on appelle l'interaction N-C (Doesburg *et al*, 1997). Les motifs impliqués dans cette interaction sont le domaine AF-2 du LBD, et les motifs situés dans le NTD sont le motif FQNLF (appartenant à la famille de motifs FxxLF) et à un degré moindre le motif WHTLF (appartenant à la famille de motifs WxxLF).

Cette interaction N-C est facilitée par les co-activateurs (Ikonen *et al*, 1997). Une étude sur GRIP1 en 2005 a montré que ce dernier forme un pont entre le domaine NTD et le LBD du RA (Shen *et al*, 2005). Ainsi, l'activité de transactivation du RA est améliorée directement par l'interaction du motif FQNLF du NTD avec le domaine AF-2 du LBD, ou indirectement par le pont formé par GRIP1.

Une étude publiée en 2006 a démontré que l'interaction N-C joue également un rôle dans le contrôle de la liaison du RA à la chromatine. Dans cette étude, les auteurs suggèrent un modèle dans lequel une interaction N-C correcte est nécessaire pour que le RA puisse recruter le complexe SWI / SNF (intervenant dans le remodelage de la chromatine), qui va à son tour remodeler la chromatine pour permettre au RA de se lier à ses éléments de réponse localisés sur la chromatine (Li *et al*, 2006).

D'autre part, des études récentes ont mené à la connaissance de deux unités d'activation de la transcription localisées dans le NTD du RA qui sont impliquées dans cette interaction N-C. Il s'agit des domaines Tau-1 et Tau-5 (figure 6). L'étude de Callewaert *et al* en 2006 indique que Tau-1 et Tau-5 sont des acteurs majeurs de la transactivation médiée par le NTD en ce sens que Tau-5 est impliqué dans le recrutement de cofacteurs tel que SRC-1, et que Tau-1 participe indirectement à ce recrutement par l'intermédiaire d'un partenaire de co-activation.

6. Exemple de gènes cibles du récepteur des androgènes

a. Le gène PSA

Ce gène est situé sur le chromosome 19 en position q13.3-q13.4. Il appartient à la famille de gènes codant pour des sérines protéases « Kallikrein-like ». Il code pour l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA). Le PSA est une glycoprotéine de faible masse moléculaire (34 kilodaltons), mise en évidence par Wang en 1979 dans le tissu prostatique (Wang *et al*, 1999). Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 240 acides aminés fabriquée exclusivement par les cellules épithéliales du tissu prostatique, normal, hyperplasique ou néoplasique. Le rôle physiologique du PSA est de liquéfier le sperme afin de faciliter le déplacement des spermatozoïdes. Il est aussi supposé qu'il aide à dissoudre la muqueuse cervicale, favorisant ainsi l'entrée du sperme.

La régulation de ce gène par le RA se fait au niveau de trois ARE présents au sein de son promoteur. Deux d'entre eux (ARE I et ARE II) sont localisés au niveau du promoteur proximal respectivement aux positions -170 à -156 pb et -394 à -376 pb du site d'initiation de la transcription (figure 17), et ARE III se situe dans la région activatrice distale en position -4148 à -4134 pb (Cleutjens *et al*, 1997). Le site ARE I est un site de liaison de haute affinité pour le RA, de plus cette séquence « 5'-GGTACAnnnTGTTCT-3' » est proche de la séquence ARE consensus. Au contraire, le site ARE II est une séquence consensus de faible affinité mais qui peut coopérer avec d'autres ARE pour augmenter ainsi le pouvoir transcriptionnel du promoteur (Cleutjens *et al*, 1996). Par ailleurs, le site ARE III « 5'-GGAACAatTGTATC-3' » est une séquence de haute affinité pour le RA. D'autres ARE (-4366 à -3874 pb), AREIIIA, AREIIIB, AREIV, AREV et AREVI, entourent le site principal ARE III. Ces ARE sont de faibles affinités mais comme pour ARE II, leur présence conduit à des activités transcriptionnelles plus fortes (Huang *et al*, 1999).

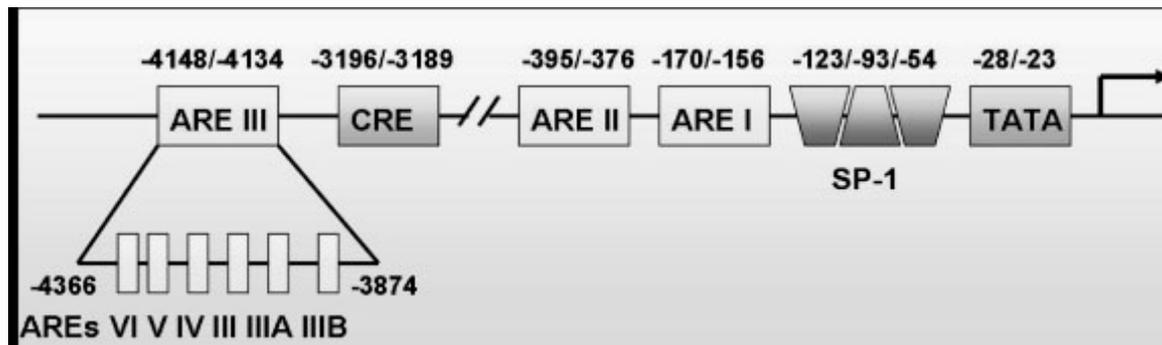


Figure 17 : Promoteur du gène PSA.

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 SP1 (Specificity Protein 1) appartenant à une large famille de facteurs transcriptionnels, et d'une région promotrice en amont refermant les séquences ARE III et CRE (cAMP Response Element), le site potentiel de fixation du facteur CREB (cAMP responsive Binding Protein).

D'après Kim et Coetzee, 2004.

b. Le gène *TMPRSS2*

Le gène *TMPRSS2* est localisé sur le chromosome 21 en position q22, et code pour une protéine transmembranaire de type II avec une activité protéase dans sa partie extracellulaire (Afar *et al*, 2001). Le promoteur du gène *TMPRSS2* est régulé par le RA au niveau d'un site potentiel ARE nommé ARE V, situé en position -13,5 kb par rapport au site d'initiation de la transcription. En effet, bien qu'il existe cinq sites de liaison du RA dans la région régulatrice du gène *TMPRSS2* (figure 18), le site ARE V (localisé à la position -13,5 kb du site d'initiation de la transcription) est celui qui est le mieux reconnu par le RA sauvage, et à partir duquel le RA sauvage est le plus fonctionnel (Wang *et al*, 2007).

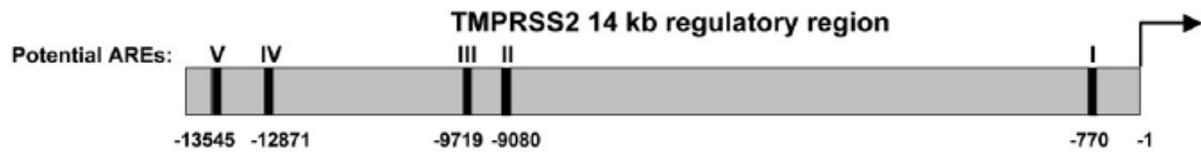


Figure 18 : Représentation schématique de la région régulatrice du gène *TMPRSS2*.

Les 5 sites ARE potentiels sont indiqués ainsi que leur position par rapport au site d'initiation de la transcription.

D'après Wang *et al*, 2007.

Récemment, des réarrangements chromosomiques impliquant le locus du gène *TMPRSS2* et ceux des gènes *ERG*, *ETV1* et *ETV4*, codant pour des facteurs de transcription de la famille ETS ont été mis en évidence dans une large fraction de cancer de la prostate. 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 (Petrovics *et al*, 2005).

Ces translocations aboutissent à des fusions géniques entre la région promotrice du gène androgéno-dépendant *TMPRSS2* et le facteur *ERG* situé sur le même chromosome en position 21q22.3. Alternativement, la région promotrice du gène *TMPRSS2* peut être transloquée en amont de gènes codant pour les facteurs *ETV1* (7p21) ou *ETV4* (17q21). Ces translocations aboutissent aux gènes de fusion *TMPRSS2:ERG*, *TMPRSS2:ETV1* ou *TMPRSS2:ETV4*, dont l'expression devient ainsi androgéno-dépendante. Suivant les études, les réarrangements chromosomiques issus de fusions géniques *TMPRSS2:ETS* seraient présents dans 50 à 70 % des cancers de la prostate (Tomlins *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.

Il s'agit du premier mécanisme moléculaire décrit impliquant directement les activités transcriptionnelles du RA dans le soutien à la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, les facteurs de transcription de la famille ETS contrôlent l'expression des gènes *IGF-I* et *IGF-II*, deux facteurs de croissance connus pour stimuler la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. Suite aux

translocations, l'expression de ces deux gènes, et par voie de conséquence, la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques, est étroitement lié aux activités transcriptionnelles du RA.

D'autre part, puisque les cellules cancéreuses arborant ces fusions géniques possèdent des caractéristiques morphologiques spécifiques, la recherche de ces fusions au niveau des tumeurs pourrait devenir un moyen de diagnostic routinier. En effet, cinq caractéristiques morphologiques ont été associées à la fusion TMPRSS2-ERG dans le CaP dont un aspect de croissance cribriforme et des macronucléoles (Mosquera *et al*, 2007).

II. La prostate et le cancer de la prostate

A. Anatomie et fonction de la prostate

La prostate englobe le carrefour des voies urinaires et des voies génitales, d'où l'origine de son nom « *prostates* » en grec, qui signifie « *protecteur, ou qui se tient devant* ».

La prostate saine est approximativement de la taille d'une prune, de 15 à 25 g à l'âge adulte (volume estimé à 20 cm³ environ). Très petite à la naissance, c'est lors de la puberté qu'elle prend du volume. Cette glande subie une seconde période de croissance après l'âge de 60 ans.

La prostate est située à l'intérieur de la loge prostatique, elle-même localisée en dessous de la vessie (figure 19 A). C'est une large glande de l'appareil génital masculin. Sa fonction principale est de sécréter et de stocker le liquide séminal, l'un des constituants du sperme. Ce liquide séminal est composé de nombreuses enzymes dont la phosphatase acide (PAP pour prostatic acid phosphatase) et l'antigène spécifique de la prostate (PSA pour prostate specific antigen), ce dernier participant à la liquéfaction du sperme. Le sperme se compose des spermatozoïdes et du fluide séminal ; environ 10 à 30% du fluide séminal est produit par la prostate, le reste étant produit par la vésicule séminale.

La prostate est située devant le rectum et juste au-dessous de la vessie, et entoure le canal de l'urètre (figure 19). L'urètre, dans cette portion prostatique, est entouré de deux sphincters (anneaux musculaires), l'un à l'entrée, l'autre à la sortie (figure 19 B). L'urètre masculin a deux fonctions : évacuer l'urine pendant la miction et transporter le sperme pendant l'éjaculation.

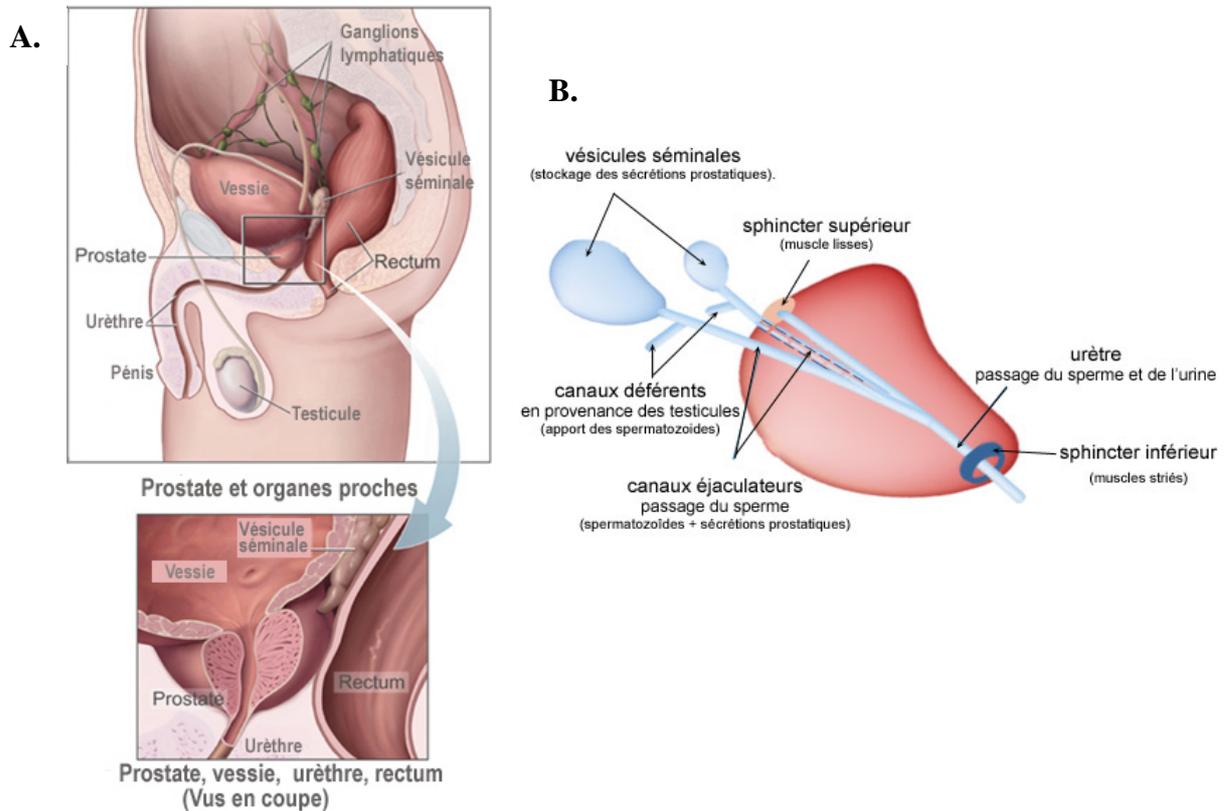


Figure 19 : Représentation de la prostate.

A. Localisation spatiale de la prostate chez l'homme.

B. Représentation des canaux présents à l'intérieur de la prostate.

La prostate contient les canaux éjaculateurs. En effet, c'est à l'intérieur de la prostate que se fait la jonction entre l'urètre venant de la vessie, le canal déférent (canal permettant aux spermatozoïdes de sortir de chacun des testicules et de rejoindre la prostate) et la vésicule séminale (produisant un liquide riche en glucides, partie majoritaire du sperme, servant à nourrir les spermatozoïdes) (figure 19 B). La prostate contient également un muscle qui aide à expulser le sperme pendant l'éjaculation.

Pour fonctionner correctement, la prostate a besoin d'androgènes, les hormones masculines. Comme énoncé précédemment, l'androgène principal est la testostérone, hormone stéroïde produite principalement par les testicules. Elle a une action permanente et indispensable sur les vésicules séminales et la prostate.

La prostate est composée de trois zones anatomiques (figure 20) : la zone périurétrale également appelée zone de transition (ZT), la zone centrale (ZC) située autour des canaux éjaculateurs, et la zone périphérique (ZP). Cette glande est composée d'un ensemble d'éléments appelés lobules. Ces lobules sont formés d'un tissu de soutien contenant des fibres musculaires lisses, des vaisseaux sanguins, des terminaisons nerveuses, ainsi que des formations glandulaires qui secrètent le liquide prostatique.

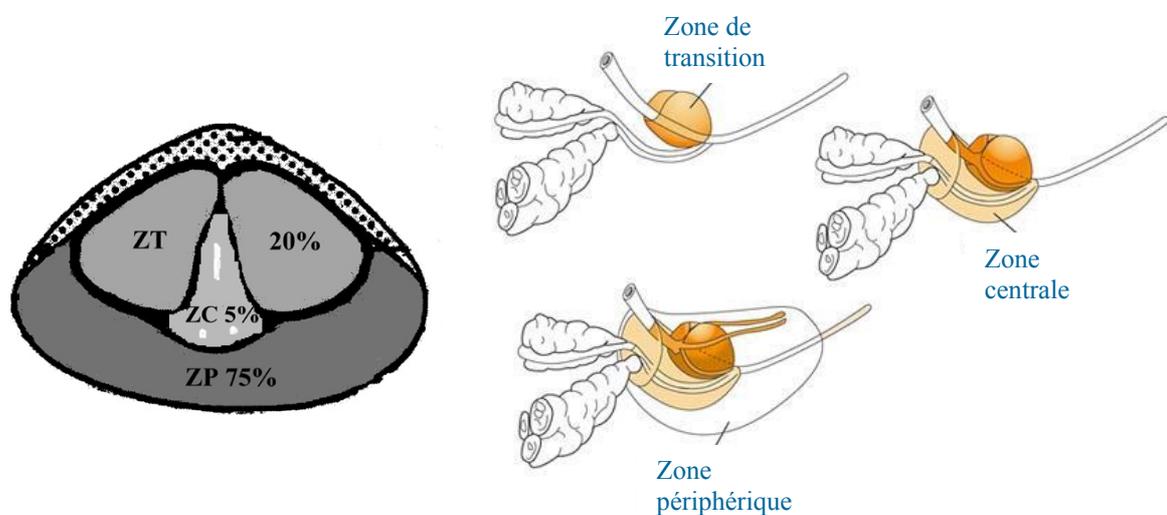


Figure 20 : Zones anatomiques de la prostate.

ZT : zone de transition ; ZC : zone centrale ; ZP : zone périphérique.

Les chiffres correspondent à la fréquence d'apparition des cancers de la prostate dans chacune des zones.

B. Composition tissulaire de la prostate

La prostate est composée d'un épithélium glandulaire et d'un stroma fibromusculaire. C'est à partir de l'épithélium que se développe le carcinome prostatique.

1. Epithélium prostatique

L'épithélium prostatique est composé de deux couches cellulaires (Long *et al*, 2005). Tout d'abord la couche basale, qui renferme les cellules souches ainsi que des cellules intermédiaires prolifératrices (*differentiating transit amplifying cells*), impliquées dans la différenciation. Ces dernières cellules sont donc dans un état intermédiaire entre les cellules non différenciées (cellules souches) et les cellules différenciées de la couche supérieure. La seconde couche présente dans l'épithélium est la couche luminale, arborant les cellules sécrétrices différenciées. Traditionnellement, il était considéré que les deux couches basales et lumineales étaient deux types cellulaires distincts. Cependant, nous savons désormais que les cellules impliquées dans le transit de différenciation donnent naissance à une sous-population hétérogène de cellules lorsqu'elles migrent de la couche basale vers la couche luminale.

Un troisième type cellulaire est également retrouvé, dispersé dans toute la glande prostatique, constitué par les cellules neuroendocrines (Schalken et Van Leenders, 2003). Ces cellules sont indépendantes des androgènes (Abrahamsson, 1996). Leur rôle exact n'est actuellement pas complètement compris, mais ces cellules doivent jouer un rôle dans la croissance et la différenciation de la prostate, et sont impliquées dans la carcinogenèse (di Sant'Agnese, 1998).

Les cellules souches, qui ont pour propriété de se diviser de façon infinie, représentent 2 % de la couche basale (Rizzo *et al*, 2005). Elles n'expriment pas le RA mais 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 lumineales sécrétrices hautement différenciées (Lam et Reiter, 2006). Les cellules lumineales ne prolifèrent pas, mais 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).

2. *Stroma prostatique*

Le stroma est constitué de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de cellules endothéliales, dendritiques, nerveuses et de quelques cellules infiltrées de type lymphocytaire. Les cellules stromales, les cellules musculaires lisses et les macrophages, expriment un RA et sont ainsi androgéno-dépendantes alors que les fibroblastes, n'exprimant pas de RA, sont androgéno-indépendants (Prins *et al*, 1991).

Le stroma produit de nombreux facteurs de croissance. Certains sont impliqués dans la différenciation prostatique, d'autres dans la prolifération ou dans l'inhibition de la croissance cellulaire (Wong et Wang, 2000). Ces facteurs agissent 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. De plus, les effets androgéniques observés sur les cellules épithéliales impliqueraient le RA des cellules stromales et non celui des cellules épithéliales (Cunha *et al*, 2004). Par ailleurs, alors que le RA des cellules stromales conduit à la sécrétion de facteurs de croissance qui vont agir directement sur les cellules épithéliales pour induire leur différenciation, le RA des cellules épithéliales permet d'activer la production des sécrétions prostatiques (PSA, PAP). (Figure 21).

Ainsi, le processus de différenciation implique des interactions complexes entre le stroma et l'épithélium, afin de maintenir un équilibre entre prolifération, différenciation et apoptose.

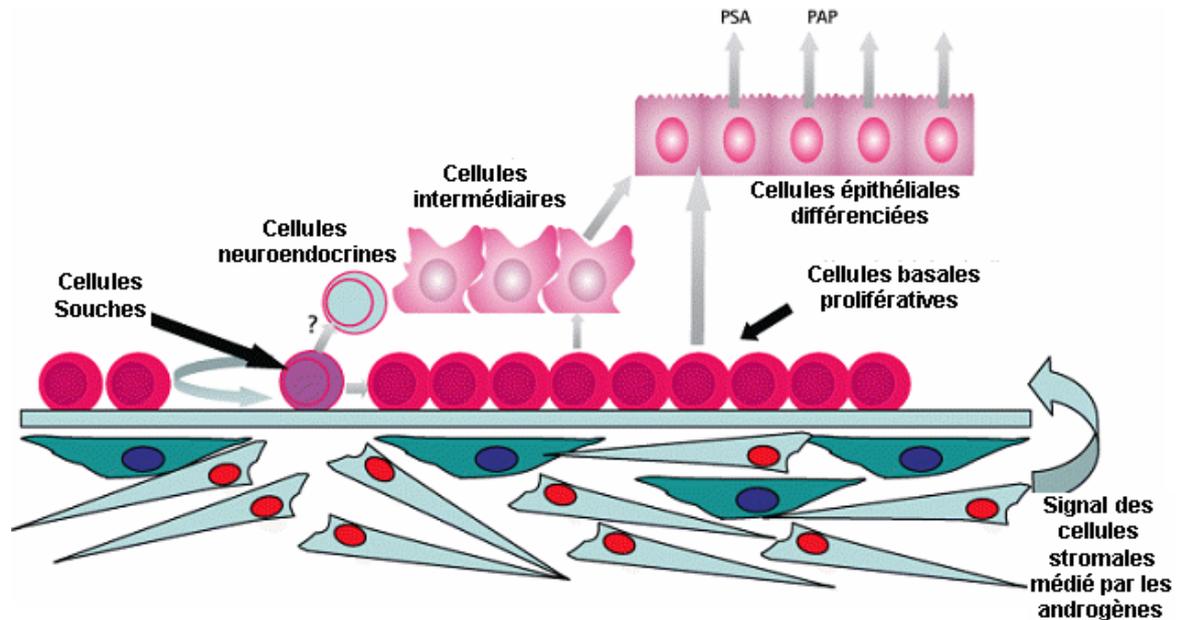


Figure 21 : Relation entre les différents types cellulaires de la prostate.

Les cellules stromales sécrètent des facteurs de croissance qui vont agir de façon paracrine sur les cellules épithéliales afin d'induire leur différenciation. Les cellules épithéliales différenciées expriment le RA et sécrètent les enzymes du fluide séminal (PSA, PAP).
D'après Maitland et Collins, 2005.

La matrice extracellulaire, les facteurs de croissance provenant du stroma, ainsi que les androgènes sont essentiels au bon fonctionnement et à la différenciation de l'épithélium prostatique. Etant donné l'importance des interactions entre le stroma et l'épithélium prostatique, on comprend que des modifications du stroma soient impliquées dans le processus de carcinogenèse prostatique. En effet, le stroma d'une tumeur de la prostate diffère d'un stroma prostatique normal en fonction de l'expression de certains gènes comme SDF-1, une cytokine impliquée dans l'angiogénèse.

C. Histoire du cancer

Dans la Grèce antique, les Asclépiades désignent diverses familles vouées à l'exercice de la médecine. Ce sont les Asclépiades qui ont dénommé *karkinos* cette redoutable affection que l'on compte parmi les plus grands fléaux de l'humanité. Ils

désignaient ainsi toutes les tumeurs à marche envahissante et rapide, qui déterminent la mort.

Mais pourquoi les Grecs ont-ils donné à ces tumeurs le nom de *karkinos*, mot qui signifie « crabe » ? Deux possibilités se présentent à nous. La première pourrait être en raison d'une comparaison des pattes d'un crabe à la forme des veines dilatées, des lymphatiques engorgés et des traînées cancéreuses qui s'écartent en rayonnant autour d'une tumeur, masse principale rappelant le corps d'un animal. L'autre possibilité pourrait être que les Asclépiades ont cru qu'un animal rongerait les tissus, tenaillant les malades, les enserrant comme dans un étau. C'est ainsi qu'Hippocrate définit en premier la maladie, comme un gonflement dur (tumeur), non-inflammatoire, ayant tendance à récidiver et se généraliser jusqu'à la mort. Les latins ont par la suite conservés l'appellation grecque sous la forme latine de *cancer*.

D. Le cancer

Le cancer est une maladie due à une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases. Les cellules cancéreuses possèdent des caractéristiques propres. Elles présentent ainsi une capacité de croissance exagérée qui est stimulée de façon non physiologique. Par ailleurs, ces cellules sont insensibles aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire, et elles ont la particularité d'échapper à l'apoptose. De plus, les cellules cancéreuses sont capables de se diviser de façon illimitée, mais aussi d'induire une néo-angiogénèse, processus nécessaire au soutien de la croissance tumorale. Enfin, ces cellules possèdent des capacités d'invasion et de métastases. Tous ces avantages acquis caractérisent une cellule cancéreuse.

A l'heure actuelle, plusieurs hypothèses existent quand à l'origine des cellules cancéreuses. L'hypothèse la plus ancienne est que les cellules cancéreuses dérivent toutes d'un même clone, appelée cellule initiatrice du cancer (figure 22 A). Dans ce cas, la transformation de cellules humaines normales en cellules cancéreuses met en jeu plusieurs altérations géniques successives faisant du cancer une pathologie

multigénique. Ces altérations se produisent de manières successives, chacune d'entre elles favorisant la suivante (figure 22 B). Ainsi, dans de rares cas, une mutation peut atteindre et modifier la structure d'un gène codant pour un facteur qui règle le contrôle de la multiplication cellulaire (oncogène ou gène suppresseur de tumeur). Dans ce cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif qui lui permettra de donner naissance à un premier clone de cellules anormales (lésion pré-cancéreuse). Dans ces cellules qui ont un avantage sélectif, la probabilité qu'une seconde mutation apparaisse et soit sélectionnée est plus importante. Dans ce cas, une seconde population sera générée, plus anormale que la première et qui va se développer aux dépens de cette dernière. Il y a ainsi, par diverses étapes successives, accumulation de plusieurs mutations, chacune d'entre elles permettant la sélection d'un clone de plus en plus malin pour finir par une cellule hautement cancéreuse. La progression tumorale correspond donc à un processus dynamique qui, à chaque étape, sélectionne une nouvelle cellule ayant subi une ou plusieurs altérations, donnant naissance à une tumeur dans laquelle toutes les cellules ont un pouvoir tumorigène.

Actuellement, bien que la théorie des mutations reste valable pour certains cancers, deux autres hypothèses sont avancées pour expliquer l'origine des cancers. Ainsi, le modèle des cellules souches prédit que seules certaines cellules présentes au sein de la tumeur, les cellules souches, ont des capacités tumorigéniques. Dans ce modèle, des mutations initiatrices du cancer ont donc lieu dans quelques cellules souches, capables de soutenir la prolifération de la tumeur (Maitland et Collins, 2005).

Le dernier modèle avancé pour l'origine des cancers est un défaut de communication entre le stroma et l'épithélium. En effet, comme précisé auparavant, il y a des échanges entre ces deux tissus importants pour un bon développement de la glande prostatique. Si ces échanges sont perturbés, l'épithélium peut donc se développer très vite par augmentation des signaux de prolifération en provenance des cellules stromales, induisant ainsi le développement d'une tumeur (Cunha *et al*, 2004).

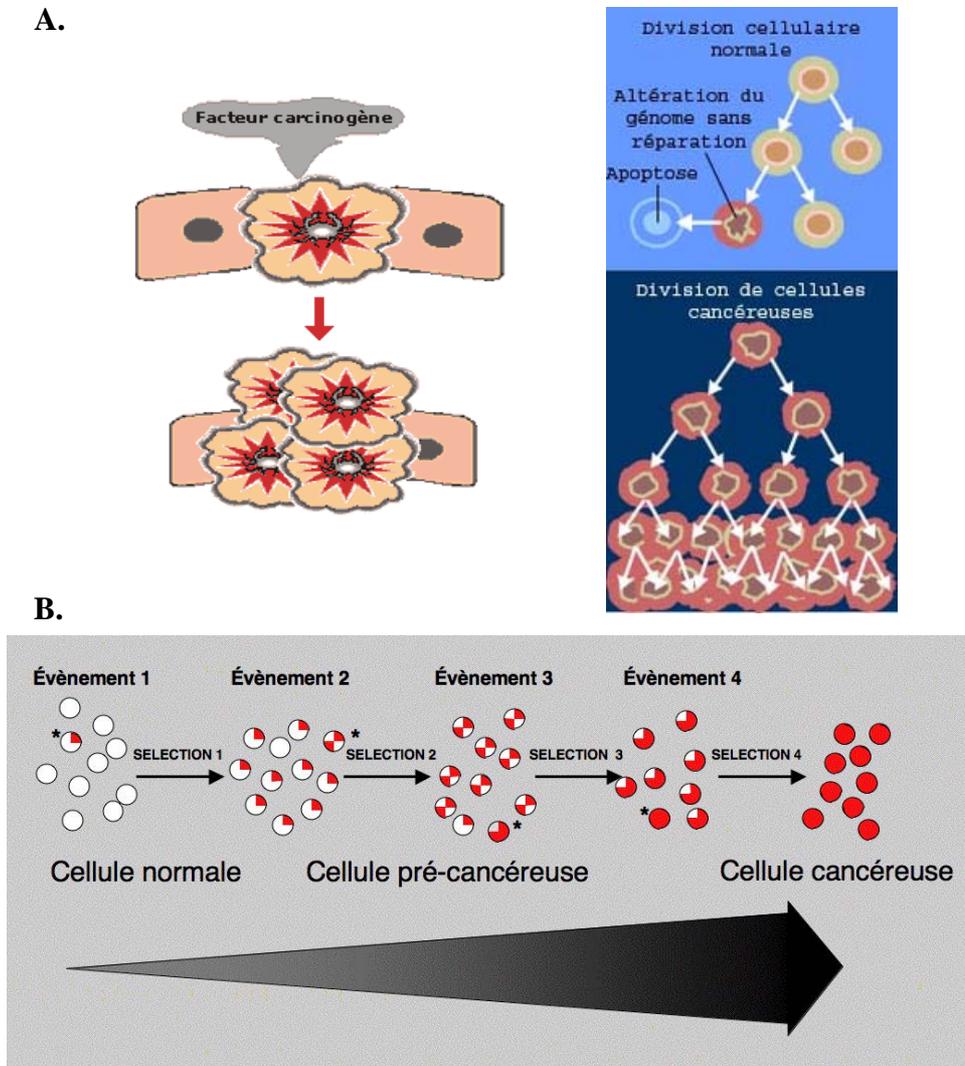


Figure 22 : Origine du cancer.

A. Lorsqu'une cellule subit une altération de son génome et que celle-ci n'est pas réparée, elle donne naissance à un clone.

B. Dans le clone formé, l'acquisition d'une autre mutation est favorisée. Plusieurs étapes d'accumulation de mutations conduisent à la naissance de cellules cancéreuses.

E. Le Cancer de la Prostate

Peu reconnu au 19^{ème} siècle où des cas de cancer de la prostate (CaP) étaient présentés lors de congrès médicaux comme un phénomène rare (Lytton, 2001), c'est actuellement le cancer le plus commun chez les hommes. En effet, avec plus de 62 000 nouveaux cas par an, le CaP représente le premier cancer de l'homme en France devant le cancer du poumon (24 000 nouveaux cas), et arrive au deuxième rang des décès par cancer chez l'homme dans les pays occidentaux après le cancer bronchique avec environ 10 000 décès par an (contre environ 27 000 pour le cancer bronchique). Ainsi, le CaP représente un problème majeur de santé publique.

Après des années de croissance lente mais régulière, l'incidence du CaP a augmenté de façon significative entre 1989 et 1993. Le nombre de CaP a augmenté de 9% en moyenne entre 1995 et 2000. Cette augmentation est estimée à 15% par an depuis 2000 (Villers *et al*, 2004). Cet accroissement serait attribuable au vieillissement de la population (au 19^{ème} siècle, les hommes vivaient moins de 50 ans contre 73 ans aujourd'hui), ainsi qu'à l'amélioration des techniques de dépistage et de l'utilisation du dosage du PSA comme test de diagnostic précoce. Ainsi, des CaP non détectés auparavant le sont actuellement. De plus, de nombreux hommes meurent avec un cancer de la prostate sans que celui-ci n'en soit la cause. Entre les années 2000 et 2004, l'âge moyen de diagnostic d'un CaP était de 68 ans.

Comparativement à d'autres cancers, le pronostic du cancer de la prostate est plutôt bon. La survie augmente nettement au cours du temps. L'amélioration des pratiques de diagnostic et le dépistage sont à l'origine du diagnostic de cas peu évolués qui sont de bon pronostic, ce qui entraîne automatiquement une augmentation de la survie moyenne. Derrière cet impact majeur du dépistage, il est difficile de faire la part d'un effet dû à l'amélioration des traitements. La gravité du cancer dépend de l'étendue de la tumeur (locale, avec métastases avoisinantes ou à distance), et du type de cellules cancéreuses, c'est à dire de leur degré de malignité. De plus, le cancer demeure bien souvent localisé dans la prostate et n'a que peu ou pas d'effet sur l'état de santé général de la personne.

F. Origine du Cancer de la Prostate

La majorité des cancers prostatiques se développera à partir de lésions précancéreuses de l'épithélium prostatique. La néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN) a été reconnue comme une lésion précurseur du CaP. Il s'agit d'anomalies nucléo-cytoplasmiques présentes sur une seule assise cellulaire au niveau des glandes et des tubules de la prostate. Trois grades ont été définis, de la dysplasie légère, parfois difficile à différencier de l'épithélium normal, à la dysplasie sévère (PIN de haut grade) (Vandenbos *et al*, 2004).

Comme cela a été précisé précédemment, la prostate est composée de trois zones anatomiques : la zone périurétrale également appelée zone de transition (ZT), la zone centrale (ZC) située autour des canaux éjaculateurs, et la zone périphérique (ZP) (figure 20).

La zone de transition et la zone centrale sont au contact de l'urètre et des canaux éjaculateurs. C'est dans ces zones que se développe l'hyperplasie bénigne (HPB) ou adénome de la prostate. L'HPB est une tumeur bénigne qui se traduit par une augmentation de volume (hypertrophie) d'une partie de la prostate. Cette augmentation de volume concerne la majorité des hommes après 50 ans, mais n'a pas obligatoirement de retentissement clinique. Le CaP survient indépendamment de l'adénome prostatique. Autour de ces zones se trouve la zone dite périphérique, très riche en petites glandes et où se développent fréquemment (mais non exclusivement) les cancers. En effet, environ 75 % des CaP naissent 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.

Les CaP ne dépassant pas la capsule prostatique sont dits localisés (à la glande prostatique), et ceux dont les cellules cancéreuses ont dépassé cette capsule sont au moins localement avancés voir métastatiques.

G. Diagnostic du Cancer de la Prostate

Les carcinomes prostatiques apparaissant en général dans la zone périphérique de la glande, il est de ce fait inhabituel qu'ils soient symptomatiques à un stade localisé ou même extra-capsulaire. Les symptômes initiaux du cancer de la prostate sont le plus souvent secondaires à l'extension extra-prostatique et aux métastases, notamment osseuses. Les symptômes typiques de «prostatisme» (diminution du jet, difficultés à initier et interrompre la miction, fréquence excessive des mictions appelées pollakiurie) sont en général dus à l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) et non pas au cancer prostatique. Toutefois, comme la prévalence de l'HBP et de cancer augmente avec l'âge, il n'est pas rare qu'un cancer soit découvert fortuitement lors de la prise en charge de symptômes urinaires.

H. Dépistage du Cancer de la Prostate

Le dépistage du CaP repose sur des tests complémentaires incluant un test sanguin afin de doser l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA), un toucher rectal, et un diagnostic issu d'un examen par imagerie révélant les anomalies de la glande prostatique. Que la maladie ait une progression lente ou agressive, elle ne peut être détectée de façon certaine qu'avec une biopsie.

1. Dosage de l'Antigène Spécifique de la Prostate

Le PSA est normalement présent dans le sang de tous les hommes à un taux infime, et sous une forme libre ou bien conjugué. Son taux sanguin augmente avec l'âge et le volume prostatique (HBP, CaP). Cependant, le PSA peut aussi être augmenté transitoirement en cas de prostatite (infection de la prostate), de chirurgie prostatique, de biopsie, d'irritation, d'éjaculation récente ou de toucher rectal. Le PSA n'est donc pas spécifique des lésions cancéreuses, mais signale plutôt une pathologie prostatique. Cependant, une gamme de concentration du PSA indique quel genre de pathologie est en jeu. Ainsi, il est considéré qu'un taux de PSA de 4 ng/ml est normal.

En revanche, des taux compris entre 4 et 10 ng/ml sont jugés comme suspects vis à vis du CaP. Des taux au delà de 10 ng/ml sont hautement significatifs. Les taux très élevés de PSA témoignent le plus souvent de formes évoluées de CaP (Bradford *et al*, 2006).

Comme nous l'avons vu, le taux de PSA dépend de plusieurs facteurs qui sont le volume de la prostate, la masse tumorale mais aussi la différenciation prostatique. En effet, un taux de PSA faible peut correspondre à une prostate normale tout comme à une néoplasie prostatique très différenciée donc très agressive, d'où l'importance d'associer le dosage du PSA aux examens de toucher rectal.

Dans la circulation sanguine, la demi-vie du PSA est de deux à trois jours. Son élévation dans le sérum semble résulter davantage de modifications et d'altérations de structures cellulaires que d'une hypersécrétion de cette protéine par les cellules cancéreuses. Une augmentation de la concentration du PSA a été montrée dans différentes pathologies prostatiques incluant le CaP mais aussi l'hypertrophie bénigne et les prostatites aiguës ou chroniques. C'est pourquoi son utilisation au titre de dépistage du CaP est contestée. De plus, lors d'une étude évaluant l'efficacité du test du PSA, 15% des hommes ayant obtenu un résultat négatif à ce test (sur une cohorte de 2950 hommes âgés de 62 ans à 91 ans) avaient effectivement le CaP (Thompson *et al*, 2004). Le calcul du rapport PSA libre/PSA total, diminué en cas de cancer, augmente la sensibilité et la spécificité du test, cependant l'implication pratique de ce dosage n'est aujourd'hui pas encore établie.

Ainsi, la détermination du PSA reste très utile dans le pronostic, la surveillance des cancers ainsi que pour les contrôles effectués après prostatectomie radicale, mais il est important qu'il soit associé au toucher rectal.

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-dessous (Figure 23).

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

Figure 23 : Biomarqueurs candidats pour la détection de cancers de la prostate. D'après Bradford et al, 2006.

2. Toucher rectal

La réalisation d'un toucher rectal a pour but d'établir la présence d'une anomalie dans la forme et la consistance de la glande. Puisque la prostate est située immédiatement à l'avant du rectum, le médecin peut la palper à travers la paroi rectale. Une prostate normale est lisse et ferme sans être dure. Il est recommandé de réaliser le toucher rectal et le dosage de PSA à titre de tests complémentaires.

I. Classification du Cancer de la Prostate

1. Classification TNM

Un système de classification identique pour tous les cliniciens et les pathologistes a été adopté par le comité «American Joint Committee on Cancer» (AJCC) pour définir les CaP en terme de stade clinique. Il s'agit du 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). Cette classification est d'une grande importance pour évaluer l'état clinique du patient et décider d'un traitement adapté (Hoedemaeker *et al*, 2000). Elle comporte différents stades décrits ci-dessous selon la version 2002 de l'AJCC.

➤ **Le stade T1**

Une tumeur T1 est non palpable et non visible à l'imagerie. Sa détection se fait de manière fortuite sur une résection transurétrale, une adénomectomie, ou a été recherchée par biopsie. On distingue le stade T1a quand la tumeur représente moins de 5 % du tissu de résection et le stade T1b quand elle représente plus de 5 % du tissu de résection. Une tumeur décelée sur une biopsie quelque soit le nombre de sites biopsiques atteints est classifiée de stade T1c.

➤ **Le stade T2**

Ce stade concerne les tumeurs confinées à la glande prostatique, mais macroscopiquement identifiables et éventuellement palpables selon leur localisation. Une tumeur est dite T2a lorsqu'elle atteint moins de 50% d'un lobe, et T2b lorsqu'elle atteint plus de 50% d'un lobe. Enfin, elle est dite T2c lorsqu'il y a atteinte des deux lobes (figure 24).

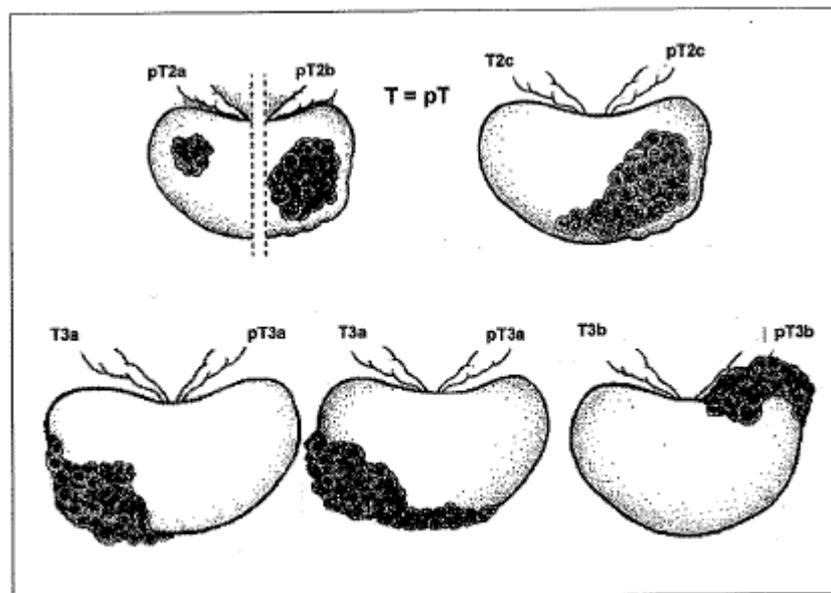


Figure 24 : Représentation schématique des stades T de la classification TNM du cancer de la prostate (AJCC de 2002).

➤ **Le stade T3**

On parle de stade T3 lorsque la tumeur s'est étendue au delà de la capsule prostatique. Lorsqu'il y a atteinte du tissu extra-prostatique (de façon unilatérale ou bilatérale) on parle alors de stade T3a, et lorsque l'extension atteint les vésicules séminales on parle de stade T3b (figure 24). A ce stade la chirurgie radicale n'a plus de raison d'être. En effet, l'exérèse de la prostate n'est plus suffisante pour contrôler la maladie néoplasique.

➤ **Le stade T4**

A ce stade, la tumeur s'est étendue aux structures adjacentes autres que les vésicules séminales (vessie, urètre, rectum).

➤ **Le stade N**

Ce stade correspond à l'atteinte des ganglions régionaux, essentiellement les ganglions pelviens situés au-dessous de la bifurcation des artères iliaques. On distingue l'absence de métastases ganglionnaires (stade N0), et la présence de métastases ganglionnaires (stade N1).

➤ **Le stade M**

Ce stade est divisé en deux sous-classes et correspond à l'apparition des métastases à distance. On distingue ainsi l'absence de métastases à distance (stade M0) de la présence de métastases en dehors du petit bassin (stade M1). Le site privilégié des métastases du CaP est la moelle osseuse.

2. Grade et score de Gleason

Lorsqu'un cancer de la prostate est diagnostiqué, le système de gradification le plus fréquemment utilisé est le grade de Gleason, qui comprend une échelle de 1 à 5 en fonction de l'architecture de la tumeur, le grade 1 correspondant à un carcinome bien différencié, le grade 5 à un carcinome indifférencié. Ce système de gradient a été établi par le Docteur Donald Gleason en 1966 (figure 25).

Grade	Glandes tumorales / épithélium	Aspect histologique
1	Prolifération monotone de glandes simples, arrondies étroitement regroupées	Nodules arrondis aux bords bien dessinés
2	Glandes simples, arrondies, plus dispersées	Masses vaguement arrondies, aux bords mal définis
3A	Glandes simples, de tailles moyennes, de forme, de taille et d'espacement irrégulier	Masses irrégulières aux bords déchiquetés
3B	Glandes simples, de très petites tailles, de forme, de taille et d'espacement irrégulier	Masses irrégulières aux bords déchiquetés
3C	Massifs épithéliaux cribriformes ou papillaires, à bords réguliers	Zones irrégulières constituées de cylindres et massifs arrondis
4A	Massifs épithéliaux de glandes fusionnées	Massifs et cordons irréguliers de glandes fusionnées
4B	Même aspect que 4A, avec présence de cellules claires	Massifs et cordons irréguliers Aspects "d'hypernéphrome"
5A	Massifs arrondis papillaires ou cribriformes avec nécrose centrale	Cylindres et massifs arrondis disposés de façon variable, avec nécrose ("Comédocarcinome")
5B	Adénocarcinome anaplasique	Massifs très irréguliers

Figure 25 : Système de classement des tumeurs réalisé par D. Gleason en 1974.
Ce système tient compte de la diversité morphologique des carcinomes et permet de donner une signification pronostique au type de cancer.

Compte tenu de l'hétérogénéité fréquente des carcinomes prostatiques, on a recours à une score appelé score de Gleason, qui correspond à la somme des grades des deux territoires les plus représentés dans la tumeur. Lorsque la tumeur est homogène, on double le grade existant pour ne pas entraîner de confusion entre le grade et le score. Ce score de Gleason varie donc de 2 à 10. Les scores de 2 à 4 sont généralement jugés faibles ; 5 et 6 sont plus faibles que la moyenne ; 7 est intermédiaire et le plus courant ; les scores de 8 à 10 sont jugés élevés. Plus le score de Gleason est faible, plus les tumeurs sont différenciées, et inversement plus le score de Gleason est élevé (supérieur à 8) plus la tumeur est indifférenciée et agressive (figure 26).

Le score de Gleason permet d'établir le degré de propagation du cancer à l'extérieur de la prostate. Ainsi, un score de Gleason élevé, de 8 à 10, combiné à un PSA élevé, rend probable la présence de cancer à l'extérieur de la prostate, ce qui a d'importantes répercussions sur le traitement et le pronostic. Le pronostic est en effet d'autant plus défavorable que les tumeurs sont moins bien différenciées.

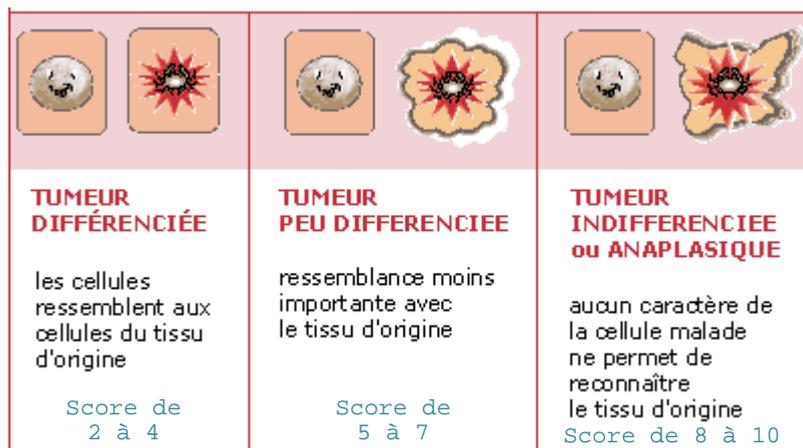


Figure 26 : Caractère de différenciation des tumeurs.

Plus la tumeur est agressive, moins elle est différenciée, c'est-à-dire qu'elle ne ressemble plus au tissu d'origine. La corrélation des stades avec le score de Gleason est indiquée.

Le stade tumoral selon le score de Gleason a une meilleure valeur pronostique quant à l'évolution attendue d'un cancer que la classification formelle selon le système TNM. Le score de Gleason influence donc de façon prépondérante les traitements qui seront choisis. Cependant, le taux de PSA ainsi que la classification selon le système TNM rentrent également en jeu pour le choix des traitements.

J. Facteurs de risque du Cancer de la Prostate

Actuellement, seul l'âge, l'existence d'antécédents familiaux de CaP ou de cancer du sein, et l'origine ethnique sont identifiés avec certitude comme étant des facteurs de risques pour le CaP. D'autres facteurs de risques ont été rapportés,

principalement liés à l'environnement. En réalité, les variations complexes de l'incidence du CaP seraient dues à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux.

1. Age

Une augmentation des risques de CaP est observée avec l'augmentation de l'âge. En effet, le risque augmente nettement tous les ans après 50 ans (figure 27).

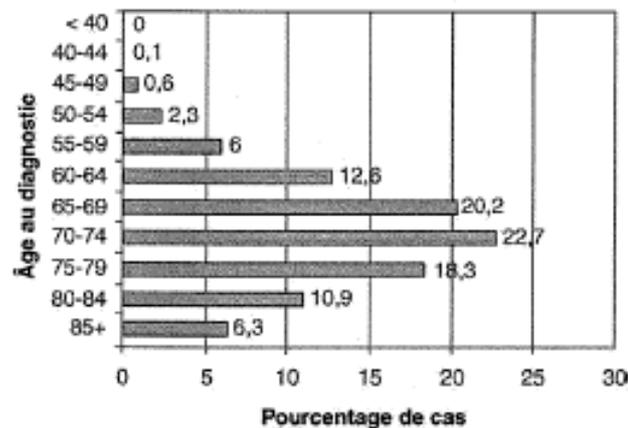


Figure 27 : Incidence du nombre de cancer de la prostate en fonction de l'âge des hommes.

Les CaP sont plus fréquents à partir de l'âge de 60 ans.

2. Facteurs familiaux et hérédité

Dès les années 1950, les travaux de Morganti avaient relevé l'existence d'agrégation familiale pour le CaP (Morganti *et al*, 1956-1957). C'est ainsi qu'il a été découvert que les hommes présentant un ou plusieurs antécédents familiaux de ce type de cancer présentaient une fréquence plus élevée de CaP. Par ailleurs, le risque pour un individu est d'autant plus élevé que le cancer est survenu à un jeune âge chez l'apparenté atteint.

Au sein des formes familiales, la reconnaissance d'une forme héréditaire est établie sur des critères stricts. Il faut en effet observer trois cas chez des apparentés

du premier ou du deuxième degré, ou bien observer deux cas diagnostiqués avant l'âge de 55 ans. La transmission héréditaire peut se faire non seulement sur un mode autosomique dominant (transmission par le père ou la mère), mais aussi sur un mode lié au sexe (transmission par la mère, qui atteint les fils mais ceux-ci ne transmettront pas la prédisposition à leurs propres fils). Les critères de reconnaissance des formes héréditaires sont donc étendus à au moins trois cas (ou deux cas avant 55 ans) chez les apparentés du deuxième degré 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 *et al*, 2004 ; Cussenot et Cancel-Tassin, 2004).

Certaines mutations germinales dans le gène du RA prédisposeraient au CaP. Ainsi, la substitution R726L dans le LBD du RA augmenterait de 6 fois le risque de CaP, et pourrait contribuer au développement de ce cancer, comme décrit dans la population finlandaise (Mononen *et al*, 2000).

Plusieurs locus de prédisposition au CaP ont été découverts. Le premier a été décrit en 1996 par l'équipe de l'Hôpital John-Hopkins situé à Baltimore. Il s'agit du locus *HPC1* localisé sur le chromosome 1 en position q24-q25 (Smith *et al*, 1996). Le gène *RNASEL*, codant pour l'endoribonucléase RNase L se situe au niveau de cette région *HPC1*. La RNase L intervient dans les activités pro-apoptotiques et anti-virales par la dégradation de molécules d'ARN virales. Ainsi, l'association du locus *HPC1* au gène *RNASEL* suggère que la RNase L inhibe une ou plusieurs étapes de la tumorigenèse prostatique (Maier *et al*, 2005).

Par la suite, en 1998 le locus PCaP (pour gène Prédisposant au Cancer de la Prostate) a été découvert dans la région télomérique du bras long du chromosome 1 en position q42.2-q43 (Berthon *et al*, 1998). Les quatre locus suivants : *HPCX* situé sur le chromosome X en position q27-q28 (Xq27-q28), *HPC20* (20q13), *HPC2* (17q11) et *PG1* (8q22-q23) ont aussi été décrits dans ce sens. Des locus en position 5q31-q33, 7q32 et 19q12 ont été associés à des formes familiales particulièrement agressives de la maladie. Tous ces résultats confirment l'hétérogénéité génétique de la prédisposition au CaP.

3. Facteurs ethniques, géographiques et environnementaux

Les données provenant des registres mondiaux indiquent qu'il existe une très grande variation d'incidence du CaP en fonction des pays et selon l'origine ethnique. Ainsi, les populations Afro-Américaine et Antillaise sont davantage touchées par le CaP.

La figure 28 montre bien que les incidences les plus élevées s'observent aux Etats-Unis et au Canada. De plus, aux Etats-Unis l'incidence est plus élevée de 30% chez les Afro-Américains que chez les Américains caucasiens. La Chine, le Japon, l'Afrique du Nord et l'Inde présentent les incidences les plus faibles. Les pays d'Europe sont à un taux intermédiaire avec une différence nord-sud. En effet, les pays du Nord de l'Europe présentent une incidence élevée comme la Suède, alors que dans le Sud l'incidence est faible comme en Espagne. La France présente une incidence plus faible que les pays du Nord mais elle reste cependant élevée. De plus, la Guadeloupe tout comme la Martinique présentent une forte incidence de CaP en liaison vraisemblable avec les origines africaines de la population.

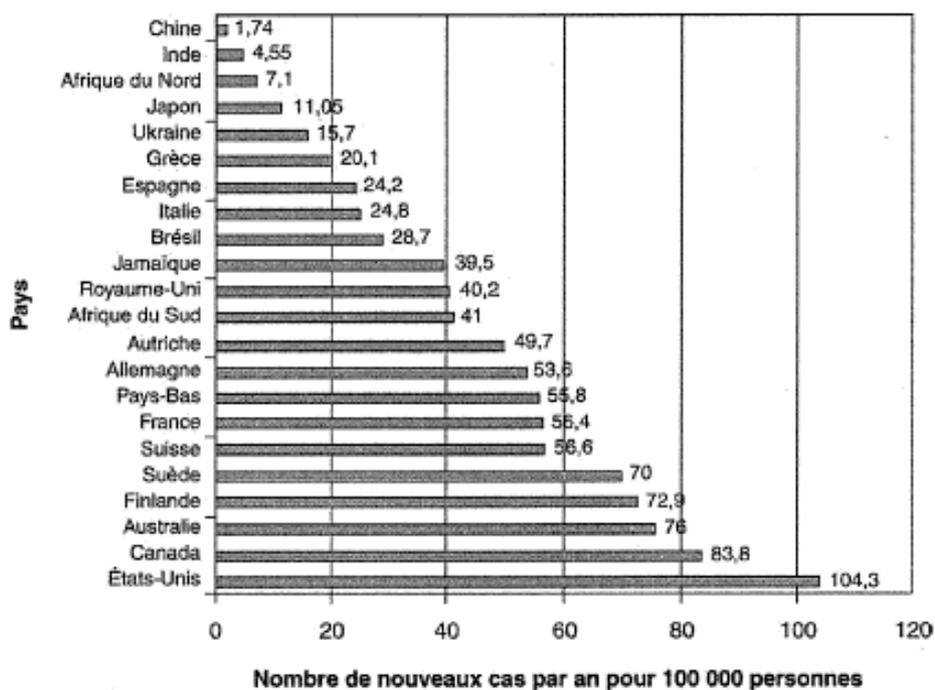


Figure 28 : Incidence standardisée pour le cancer de la prostate en fonction de l'origine ethnique.

Plusieurs observations permettent de soupçonner un rôle combiné de facteurs génétiques et de l'environnement pour expliquer ces variations. En effet, l'augmentation de l'incidence chez les populations asiatiques récemment émigrées aux USA comparé aux populations qui n'ont pas migrées, suggère l'influence de facteurs environnementaux (Fournier *et al*, 2004). De plus, l'incidence du CaP a augmenté au Japon au cours de l'évolution vers un mode de vie occidental. Cependant des facteurs génétiques ont probablement une part de responsabilité puisque l'incidence des Asiatiques aux Etats-Unis n'atteint pas malgré tout celle des Américains (Shimizu *et al*, 1991). De la même façon, la plus grande fréquence de CaP chez les Américains d'origine africaine s'expliquerait par des facteurs génétiques prédisposant puisque leur incidence est la même que celle des Africains vivant au Niger ou à la Jamaïque. Les gènes concernés pourraient être ceux impliqués dans le métabolisme des androgènes ou dans la détoxification de facteurs carcinogènes de l'environnement par exemple. De plus, il semble y avoir un impact probable des variations nucléotidiques au niveau des allèles entre les différentes populations (polymorphisme), touchant des gènes impliqués dans le processus de détoxification ou du métabolisme des hormones (Mao *et al*, 2004).

4. Facteurs hormonaux et autres facteurs de croissance

a. Les androgènes

Le rôle des androgènes dans le développement de la prostate normale et dans la progression des CaP est largement établi depuis les travaux du Dr. Huggins (Huggins et Hodges, 1941). Une méta-analyse réalisée en 2000 conclue qu'un taux de testostérone élevé expose à un risque supérieur à la normale (Shaneyfelt *et al*, 2000). Ceci s'explique bien par le fait que les androgènes (notamment la testostérone convertie en DHT) vont activer le RA dont l'un des rôles est la régulation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ainsi, si la concentration d'androgène est augmentée, la prolifération cellulaire le serait d'autant, entraînant un accroissement du risque de développer un CaP. Cependant, une récente méta-analyse indique que les concentrations d'hormones stéroïdes ne sont pas associées à un risque de CaP

(Endogenous Hormones, Prostate Cancer Collaborative Group, 2008). Les études réalisées jusqu'ici sont contradictoires et ne sont donc pas concluantes quant à l'impact des androgènes comme facteur de risque du CaP.

b. Le récepteur des androgènes

Comme mentionné précédemment, le RA possède dans sa région N-terminale un petit nombre de répétitions CAG (< 18-23) ou GGC (< 16). Ces répétitions sont associées au haut niveau de transactivation du RA, mais également à une augmentation du risque de CaP. En effet, il a été montré que les Afro-Américains, ayant un risque élevé de développer un CaP, présentent le plus souvent des allèles courts en CAG et GGC. En revanche, chez les Blancs non hispaniques leur nombre est intermédiaire tout comme leur risque, et les Asiatiques à faible risque de CaP ont un nombre de répétitions élevé (Irvine *et al*, 1995).

De plus, lorsque le nombre de répétition est plus faible, non seulement le risque de développer un CaP est augmenté, mais en plus ceux-ci sont plus agressifs.

D'autre part, les populations à forte incidence de CaP ont en général un nombre de glutamine diminué par rapport aux populations à faible risque. Cependant, les résultats d'une méta-analyse effectuée en 2004 montrent que la diminution du nombre de répétition est faiblement associée à un risque de CaP, mais que la différence absolue de ce nombre de répétition entre les cas et les contrôles est inférieure à 1 (Zeegers *et al*, 2004).

c. Enzyme 5 α -réductase

Un polymorphisme du gène de l'enzyme 5 α -réductase de type 2 (*SDRSA2*) est fréquemment retrouvé dans les populations Afro-Américaines et a été associé au risque de CaP. Il s'agit de la répétition d'un dinucléotide (TA) dans la région 3' non traduite de l'ARNm de *SDRSA2*. Une augmentation du nombre de ces répétitions conduit à une stabilisation de l'ARNm et par conséquent à une augmentation de l'expression de ce gène.

d. Facteurs de croissance

Il a été montré que le taux sanguin circulant d'IGF1 (Insuline Growth Factor 1) est corrélé au risque de CaP (Chan *et al*, 1998). En effet, plus ce taux est élevé, plus le risque de présenter un CaP est fort.

5. Facteurs provenant de l'alimentation

L'alimentation riche en graisses augmenterait le risque de CaP, ceci essentiellement par le biais des acides gras poly-insaturés. Cela se ferait par divers mécanismes tels que l'augmentation du taux d'hormones sexuelles, la réponse immunitaire, la composition des membranes cellulaires en phospholipides, la formation de radicaux libres, la diminution de la vitamine D, l'augmentation de l'IGF-1 ou encore par une action sur la 5 α -réductase de type 2. De plus, une forte consommation de calcium et de produits laitiers est associée à un risque plus élevé de CaP (Fournier *et al*, 2004).

En revanche, certains aliments ont un rôle protecteur vis-à-vis du CaP du fait de la diminution du risque lorsqu'ils sont consommés (Weisburger, 2000). Ainsi, les polyphénols contenus dans le thé vert grâce à leurs propriétés anti-oxydantes, les aliments à base de soja contenant des isoflavones (Zhou *et al*, 1999), les tomates de par les lycopènes sont autant d'aliments à privilégier. Le sélénium, les vitamines D et E font également partis des éléments dont l'apport semble avoir une importance sur la diminution du risque du CaP.

Pour conclure, le CaP a des origines diverses, mais son apparition est favorisée par différents facteurs décrits ci dessus présents seuls, ou en combinaison.

K. Traitements du Cancer de la Prostate

Le CaP peut être traité par la chirurgie, la radiothérapie, la thérapie hormonale, la chimiothérapie, ou une combinaison de ces méthodes. L'état de différenciation de la tumeur ainsi que son étendue, tout comme l'âge, la santé et l'état général du patient sont importants pour le choix de la thérapeutique. En effet, le bien-être et la qualité de vie du patient sont des éléments primordiaux pris en compte par les cliniciens, puisque la manière dont sera traité un cancer repose sur un arbitrage entre les effets positifs et négatifs du traitement adopté.

1. La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale est le traitement qui assure le meilleur contrôle de la maladie. Cet acte chirurgical présente l'intérêt majeur d'obtenir de grandes chances de guérison dans le cas où le cancer est bien confiné à la glande prostatique c'est-à-dire jusqu'au stade T2. Il s'agit de l'ablation totale ou partielle de la glande prostatique et des vésicules séminales, permettant d'éliminer le CaP et d'éviter tout risque de récurrence.

Les effets secondaires de ce traitement sont un risque de troubles érectiles voir d'impuissance, mais aussi d'incontinence urinaire. L'impuissance est définie par l'impossibilité à obtenir une érection. En effet, la chirurgie prostatique peut endommager les nerfs érecteurs. Après prostatectomie totale, 60 à 90% des patients sont impuissants. Les chances de récupérer des érections sont liées à l'âge du patient, à la préservation des nerfs érecteurs et au stade de la maladie. Interviennent alors des traitements comme les prothèses péniennes, les injections intra-caverneuses de prostaglandine E1 et l'administration de citrate de sildénafil (Viagra®). L'incontinence urinaire correspond à l'impossibilité de contrôler les urines. Il peut s'agir d'une incontinence urinaire d'effort qui est causée par une insuffisance du sphincter, la chirurgie prostatique pouvant endommager le sphincter ou d'une incontinence par regorgement qui est due à la mauvaise évacuation de la vessie.

2. La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée pour traiter les cancers qui sont localisés à la prostate, ou qui ont atteint les tissus voisins proches. Elle peut être utilisée à titre palliatif pour diminuer le volume de la tumeur ou éviter des complications locales. Deux types de radiothérapies existantes sont employés à l'heure actuelle.

a. La radiothérapie externe

La première technique employée est la radiothérapie externe qui utilise des radiations électromagnétiques externes, émises par un appareil de radiothérapie. Ces radiations loco-régionales ont pour but de détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. Cependant l'irradiation a pour but de détruire toutes les cellules tumorales tout en épargnant les tissus sains périphériques. Elle est, avec la chirurgie, un des traitements le plus fréquent des cancers et peut entraîner une guérison à elle seule. La radiothérapie externe peut être utilisée seule ou associée à la chirurgie et à la chimiothérapie. Ses indications sont liées au type de la tumeur, à sa localisation, à son stade et à l'état général du patient. En cas de cancer localement avancé ou métastatique, elle peut être utilisée dans un but palliatif afin de soulager le patient par de faibles doses afin d'atténuer la douleur due au cancer.

La radiothérapie externe peut entraîner des troubles intestinaux (tels que diarrhée, colite), et des troubles urinaires survenant essentiellement pendant le traitement (fréquence urinaire, diminution du jet, envies pressantes, brûlures en urinant, présence de sang dans les urines, ou fuites par impériosités mictionnelles quand la tolérance de la vessie au remplissage est diminuée). De plus, la radiothérapie peut engendrer une certaine fatigue en cours de traitement.

b. La curiethérapie

Le deuxième type de radiation utilisé est la curiethérapie (ou brachythérapie) qui consiste à placer des sources radioactives directement dans le tissu prostatique. A la différence de la radiothérapie externe, le rayonnement photonique utilisé traverse d'abord la tumeur, où il s'atténue rapidement, avant d'irradier secondairement les tissus sains adjacents à la tumeur (Garnick et Fair, 1996). L'avantage principal de la curiethérapie est la possibilité de délivrer une dose importante dans un volume étroit, avec en principe une dose satellite réduite au niveau des organes voisins.

3. Traitement hormonal

Ce traitement hormonal résulte des travaux du Dr. Charles Brenton Huggins (Huggins et Hodges, 1941).

Charles B. Huggins (figure 29) est né en 1901 à Halifax en Nouvelle Écosse (Canada), et est décédé en 1997 à Chicago en Illinois (USA). Il est à la base du traitement par hormonothérapie dès 1941. Il a en effet été le premier à démontrer une relation entre les hormones et certains types de cancers. Cela a apporté de l'espoir à la perspective de traiter les cancers avancés. Ses travaux lui ont valu d'obtenir le Prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1966.

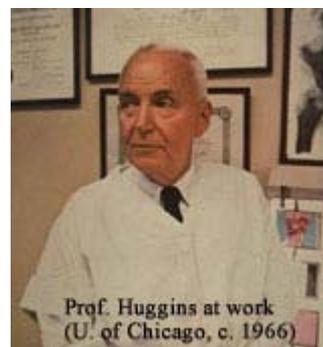
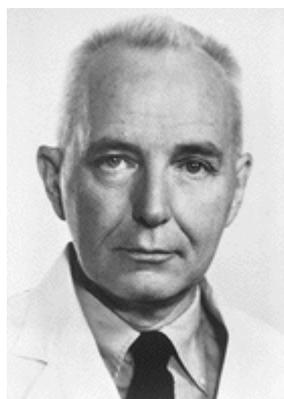


Figure 29 : Portraits de Charles B. Huggins.

Il s'est aperçu en 1941, en collaboration avec ses étudiants Clarence V. Hodges et William Wallace Scott, qu'il pouvait retarder la croissance du CaP en bloquant l'action des hormones mâles des patients avec des doses d'hormones femelles, les œstrogènes (Huggins et Hodges, 1941). Ces recherches ont montré que certaines cellules cancéreuses, tout comme les cellules normales du corps, sont dépendantes de signaux hormonaux pour leur survie et leur croissance. Ainsi, en privant les cellules cancéreuses des signaux corrects, la croissance des tumeurs pouvait être ralentie, au moins temporairement. En 1951, Charles B. Huggins a montré que les cancers du sein sont aussi dépendants d'hormones spécifiques. En retirant les ovaires et les glandes adrénales, qui sont les sources d'œstrogènes, il arrivait à une régression significative de la tumeur chez certaines de ses patientes.

Grâce à ses travaux, des drogues capables de bloquer la production endogène d'œstrogènes ou d'androgènes sont devenues d'importantes ressources pour le traitement des cancers du sein et des cancers de la prostate avancés.

Le traitement hormonal est utilisé lorsque le CaP a dépassé le stade localisé, c'est à dire lorsque le cancer s'est étendu au delà de la glande prostatique. A ce moment là, les traitements par radiothérapie ou par chirurgie ne sont plus envisageables. Ce traitement est également utilisé en seconde ligne, lorsque la chirurgie ou la radiothérapie en première ligne thérapeutique ont échoué et que le CaP est toujours présent ou lorsqu'il récidive. Enfin, lorsque le patient présente un risque élevé de récurrence du CaP, l'hormonothérapie peut être utilisée en complément de la radiothérapie.

Le but du traitement hormonal est de s'opposer à l'action des androgènes qui stimulent la prostate. Ainsi, la diminution du taux de testostérone bloquera la prolifération des cellules cancéreuses et diminuera ainsi le volume tumoral. Le traitement hormonal n'a qu'un effet palliatif puisqu'il bloque la prolifération du cancer sans le guérir. Cependant, bien que ce traitement ne soit pas curatif, il permet de diminuer de manière spectaculaire la taille de la tumeur et le nombre de métastases, et de réduire la croissance tumorale. C'est le traitement principal utilisé contre le CaP métastatique. A long terme, le traitement hormonal peut entraîner une ostéoporose avec fragilisation osseuse, due à l'action inhibitrice des androgènes, directe ou indirecte suite à leur conversion en œstrogènes, sur le remodelage osseux.

Les différents traitements utilisés en hormonothérapie sont précisés ci-dessous.

a. Analogues de la LH-RH

La première ligne d'hormonothérapie utilisée à l'heure actuelle est l'administration d'agonistes de la LH-RH. Le mode d'action des agonistes de la LH-RH s'explique par un rétrocontrôle au niveau de l'hypophyse. Ces molécules vont se fixer sur les récepteurs hypophysaires pour la LH-RH, qui sont alors totalement saturés et deviennent insensibles à tout autre stimulus. Par la suite, les récepteurs gonadiques pour la LH ou pour la FSH sont aussi réduits. Ce blocage de la libération de LH et de FSH entraîne ainsi une diminution de la production de testostérone par les testicules. En conséquence, les taux d'androgènes diminuent et les cellules cancéreuses ne sont donc plus exposées aux hormones masculines, ce qui a pour conséquence de bloquer dans un premier temps, puis de ralentir leur croissance (figure 30 B).

Au début de ce traitement, les cellules hypophysaires répondent à la stimulation des analogues des hormones hypothalamiques par une augmentation de sécrétion de LH-RH. Ceci aboutit dans un premier temps au fait que le testicule répond par une augmentation de sécrétion de testostérone, stimulant donc les cellules cancéreuses (figure 30 A). Cela a été nommé effet « flush ». Il y a donc un temps de latence avant de voir un effet bénéfique de ce traitement qu'il est important de considérer afin de se préparer à une aggravation de la symptomatologie douloureuse du patient. Pour éviter cet effet « flush », on démarre souvent un traitement par un anti-androgène quelques jours avant d'administrer les agonistes de la LH-RH.

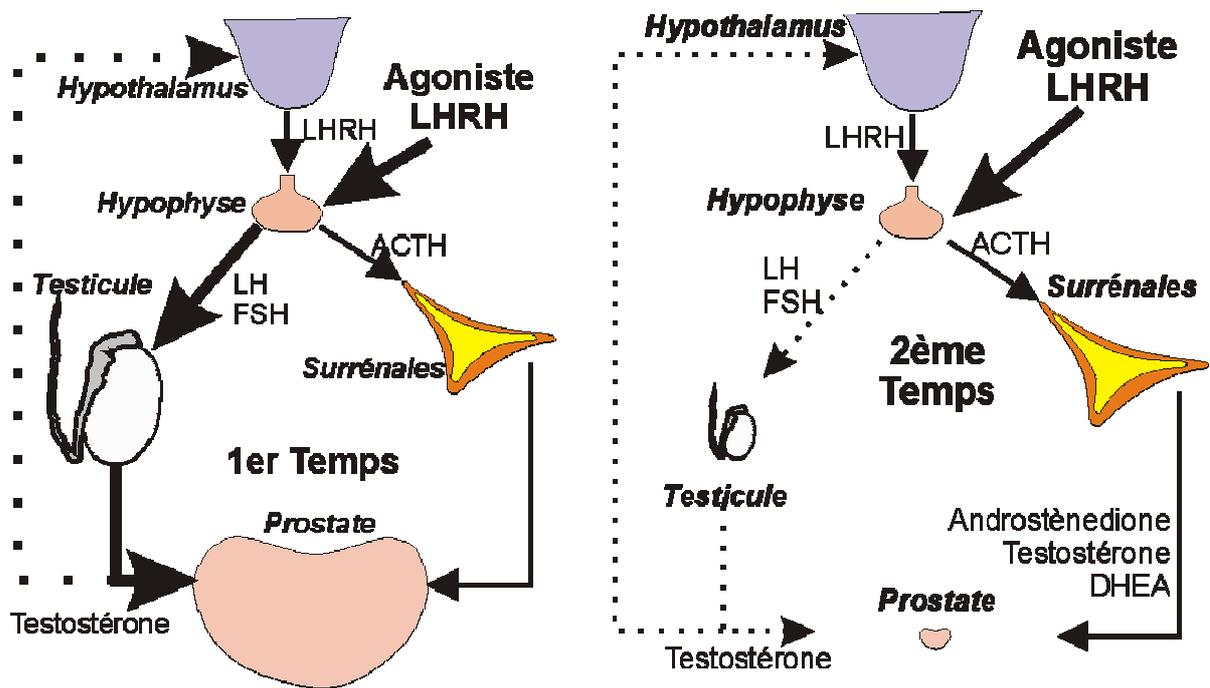


Figure 30 : Traitement du cancer de la prostate par les agonistes de la LH-RH.

A. La stimulation des récepteurs de la LH-RH conduit dans un premier temps à une production massive de testostérone par le testicule, qui va stimuler la prostate, et donc les cellules cancéreuses.

B. Dans un deuxième temps, les récepteurs de la LH-RH étant saturés, la production de testostérone par les testicules diminue fortement. La prostate n'est alors que peu stimulée ce qui entraîne une chute de la croissance tumorale.

D'après http://www.oncoprof.net/Generale2000/g10_Hormonotherapie/g10_hto6.html

b. Antagoniste de la LH-RH

Une étude clinique est actuellement en cours pour l'évaluation de l'utilisation d'un antagoniste de la LH-RH. Cette molécule, le Degarelix provenant du laboratoire Ferring, a fait preuve d'une grande efficacité lors de la phase II de l'essai clinique. Le Degarelix est conçu pour bloquer sélectivement le récepteur de la LH-RH. Cette action entraîne une suppression rapide, importante et soutenue de la production de testostérone, sans pic, et évite ainsi le risque d'une flambée tumorale contrairement aux agonistes de la LH-RH.

L'étude randomisée multicentrique menée sur 172 hommes, âgés de 48 à 89 ans, a permis de tester, grâce au contrôle du niveau de testostérone et de PSA, l'efficacité du Degarelix chez des patients traités avec des doses comprises entre 120 mg et 320 mg à des concentrations variant entre 20 et 60 mg/ml. 169 patients (c'est-à-dire 98%) ont été évalués à 28 jours, aucun abandon suite à des effets secondaires n'a été observé. Les effets du Degarelix sont dépendants de la dose et de la concentration. La meilleure réponse a été obtenue avec une dose initiale de 240 mg (40 mg/ml) pour laquelle 96% des patients obtiennent des niveaux de testostérone inférieurs ou égaux à 0,5 ng/ml aux 3^{ème} et 28^{ème} jours de l'étude. Ainsi, grâce au Degarelix, les problèmes traditionnellement associés aux traitements hormonaux, tels que les symptômes occasionnés par la première poussée de testostérone et ceux dus à l'aggravation de la maladie, semblent pouvoir être évités. Les résultats d'autres études en cours sur les doses sont nécessaires pour déterminer le schéma posologique optimal, mais ces résultats sont extrêmement encourageants pour l'avenir du traitement des formes avancées de CaP.

c. Anti-androgènes

La fraction de testostérone provenant de la conversion de précurseurs surrénaliens se soustrait à l'action des analogues de la LH-RH. Lorsqu'un anti-androgène est administré, il inhibe l'effet de ces androgènes résiduels au niveau des organes cibles, en particulier la prostate, en bloquant le site de liaison de l'hormone du RA. Les cellules cancéreuses ne peuvent plus ni croître ni proliférer. Les anti-androgènes sont souvent utilisés en combinaison avec la castration chirurgicale ou la prescription d'analogues de la LH-RH car cela permet un blocage androgénique complet (BAC).

Leurs effets secondaires les plus fréquents sont directement liés à la diminution du taux d'hormones : bouffées congestives, perte de libido et impuissance. De plus, l'administration de certains anti-androgènes peut entraîner des effets secondaires tels que diarrhée, difficultés respiratoires, troubles de l'accommodation visuelle...

d. Les œstrogènes

Ils sont utilisés en seconde intention. Ils permettent de diminuer le taux de testostérone en bloquant la sécrétion hypothalamique de LH-RH. Ceci a pour conséquence d'induire une suppression de la sécrétion de testostérone. L'œstrogène de synthèse le plus couramment utilisé est le diéthylstilbestrol (DES). Le recours à un traitement par œstrogènes à forte dose (5 mg par jour) s'accompagne d'une morbidité cardiovasculaire. Les doses plus faibles ont néanmoins montré qu'elles limitaient ce type de risques. Une dose de 3 mg par jour permet une meilleure efficacité mais augmente les risques d'effets secondaires. C'est pourquoi ce traitement par le DES est limité chez certains patients.

e. Castration chirurgicale

Il s'agit d'une intervention chirurgicale qui consiste à faire une incision au niveau des bourses et à enlever la partie des testicules qui sécrète la testostérone (pulpéctomie). L'ablation totale des testicules ou orchidectomie permettait de priver les cellules cancéreuses de testostérone. Bien qu'une petite quantité d'hormones persiste dans le sang (sécrétée par les glandes surrénales), une réponse favorable d'une durée moyenne d'efficacité de 2 ans et demi pouvait être attendue chez environ 80% des patients traités. Ces interventions sont peu pratiquées actuellement car les médicaments permettent une castration dite médicale.

f. Conclusion sur le traitement hormonal

Le plus souvent, l'hormonothérapie permet d'obtenir une régression de la maladie. En effet, dans 70 à 80% des cas, les patients répondent à cette hormonothérapie de première ligne mais malheureusement, tous les patients rechutent après une durée médiane de rémission de 12 à 18 mois, avec des extrêmes allant de quelques mois à plusieurs années. On parle alors d'échappement à la privation androgénique.

INTRODUCTION

Suite à un traitement hormonal, une réponse est généralement observée (qui se caractérise par une diminution du taux de PSA) et correspond à un recul de la maladie. Après le premier échappement hormonal, des hormonothérapies de seconde ligne sont administrées. Il y a toujours maintien de l'analogue de la LH-RH mais associé à un anti-androgène différent, ou à un œstrogène ou à l'hydrocortisone. Il peut y avoir plusieurs lignes de réponse suivies de relances de la maladie, jusqu'à atteindre un stade où la tumeur ne répond plus au traitement hormonal (généralement après la troisième ligne de traitement). Dans ce cas, on dit que la tumeur est devenue hormono-résistante (figure 31). Nous verrons par la suite les mécanismes impliqués dans cet échappement hormonal.

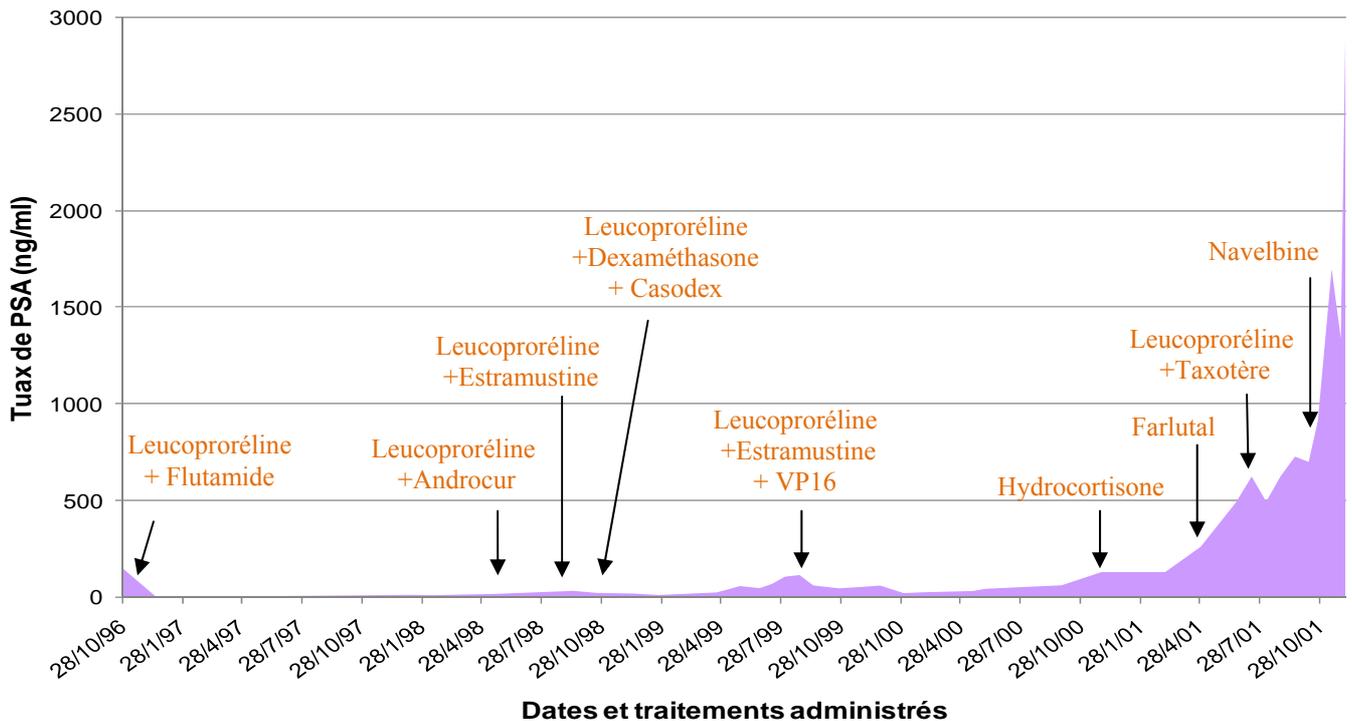


Figure 31 : Réponse d'un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique à différentes tentatives d'hormonothérapie.

4. Chimiothérapie

La chimiothérapie est utilisée dans le cancer de la prostate quand celui-ci a évolué avec une extension extra-prostatique et qu'il ne répond plus au traitement hormonal. La chimiothérapie diminue la croissance tumorale et peut diminuer les douleurs liées au cancer.

Elle consiste à administrer des agents chimiques toxiques combinés à un stéroïde afin d'éliminer les cellules cancéreuses. Les agents chimiothérapeutiques utilisés appartiennent à différentes familles de molécules actives sur différentes phases du cycle cellulaire. Leurs principales cibles sont l'ADN et les fuseaux qui guident la division cellulaire, le but étant de stopper la multiplication des cellules cancéreuses. A partir de 1994, le traitement recommandé était l'association de Mitoxantrone et de Prednisone, suite à l'étude de Tannock et de ses collaborateurs qui montrait un bénéfice significatif en terme de palliation de la douleur, de diminution de consommation d'antalgiques et de qualité de vie par rapport à la prednisone seule (Tannock *et al*, 1996). Depuis 2004, l'association du Taxotère à la Prednisone est le traitement de référence puisqu'il permet une meilleure réponse et un bénéfice de survie significatif de l'ordre de deux à trois mois (Tannock *et al*, 2004).

Puisque la chimiothérapie cible les cellules en prolifération, elle a pour conséquences de détruire des cellules normales de tissus en renouvellement permanent (peau, muqueuses, cellules sanguines...). Les effets secondaires de ce traitement sont donc en grande partie liés à ce mode d'action, mais varient selon le type de médicament, la dose utilisée et la durée du traitement. Ces effets sont notamment l'apparition de nausées et de vomissements, une chute des cheveux, une inflammation de la muqueuse buccale, des diarrhées, une constipation, une chute du taux de globules blancs, de globules rouges et de plaquettes, des troubles cutanés, etc... Les effets secondaires, parfois extrêmement gênants et d'intensité variable, sont en général transitoires, et disparaissent habituellement à l'arrêt du traitement. Ils peuvent pour la plupart être prévenus par un traitement adapté.

La chimiothérapie est moins efficace dans le traitement du CaP que pour d'autres cancers parce que les cellules cancéreuses de la prostate ne croissent pas aussi rapidement que d'autres types de cellules cancéreuses.

5. Surveillance (traitement différé)

Pour certains patients, une surveillance sans traitement immédiat est parfois la meilleure stratégie. Ce traitement est choisi lorsque la tumeur est bien circonscrite à la prostate. Ce traitement est couramment employé chez certains patients âgés, présentant un petit cancer peu agressif, et dont l'espérance de vie est inférieure à dix ans. En effet, la tumeur n'aurait pas le temps de grossir avant que d'autres problèmes de santé ne surviennent. On évite ainsi les effets secondaires éventuels d'un traitement plus invasif (douleur, incontinence urinaire, infection, incapacité à avoir une érection).

6. Traitement de la douleur

Dans certains cas, en particulier quand il existe des métastases osseuses, des douleurs peuvent entraîner une altération de la qualité de vie et nécessiter un traitement adapté. Certains médicaments comme le biphosphonate peuvent ralentir les lésions osseuses liées au cancer de la prostate et diminuer les douleurs. Il existe d'autres méthodes pour traiter les douleurs osseuses comme des séances de rayons focalisés sur les zones douloureuses ou une injection intraveineuse de produits radioactifs qui vont se fixer sur les métastases osseuses (comme le Strontium 89).

7. Traitements expérimentaux

La cryochirurgie permet de détruire les cellules cancéreuses par congélation brutale et répétée de la prostate à l'aide d'une sonde refroidissante (azote liquide) introduite sous anesthésie dans la prostate. Elle est utilisée pour certains cancers de

très petite taille ou pour des lésions précancéreuses. Cependant, l'efficacité de cette technique n'est pas encore démontrée. La plupart des médecins réservent cette technique pour les patients qui ne sont pas de bons candidats pour les autres traitements du cancer.

Un deuxième traitement expérimental est l'Ablatherm®. Il s'agit d'un système de traitement du CaP par ultrasons focalisés par voie endorectale. Il repose sur la destruction thermique des tissus par un faisceau d'ultrasons convergents. Ce traitement peu invasif semble adapté aux patients de plus de 67 ans non candidats à la chirurgie. En cas d'échec, on peut recourir à la radiothérapie externe.

L. Mécanismes de l'échappement hormonal

Comme énoncé précédemment, il est inévitable que les patients traités pour un CaP avancé deviennent résistants à tout traitement. Ceci est dû au fait que les tumeurs deviennent réfractaires à la privation androgénique, c'est à dire qu'elles sont capables de croître sans apport d'hormones. La physiopathologie de cet échappement hormonal ou, plus exactement, de cet échappement à la privation androgénique est encore mal connue et peut faire appel à plusieurs mécanismes (Feldman et Feldman, 2001). Il apparaît que le RA joue un rôle essentiel dans l'échappement à la privation androgénique puisqu'il est impliqué dans la plupart de ces mécanismes. Un des mécanismes par lequel un CaP peut contrecarrer la privation androgénique est de devenir très sensible aux faibles niveaux d'androgènes. Cela est réalisé par plusieurs approches que nous verrons par la suite. Le RA peut également être rendu inductible par des ligands non androgéniques, ou voire même devenir indépendant de tout ligand, ou encore pouvoir activer des voies de signalisation comme MAPK/ERK ou PI3K et des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Enfin, le RA peut court-circuiter sa voie d'activation par la présence de mutation au sein de son gène (Feldman et Feldman, 2001).

1. Amplification du récepteur des androgènes

Environ 30% des tumeurs devenant résistantes à la privation androgénique possèdent une amplification du gène du RA, alors que ce n'est pas le cas des tumeurs non traitées (Koivisto *et al*, 1997). Ce mécanisme permet en effet aux cellules tumorales de survivre et de proliférer à partir du peu d'androgènes présents.

2. Augmentation de la sensibilité du récepteur des androgènes

Ce mécanisme résulte d'une sur-expression du RA, d'une stabilité accrue du RA et d'une localisation nucléaire du RA améliorée dans les cellules tumorales. De plus, les cellules tumorales sont aussi hypersensibles à la DHT puisque environ quatre fois moins de DHT sont nécessaires pour une activation équivalente à celle des cellules non tumorales. Cette sensibilité améliorée peut également être due à la sur-expression de co-activateurs du RA tout comme à une diminution de l'expression de ses co-répresseurs.

3. Augmentation des concentrations d'androgènes

Ce mécanisme permet de contrecarrer la privation androgénique, et donc la baisse de testostérone circulante, en augmentant la production locale d'androgènes. Ceci est réalisé en augmentant l'activité de l'enzyme 5 α -réductase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT. Ce mécanisme a un impact notable puisque lors de la déprivation, la concentration d'androgènes au niveau des tissus de la prostate n'est diminuée que de 60% contre 95% de diminution de la testostérone dans le sérum (Labrie *et al*, 1986). Ce mécanisme mène ainsi à l'activation d'un plus grand nombre de RA.

4. Activation du récepteur des androgènes indépendamment d'un ligand

Dans ce cas, le RA est activé par d'autres voies de signalisation en absence de tout ligand. Cela est réalisé sous l'effet de phosphorylations induites par des kinases comme PKB (Akt) et MAPK, impliquées dans la transduction des signaux émanant de facteurs de croissance et de cytokines. Les voies de signalisation engagées dans ce mécanisme d'échappement hormonal impliquent des facteurs de croissance tels que TGF β , IGF-I et KGF ou encore les voies des récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que les récepteurs à l'EGFR et Her2/neu. De plus, la voie d'Akt semble être une voie centrale dans l'activation du RA par les voies de signalisation alternatives au ligand (So *et al*, 2003 ; Feldman et Feldman, 2001).

5. Activation des gènes de survie cellulaire

Ce mécanisme implique un jeu combiné de l'activation d'oncogènes et de l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur pouvant court-circuiter le RA afin de permettre aux cellules cancéreuses une survie et une prolifération cellulaires indépendantes du RA. Dans certains CaP, l'expression du RA est totalement abolie (par méthylation de son promoteur). Il s'agit par ce processus de bloquer notamment le signal de l'apoptose. Cela est réalisé par l'intermédiaire du gène *BCL2*. Ce gène fait partie de la famille des gènes régulateurs de l'apoptose qui fonctionnent comme inhibiteur de l'apoptose contrairement aux gènes Bax et Bad, qui eux l'induisent. Dans les cellules épithéliales d'une prostate normale, ce gène n'est normalement pas exprimé (McDonnell *et al*, 1992). En revanche, lors d'un CaP en échappement hormonal il l'est fréquemment, ce qui a pour conséquence de protéger les cellules cancéreuses de l'apoptose (So *et al*, 2003).

6. Les mutations du RA

Les mutations du RA augmentent avec le stade évolutif du cancer, puisque seules 0 à 4% de mutations sont retrouvées dans des tumeurs latentes, alors que dans les tumeurs métastatiques traités par hormonothérapie, 10 à 44% de mutations sont observées selon les auteurs, la technique d'échantillonnage et les thérapeutiques antérieures (Tilley *et al*, 1996 ; Marcelli *et al*, 2000 et Taplin *et al*, 2003). Ces mutations du RA, sélectionnées au cours de l'hormonothérapie, entraînent une modification du phénotype tumoral, permettant aux cellules tumorales de s'adapter à leur milieu environnant afin d'augmenter leur taux de survie (Taplin *et al*, 1999), et sont donc impliquées dans l'échappement des CaP à la privation androgénique.

Les mutations décrites dans les CaP touchent les différents domaines fonctionnels du RA (Gottlieb *et al*, 2004) ; (figure 32). La plupart des mutations sont des mutations ponctuelles conduisant à la substitution d'un acide aminé par un autre ou à des délétions. Elles se produisent le plus souvent au niveau du LBD, entraînant généralement un élargissement du spectre de sensibilité du RA aux stéroïdes endogènes ou exogènes. Mais les mutations se produisent également au niveau du DBD, permettant de modifier notamment les capacités de reconnaissance du RA vis-à-vis de l'ADN, comme nous le verrons par la suite.

Les conséquences de ces mutations sont de permettre l'activation du RA dans des conditions théoriquement non favorables de part l'acquisition de nouvelles propriétés fonctionnelles permettant au RA muté de soutenir la prolifération et la survie cellulaire cancéreuse.

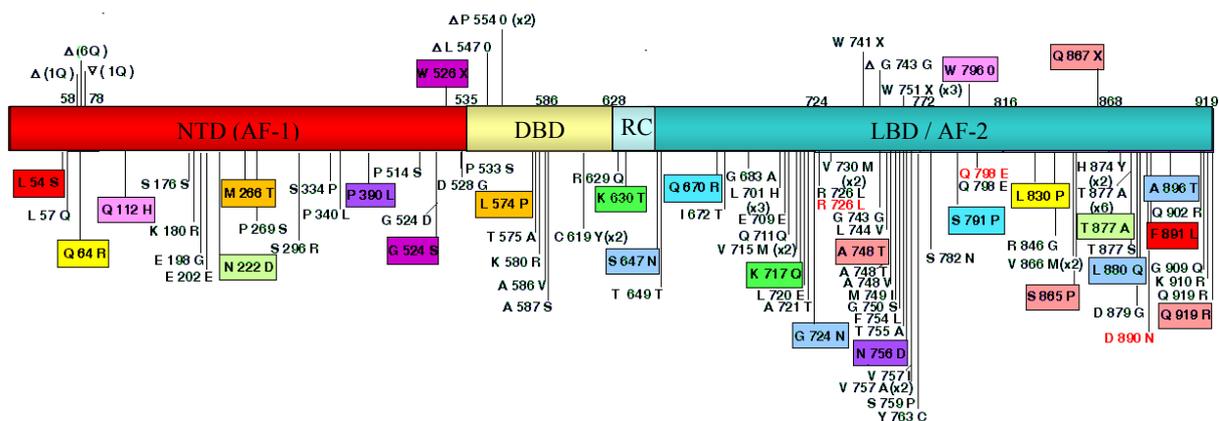


Figure 32 : Mutations du gène du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate.

Les mutations touchent tous les domaines du RA. Les mutations encadrées de la même couleur ont été retrouvées dans le même échantillon de CaP.

D'après : <http://androgendb.mcgill.ca/>

L'émergence de récepteurs mutants est un phénomène relativement fréquent au cours de l'évolution des CaP traités par hormonothérapie. Elle suppose d'une part une instabilité génétique particulièrement élevée qui pourrait être favorisée par l'inactivation du gène de glutathion-S-transférase π_1 (*GSTP1*) rencontrée précocement dans la quasi-totalité des CaP (Song *et al*, 2002 ; Harden *et al*, 2003), associée d'une part au dysfonctionnement de systèmes de réparation de l'ADN, en particulier de la réparation des mésappariements de base (Yeh *et al*, 2001 ; Chen *et al*, 2003), et d'autre part à une pression de sélection positive des clones mutés stimulés par des ligands endogènes ou exogènes.

La fréquence des mutations varie en fonction du stade d'évolution du cancer étudié et des thérapeutiques antérieures administrées. Les patients ayant eu une longue exposition à une thérapie hormonale ont une fréquence de mutations plus élevée que ceux qui n'ont pas été traités (Taplin *et al*, 1995 ; Marcelli *et al*, 2000). Ces résultats confirment que des mutations du RA peuvent être un des mécanismes de résistance à la thérapie. Les mutations sélectionnées confèrent un avantage de croissance aux cellules tumorales dans des conditions défavorables.

Cependant, le fait que des mutations du RA soient présentes dans 20 à 45 % des CaP métastatiques n'ayant pas subi d'hormonothérapie, suggère que la privation androgénique n'est pas seule 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.

Dans ces conditions, il est clair que l'échappement hormonal ne fait pas partie de l'histoire naturelle de la maladie mais résulterait plutôt d'une pression sélective induite par l'hormonothérapie.

La première mutation faux sens du RA a été décrite dans une lignée cellulaire de CaP, la lignée LNCaP (Veldscholte *et al*, 1992). Il s'agit d'une mutation du RA au niveau du codon 877 où une thréonine est remplacée par une alanine. Cette mutation est notée T877A. Cette mutation est retrouvée fréquemment chez des patients (40 %) traités par un anti-androgène (le flutamide) au cours d'un blocage androgénique complet. Cette mutation T877A entraîne un changement de spécificité du RA, ce qui a pour conséquence de le rendre activable par plusieurs hormones stéroïdiennes (progestérone, œstradiol) mais surtout par des anti-androgènes comme le 4-hydroxyflutamide (métabolite actif du flutamide) (Veldscholte *et al*, 1992). De ce fait, la mutation T877A promeut la croissance et la survie des cellules (Sun *et al*, 2006). Ceci indique l'importance du résidu T877 localisé dans la poche de liaison du ligand.

Lors de l'étude menée par Taplin *et al* en 1999, il a été observé que l'émergence de clones présentant la mutation T877A est plus fréquente chez les patients traités par flutamide (31% contre 0% chez les patients non traités), ce qui suggère un effet de sélection des clones anormaux *in vivo* par le traitement administré.

De plus, l'émergence de ce mutant T877A explique l'observation de cas de rémissions transitoires de la maladie lorsque les patients en échappement au traitement sont sevrés de flutamide (Paul et Breul, 2000).

D'autres mutants du RA isolés chez des patients en échappement hormonal semblent également répondre aux glucocorticoïdes (Zhao *et al*, 1999 ; Chang *et al*, 2001), aux anti-androgènes, et/ou aux précurseurs androgéniques

surréaliens et/ou aux œstrogènes et/ou à la progestérone (Zhao *et al*, 2000 ; Wang *et al*, 2000).

a. Mutations dans le domaine de liaison au ligand

Les mutations au niveau du LBD sont nombreuses et peuvent affecter aussi bien la reconnaissance du ligand que l'interaction avec les co-activateurs.

Un exemple d'altération de reconnaissance du ligand est la mutation L701H (remplacement de la lysine en position 701 par une histidine), qui diminue fortement l'affinité du RA pour la DHT. Cependant, elle favorise la fixation de corticostéroïdes surréaliens comme le cortisol et la cortisone. Un double mutant L701H/T877A a également été trouvé pour lequel l'hydrocortisone et la cortisone fonctionnent comme des agonistes. Étant donné que ce double mutant a une forte affinité pour le cortisol et la cortisone, un niveau physiologique semble suffisant pour permettre la croissance tumorale chez les patients ayant cette double mutation (Zhao *et al*, 2000). Ces études mettent en évidence l'importance du résidu L701 dans la poche de liaison du ligand.

Depuis quelques années, le bicalutamide est utilisé préférentiellement au flutamide dans le blocage androgénique complet. L'étude de Hara *et al* en 2003 a montré l'émergence d'une nouvelle mutation du RA dans les CaP ainsi traités. Ainsi, le RA exprimé par ces cellules possède les mutations W741C et W741L (remplacement du tryptophane en position 741 par une cystéine ou par une leucine), ce qui lui permet d'établir une interaction de type agoniste avec le bicalutamide.

Le recrutement de cofacteurs du RA peut également être modifié en présence de mutations dans le LBD. Ainsi, la mutation T877A renforce les interactions du RA avec les motifs de type FxxLF, présents au niveau de certains cofacteurs spécifiques du RA comme les membres de la famille SRC, expliquant l'activation du RA par les anti-androgènes (Ozers *et al*, 2007).

Une nouvelle classe de récepteurs mutés a été découverte au laboratoire. Il s'agit de récepteurs tronqués de leur partie C-terminale par l'apparition d'une mutation non-sens conduisant à un codon stop prématuré. Ces RA tronqués ont été retrouvés dans 18% de CaP localisé, et dans 100% des prélèvements de moelle osseuse présentant des cellules cancéreuses prostatiques. Un exemple de ces RA

tronqués est le RA Q640X. Ce dernier manifeste des activités transcriptionnelles constitutives et supérieures à celle du RA sauvage à partir de constructions artificielles contenant un promoteur répondant aux androgènes (Céraline *et al*, 2004). De plus, l'expression de ce RA mutant semble conduire à des actions paracrines. En effet, les cellules prostatiques LNCaP transfectées avec le RA Q640X sécrètent des facteurs solubles capables d'induire en absence d'hormone la translocation nucléaire des RA endogènes des cellules voisines non transfectées (Lapouge *et al*, 2007).

b. Mutations dans le domaine de liaison à l'ADN

Comme énoncé précédemment, les mutations ne touchent pas seulement le LBD, mais également les autres domaines du RA. C'est ainsi que l'on retrouve des mutations au niveau du DBD. Ces dernières seraient ainsi à la base de modifications de spécificité d'interaction avec l'ADN, mais également de l'altération des capacités de dimérisation et de translocation nucléaire du récepteur.

Des mutations dans ce domaine de liaison à l'ADN conduisant à une perte de fonction du RA, qui devient alors incapable d'exercer ses fonctions de facteur transcriptionnel, sont retrouvées dans le cadre du syndrome d'insensibilité aux androgènes (SIA). Le SIA est une maladie génétique dans laquelle les fœtus masculins XY sont insensibles aux hormones masculines (les androgènes), ce qui résulte en un morphotype féminin. Il existe des formes plus ou moins sévères, avec des morphotypes masculins plus ou moins partiels jusqu'à un morphotype totalement féminin.

En revanche, dans le cadre du CaP, les mutations retrouvées au niveau du DBD du RA lui apportent un gain de fonction, conférant ainsi de nouvelles propriétés fonctionnelles au RA. Deux exemples de telles mutations dans le DBD du RA sont décrits ci-dessous.

Une insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD a été mise en évidence au laboratoire dans un échantillon de CaP métastatique. Ce RA

mutant présente un défaut de translocation nucléaire après stimulation hormonale, et forme des agrégats cytoplasmiques et périnucléaires. Cette nouvelle localisation intracellulaire du RA muté après stimulation hormonale s'accompagne d'actions non génotropiques sur les activités de certains facteurs de transcription tels que AP-1 et NF- κ B (Jagla *et al*, 2007).

D'autre part, une mutation dans le DBD peut modifier la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse aux hormones par le RA. C'est le cas de la mutation T575A (où une thréonine en position 575 est remplacée par une alanine) qui a été détectée dans un CaP métastatique en échappement à la privation androgénique. En effet, le RA portant cette mutation T575A voit ses activités transcriptionnelles renforcées sur des promoteurs contenant des éléments de réponse non spécifiques des androgènes (Monge *et al*, 2006). Cette étude ayant consisté en mon travail de thèse, nous verrons par la suite le détail des gains apportés au RA par cette mutation.

La figure 33 récapitule les différentes origines possibles de l'échappement hormonal.

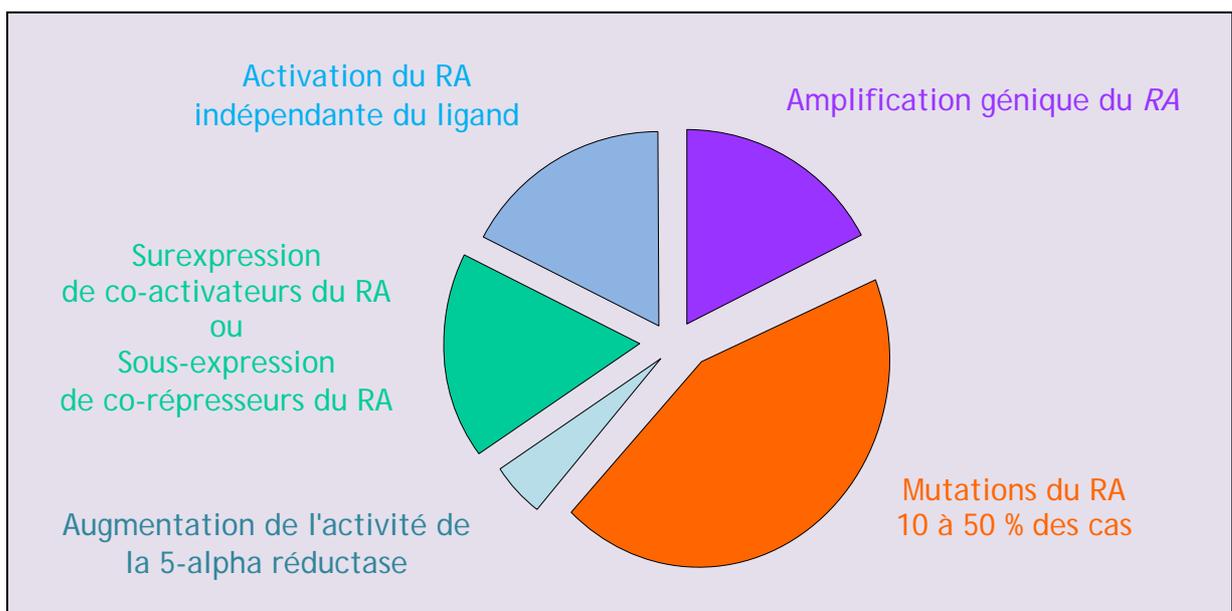


Figure 33 : Récapitulatif des origines de l'échappement hormonal dues au récepteur des androgènes.

M. Détection des mutations du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Dans le but de mieux évaluer l'impact des mutations du RA dans l'échappement hormonal des CaP, un test fonctionnel du RA chez la levure a été élaboré au sein de notre laboratoire (Céraline *et al*, 2003). Ce test fonctionnel permet non seulement de détecter la présence de mutations du RA dans un échantillon de cancer de la prostate mais aussi d'étudier leurs propriétés fonctionnelles.

Le gène du RA étant situé sur le chromosome X, l'expression du RA est mono-allélique chez les sujets de sexe masculin. La détection d'une mutation dans un échantillon de CaP sera donc représentative de ce qui se passe *in vivo* chez ce patient.

1. Principe du test fonctionnel

La souche de levure utilisée dans ce test possède une croissance conditionnée par l'expression d'un gène rapporteur dont l'expression est nécessaire à la croissance des levures. Ce gène rapporteur est le gène *ADE2* qui code pour une enzyme intervenant dans la biosynthèse de l'adénine. Les levures qui ne possèdent pas cette enzyme ne sont pas capables de pousser sur un milieu de culture dépourvu d'adénine. Dans ce test, le gène *ADE2* est placé sous le contrôle d'un promoteur androgéno-dépendant contenant trois répétitions de l'élément de réponse aux androgènes (ARE). Le gène *ADE2* ne sera transcrit que 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.

Brièvement, le test se déroule comme décrit ci-après. Les ARNm extraits de biopsies tumorales (tumeurs primitives ou ponctions de moelle osseuse) sont transformés en ADNc. Un fragment d'ADNc de 1786 pb comprenant une partie de AF-1, le DBD, la région charnière et la région carboxy-terminale, correspondant ainsi à une partie du RA du patient, est amplifié à l'aide d'amorces spécifiques et inséré par recombinaison homologue chez la levure dans un vecteur d'expression nommé « Gap Repair » (figure 34).

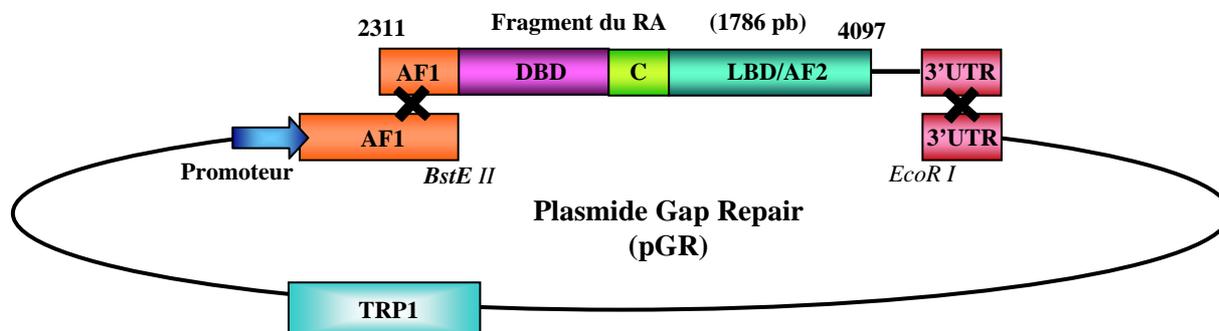


Figure 34 : Vecteur d'expression du récepteur des androgènes Gap Repair.

Le plasmide Gap Repair (pGR), contenant la partie AF-1 et 3'UTR du RA est digéré par *BstEII* et *EcoRI* afin de permettre la recombinaison homologue avec le fragment du RA à tester. Le plasmide pGR porte le marqueur de sélection TRP1 afin de sélectionner les levures dont plasmide a intégré le RA du patient.

Les levures sont ensuite transformées avec ce vecteur d'expression avant d'être ensemencées pour trois jours sur un milieu sélectif contenant l'hormone à tester. Une gamme de différentes doses d'hormones est testée, de 10 nM à 100 µM. Ceci permet d'étudier *in vitro* le spectre de sensibilité du RA à différentes hormones stéroïdes et à différents agonistes et antagonistes de synthèse, testés à différentes concentrations. Suite au résultat du test, deux cas de figure peuvent se présenter.

➤ *Le RA inséré dans la levure est sauvage*

L'activation du RA sauvage par la DHT ou par d'autres stéroïdes comme l'androstènedione, la progestérone et l'œstradiol entraîne l'expression du gène *ADE2* suite à la liaison du RA au niveau des ARE. Le gène *ADE2* étant produit par la levure, cette dernière est à même de produire de l'adénine, et ainsi de pousser sur un milieu minimum sans adénine. On observera donc des colonies sur la boîte (figure 35 A).

En présence d'un anti-androgène ou d'un stéroïde non agoniste, le RA sauvage n'est pas activé. Le gène *ADE2* n'est donc pas exprimé, et les levures ne peuvent pas croître sur un milieu dépourvu d'adénine (figure 35 B).

➤ *Le RA inséré dans la levure est muté*

Si le RA porte une mutation entraînant une spécificité vis-à-vis des ligands élargie en comparaison au récepteur sauvage, il peut être activé par d'autres ligands que ceux qui activent le RA naturellement, comme certains stéroïdes, voir même par un anti-androgène comme le flutamide (c'est le cas pour le RA T877A). Ainsi, lors du test, ce RA muté mènera à la croissance des levures sur un milieu minimum sans adénine en présence de ligands activateurs (figure 35 C).

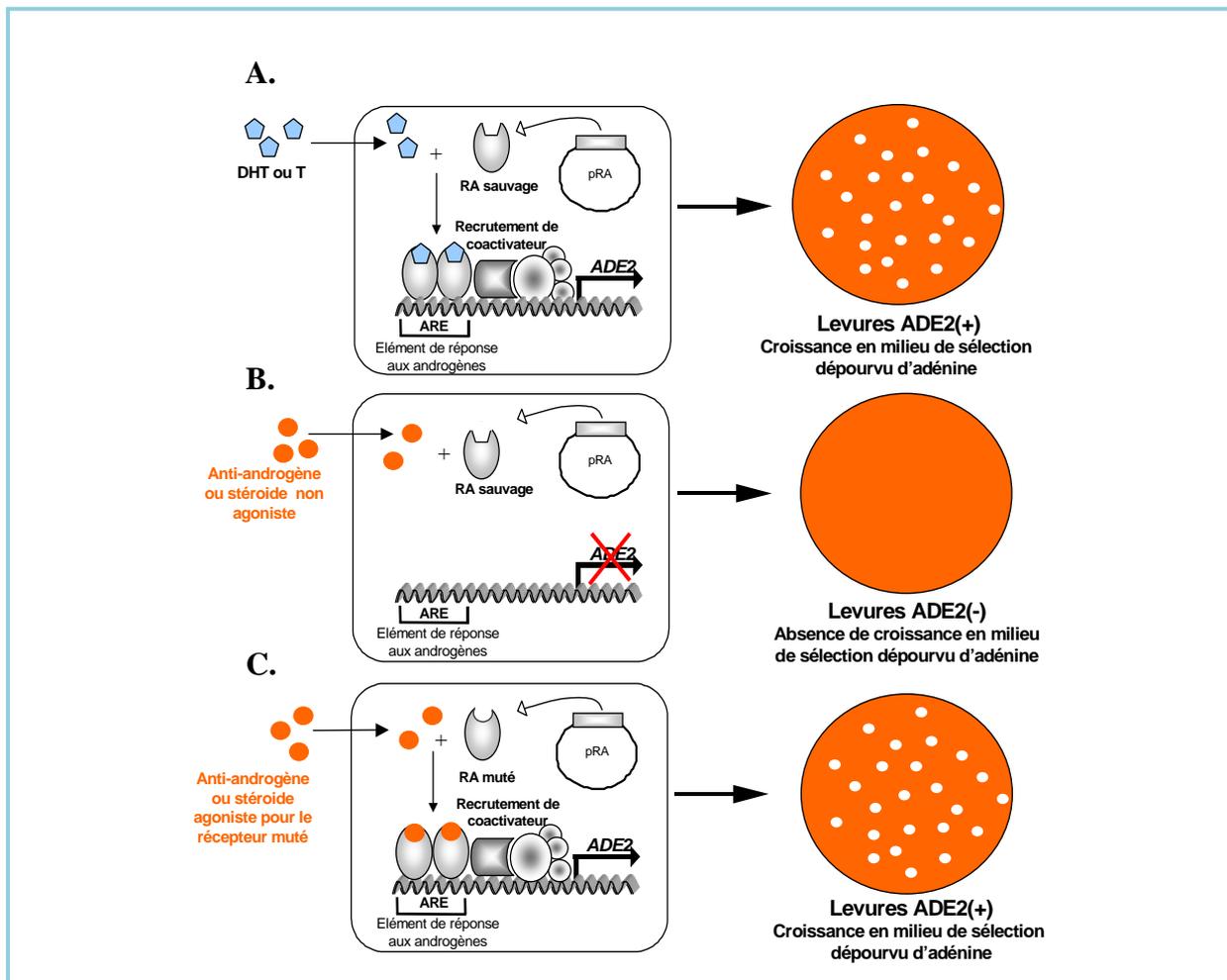


Figure 35 : Principe du test fonctionnel du récepteur des androgènes chez la levure.

L'expression du gène rapporteur *ADE2* est androgéno-dépendante.

- L'activation du RA sauvage par la dihydrotestostérone (DHT) entraîne l'expression du gène *ADE2* suite à la liaison du RA au niveau des éléments de réponse aux androgènes (ARE), permettant aux levures de pousser sur milieu minimum sans adénine.
- En présence d'un anti-androgène ou d'un stéroïde non agoniste, le RA sauvage n'est pas activé, ne permettant pas la croissance des levures sur milieu dépourvu d'adénine.
- Un RA mutant présentant une spécificité vis-à-vis des ligands élargie par rapport au récepteur sauvage peut être activé par d'autres ligands, menant à la croissance des levures sur milieu minimum sans adénine.

Ce test permet de distinguer différents types de mutations du RA. Ainsi, dans le cas d'une mutation rendant le RA actif de manière constitutive, on observera une croissance des levures même en absence de ligand. En revanche, si une mutation entraîne une modification de reconnaissance des éléments de réponse présents au niveau du promoteur, la croissance des levures différera de celle du RA sauvage. C'est à dire que l'on aura malgré tout une croissance, mais qui sera plus forte ou plus faible en comparaison au RA sauvage pour la même hormone, voir même une croissance sur une hormone où le RA sauvage ne pousse pas (comme le flutamide). Enfin, si la mutation élimine la capacité de reconnaissance du RA vis-à-vis de l'ADN, aucune croissance des levures ne pourra être observée même en présence d'un ligand agoniste.

2. Résultats du test fonctionnel

Un comptage des colonies est réalisé pour chaque condition testée après trois jours d'ensemencement des levures sur les boites. Ce comptage permet de réaliser un hormonogramme dans lequel est indiqué le nombre de colonies pour chaque hormone testée. Le profil de réponse obtenu, spécifique à chaque patient, est comparé à celui du RA sauvage. Un exemple d'hormonogramme d'un RA sauvage et d'un RA portant la mutation T877A est montré en figure 36.

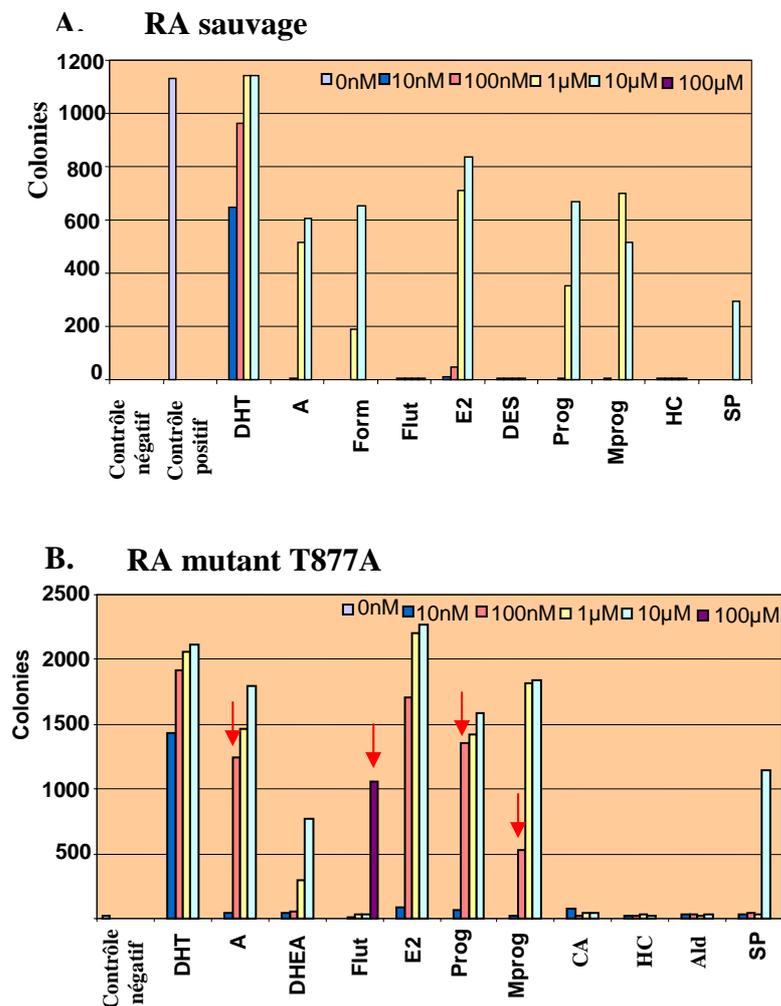


Figure 36 : Résultats du test fonctionnel du récepteur des androgènes chez la levure.

Comparaison du RA sauvage et du RA mutant T877A. Des différences de croissance sont observées avec la mutation T877A, comme indiqué par les flèches. Les levures poussent en effet en présence du flutamide et pour des doses plus faibles de progestatifs en présence du RA T877A.

Les levures ont été transformées avec le plasmide d'expression codant le RA sauvage (A) ou le RA mutant T877A (B), puis placées sur un milieu sélectif contenant l'un des ligands stéroïdes, ou non stéroïdes suivants : DHT, dihydrotestostérone ; A, androstènedione ; Form, formestane ; Flut, flutamide ; E2, β -estradiol ; DES, diethylstilbestrol ; Prog, progestérone ; Mprog, medroxyprogestérone ; HC, hydrocortisone ; CA, cortisone acetate ; DHEA, dehydroepiandrosterone ; Ald, aldosterone ; SP, spironolactone.

Les histogrammes représentent le nombre de colonies obtenues pour chaque dose d'hormone. Les concentrations employées pour les différents ligands sont indiquées. Chaque expérience a été réalisée trois fois.

Les molécules testées dans ce test fonctionnel sont pour certaines utilisées dans les lignes d'hormonothérapie. Ces molécules incluent les androgènes et leurs précurseurs : la DHT, l'androstènedione, la prégnénolone et la DHEA ; les œstrogènes comme le β -œstradiol ; les progestatifs comme la progestérone, la 17 α -hydroxyprogestérone ou son dérivé synthétique la médroxyprogestérone ; les glucocorticoïdes : l'hydrocortisone, la cortisone ; un minéralocorticoïde : l'aldostérone et un anti-minéralocorticoïde : la spironolactone, mais aussi un anti-androgène : le flutamide et un agoniste partiel : l'acétate de cyprotérone.

Un protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC) a été mené au laboratoire de novembre 2003 à janvier 2008. Cette étude clinique a porté sur 140 patients, au sein desquels de nombreuses mutations du RA ont déjà été détectées à l'aide du test fonctionnel chez la levure. La plupart des mutations touchent le LBD et la région charnière, notamment une nouvelle classe de mutation du RA conduisant à des récepteurs tronqués de leur partie carboxy-terminale, mais des mutations dans le DBD ont aussi été retrouvées (figure 37).

Type de mutation	Acide aminé	Changement	Localisation
Substitution	701	Leu au lieu de His (L701H)	LBD
Substitution	877	Ala au lieu de Thr (T877A)	LBD
Double substitution	575 et 877	Ala au lieu de Thr (T575A / T877A)	DBD et LBD
Insertion	589	Insertion de 21 acides aminés	DBD
Substitution	711	Arg au lieu de Gln (Q711R)	LBD
Substitution	738	Arg au lieu de Gln (Q738R)	LBD
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	709	Codon stop au lieu de Glu (E709X)	LBD
Substitution	711	Codon stop au lieu de Gln (Q711X)	LBD

Figure 37 : Exemple de mutations détectées par le test fonctionnel chez la levure au sein du laboratoire.

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 ont également été mises en évidence.

Mon travail de thèse a consisté à étudier le RA portant les deux mutations T575A et T877A découvert au cours de ce protocole clinique.

La mutation T575A est localisée dans le DBD du RA, et la mutation T877A est située dans le LBD. Les propriétés fonctionnelles apportées au RA par ces deux mutations ont tout d'abord été analysées, suivies d'une étude sur les conséquences de la mutation sur la reconnaissance de l'ADN par le RA mutant T575A, ainsi que sur la structure du DBD. Les conséquences fonctionnelles de la mutation T877A étant connues, le RA simple mutant T575A a été étudié en parallèle au RA double mutant afin d'appréhender les modifications des propriétés du RA dues à cette mutation dans le contexte double mutant T575A/T877A.

MATERIELS ET METHODES

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans le cadre du PHRC mené au laboratoire, le test fonctionnel chez la levure a permis de détecter de nombreuses mutations du RA. L'un des patients inclus dans ce protocole clinique présentait un CaP métastatique en échappement à plusieurs lignes d'hormonothérapie, dont le profil de réponse hormonale est présenté dans la figure suivante (figure 45). Les différences notables de sensibilité aux hormones comparées au RA sauvage sont indiquées par les flèches rouges. Le bruit de fond présent pour toutes les conditions y compris pour le contrôle négatif fait également partie des différences par rapport au RA sauvage.

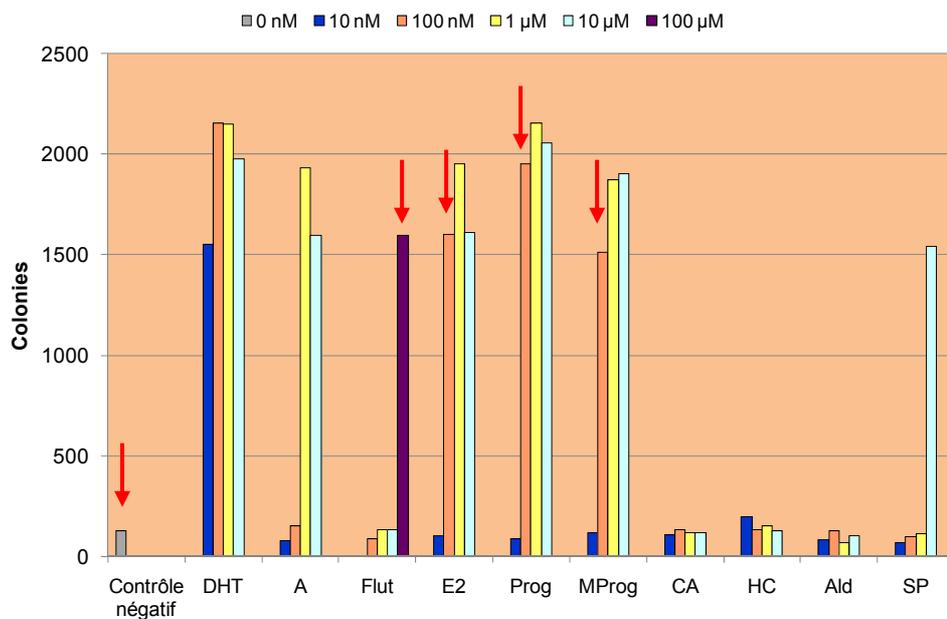


Figure 45 : Hormonogramme obtenu chez un patient du protocole clinique.

L'historgramme représente le nombre de colonies obtenues. Sont indiquées les concentrations employées des différents ligands. L'expérience a été réalisée trois fois.

Les levures ont été transformées avec le plasmide d'expression codant le RA du patient, puis placées sur un milieu sélectif contenant l'un des ligands stéroïdes, ou non stéroïdes suivants : DHT, dihydrotestostérone ; A, androstènedione ; Flut, flutamide ; E2, β -estradiol ; Prog, progestérone ; Mprog, medroxyprogestérone ; CA, cortisone acetate ; HC, hydrocortisone ; Ald, aldosterone ; SP, spironolactone.

Les différences notables de sensibilité aux hormones comparées au RA sauvage sont indiquées par les flèches. Le bruit de fond présent pour toutes les conditions y compris pour le contrôle négatif fait également partie des différences par rapport au RA sauvage (dont le profil est représenté à la page 86).

Chez ce patient, trois mutants du RA ont été détectés :

- Le RA T877A, présentant une sensibilité plus grande par rapport au RA sauvage pour certains stéroïdes endogènes et pour le flutamide comme indiqué dans la figure 35 ;
- Le RA Q640Stop/T877A portant deux mutations, l'une, Q640Stop dans la région charnière entre le DBD et le LBD, et la substitution T877A dans le LBD. La mutation non-sens Q640Stop conduit à l'expression d'un récepteur tronqué de son extrémité C-terminale, et donc dépourvue du domaine de liaison au ligand et de AF-2. Il a été démontré dans notre laboratoire que ce mutant du RA présente une activité intrinsèque et puissante indépendante de la liaison au ligand (Céraline *et al*, 2004) ;
- Le RA T575A/T877A portant une double substitution d'une thréonine en alanine en position 575 (située dans le DBD) ainsi qu'en position 877 (localisée dans le LBD).

Il s'agit de la première description du RA double mutant T575A/T877A. L'association des deux mutations dans un même récepteur confère au RA de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles certainement nécessaires pour la prolifération et la survie des cellules tumorales, malgré le traitement infligé au patient.

La mutation T877A a été largement décrite dans la littérature. Il est établi que cette mutation, présente dans le LDB, permet au RA d'être activé par des hormones autres que ses ligands habituels, du fait notamment de l'agrandissement de la poche de liaison au ligand (Sack *et al*, 2001), la chaîne latérale de l'alanine ayant un encombrement plus faible que celle de la thréonine.

La simple mutation T575A du RA a déjà été décrite dans un CaP métastatique (Marcelli *et al*, 2000), mais ses conséquences sur l'activité du récepteur n'ont encore jamais été étudiées. Cette mutation est située dans le premier doigt de zinc du DBD (figure 8), juste avant la boîte P, intervenant dans la liaison à l'ADN et la dimérisation du RA, ce qui laisse penser que cette mutation T575A pourrait intervenir dans l'interaction du RA avec l'ADN.

Les objectifs de mon travail de thèse ont consisté à étudier les propriétés apportées par cette mutation T575A au RA mutant, au niveau fonctionnel mais aussi au niveau structural. Les conséquences fonctionnelles de l'association des deux mutations T575A et T877A a également été un autre point de mon travail de thèse.

Ce travail a été réalisé en étudiant tout d'abord les conséquences des deux mutations sur les activités transcriptionnelles du RA, en comparaison au RA sauvage. Ceci a été réalisé sur différents promoteurs spécifiques des androgènes et non spécifiques des androgènes. L'impact des mutations sur l'expression de deux gènes cibles du RA, ainsi que sur le recrutement de certains cofacteurs a été analysé. Par ailleurs, les conséquences structurales de la mutation T877A étant déjà connues, une analyse structurale de la mutation T575A a été réalisée. Ainsi, un alignement de séquences de différents DBD, une modélisation moléculaire, et des études de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées.

A. Analyse fonctionnelle du récepteur des androgènes T575A/T877A

1. Test fonctionnel chez la levure

Comme précisé auparavant, le premier test réalisé sur le RA du patient était le test fonctionnel chez la levure, dont le résultat est présenté dans la figure 45. Le profil du RA de ce patient étant différent du profil du RA sauvage, l'analyse de l'ADNc de ce RA a permis de détecter le RA mutant T575A/T877A comme décrit auparavant. Nous avons par la suite testé ce RA double mutant avec le test fonctionnel chez la levure.

Comme vous pouvez le voir sur la figure 46 C, le RA double mutant T575A/T877A n'entraîne aucune croissance des levures, quelque soit l'hormone et la dose testée. Nous avons ensuite étudié l'impact des simples mutations sur les activités transcriptionnelles du RA. Pour cela, les hormonogrammes des RA mutants T877A et T575A ont été réalisés. Le RA mutant T877A (figure 46 B) entraîne une croissance des levures avec un profil de réponse aux hormones différent de celui du RA sauvage (figure 46 A), les différences étant indiquées par les flèches rouges. Par contre, en présence du RA T575A, aucune colonie n'est visible, en dehors du contrôle

positif (figure 46 D), dans lequel la croissance des levures est indépendante des activités transcriptionnelles du RA.

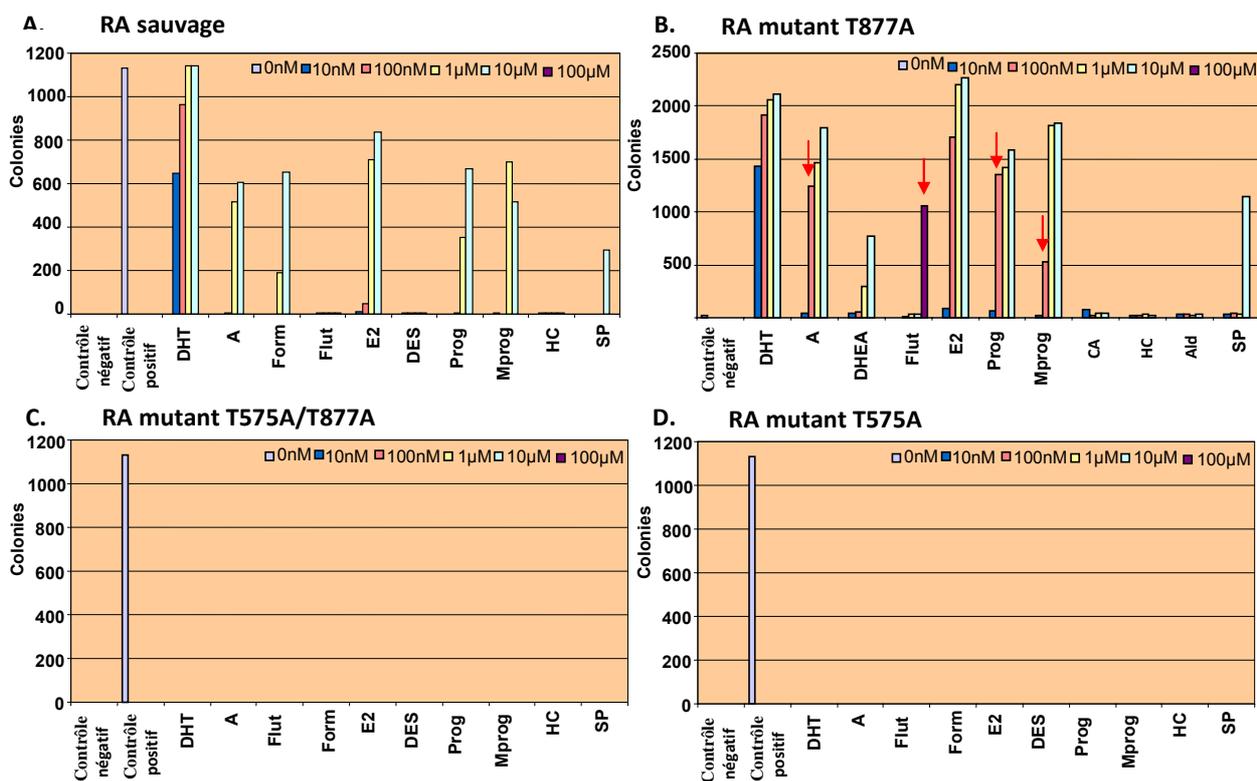


Figure 46 : Hormonogrammes du récepteur des androgènes sauvage, T877A, T575A et T575A/T877A.

Les histogrammes représentent le nombre de colonies obtenues. Sont indiquées les concentrations employées des différents ligands. Chaque expérience a été réalisée trois fois. Les levures ont été transformées avec le plasmide d'expression codant le RA sauvage (A), le RA mutant T877A (B), le RA mutant T575A/T877A (C) ou le RA mutant T575A (D), puis placées sur un milieu sélectif contenant l'un des ligands stéroïdes, ou non stéroïdes suivants : DHT, dihydrotestostérone ; A, androstènedione ; Form, formestane ; Flut, flutamide ; E2, β -estradiol ; DES, diethylstilbestrol ; Prog, progestérone ; Mprog, medroxyprogestérone ; HC, hydrocortisone ; CA, cortisone acetate ; DHEA, dehydroepiandrosterone ; Ald, aldosterone ; SP, spironolactone. Les flèches indiquent les différences notables de sensibilité aux hormones dues à la mutation T877A, comparées au RA sauvage.

Ainsi, l'absence de colonies observée en présence du RA double mutant T575A/T877A peut être imputée à la simple mutation T575A. Cette observation peut être expliquée par plusieurs hypothèses.

➤ La première possibilité est que le RA du patient n'est pas exprimé chez la levure. Afin de vérifier cette hypothèse, un western blot a été réalisé à partir d'extraits protéiques de levures transfectées par les différents RA. Comme vous pouvez le voir sur la figure 47 ci-dessous, le niveau d'expression des différents RA sont équivalents, suggérant que tous les RA mutants sont bien exprimés chez la levure. L'absence de colonies dans le test fonctionnel en présence du RA T575A ou du RA T575A/T877A ne s'explique donc pas par un défaut d'expression de ces RA chez la levure.

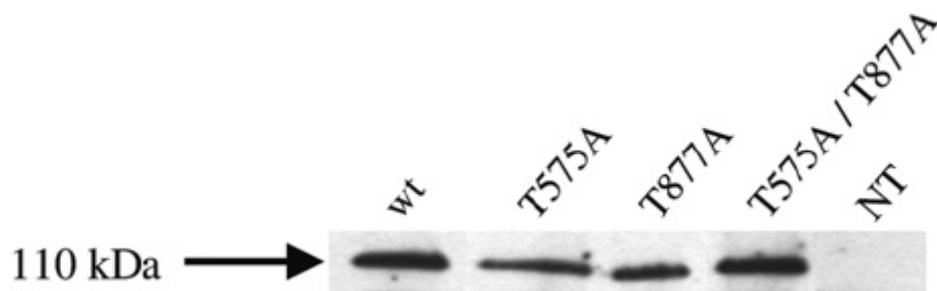


Figure 47: Le niveau d'expression des récepteurs des androgènes sauvage ou mutants chez la levure est équivalent.

Des extraits protéiques issus de levures exprimant le RA sauvage (wt), T575A, T877A ou T575A/T877A ou de levures non transfectées ont été séparés sur un gel de polyacrylamide de 7,5% en conditions dénaturantes. Les bandes correspondantes au RA ont été révélées à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le RA.

➤ La deuxième hypothèse, qui semble la plus probable, est que le RA mutant est fonctionnel, mais la mutation touche la fonction de reconnaissance des éléments de réponse aux androgènes situés dans le plasmide du test fonctionnel.

Afin de tester cette possibilité, nous avons continué l'exploration fonctionnelle du RA T575A et du RA T575A/T877A dans des lignées cellulaires. Nous avons tout d'abord vérifié par immunofluorescence la distribution intracellulaire de ces différents récepteurs en comparaison au RA sauvage et au RA T877A.

2. Localisation intracellulaire des récepteurs mutants

Une étude d'immunomarquage a été effectuée sur les cellules CV-1, issues de rein de singe vert, transfectées par les plasmides d'expression du RA sauvage ou des RA mutants T575A, T877A, et T575A/T877A. La lignée CV-1 a été utilisée car elle présente l'avantage de ne pas exprimer de RA endogène, cela nous permet ainsi de suivre aisément la distribution intracellulaire du RA transfecté dans ces cellules.

Comme indiqué sur la figure 48, la présence de la mutation T575A ne semble pas interférer avec la translocation nucléaire du RA après stimulation par 100 nM de DHT. En effet, comme pour le RA sauvage et le RA T877A, qui ne portent pas de mutation dans le DBD, les RA mutants T575A et T575A/T877A montrent une localisation exclusivement nucléaire après stimulation hormonale. En absence de DHT, ces deux RA sont cytoplasmiques, tout comme le RA sauvage et le RA mutant T877A. Ces résultats indiquent que la mutation T575A n'altère pas la dynamique intracellulaire du RA après une stimulation hormonale, et nous oriente plutôt vers une modification de l'affinité et/ou de la spécificité du RA vis-à-vis des éléments de réponse hormonaux.

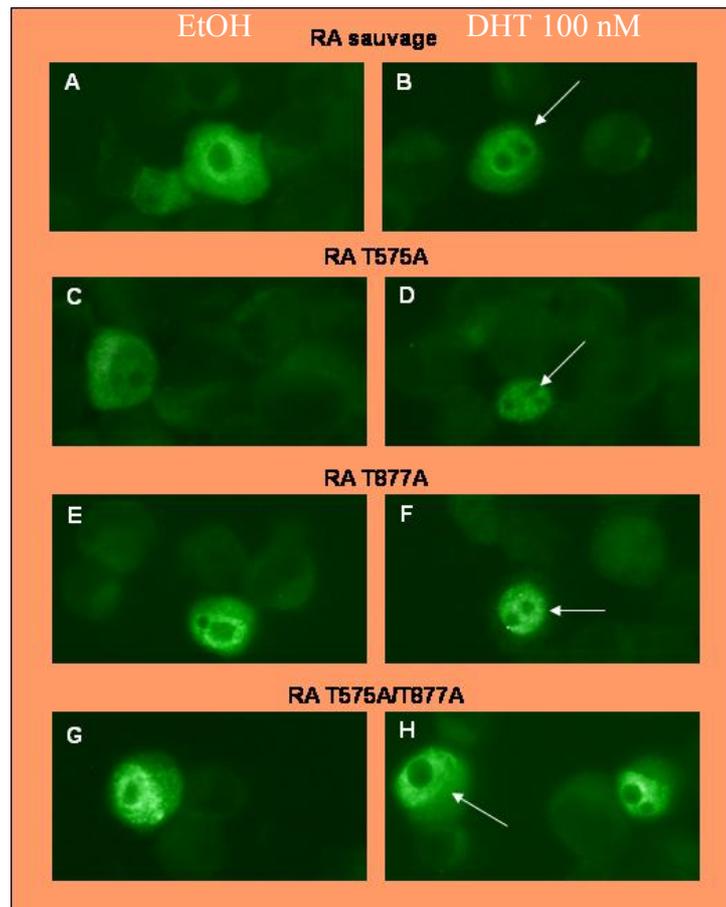


Figure 48 : Localisation des récepteurs des androgènes sauvage et mutants T575A, T877A et T575A/T877A.

Les images ont été obtenues par immunofluorescence après incubation des cellules CV-1 avec un anticorps monoclonal anti-RA, puis avec un anticorps secondaire couplé au FITC. Les cellules des figures A, C, E et G ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH).

Comme les contrôles RA sauvage et RA T877A (B et F), les RA mutant T575A et T575A/T877A présentent une localisation intranucléaire après stimulation par 100 nM de DHT (D et H). La flèche indique le noyau des cellules.

D'après cette hypothèse, le RA mutant T575A/T877A et le RA mutant T575A ne reconnaîtraient pas les éléments de réponse présents dans la construction utilisée lors du test chez la levure. Afin de vérifier si les RA mutants sont capables de reconnaître d'autres éléments de réponse, des tests d'activation transcriptionnelle dans une lignée cellulaire n'exprimant pas de RA ont été réalisés.

B. Analyse des capacités d'activation transcriptionnelle des récepteurs mutants dans la lignée cellulaire CV-1

1. Etude de la mutation T575A

Pour vérifier notre hypothèse, les capacités d'activation transcriptionnelle du RA mutant T575A/T877A en réponse à une stimulation par 100 nM de DHT ont été étudiées à l'aide d'un test de gène rapporteur dans des cellules CV-1, et comparées à celles du RA sauvage ainsi qu'à celles des RA mutants T575A et T877A. La DHT étant diluée dans de l'éthanol, les activités transcriptionnelles des différents récepteurs ont été observées en présence d'éthanol (EtOH) afin de vérifier que l'effet observé n'est pas dû au diluant mais bien à l'hormone elle-même.

Les cellules CV-1 sont co-transfectées avec un plasmide d'expression du RA sauvage ou de l'un des RA mutant T575A, T877A ou T575A/T877A, ainsi qu'avec une construction contenant un promoteur hormono-sensible en amont du gène rapporteur luciférase. Les constructions utilisées, PSA 61-Luc et MMTV-LTR-Luc correspondent respectivement à un fragment de 6 kb du promoteur du gène humain *PSA*, contenant les trois ARE décrit précédemment, et à la séquence LTR (Long Terminal Repeat) du virus de la tumeur mammaire de la souris, MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus). Cette dernière construction contient des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), qui sont plus reconnus par le récepteur des glucocorticoïdes, mais les autres récepteurs des hormones stéroïdes, notamment le RA, peuvent également les reconnaître.

Dans la figure 49 A sont représentés les résultats obtenus avec la construction pMMTV-Luc. Après stimulation par 100 nM de DHT, les RA mutants T575A et T575A/T877A conduisent à une activité luciférase exceptionnellement forte comparée à celle obtenue avec le RA sauvage (3,5 fois supérieure pour le RA T575A et 3,4 fois pour le double mutant). Le RA mutant T877A, qui comme le RA sauvage ne possède aucune mutation dans le DBD, présente une activité transcriptionnelle comparable à celle du RA sauvage (induction de 1,3 fois). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la mutation T575A n'empêcherait pas la liaison du RA à l'ADN, mais au contraire modifierait l'affinité et/ou la spécificité du RA pour les HRE.

La même expérience mais en présence de la construction PSA 61-luciférase a été effectuée. Dans ce cas, les RA sauvage et mutant T877A présentent une forte activité luciférase (respectivement 3500 et 7350 unités arbitraires) (figure 49 B). En revanche, les RA mutants T575A et T575A/T877A présentent une activité luciférase réduite à partir de ce promoteur (1500 et 2150 UA respectivement, soit 0,4 et 0,6 fois moins comparés au RA sauvage). Ces résultats suggèrent que la liaison du RA à ses HRE serait altérée par la présence de la mutation T575A. Cette mutation semblerait donc diminuer l'affinité du RA pour ses éléments de réponse naturels.

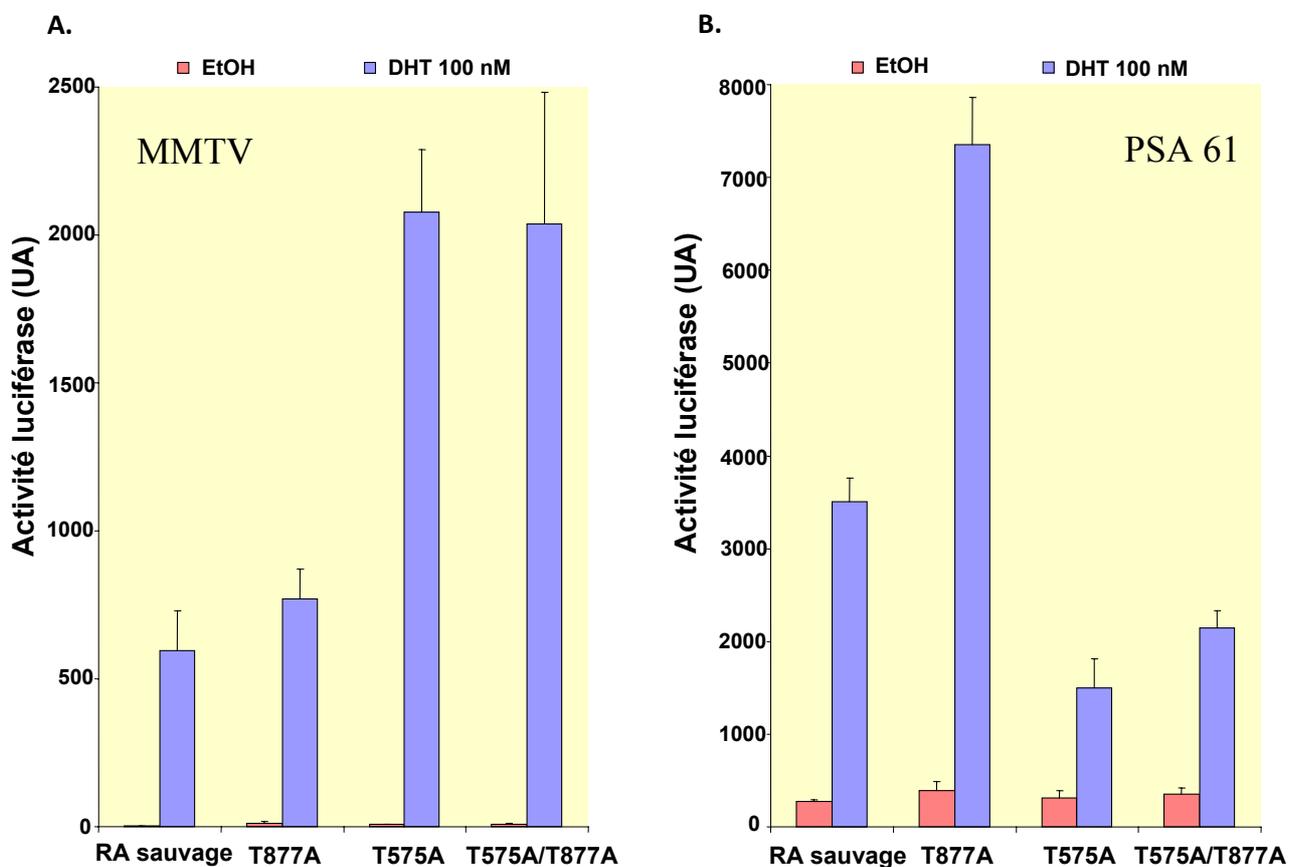


Figure 49 : La mutation T575A dans le domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes affecte son activité transcriptionnelle.

Les deux histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires, UA) obtenue après transfection des cellules CV-1 avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou des RA mutants, ainsi qu'avec le plasmide rapporteur pMMTV-Luc (A) ou PSA 61-Luc (B). Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de stéroïdes pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

Afin de déterminer si la mutation T575A mène effectivement à une diminution de l'affinité du RA pour ses ARE naturels, d'autres ARE présents au niveau du promoteur de gènes connus pour être régulés par les androgènes ont été utilisés dans des expériences similaires aux précédentes. Les différentes constructions utilisées correspondent à ces éléments ARE placés en amont d'une boîte TATA, le tout disposé en amont du gène rapporteur luciférase.

Comme indiqué sur la figure 38, les éléments de réponse aux hormones utilisés dans cette étude peuvent être divisés en trois classes en fonction de leur réponse au RA. En effet, nous pouvons distinguer les éléments de haute affinité et spécifiques du RA, c'est-à-dire situés au niveau des promoteurs de gènes régulés par le RA *in vivo*, comme pbARE2, scARE1.2, ou slpHRE2 ; un élément de faible affinité mais spécifique du RA, scARE et les éléments de haute affinité mais non spécifiques du RA telles que la séquence C3(1)ARE.

La Probasine (pb) est exprimée 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 d'un élément ARE dans sa région promotrice (Zhang *et al*, 2004).

Le « Secretary 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 comportent un ARE (Haelens *et al*, 1999).

Le « Sex Limited Protein » (slp) est exprimé chez la souris. C'est une protéine du sérum qui partage 95% d'identité de séquence avec le composant C4 du complément murin, mais qui ne possède pas d'activité C4. Son promoteur contient trois HRE, et il a été démontré que HRE 2 est spécifique des androgènes (Adler *et al*, 1992).

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 *et al*, 2001).

Des cellules CV-1 ont été co-transfectées transitoirement par les vecteurs d'expression du RA sauvage ou des RA mutant, ainsi qu'avec une des constructions de gènes rapporteurs décrites ci-dessus, puis stimulées par 100 nM de DHT. Dans ces conditions, la construction contenant le motif C3(1)ARE, de haute affinité mais non spécifique du RA, est induite 1,6 fois plus avec le RA mutant T575A par rapport au RA sauvage (figure 50 A). En revanche, les éléments de réponse de haute affinité et spécifiques du RA tels que pbARE2, scARE1.2 et slpHRE2 présentent une réponse inférieure avec le RA mutant T575A comparé au RA sauvage après stimulation par 100 nM de DHT (figure 50 B). En effet, pbARE2 est induit 3 fois par 100 nM de DHT avec le RA sauvage, mais seulement 2 fois avec le RA mutant T575A. De même, scARE1.2 et slpHRE2 sont induits respectivement 8 et 10 fois par 100 nM de DHT avec le RA sauvage, mais seulement 2 et 5 fois avec le RA T575A. En utilisant un promoteur de faible affinité mais spécifique du RA : scARE, le RA sauvage stimulé par 100 nM de DHT induit une activité transcriptionnelle modérée (4 fois), alors qu'en présence du RA mutant T575A l'induction est encore plus faible (2 fois) (figure 50 C).

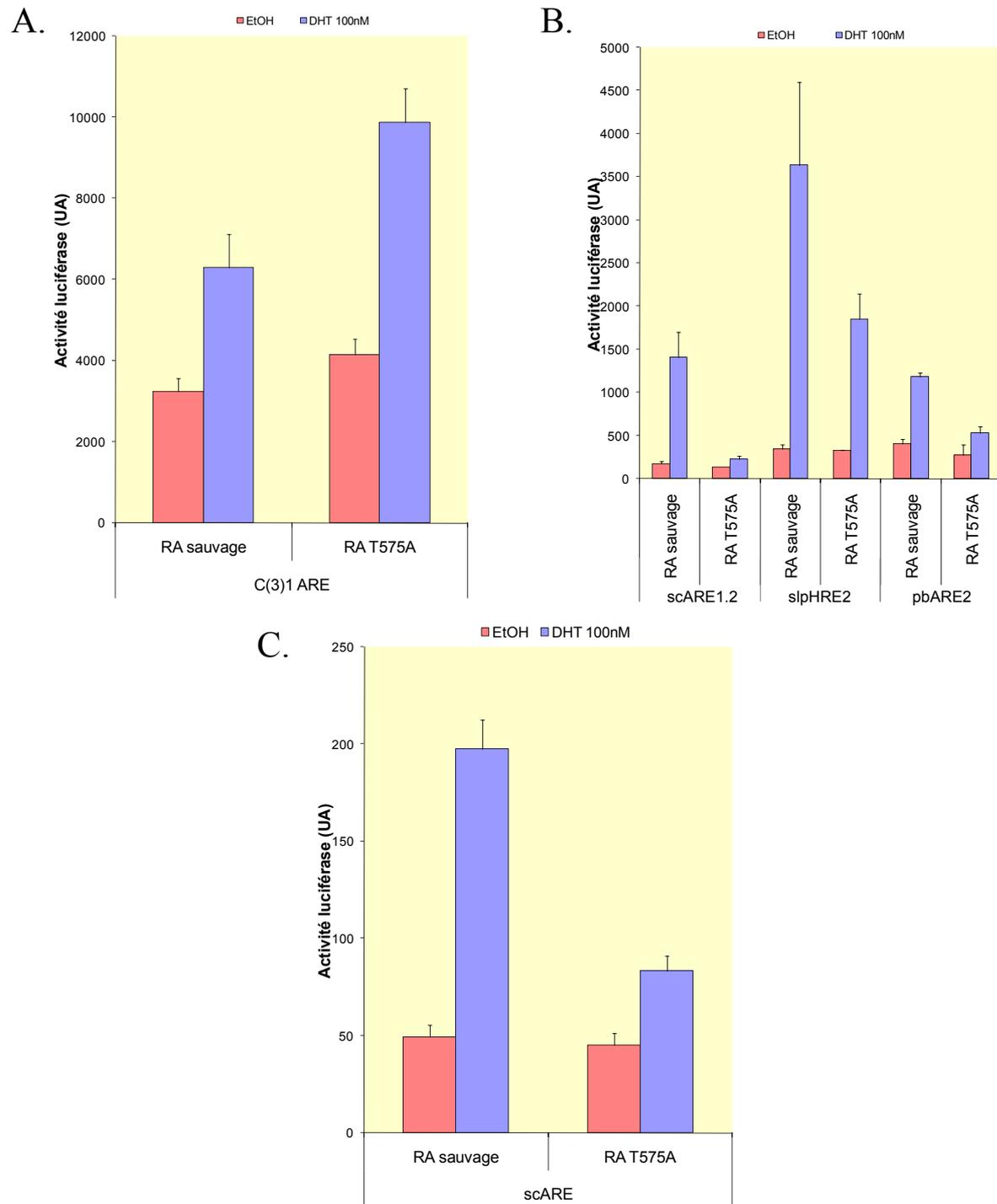


Figure 50: La mutation T575A modifie la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse aux hormones du récepteur des androgènes.

Les trois histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires) obtenue après transfection des cellules CV-1 avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou des RA mutants, ainsi qu'avec les plasmides suivants : C3(1)ARE-Luc de haute affinité et non spécifique du RA (A), pbARE2, scARE1.2 ou slpHRE2-Luc de haute affinité mais spécifique du RA (B), ou encore avec scARE-Luc de faible affinité et spécifique du RA (C).

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de stéroïdes pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

Tous ces résultats indiquent que le RA mutant T575A présente une activité transcriptionnelle plus forte que le RA sauvage sur des promoteurs contenant des éléments de réponse non spécifiques des androgènes, comme les promoteurs MMTV et C3(1), mais en revanche plus faible sur les HRE spécifiques du RA. Ces résultats confirment les précédents obtenus en présence des promoteurs MMTV et PSA 61. Tout ceci suggère que la mutation T575A pourrait modifier la spécificité du RA pour les HRE. D'autre part, des tests complémentaires de retardement sur gel réalisés au laboratoire par Mlle Monika Jagla ont par ailleurs indiqué que ces différences d'activation transcriptionnelle s'expliquent par une plus forte fixation de la protéine entière T575A sur les HRE non spécifiques (Monge *et al*, 2006).

Jusque là, il était admis que seuls les acides aminés de la boîte P intervenaient dans la reconnaissance de l'ADN. Or dans notre cas, la mutation T575A est située juste avant la boîte P et semble jouer un rôle important dans la spécificité d'action du RA. De plus, il a été montré que le changement d'un acide aminé dans le récepteur des glucocorticoïdes (substitution d'une glycine en valine en position 437, correspondant à la position 568 dans le RA) entraîne une discrimination du promoteur différente (Necela et Cidlowski, 2004). Cette observation confirme notre étude dans le fait que les acides aminés de la boîte P ne seraient probablement pas les seuls à permettre la discrimination des différents promoteurs.

2. Impact de la double mutation T575A/T877A sur les activités transcriptionnelles du récepteur des androgènes

Il est établi que la mutation T877A, présente dans le LDB, permet au RA d'être activé par des hormones autres que ses ligands habituels. Afin de connaître les effets des deux mutations combinées T575A et T877A, les capacités d'activation transcriptionnelle du RA double mutant T575A/T877A ont été étudiées en présence du promoteur MMTV, sur lequel le RA mutant T575A est très actif, et de 17 α -hydroxyprogestérone, un stéroïde endogène pour lequel le RA mutant T877A présente une affinité très grande comparée au RA sauvage. Les cellules CV-1 sont

donc co-transfectées avec le plasmide pMMTV-Luc et le plasmide d'expression du RA sauvage, ou de l'un des RA mutants T575A, T877A, ou T575A/T877A. Cette transfection est suivie d'une stimulation hormonale par de l'éthanol ou par 100 nM de 17 α -hydroxyprogestérone. La figure 51 représente le taux d'induction obtenu suite à cette stimulation hormonale. En présence du RA sauvage et du RA mutant T575A dont le LBD est normal, aucune induction significative n'est observée. En revanche, en présence du RA mutant T877A la 17 α -hydroxyprogestérone entraîne une augmentation de l'activité luciférase de 6 fois. Cependant, le RA double mutant T575A/T877A conduit à une induction encore plus forte de près de 36 fois.

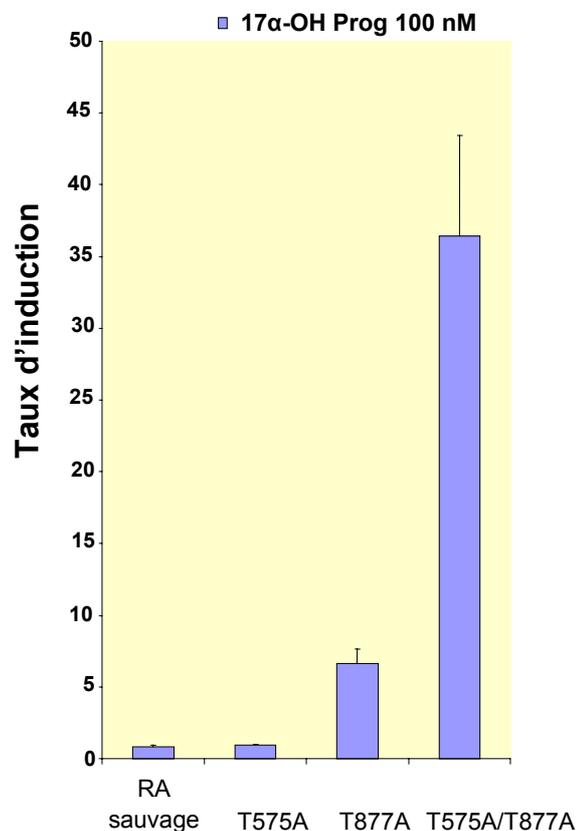


Figure 51: La double mutation T575A/T877A confère de nouvelles propriétés au récepteur des androgènes double mutant.

L'histogramme indique le pourcentage d'induction de l'activité luciférase, obtenu suite à une stimulation par 100 nM de 17 α -hydroxyprogestérone (pendant 48h dans un milieu dépourvu de stéroïdes). La stimulation a été réalisée après transfection des cellules CV-1 par les vecteurs d'expression du RA sauvage ou des RA mutants, ainsi qu'avec le plasmide pMMTV-Luc.

L'induction est calculée par rapport à l'activité trouvée dans les cellules traitées par de l'éthanol. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

Ces résultats semblent indiquer que les deux mutations T575A et T877A coopèrent pour donner de nouvelles propriétés au RA double mutant T575A/T877A. La mutation T877A permet d'une part d'élargir le spectre de sensibilité à des hormones autres que les androgènes, et la mutation T575A quant à elle modifie la spécificité du récepteur pour les HRE (Monge *et al*, 2006).

C. Etude des mutations T575A et T575A/T877A dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate

1. Effet de la mutation T575A sur les activités transcriptionnelles du RA.

Les résultats obtenus dans les cellules CV-1 indiquent une différence de reconnaissance des HRE dès lors que le RA porte la mutation T575A, en comparaison au RA sauvage.

Par la suite, notre but a été de voir ce qu'il se passait dans un contexte prostatique en présence du RA mutant T575A. A cette fin, les mêmes expériences d'activation transcriptionnelle que celles effectuées dans les cellules CV-1 ont été réalisées dans la lignée cellulaire LNCaP. Il s'agit d'une lignée humaine de cancer de la prostate. Ces cellules sont toujours dépendantes des androgènes, et expriment un RA nommé RA endogène par la suite. Ce dernier présente la mutation T877A dans son LBD. Du fait de la présence d'un RA endogène dans ces cellules, lors des expériences décrites par la suite, un contrôle transfecté dans les mêmes conditions que les tests a systématiquement été réalisé. Ce contrôle, noté C3, correspond au plasmide d'expression du RA vide. Ce contrôle nous permet de vérifier le niveau d'expression de base des cellules dû au RA endogène en réponse à la stimulation hormonale.

Les cellules LNCaP sont co-transfectées avec un plasmide d'expression du RA sauvage ou du RA mutant T575A ou avec le plasmide C3, et avec une construction contenant un promoteur répondant aux hormones tel que les constructions PSA 61-Luc ou MMTV-Luc dans lesquels un gène rapporteur luciférase est placé

respectivement sous le contrôle d'HRE spécifiques du RA (ARE) ou d'HRE non spécifiques du RA (GRE).

A l'inverse de ce qui a été observé dans les cellules CV-1, les tests luciférase dans les cellules prostatiques LNCaP indiquent que le RA mutant T575A présente toujours une activité transcriptionnelle supérieure comparé au RA sauvage, indépendamment des HRE testés (figure 52). En effet, dans les deux cas, le RA sauvage présente une activité transcriptionnelle plus faible que celle du RA T575A, différenciant ainsi des résultats obtenus dans les cellules CV-1.

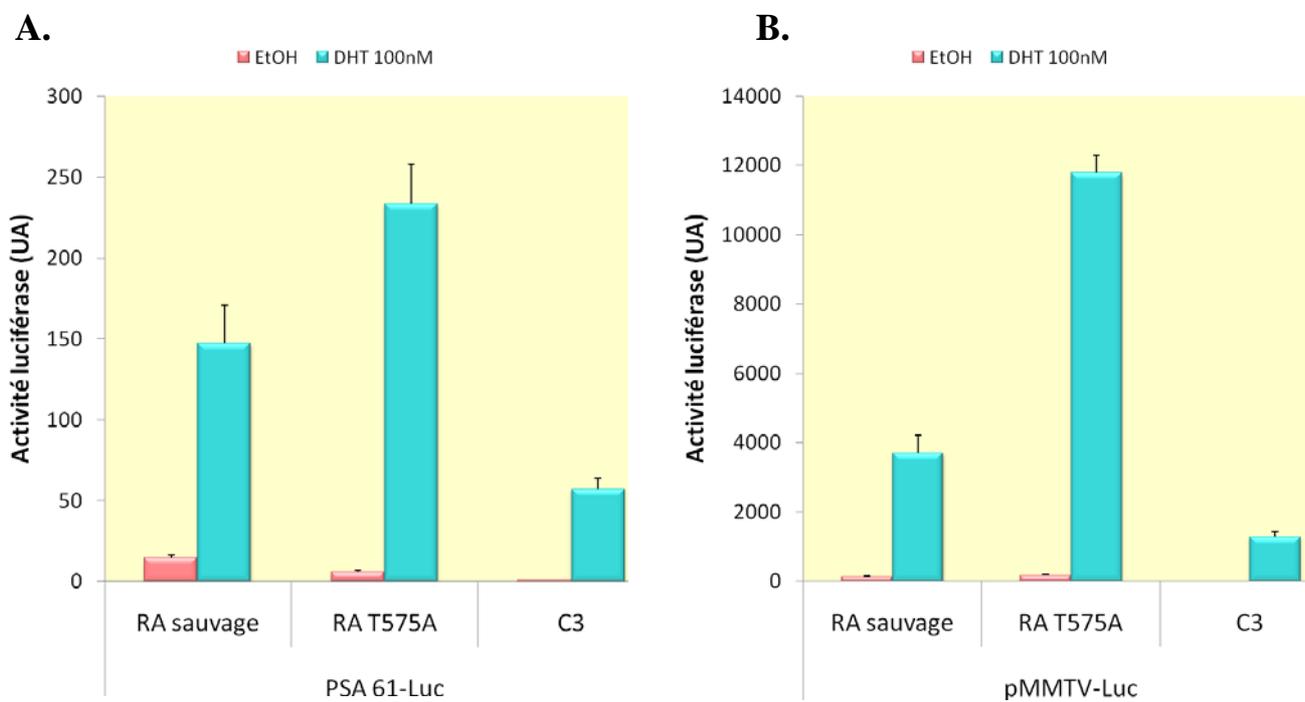


Figure 52 : La mutation T575A dans le domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes augmente son activité transcriptionnelle dans une lignée cellulaire prostatique.

Les deux histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires, UA) obtenue après transfection des cellules LNCaP avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou des RA mutants, ainsi qu'avec le plasmide rapporteur pMMTV-Luc (A) ou PSA 61-Luc (B).

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de stéroïdes pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

Par la suite, afin de confirmer ces résultats, les capacités d'activation transcriptionnelle du RA sauvage et du RA mutant T575A ont été analysées dans les cellules LNCaP à partir de promoteurs minimum. Ces constructions consistent en une boîte TATA précédée de deux ou quatre répétitions de l'élément de réponse aux hormones, le tout disposé en amont du gène rapporteur luciférase. Les HRE utilisés dans cette étude sont GREcs et sSTAT-GRE pour les éléments non spécifiques des androgènes, et ARE PSA ainsi que scARE1.2 pour les éléments spécifiques.

Comme indiqué dans la figure 53, nous n'observons aucune différence entre les activités transcriptionnelles du RA mutant T575A et celles du RA sauvage sur les promoteurs minimum étudiés. Ainsi, que ce soit à partir d'HRE spécifiques des androgènes, ou d'HRE non spécifiques des androgènes, l'activation transcriptionnelle induite par le RA sauvage est équivalente à celle induite par le RA mutant T575A. La plus forte activité observée en présence du RA T575A sur le promoteur minimum sSTAT-GRE n'est pas significative en raison de la barre d'erreur. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus à partir des promoteurs entiers MMTV-LTR et PSA 61.

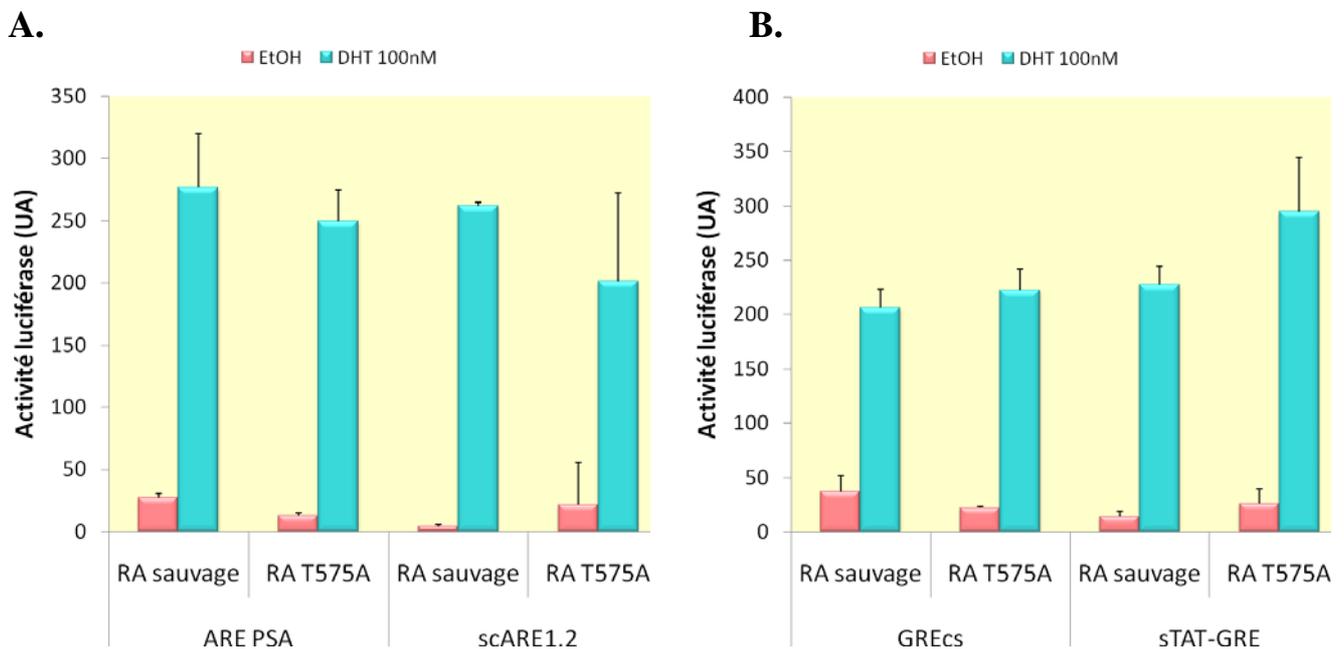


Figure 53 : La mutation T575A n'influence pas l'activation transcriptionnelle du récepteur des androgènes à partir de promoteurs minimum.

Les deux histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires) obtenue après transfection des cellules LNCaP avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou du RA mutant T575A, ainsi qu'avec les plasmides rapporteurs luciférase contenant un promoteur minimum spécifique (A) ou non spécifique (B) des androgènes.

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de stéroïdes pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

Pris ensemble, nos résultats indiquent que :

- La mutation T575A semble affecter la liaison du RA à l'ADN en augmentant l'activité transcriptionnelle du RA à partir de promoteurs non spécifiques du RA.
- L'impact de la mutation T575A dépend du contexte cellulaire car dans une lignée de CaP, le RA mutant T575A est toujours plus actif ou au moins aussi actif que le RA sauvage.

Ces résultats suggèrent que des cofacteurs pourraient interagir différemment avec le RA sauvage et avec le RA mutant T575A de manière à moduler l'activité du RA, ce qui expliquerait les différences observées dans nos tests.

En effet, les lignées cellulaires de rein de singe et de prostate humaine ne présentent pas le même profil d'expression de cofacteurs interagissant avec le RA. Les résultats obtenus ici suggèrent que certains cofacteurs doivent être recrutés différemment par le RA sauvage en comparaison au RA mutant T575A, ce qui résulte en une modulation différente des activités du RA. Cette hypothèse est appuyée par les tests d'activation transcriptionnelle à partir de promoteur minimum dans les LNCaP, où la simple présence des HRE ne suffit pas au RA T575A pour entraîner une activation transcriptionnelle plus importante. De plus, les promoteurs des gènes cibles contiennent des sites de fixation pour de nombreux facteurs notamment pour des cofacteurs, sites qui sont absents de ces constructions minimales.

Le niveau d'expression de certains cofacteurs du RA pourrait expliquer les différences observées entre les deux lignées. La mutation T575A pourrait affecter le recrutement de certains cofacteurs jouant un rôle important pour les activités du RA. Les interactions du RA sauvage et du RA mutant T575A avec certains cofacteurs seront analysées par la suite.

2. Effet de la double mutation T575A/T877A sur les activités transcriptionnelles du RA

Comme réalisé dans la lignée CV-1 (figure 51), j'ai regardé si les deux mutations T575A et T877A pouvaient coopérer afin d'augmenter les activités transcriptionnelles du RA dans la lignée cancéreuse prostatique LNCaP.

Nous avons vu que le RA mutant T575A activé par la DHT est très actif sur le promoteur MMTV, et que le RA T877A possède une grande affinité pour la 17 α -hydroxyprogestérone. Ainsi, les activités transcriptionnelles du RA double mutant T575A/T877A sur le promoteur MMTV ont été étudiées dans les cellules LNCaP en présence de 17 α -hydroxyprogestérone.

Les cellules LNCaP sont donc co-transfectées avec le plasmide pMMTV-Luc et le plasmide d'expression du RA sauvage, ou de l'un des RA mutants T575A, T877A, ou T575A/T877A. Cette transfection est suivie d'une stimulation hormonale par de l'éthanol ou par 100 nM de 17 α -hydroxyprogestérone.

La figure 54 représente le taux d'induction obtenu suite à cette stimulation hormonale. Comme dans les cellules CV-1, en présence du RA sauvage et du RA mutant T575A dont le LBD est normal, aucune induction significative n'est observée. En revanche, en présence du RA mutant T877A la 17 α -hydroxyprogestérone entraîne une augmentation de l'activité luciférase 3,6 fois plus forte que celle du RA sauvage. A la différence des cellules CV-1, le RA mutant T575A/T877A ne conduit pas à une induction plus forte que celle du RA T877A dans les cellules LNCaP. En effet, le RA double mutant n'entraîne qu'une induction 3,2 fois supérieure à celle du RA sauvage.

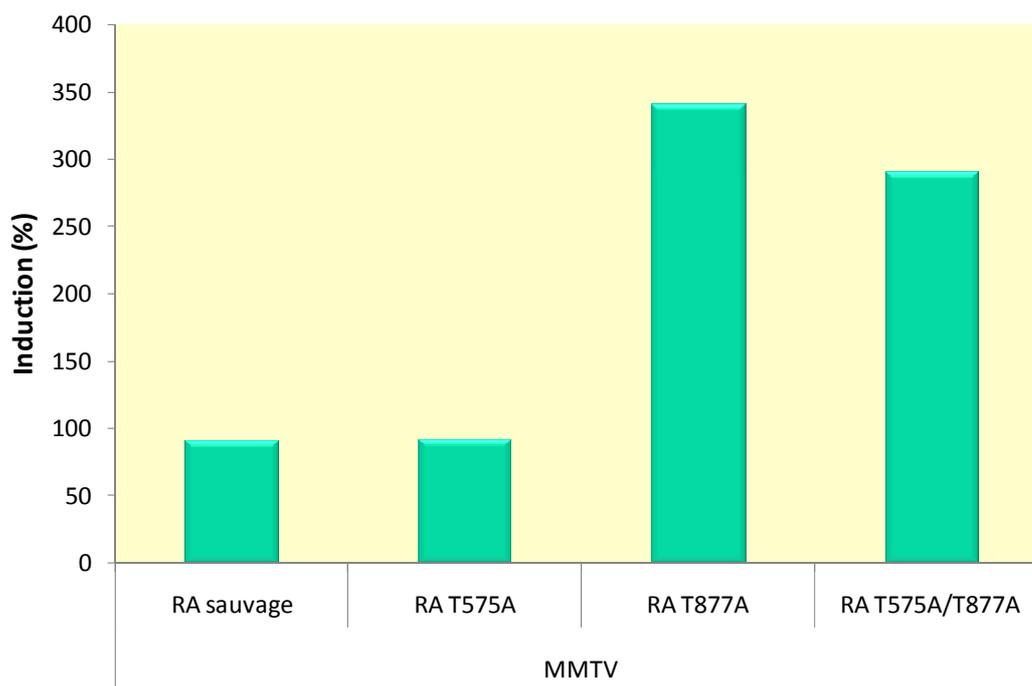


Figure 54 : Les deux mutations T575A et T877A ne coopèrent pas dans la lignée prostatique LNCaP.

L'histogramme indique le pourcentage d'induction de l'activité luciférase, obtenu suite à une stimulation par 100 nM de 17 α -hydroxyprogestérone (pendant 48h dans un milieu dépourvu de stéroïdes). La stimulation a été réalisée après transfection des cellules LNCaP par les vecteurs d'expression du RA sauvage ou des RA mutants, ainsi qu'avec le pMMTV-Luc. L'induction est calculée par rapport à l'activité trouvée dans les cellules contrôles traitées par de l'éthanol.

Bien qu'il n'y ait pas de coopérations entre les deux mutations dans la lignée LNCaP, nous voyons dans ces cellules un impact majeur de la mutation T575A en présence de son ligand naturel, la DHT. En effet, la présence de cette mutation T575A augmente les activités transcriptionnelles du RA mutant sur des promoteurs spécifiques ou non spécifiques des androgènes.

Les activités transcriptionnelles étant modifiées en fonction du RA présent dans la cellule, nous avons ensuite voulu vérifier si cette différence d'activité se répercute sur l'expression de gènes cibles du RA.

3. Effet de la mutation T575A sur l'expression de deux gènes cibles du récepteur des androgènes

Afin de corrélérer les fortes activités transcriptionnelles du RA mutant T575A à une variation de l'expression de gènes cibles dans les cellules LNCaP, l'impact de la mutation sur le niveau d'expression de deux gènes cibles du RA a été analysé par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérase en chaîne (RT-PCR).

Le premier gène cible étudié a été le gène de *l'Antigène Spécifique de la Prostate (Prostate Specific Antigen ou PSA)*. Cette protéine est un marqueur du CaP, et sa production est connue pour être sous le contrôle des androgènes. Le deuxième gène analysé est le gène *TMPRSS2*. Ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des sérines protéases, et contient un domaine transmembranaire de type II. Il a été démontré que ce gène est sur-régulé dans les cellules de CaP par les hormones androgéniques, et que au contraire dans les tissus cancéreux androgéno-indépendant ce gène est sous-régulé.

a. Gène *PSA*

Les ARN de cellules LNCaP exprimant le RA sauvage, le RA mutant T575A, T877A, ou T575A/T877A en fusion avec l'EGFP, ont été isolés et convertis en ADNc, puis amplifiés par la suite par PCR à l'aide d'amorces spécifiques.

Le niveau d'expression des gènes β -actine et RA endogène a servi de contrôle interne. Une amplification spécifique de l'EGFP a servi de contrôle de transfection. Comme représenté sur la figure 55 A, le niveau d'expression des gènes de fusion EGFP-RA est équivalent. L'intensité de l'expression du gène *PSA* est calculée en tenant compte du niveau d'expression de la β -actine pour chaque condition, comme indiqué dans la partie « Matériels et Méthodes ».

Les résultats obtenus nous indiquent une forte induction du gène *PSA* de 47,2% en présence de 100 nM de DHT dans les cellules transfectées par le plasmide contrôle C3 (figure 55). De plus, lorsque les cellules LNCaP sont transfectées par les quatre plasmides d'expression du RA, un niveau d'expression du *PSA* plus élevé en

présence d'éthanol est observé (figure 55 B), ce bruit de fond est probablement dû à la présence des RA transfectés.

Comme indiqué dans la figure 55 A et 55 B, en présence du RA sauvage, l'induction du *PSA* observée est de 28,9% et atteint 38,2% en présence du RA T575A. En présence du RA mutant T877A, à cause d'un bruit de fond élevé en présence d'éthanol, l'expression du gène *PSA* est faiblement induite par la DHT avec 6,5% d'induction, mais atteint 20,4% en présence du RA mutant T575A/T877A et de 100 nM de DHT. En réalité, l'expression du *PSA* est due à un effet combiné des deux mutations : la mutation T575A augmente l'expression du *PSA* mais puisque la mutation T877A la diminue, le RA double mutant entraîne une activation intermédiaire, et donc environ équivalente à celle induite par le RA sauvage.

Ces résultats indiquent une différence entre le RA sauvage et le RA mutant T575A au niveau du contrôle de la transcription du gène *PSA*. Par la suite nous avons voulu vérifier si la mutation T575A avait également un impact au niveau de la sécrétion de la protéine *PSA*. Ainsi, l'évolution du taux du *PSA* en présence des différents RA à l'aide du test ELISA a été analysée. Le niveau de sécrétion du *PSA* a été mesuré à partir du milieu provenant des cultures cellulaires de LNCaP juste avant l'extraction d'ARN. Comme représenté dans la figure 55 C, après stimulation par 100 nM de DHT, le niveau d'expression du *PSA* est augmenté de 4,2% en présence du RA T575A. Cette augmentation est seulement de 3,5%, de 4,1% ou de 3,7% en présence respectivement du RA sauvage, T877A ou T575A/T877A. Ainsi ces résultats indiquent que les mutations n'entraînent pas d'effet majeur sur la sécrétion du *PSA*.

Dans nos conditions expérimentales, le faible taux de cellules LNCaP transfectées (environ 15%) pourrait expliquer les faibles variations observées tant au niveau de l'expression du *PSA* que de la sécrétion de la protéine.

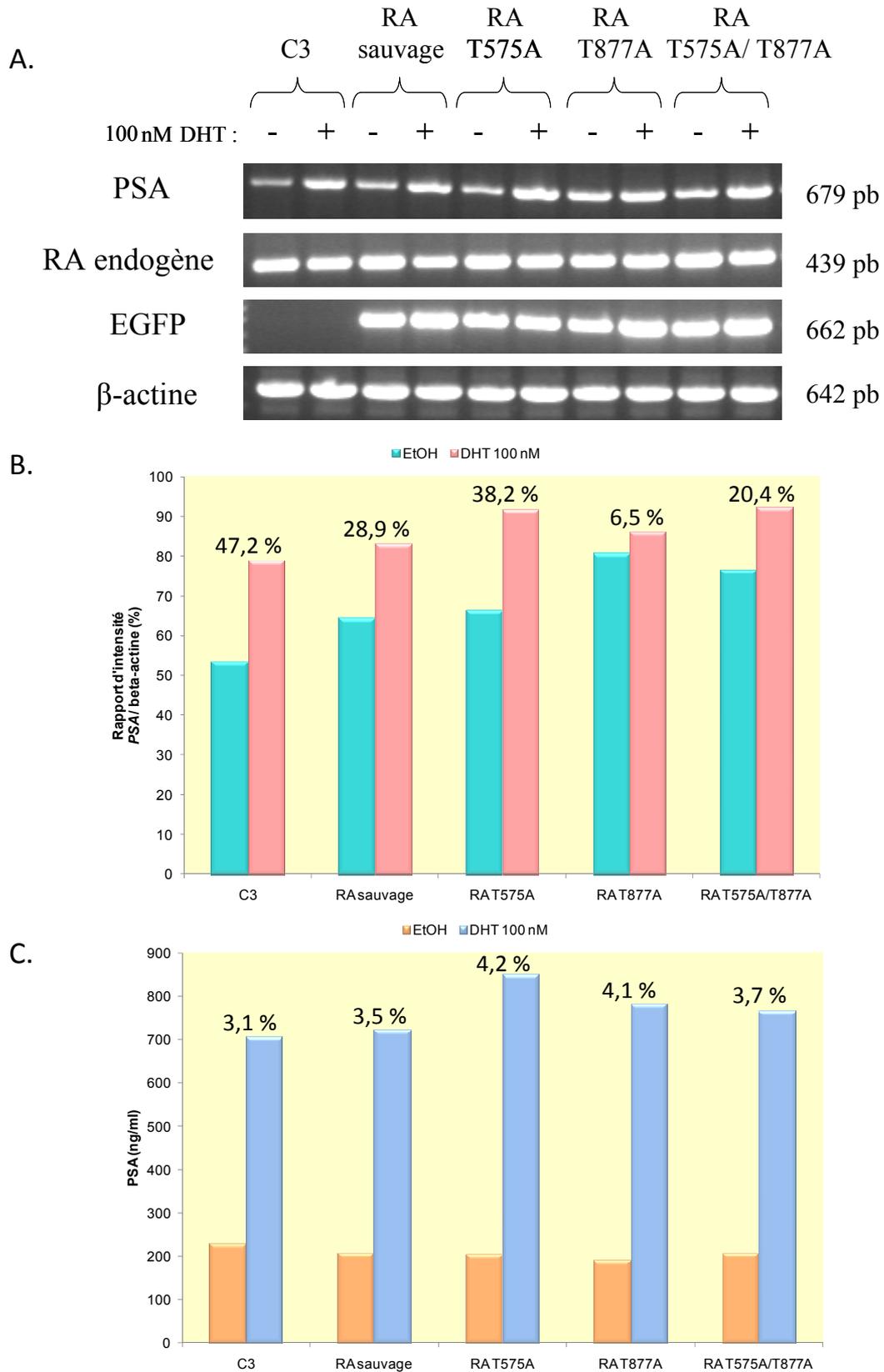


Figure 55 : Le gène *PSA* est sur-exprimé en présence du récepteur des androgènes *T575A*.

Les cellules LNCaP ont été co-transfectées avec les vecteurs d'expression pour les protéines de fusion EGFP-RA sauvage, *T575A*, *T877A* ou *T575A/T877A* ou un plasmide vide (*C3*). Ces

cellules sont traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT pour 48h dans un milieu dépourvu de stéroïdes. Les ARN ont été ensuite extraits, rétro-transcrits et amplifiés par PCR (A), et les intensités des bandes obtenues pour chaque récepteur correspondant au gène PSA sont indiquées en tenant compte des valeurs obtenues pour la β -actine (B). Les surnageants des cellules ont été récoltés et testés pour la sécrétion de PSA par la méthode ELISA (C). Les cellules transfectées avec le plasmide vide C3 ne permettent pas d'amplifier l'EGFP car l'amorce anti-sens s'hybride dans le RA. Le pourcentage d'induction par la DHT 100 nM pour chaque plasmide est indiqué sur les graphiques.

L'ensemble de ces résultats indique que le RA mutant T575A semble augmenter l'expression du PSA dans les cellules transfectées. Cependant, ces résultats devraient être confirmés en reproduisant ces expériences à partir de cellules exprimant de façon stable les différents RA.

Cette hypothèse est étayée par une étude d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrant que le RA mutant T575A est capable de former des complexes sur l'ADN de manière plus stable que le RA sauvage, puisqu'il est fortement recruté au niveau du PSA-ARE I comparé au RA sauvage même en présence d'un antagoniste (Jagla, 2007b).

b. Gène *TMPRSS2*

L'expression d'un deuxième gène cible du RA, le gène *TMPRSS2*, a été analysée dans le but d'observer si le RA T575A est capable d'influencer l'expression d'autres gènes cibles. Une RT-PCR a été réalisée à partir des ARN isolés de cellules LNCaP transfectées avec le RA sauvage ou avec le RA mutant T575A avec des amorces spécifiques de ce gène. Comme indiqué dans la figure 56, en présence du plasmide C3, une induction de 28,7% de l'expression du *TMPRSS2* est observée. Cette induction provient du RA endogène des cellules LNCaP. En présence du RA sauvage, une augmentation de 36,8% de l'induction du gène *TMPRSS2* est visible. Cette plus forte induction observée serait due au RA sauvage. En revanche, en présence du RA

T575A, une induction par la DHT 100 nM plus faible que celle obtenue pour le contrôle C3 est observée (23%).

Comparé au RA sauvage, le résultat observé en présence du RA T575A suggère que ce RA mutant est soit inactif sur ce promoteur, soit qu'il entraîne une inhibition de l'expression du gène *TMPRSS2*.

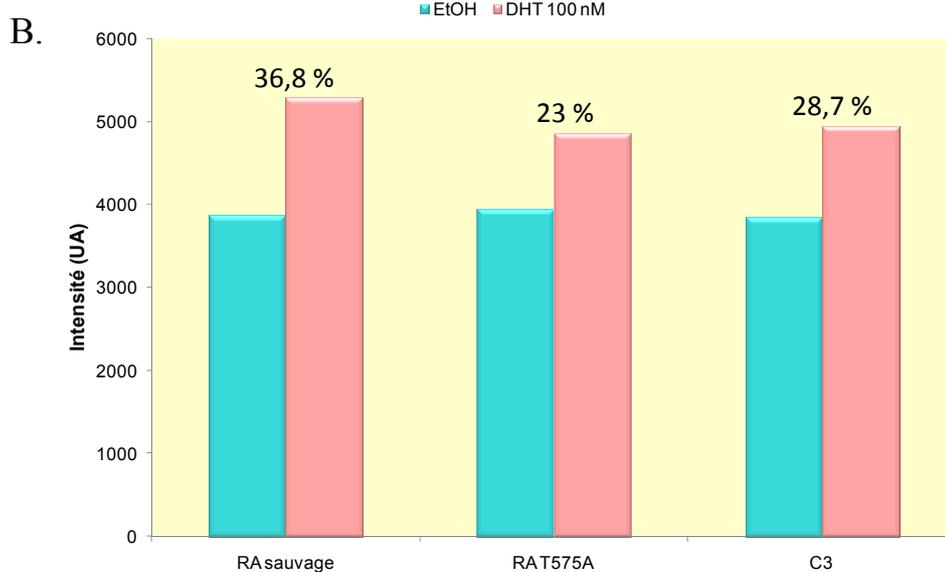
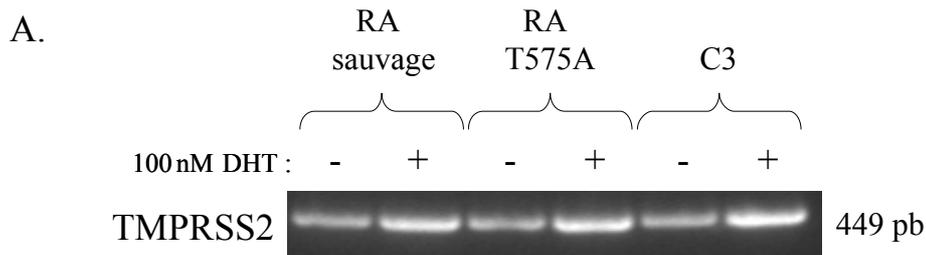


Figure 56 : Le niveau d'expression du gène *TMPRSS2* n'est pas augmenté par la mutation T575A.

Les cellules LNCaP ont été co-transfectées avec les vecteurs d'expression pour le RA sauvage, T575A ou un plasmide vide (C3). Ces cellules sont traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT pour 48h dans un milieu dépourvu de stéroïdes. Les ARN ont été ensuite extraits, rétro-transcrits et amplifiés par PCR (A), et les intensités des bandes obtenues pour chaque récepteur correspondant au gène *PSA* sont indiquées (B). Le pourcentage d'induction par la DHT 100 nM pour chaque plasmide est indiqué sur les graphiques.

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont également été réalisées afin d'étudier l'occupation du site ARE I (localisé en position -770 pb) du promoteur du gène *TMPRSS2*. Elles indiquent qu'en présence de DHT, le RA mutant T575A est plus fortement recruté au niveau de ce site ARE I en comparaison au RA sauvage.

Ce résultat indique que le RA mutant T575A ne serait pas inactif puisqu'il est capable de se fixer sur le promoteur de ce gène *TMPRSS2*. Ainsi, la mutation T575A semble plutôt entraîner une inhibition du gène *TMPRSS2*. Ce résultat reste à confirmer dans une lignée exprimant de manière stable les différents récepteurs.

Ainsi, malgré le fait que le promoteur de ce gène soit mieux reconnu par le RA mutant T575A (résultat du ChIP), cela ne mène pas à une augmentation de l'expression de ce gène. Au contraire, cette plus forte fixation semblerait plutôt entraîner une inhibition de ce gène.

Cependant, une étude récente indique que sur les cinq sites ARE présents au niveau du promoteur *TMPRSS2*, le site ARE V présent en position -13,5 kb par rapport au site d'initiation de la transcription serait le site le plus important pour l'induction de l'expression de ce gène par le RA sauvage (Wang *et al*, 2007) ; (figure 18).

Les expériences menées précédemment en présence de l'ARE I doivent donc être reproduites en ciblant ce site ARE V.

Les différences d'expression des gènes *PSA* et *TMPRSS2* observées en présence du RA T575A pourraient s'expliquer par une reconnaissance différente des sites potentiels de liaison du RA. En effet, le RA sauvage ne permet d'activer que certains de ces sites localisés le long du génome. Il est possible que la présence de la mutation T575A au sein du RA permette à ce dernier de reconnaître d'autres sites de liaison au niveau des régions activatrices de gènes cibles. Cela pourrait expliquer les différences observées dans nos expériences, où le RA mutant T575A est capable d'augmenter l'expression du gène *PSA*, et au contraire de diminuer l'expression du gène *TMPRSS2*.

D'après cette hypothèse, on ne peut pas exclure une expression génique différentielle en présence du RA mutant T575A. En effet, il est possible que d'autres gènes cibles du RA voient leur niveau d'expression modifié en présence du RA mutant T575A. Cependant, tous les gènes cibles du RA ne sont pas forcément affectés par cette mutation.

4. Impact de la mutation T575A sur le recrutement de cofacteurs par le récepteur des androgènes

Il a déjà été reporté qu'une mutation du RA pouvait changer les interactions du RA avec ses cofacteurs, comme l'exemple de la mutation T877A qui modifie les interactions du RA mutant avec le co-répresseur NCoR (Berrevoets *et al*, 2004). En effet, suite à la liaison d'un anti-androgène sur le RA mutant T877A, un changement conformationnel altéré par rapport au RA sauvage a lieu, qui semble empêcher le recrutement correct de NCoR à cause de la présence de cette mutation T877A. En conséquence, NCoR ne peut jouer son rôle de co-répresseur sur ce RA, et cela permet donc à un anti-androgène d'agir comme un fort agoniste.

Les résultats des études sur les activités transcriptionnelles du RA décrites précédemment suggèrent que des cofacteurs pourraient interagir d'une manière différente avec le RA sauvage ou avec le RA mutant T575A afin de moduler l'activité du RA.

D'autre part, le DBD du RA étant le siège d'interactions avec des cofacteurs, j'ai voulu vérifier si les fortes activités transcriptionnelles du RA T575A n'étaient pas dues à des interactions modifiées avec certains co-régulateurs.

Pour valider cette hypothèse, des expériences de co-localisation du RA T575A avec les co-activateurs SRC-2 et SRC-3, ainsi qu'avec le co-répresseur NCoR ont été réalisées en microscopie confocale.

Pour cela, des cellules LNCaP ont été transfectées avec le plasmide d'expression du RA en fusion avec l'EGFP (enhanced green fluorescent protein) : pEGFP-RA sauvage, pEGFP-RA T575A ou avec le plasmide vide contrôle

(pEGFP-C3). Les résultats obtenus avec ce contrôle ne seront pas montrés ici puisqu'ils confirment que l'expression de la protéine EGFP seule n'influence pas la localisation des cofacteurs.

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH), 100 nM de DHT, ou encore 1 μ M de Casodex dans l'étude avec NCoR. La co-localisation des deux RA avec les cofacteurs a été mise en évidence par l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques des cofacteurs endogènes aux cellules LNCaP, et d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy5. Un contrôle isotypique a également été effectué attestant la spécificité de l'immunofluorescence observée pour les différents cofacteurs (figure 57 A). Le noyau des cellules présentes dans le champ est visualisé en bleu grâce à un marquage par le Hoechst.

Le RA sauvage, ainsi que le RA mutant T575A sont visualisés tous deux en vert en conséquence de leur fusion avec la protéine EGFP. Comme indiqué dans la figure 57, en présence d'EtOH, les RA sauvage et mutant T575A sont localisés principalement dans le cytoplasme des cellules. En revanche, en présence de DHT, ces RA présentent une localisation exclusivement nucléaire.

La fluorescence rouge correspond au marquage du co-activateur SRC-2, qui est à la fois cytoplasmique et nucléaire, et ceci en présence ou en absence d'hormone (figure 57 B).

La co-localisation de SRC-2 et de l'EGFP-RA sauvage ou EGFP-RA T575A est représentée en jaune sur la figure, résultant de la superposition des fluorescences rouge et verte. Comme représenté sur la figure 57 B, aucune différence de co-localisation n'est observée entre SRC-2 et le RA sauvage ou le RA mutant T575A.

L'étude avec SRC-3 indique que le signal correspondant à SRC-3 est faible et diffus au niveau des cellules non transfectées, mais qu'il est beaucoup plus intense au niveau du noyau des cellules transfectées (figure 58). Ceci suggère une redistribution nucléaire de ce co-activateur en présence d'un RA transfecté. Toutefois, la mutation T575A ne semble pas influencer cette redistribution nucléaire de SRC-3.

De plus, aucune différence de co-localisation n'est observée entre le co-activateur SRC-3 et le RA sauvage ou le RA mutant T575A (figure 58).

La mutation T575A ne semble donc pas influencer la co-localisation du RA avec ces deux co-activateurs.

La co-localisation des RA sauvage et RA mutant T575A avec le co-répresseur NCoR a également été observée (figure 59).

En présence d'éthanol et de DHT, NCoR présente une localisation cellulaire diffuse dans l'ensemble de la cellule, avec une expression plus importante au niveau des nucléoles, à la fois dans les cellules transfectées avec le RA sauvage ou le RA T575A, mais aussi dans les cellules non transfectées voisines. De même, en présence de Casodex, NCoR est majoritairement localisé au niveau des nucléoles en présence du RA sauvage ou dans les cellules voisines non transfectées. En revanche, dans les cellules transfectées avec le RA T575A, NCoR est redistribué au niveau de l'ensemble du noyau de ces cellules, mais reste exclusivement au niveau des nucléoles dans les cellules voisines non transfectées. Ces résultats suggèrent que la mutation T575A pourrait avoir un impact sur le recrutement de ce co-répresseur en présence d'un antagoniste.

Pour conclure sur ces expériences de co-localisation avec les cofacteurs SRC-2, SRC-3 et NCoR, aucune différence de co-localisation du RA mutant avec chacun de ces co-régulateurs n'a pu être observée par rapport au RA sauvage excepté pour NCoR en présence du RA mutant T575A et de Casodex.

Cependant, bien qu'une différence entre les deux RA soit observée pour NCoR, les différences d'activité transcriptionnelle observées dans les tests précédents en présence de DHT ne s'expliquent pas par une interaction modifiée avec ces deux co-activateurs, mais s'expliqueraient probablement plutôt par une liaison plus stable du RA mutant T575A avec l'ADN.

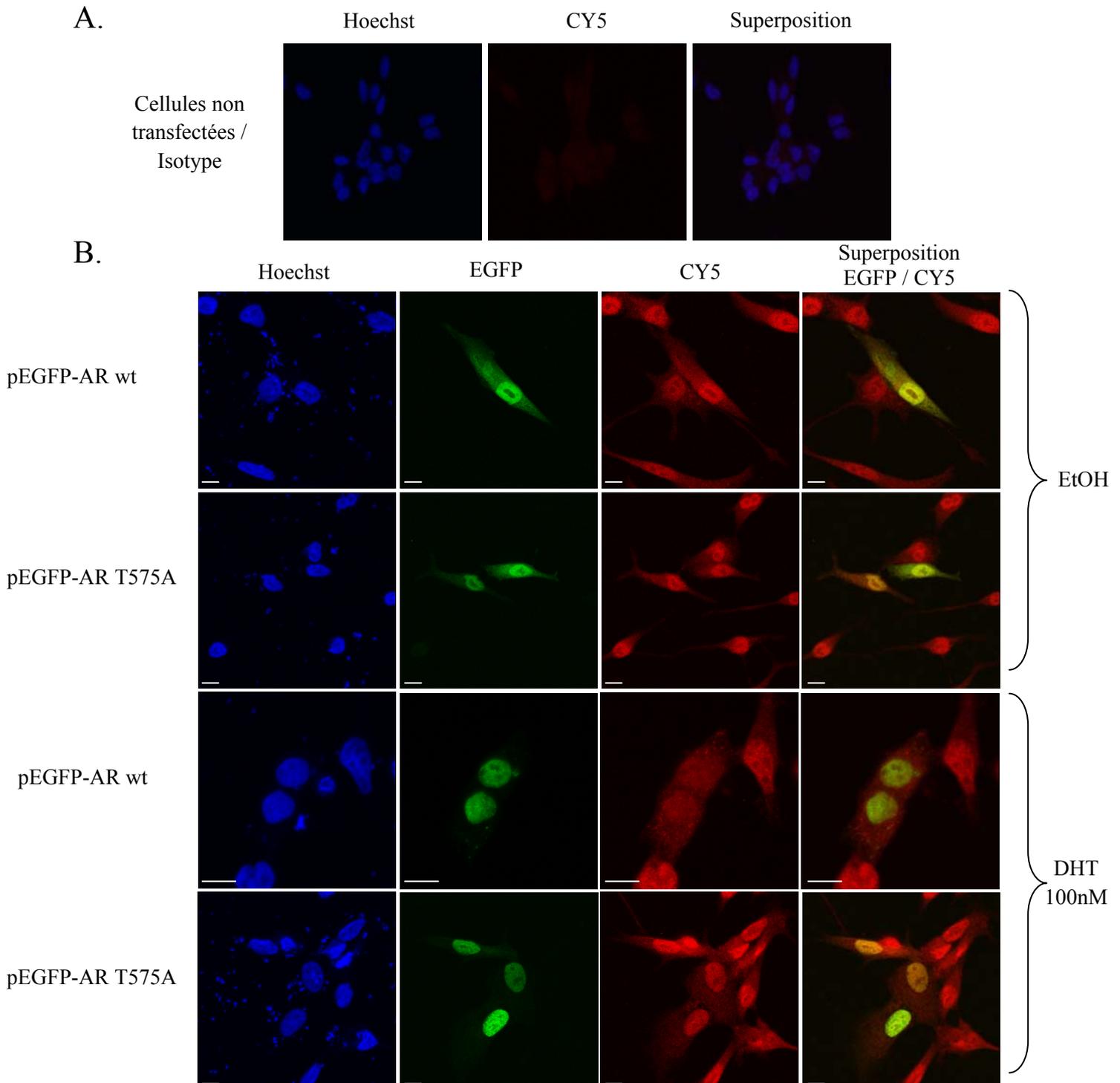


Figure 57: Etude de la co-localisation de SRC-2 par le récepteur des androgènes sauvage ou mutant T575A.

Les cellules LNCaP sont transfectées avec l'un des plasmides pEGFP-AR. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les noyaux, visibles en bleu, sont marqués au Hoechst 33258. La fluorescence verte correspond à la protéine de fusion EGFP, le co-activateur SRC-2 est visualisé en rouge suite au marquage avec l'anticorps secondaire couplé au CY5, et la couleur jaune correspond à la superposition des canaux EGFP et CY5.

A. Contrôle isotypique réalisé avec un IgG de lapin, barre=10µM.

B. Etude de la co-localisation du RA sauvage (wt) et du RA T575A avec le co-activateur SRC-2, barre = 10µM. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica SP2 UVAOBS.

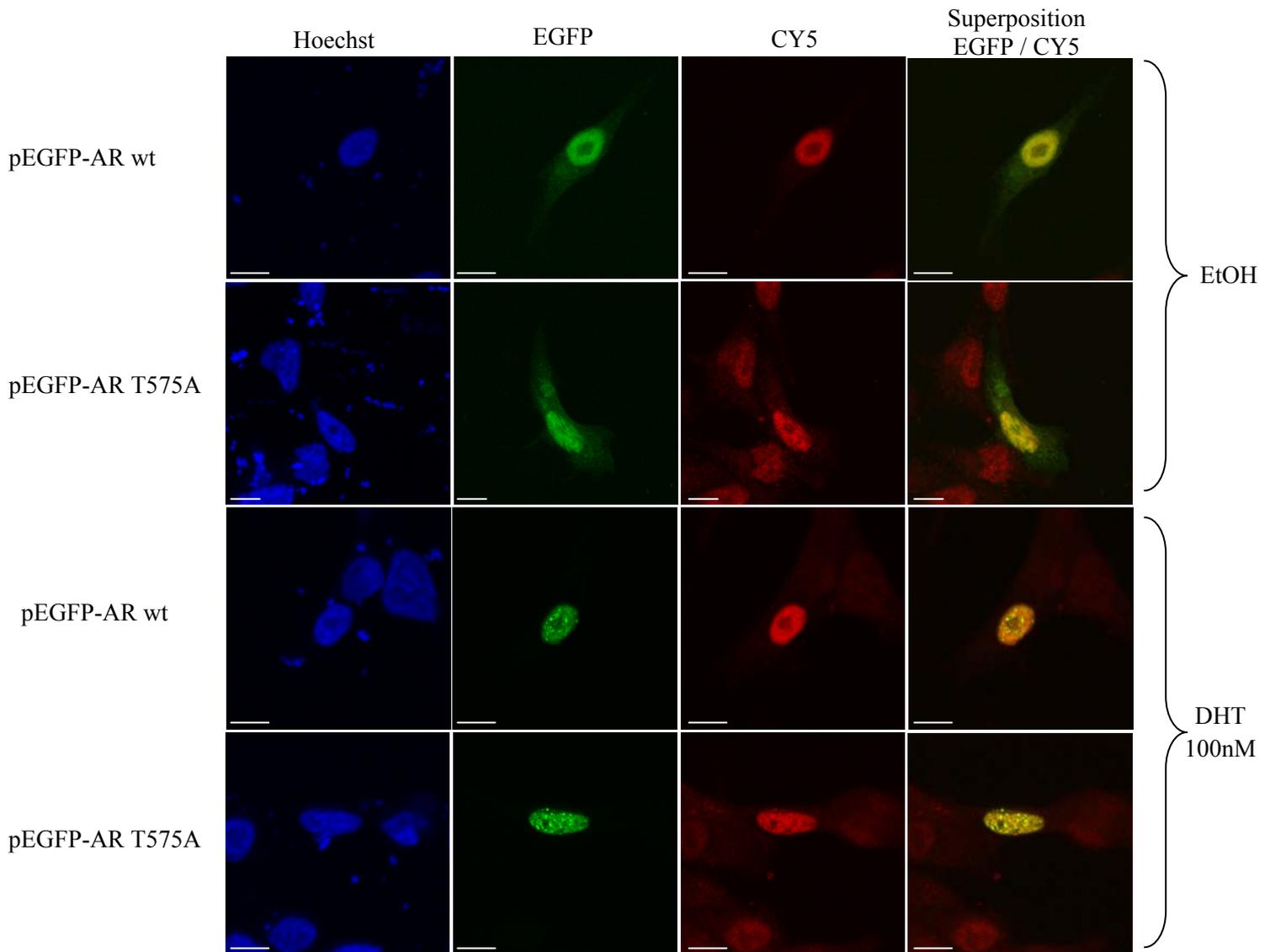


Figure 58 : Etude de la co-localisation de SRC-3 par le récepteur des androgènes sauvage ou mutant T575A.

Les cellules LNCaP sont transfectées avec l'un des plasmides pEGFP-AR. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les noyaux, visibles en bleu, sont marqués au Hoechst 33258. La fluorescence verte correspond à la protéine de fusion EGFP, le co-activateur SRC-3 est visualisé en rouge suite au marquage avec l'anticorps secondaire couplé au CY5, et la couleur jaune correspond à la superposition des canaux EGFP et CY5. Barre = 10µM. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica SP2 UV AOBs.

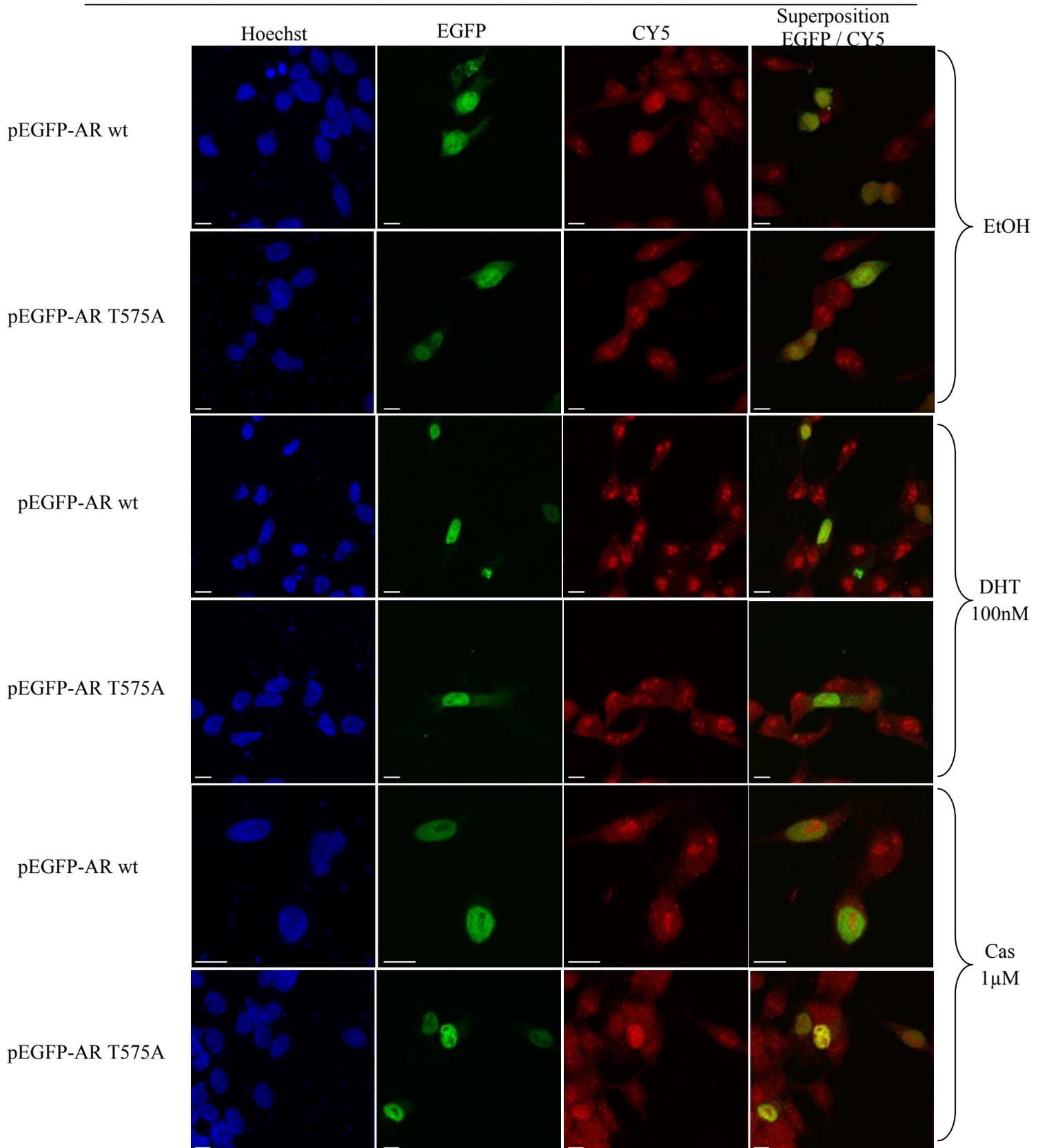


Figure 59: Etude de la co-localisation de NCoR par le récepteur des androgènes sauvage ou mutant T575A.

Les cellules LNCaP sont transfectées avec l'un des plasmides pEGFP-AR. Quarante huit heures après transfection, les cellules sont fixées et les noyaux, visibles en bleu, sont marqués au Hoechst 33258. La fluorescence verte correspond à la protéine de fusion EGFP, le co-répresseur NCoR est visualisé en rouge suite au marquage avec l'anticorps secondaire

couplé au CY5, et la couleur jaune correspond à la superposition des canaux EGFP et CY5. Barre = 10 μ M. Les images ont été acquises à l'aide du microscope confocal Leica SP2 UV AOB.

Dans le but de confirmer les résultats d'immunofluorescence, des études d'activation transcriptionnelle en présence des cofacteurs cités ci-dessus ont été réalisées. Pour cela, des cellules LNCaP ont été co-transfectées par trois plasmides. Il s'agit d'un plasmide d'expression du RA sauvage, du RA mutant T575A ou le plasmide C3 ; d'un plasmide codant pour l'un des cofacteurs suivant : SRC-2, SRC-3 ou NCoR ; et d'une construction contenant le gène rapporteur *luciférase* en aval d'un promoteur répondant aux hormones, à savoir les constructions PSA 61-Luc ou MMTV-Luc. Le plasmide codant pour la β -galactosidase (β -gal) a été utilisé comme contrôle afin d'avoir la même quantité d'ADN pour toutes les conditions.

Comme indiqué sur la figure 60 A, sur le promoteur non spécifique des androgènes MMTV, le co-activateur SRC-2 et le co-répresseur NCoR ne modifient pas les activités transcriptionnelles du RA sauvage et du RA mutant T575A. En revanche, SRC-3 augmente les activités transcriptionnelles ligand-dépendantes des deux récepteurs, avec un effet similaire.

Globalement, le profil observé pour chaque récepteur en présence des différents cofacteurs est identique sur le promoteur non-spécifique des androgènes MMTV.

Le cofacteur SRC-3 a également un impact sur les activités du RA endogène. En effet, en présence du plasmide contrôle C3, une augmentation de l'activité luciférase en présence de SRC-3 est observée, correspondant à l'activité du RA endogène des cellules LNCaP.

Sur le promoteur spécifique des androgènes PSA 61, le profil global d'activation transcriptionnelle est le même pour les deux récepteurs. En effet, sur ce promoteur, le co-répresseur NCoR ne semble pas influencer les activités transcriptionnelles des deux récepteurs, alors que SRC-2 semble diminuer uniquement leurs activités transcriptionnelles ligand-dépendantes (figure 60 B). En effet, en présence d'éthanol aucune variation n'est observée. Comme sur le promoteur

MMTV, les activités transcriptionnelles ligand-dépendantes du RA endogène, mais aussi des RA sauvage et muté transfectés sont augmentées en présence d'une sur-expression de SRC-3 sur ce promoteur PSA 61. Une nette augmentation des activités luciférase en présence d'éthanol au niveau des cellules sur-exprimant SRC-3 est également observée.

Les résultats obtenus en absence de ligand suggèrent que SRC-3 conduirait à une augmentation des activités transcriptionnelles ligand-indépendantes du RA. Toutefois, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

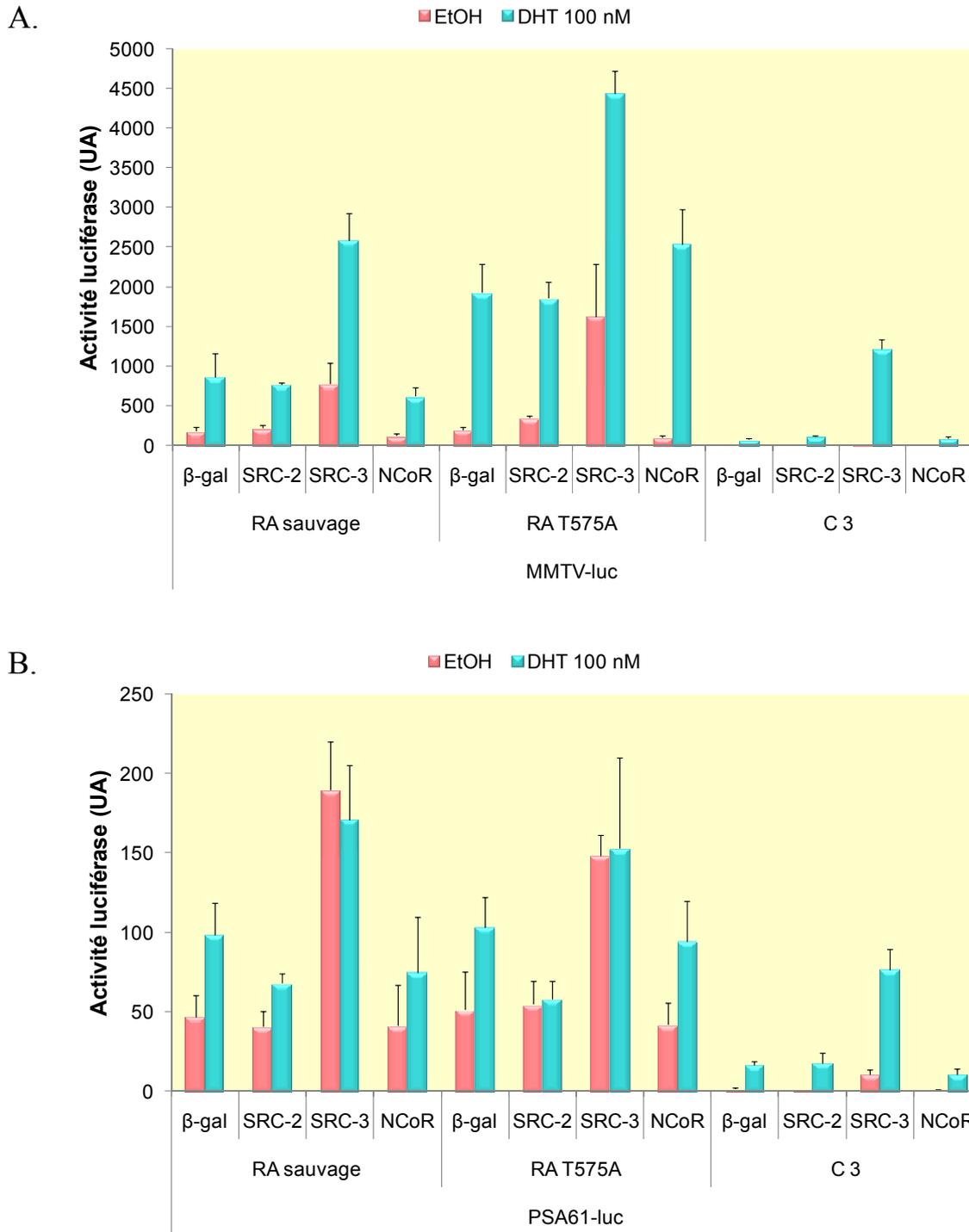


Figure 60 : Activité transcriptionnelle des récepteurs des androgènes sauvage et mutant T575A en présence de trois cofacteurs.

Les deux histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires, UA) obtenue après transfection des cellules LNCaP avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou du RA mutant T575A, ou le plasmide contrôle C3 ; avec un plasmide codant pour les co-activateurs SRC-2 et SRC-3 ou le co-répresseur NCoR, ainsi qu'avec le plasmide rapporteur pMMTV-Luc (A) ou PSA 61-Luc (B).

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de stéroïdes pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets ± écart-type.

Les résultats des tests d'activation transcriptionnelle dans les cellules LNCaP en présence des cofacteurs vont dans le même sens que les résultats observés en immunofluorescence. En effet, bien que la sur-expression des deux co-activateurs SRC-2 et SRC-3 et du co-répresseur NCoR ait une action spécifique sur les activités transcriptionnelles du RA, la mutation T575A ne semble pas modifier l'impact de ces cofacteurs sur le RA.

5. Conclusion des études fonctionnelles

L'ensemble des données obtenues lors de l'étude fonctionnelle du RA mutant T575A/T877A et du RA mutant T575A nous indiquent que la présence de la mutation T575A au sein du RA modifie les propriétés fonctionnelles de ce dernier.

Nous avons ainsi observé que la mutation T575A semble altérer la capacité de reconnaissance et de liaison à l'ADN du récepteur portant cette mutation. En effet, dans la lignée cellulaire CV-1, la présence de la mutation T575A augmente les activités transcriptionnelles du RA mutant sur les promoteurs contenant des éléments de réponse non spécifiques des androgènes, et au contraire diminue les capacités d'activation transcriptionnelle du RA mutant à partir de promoteurs spécifiques du RA.

D'autre part, la présence de la mutation T575A au sein du RA n'entraîne pas les mêmes conséquences en fonction de la lignée cellulaire testée. En effet, dans la lignée prostatique LNCaP, la présence de la mutation T575A augmente les activités transcriptionnelles du RA mutant à la fois sur les promoteurs contenant des éléments de réponse spécifiques des androgènes et non spécifique des androgènes.

Nous avons vu que cet effet n'était pas dû à un recrutement différent des cofacteurs SRC-2, SRC-3 et NCoR par le RA mutant, mais plutôt à une liaison altérée au niveau du promoteur des gènes cibles. Cette modification de la liaison au promoteur de gènes cibles entrainerait une variation d'expression de ces derniers. Cependant, bien que le RA mutant T575A se fixe de manière plus importante et plus stable que le RA sauvage au niveau du promoteur des gènes cibles *PSA* et *TMPRSS2*, l'expression de ces gènes peut être soit augmentée, soit diminuée. Cette différence pourrait s'expliquer par une reconnaissance différente des éléments de réponse

présents au niveau du promoteur et de la région enhancer de ces gènes cibles, notre hypothèse étant que le RA mutant T575A est capable de reconnaître des éléments de réponse non reconnus par le RA sauvage. En effet, au niveau des régions promotrice et enhancer des gènes cibles du RA, il peut exister plusieurs séquences de liaison du RA (ARE) dont seule une fraction peut être reconnue par le RA sauvage. Le RA T575A pourrait reconnaître des sites ARE différents et ainsi modifier l'expression de ces gènes.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude fonctionnelle ne suffisent pas à comprendre totalement l'impact de la mutation T575A sur le mode d'action des RA portant cette mutation T575A. C'est pourquoi une étude structurale du RA portant la mutation T575A a été entreprise.

D. Etude structurale de la mutation T575A

Les études fonctionnelles indiquent que la mutation T575A semble jouer un rôle sur la détermination de la reconnaissance de l'ADN.

Cette étude structurale de la mutation T575A a donc eu pour but de mieux comprendre comment le remplacement d'une thréonine en alanine à la position 575 du RA humain peut influencer la liaison à l'ADN.

Une comparaison de séquence du DBD de différents récepteurs nucléaires a tout d'abord été réalisée afin de déterminer si la position 575 du RA présente une forte homologie au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires.

1. Alignement de séquences et modélisation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes

L'alignement des séquences du DBD de différents récepteurs nucléaires montre que le résidu thréonine (T) en position 575 est très conservé au niveau du RA de différentes espèces (figure 61). La plupart des autres membres de la superfamille

formé des récepteurs RAR α et β , mais aussi des récepteurs PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) α , β et γ (représenté dans le cadre jaune sur la figure).

La présence d'une alanine à cette position dans ces récepteurs suggère l'acquisition d'une certaine spécificité vis-à-vis de l'ADN en comparaison aux autres récepteurs nucléaires. En effet, à cette position au sein des récepteurs nucléaires, seules une sérine, une thréonine ou une alanine sont observées, suggérant que le résidu à cette position pourrait jouer un rôle dans la spécificité du récepteur.

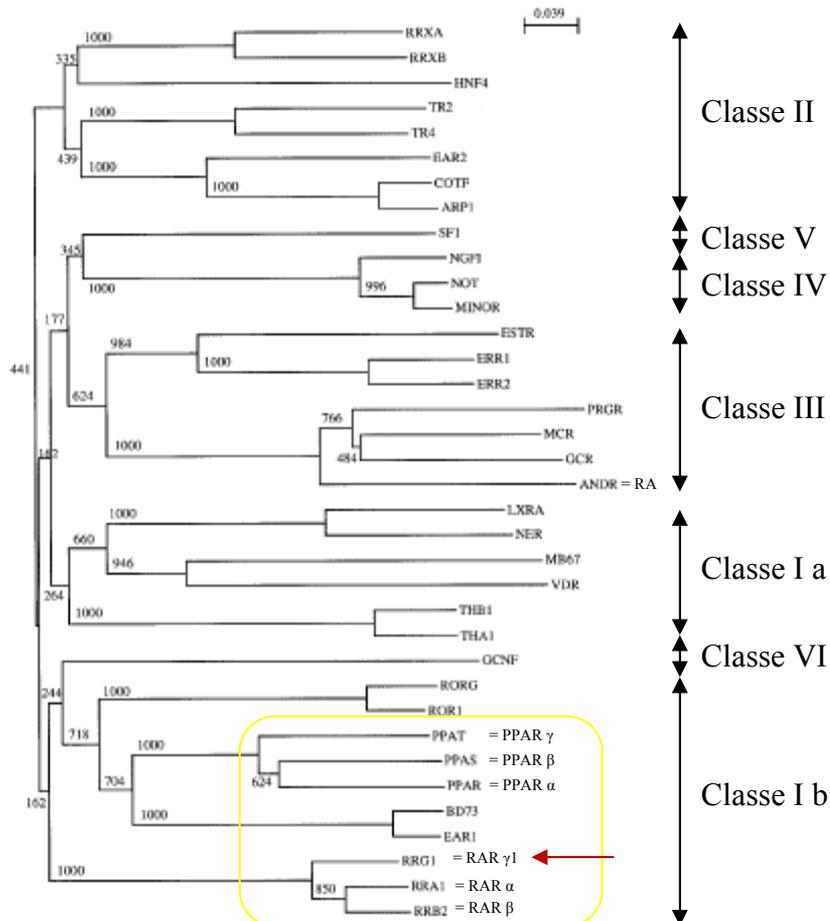


Figure 62 : Arbre de regroupement des séquences du domaine de liaison à l'ADN de différents récepteurs nucléaires chez l'Homme.

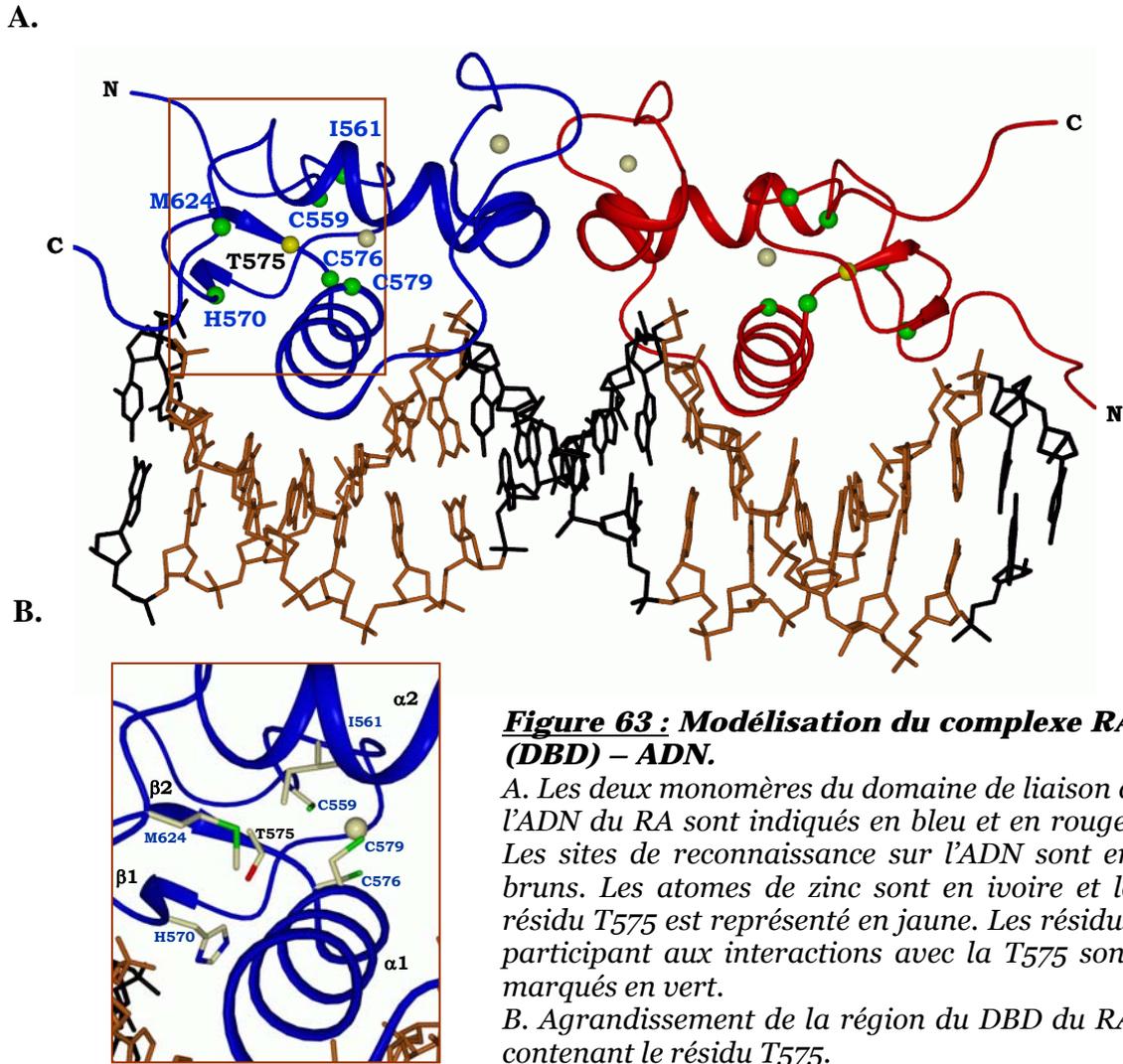
La séquence d'origine commune est située sur la gauche de l'arbre, les distances séparant les différents embranchements sont indiquées sur chaque branche, un embranchement impliquant une différence dans les séquences. Les récepteurs présentant une alanine à la position équivalente à la position 575 du RA humain sont indiqués dans le cadre jaune, à l'exception du RAR γ 1 qui présente une sérine à cette position. Il s'agit des récepteurs RAR α et β , les récepteurs PPAR α , β et γ , BD73 et EAR1. Le RA est également représenté pour comparaison. Les classes des récepteurs nucléaires sont indiquées, en prenant comme référence la classification présentée dans la figure 5 de l'introduction. Le nom des récepteurs correspond à leur appellation d'après SwissProt.

D'après Garcia-Vallvé et Palau, 1998.

La très grande conservation des résidus thréonine et sérine à cette position 575 du RA humain suggère une fonction particulière du groupement hydroxyle dans le mécanisme d'action du DBD. Cette hypothèse est étayée par les résultats obtenus avec le test fonctionnel chez la levure où le remplacement de la thréonine 575 par une alanine (A) entraîne une absence de réponse suite à une stimulation hormonale.

Afin de déterminer comment le remplacement du résidu thréonine en position 575 par le résidu alanine peut affecter la liaison du RA à l'ADN, une modélisation du DBD du RA a été réalisée au département de Biologie et de Génomique Structurales de l'IGBMC. Les analyses tridimensionnelles ont indiqué que le résidu T575 n'est pas situé à la surface de la structure globulaire du DBD, mais au contraire que ce résidu y est complètement enfoui (figure 63). Ainsi, il ne serait pas en mesure d'interagir directement avec l'ADN ni même avec l'autre monomère de RA. La principale conclusion de cette analyse est que ce résidu T575 pourrait jouer un rôle crucial pour l'architecture du DBD du RA. En effet, de nombreux contacts de type Van der Waals avec les acides aminés voisins seraient possibles, notamment avec les résidus C559, I561 et H570 du premier doigt de zinc, et les résidus C576 et C579 de l'hélice α_1 (figure 8). Le résidu T575 pourrait aussi interagir avec le résidu M624 situé entre l'hélice α_2 et la région CTE (extension C-terminale). La mutation T575A remplaçant un acide aminé polaire par un acide aminé neutre, pourrait conduire à la perte de ces contacts, entraînant peut être un repliement différent du DBD du RA et perturbant ainsi la liaison normale du RA à l'ADN.

Cette hypothèse serait par ailleurs compatible avec mes résultats précédents, qui indiquent que la présence de la mutation T575A au sein du RA perturbe la liaison à l'ADN.



Cependant, cette étude de modélisation moléculaire n'est pas suffisante pour comprendre l'impact de la mutation sur les propriétés fonctionnelles du RA. Ainsi, afin de mieux comprendre l'impact de la mutation T575A sur les propriétés structurales du RA et de relier les propriétés fonctionnelles du RA mutant à une information structurale, des expériences de retardement sur gel ainsi qu'une étude structurale par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été réalisées.

2. Analyse de la liaison à l'ADN du récepteur des androgènes T575A par retardement sur gel

Pour mener à bien ces études, les DBD du RA T575A et du RA sauvage ont été produits et purifiés. Leur capacité à se lier à l'ADN a été analysée grâce à la technique de retardement sur gel visualisé à l'aide de marqueurs fluorescents. Cette étude nous permet de visualiser l'impact direct de la mutation sur la fixation du DBD à l'ADN, sans tenir compte du reste de la protéine. Les DBD ainsi obtenus ont été testés sur des éléments de réponse spécifiques ou non spécifiques des androgènes.

a. Principe

L'étude de l'affinité vis-à-vis des éléments de réponse du DBD du RA T575A a été réalisée par la technique de retardement sur gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay, ou EMSA). En effet, cette technique permet de mesurer l'affinité d'une protéine pour une séquence d'ADN. Nous utilisons ici une variante où la révélation des complexes ADN-protéine est réalisée par l'incubation du gel avec des fluorochromes. Cette technique consiste ainsi à incuber la séquence d'ADN choisie avec la protéine d'intérêt. Plus la protéine possède 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 en condition non dénaturante 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 ADN-protéine plus lourds vont migrer plus lentement, ils vont être qualifiés de retardés. Le gel est ensuite incubé successivement avec deux fluorochromes. La première incubation se fait avec du SYBR Green, qui va se fixer sur l'ADN, permettant ainsi de révéler les complexes ADN-protéine, mais également l'ADN non lié. Après révélation à l'aide d'une lampe ultra-violet, le gel est incubé avec un deuxième fluorochrome : le SYPRO Ruby. Ce dernier va permettre de mettre en évidence les protéines. Ce deuxième marquage permet, à la différence des techniques classiques de retardement sur gel où seul l'ADN est marqué, de vérifier l'emplacement des protéines dans le gel.

b. Résultats

Lors de ces études, nous avons regardé l'affinité des DBD sauvage et mutant T575A vis-à-vis d'éléments de réponse spécifiques (AREcs, PSA-ARE1) et non spécifiques (GREcs, C3(1)ARE) du RA. Comme cela a été décrit dans la partie Matériels et Méthodes, et comme indiqué dans la figure 64, nous avons testés les DBD possédant (forme longue) ou non (forme courte) l'extension C-terminale à la fin du DBD, considérée comme importante pour une reconnaissance spécifique des éléments de réponse.

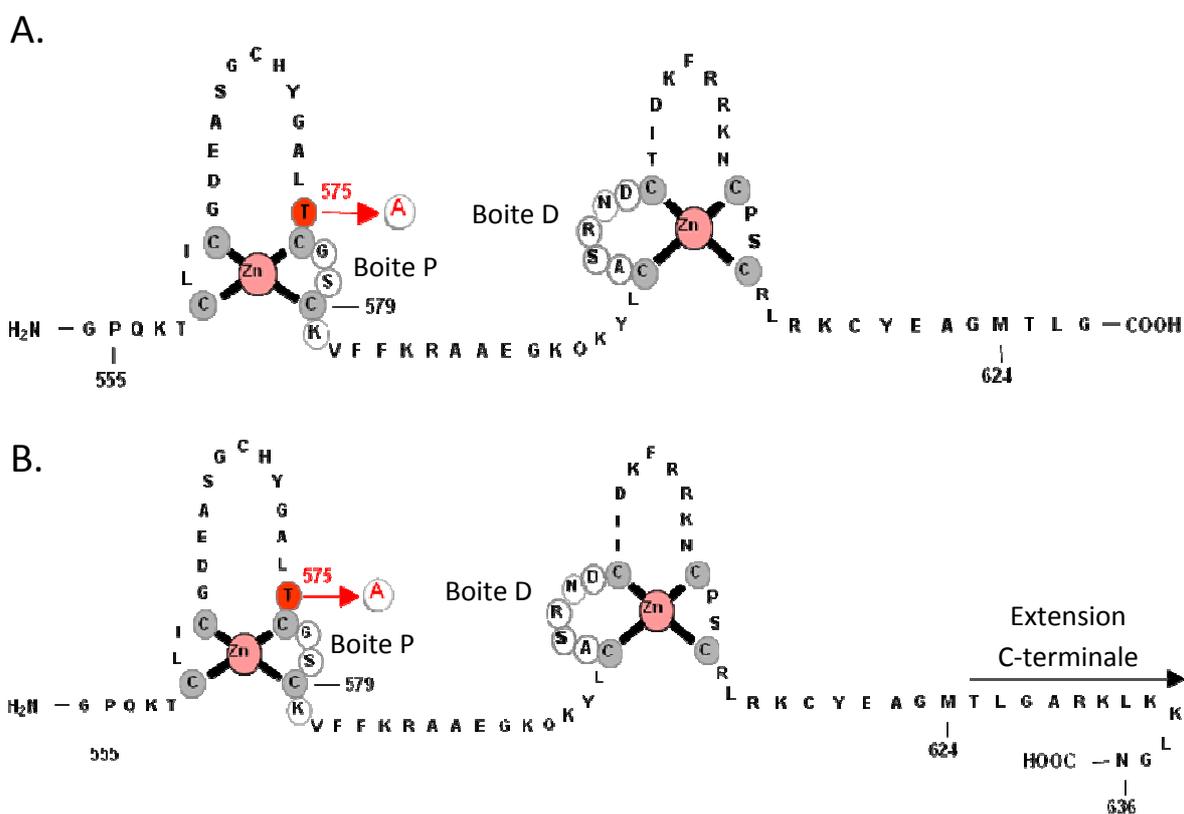


Figure 64 : Représentation schématique des séquences du domaine de liaison à l'ADN employées lors des études structurales.

La construction ne contenant pas l'extension C-terminale, appelée forme courte du DBD (A) et celle contenant cette extension C-terminale, appelée forme longue du DBD (B) ont été produits à la fois pour le RA sauvage et pour le RA mutant T575A.

Dans un premier temps, les formes courtes des DBD sauvage et mutant T575A ont été analysées.

Lorsque ces formes courtes de DBD sont incubées en présence des éléments de réponse AREcs et PSA-ARE1, éléments de réponse spécifiques des androgènes, le DBD mutant T575A présente une bande retardée de plus faible intensité que la bande retardée en présence du DBD sauvage (figure 65 A). Une bande retardée de faible intensité indique qu'il y a peu de protéine qui s'est liée à l'ADN. Ainsi, le DBD T575A reconnaît moins bien que le DBD sauvage les ARE spécifiques. Ce résultat est en accord avec les résultats d'activation transcriptionnelle, ainsi que les résultats obtenus en retardement sur gel avec la protéine entière (Monge *et al*, 2006).

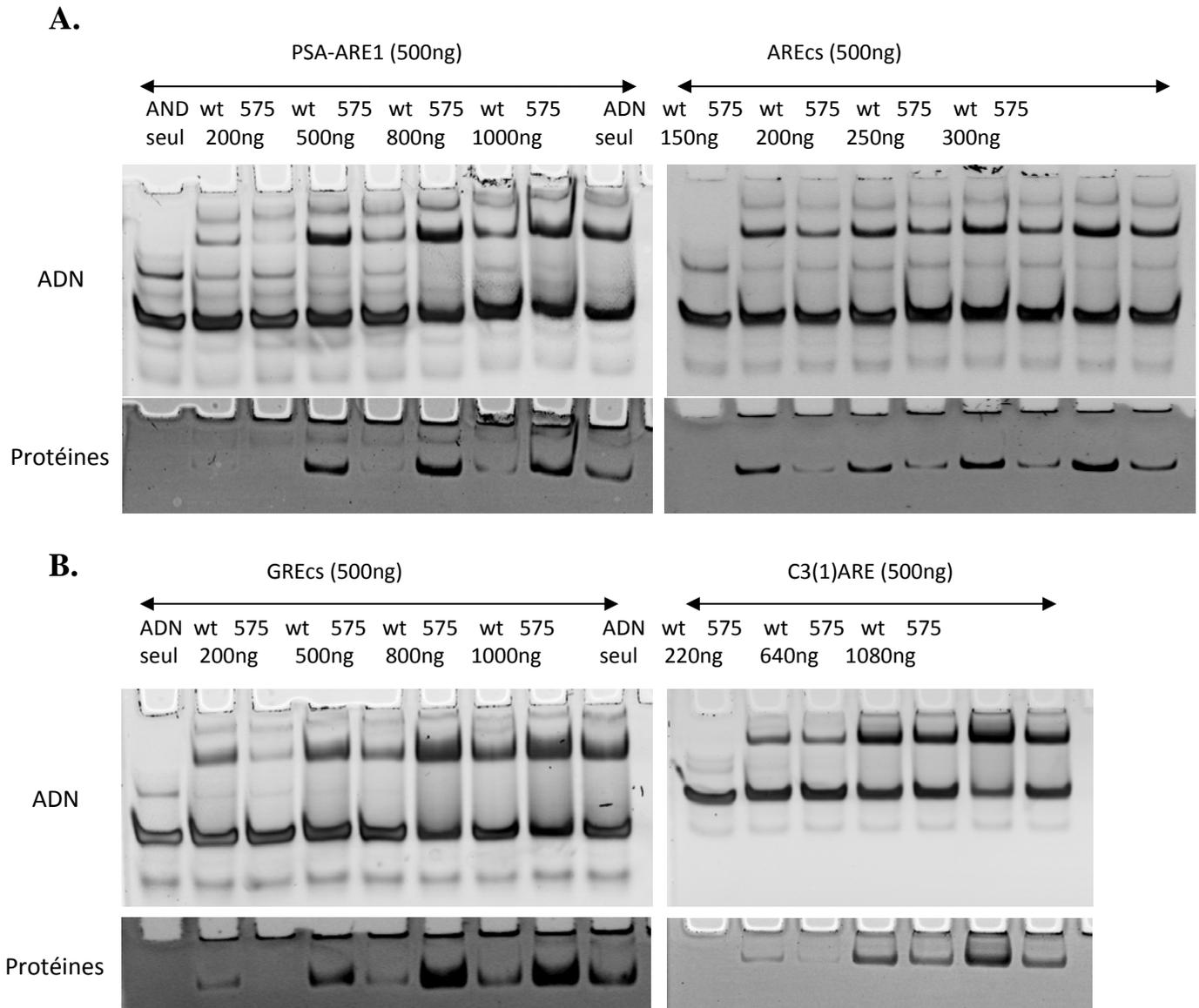


Figure 65 : Affinité des domaines de liaison à l'ADN sauvage et mutant T575A de forme courte.

Retardements sur gel des formes courtes des DBD sauvage (wt) et mutant T575A obtenus en présence d'éléments de réponse spécifiques des androgènes (A) et non spécifiques des androgènes (B). Les quantités d'ADN et de protéines sont indiquées sur les figures. Les gels du haut mettent en évidence l'ADN et ceux du bas les protéines, respectivement grâce au marqueur fluorescent SYBR Green et au SYPRO Ruby.

Nous avons par la suite testé les formes courtes des DBD avec des éléments de réponse non spécifiques des androgènes : GREcs et C3(1)ARE. Dans ce cas, le DBD T575A présente une liaison plus faible que le DBD sauvage (figure 65 B), ce qui est

contraire aux résultats obtenus précédemment avec la protéine entière (Monge *et al*, 2006). Ainsi, le fait d'avoir testé le DBD du RA mutant T575A ne permet pas d'expliquer la plus forte activation transcriptionnelle de la protéine entière T575A par une liaison plus forte à l'ADN du DBD du RA mutant. Les expériences de retardement sur gel effectuées avec la protéine entière indiquaient en revanche une liaison plus forte de la protéine mutante T575A en comparaison au RA sauvage.

L'hypothèse émise suite à ces résultats est que l'extension C-terminale du DBD doit rentrer en jeu pour la reconnaissance différente de l'ADN par le RA T575A.

Les mêmes tests de retardement sur gel que ceux décrits ci-dessus ont donc été réalisés, mais en utilisant les formes longues des DBD sauvage et mutant T575A, contenant l'extension C-terminale.

Comme indiqué sur la figure 66, une fixation plus faible de la forme longue du DBD T575A par rapport à celle du DBD sauvage est observée à la fois en présence d'éléments de réponse spécifique du RA (comme AREcs) et d'éléments de réponse non spécifiques du RA (comme GREcs). Ceci est donc en contradiction avec les résultats d'activation transcriptionnelle où le RA T575A présentait une activation plus importante sur les éléments de réponse non spécifiques.

Il semble donc que la seule présence de l'extension C-terminale ne suffit pas à orienter le DBD du RA mutant T575A vers des éléments de réponse non spécifique des androgènes.

Par ailleurs, deux bandes retardées peuvent être visualisées lorsque le DBD sauvage ou le DBD T575A est incubé avec AREcs (figure 66), mais pas avec GREcs où une seule bande est observée. Une dégradation de la forme longue du DBD purifié ne peut expliquer ce profil de migration car une bande supplémentaire serait également observée en présence de l'élément GREcs.

Une hypothèse pouvant expliquer cette observation serait une interaction des formes longues des DBD sauvage et mutant T575A avec l'élément AREcs sous forme de monomère, en plus de l'interaction classique sous forme de dimère. Dans nos expériences, il nous est impossible de vérifier si les DBD se lient en dimère ou en monomère. Cependant, il est probable que la différence de taille provienne du fait

que sur cet élément de réponse spécifique des androgènes, le DBD comprenant l'extension C-terminale puisse se lier à la fois en tant que monomère (bande inférieure), et à la fois en tant que dimère (bande supérieure).

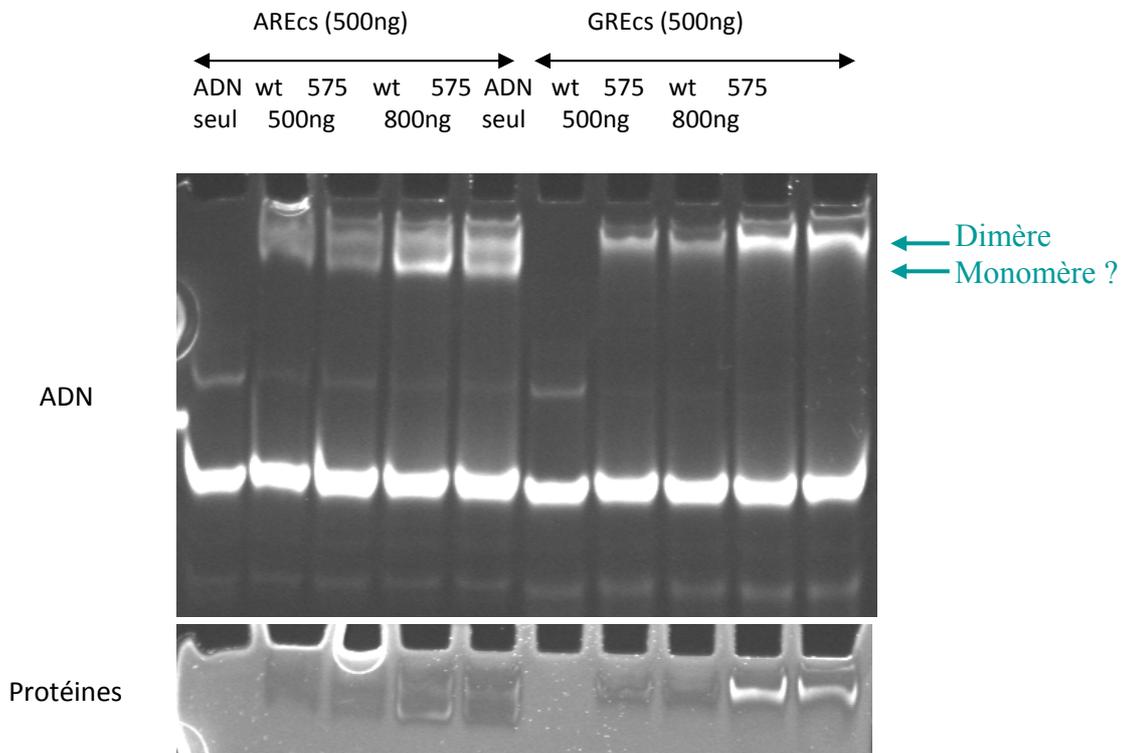


Figure 66 : Affinité des domaines de liaison à l'ADN sauvage et mutant T575A de forme longue.

Retardements sur gel des formes longues des DBD sauvage (wt) et mutant T575A obtenus en présence d'un élément de réponse spécifique des androgènes (AREcs) et d'un élément de réponse non spécifique des androgènes (GREcs). Les quantités d'ADN et de protéines sont indiquées sur les figures. Le gel du haut met en évidence l'ADN et celui du bas les protéines, respectivement grâce au marqueur fluorescent SYBR Green et au SYPRO Ruby.

En conclusion, les résultats obtenus avec ces expériences de retardement sur gel indiquent que le DBD T575A présente une plus faible liaison comparée au DBD sauvage quelque soit l'élément de réponse testé, et ceci en présence ou en absence de l'extension C-terminale. Ces résultats diffèrent de ceux observés précédemment avec la protéine entière.

Ainsi, ces analyses à elles seules ne suffisent pas pour expliquer les différences de reconnaissance de l'ADN de la protéine entière portant la mutation T575A. Ces études suggèrent que la conformation de la protéine entière jouerait probablement un rôle important sur la liaison à l'ADN.

3. Analyse structurale du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes par résonance magnétique nucléaire

L'impact de la mutation sur la structure et sur les propriétés dynamiques du DBD en solution a été analysé par RMN.

Ces analyses de RMN sont réalisées par le laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire Structurale à l'ESBS, et plus particulièrement par Mlle Ying-Hui Wang, le Dr. Andrew Atkinson et le Pr. Bruno Kieffer.

A l'heure actuelle, les résultats principaux de l'analyse comparative par RMN des DBD sauvage et mutant T575A indiquent tout d'abord que la mutation T575A ne modifie pas drastiquement la conformation tridimensionnelle du DBD. En effet, comme représenté sur la figure 67, la structure du DBD mutant T575A est similaire à celle du DBD sauvage, et très proche de la structure cristallographique. Dans ces structures, on retrouve les deux hélices α qui présentent une orientation perpendiculaire l'une par rapport à l'autre.

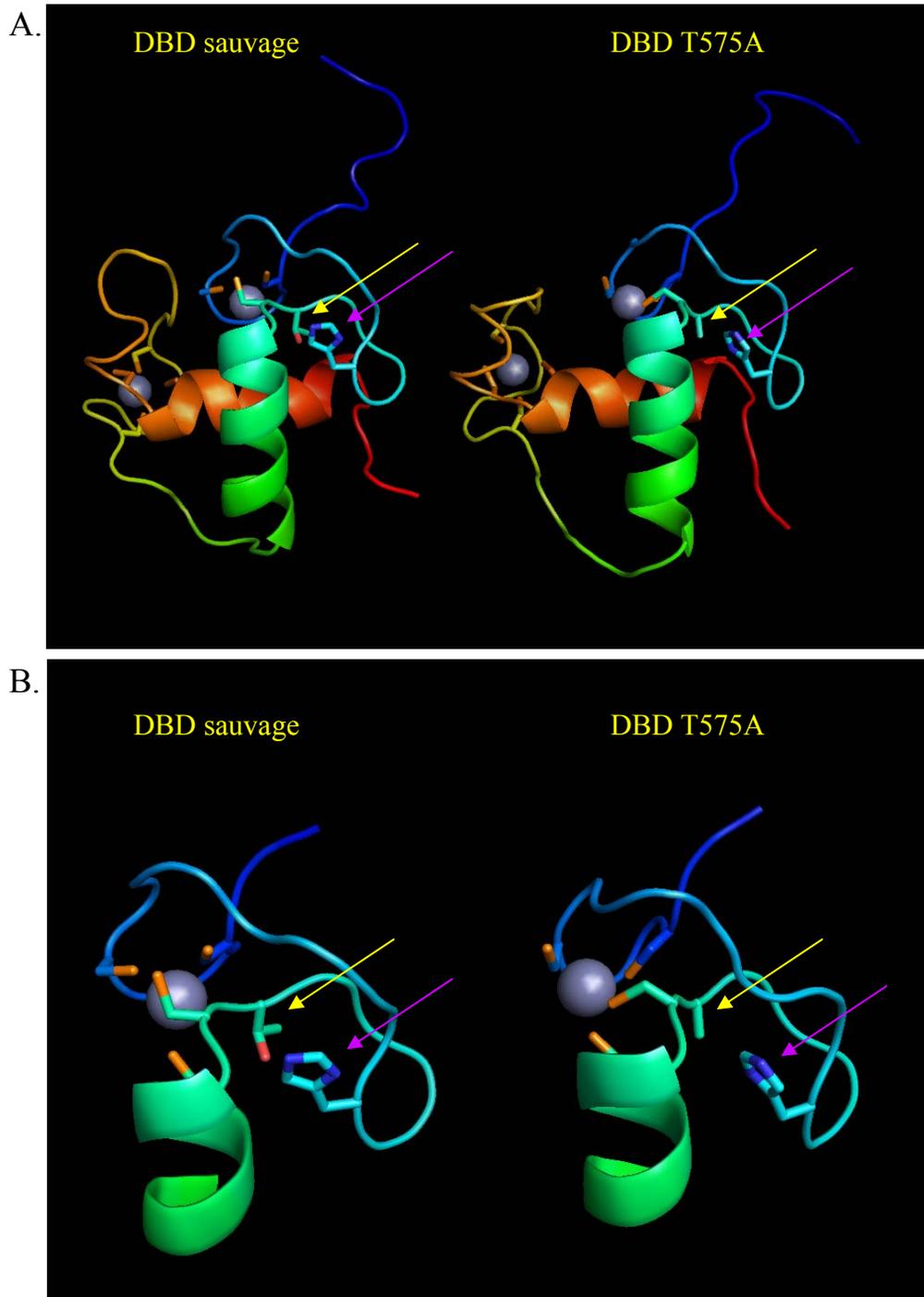


Figure 67: Structure des domaines de liaison à l'ADN des récepteurs des androgènes sauvage et mutant T575A.

Le DBD sauvage est représenté sur la gauche des images, le DBD T575A sur la droite. La structure des deux DBD entiers est indiquée sur la figure du haut (A), et un zoom sur la région correspondant au premier doigt de zinc est représenté en bas (B). La séquence des DBD se lit de l'extrémité N-terminale du DBD (représentée en bleu) à l'extrémité C-terminale (en rouge). Les atomes de zinc sont schématisés par les sphères grises, l'hélice α_1 de reconnaissance de l'ADN est visualisée en vert et l'hélice α_2 en rouge. Les chaînes latérales des cystéines situées au niveau des deux doigts de zinc liant ce dernier sont représentées (extrémités en orange). Les flèches jaunes représentent le résidu en position 575 : une thrénine au sein du DBD sauvage ou une alanine au sein du DBD mutant T575A. Les flèches violettes représentent l'histidine localisée en position 570.

Bien que les structures des deux DBD sauvage et mutant T575A soit ressemblantes, les analyses RMN ont révélé une différence notable de l'état de protonation de l'histidine localisée en position 570 en présence de la mutation T575A (figure 68).

En effet, l'étude de corrélation de chaque proton à l'atome d'azote voisin au sein du noyau imidazole de l'histidine 570 conduit aux spectres HSQC présentés dans la figure 68. Les spectres observés diffèrent en fonction de la charge de ce noyau. Le spectre obtenu avec le RA sauvage correspond à la forme protonée de l'histidine 570, alors que celui du RA mutant T575A correspond à la forme neutre non protonée.

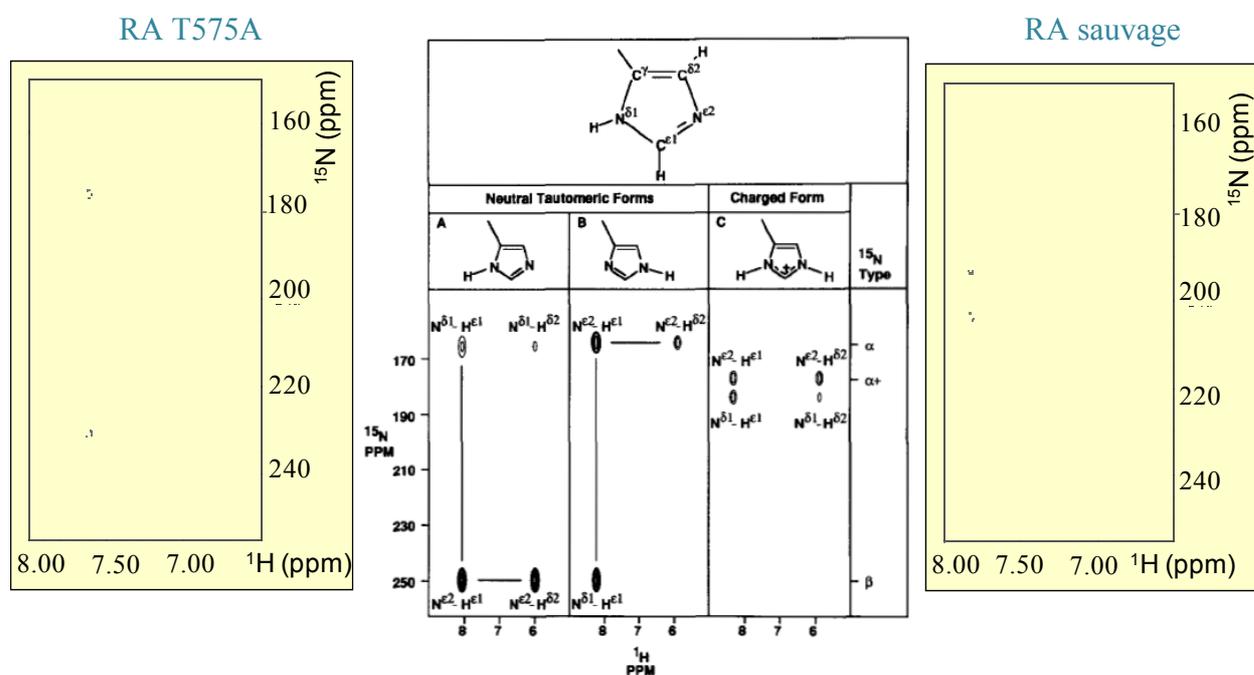


Figure 68 : Etat de protonation de l'histidine en position 570 du récepteur des androgènes sauvage et mutant T575A.

Les spectres HSQC du RA sauvage et du RA T575A sont représentés respectivement à droite et à gauche de la figure. Au centre sont indiqués les spectres attendus pour les différentes formes de protonation de l'histidine.

L'histidine en position 570 du RA sauvage présente une forme chargée, tandis que celle du RA mutant T575A est dans une forme neutre.

Ainsi, cette histidine chargée dans le DBD sauvage, devient neutre en présence de la mutation T575A. Cette variation de protonation entre les deux RA serait certainement due à la perte du résidu hydroxyle en position 575. L'histidine 570 étant localisée proche du squelette phosphate de l'ADN, ce changement de protonation pourrait avoir une influence sur la liaison avec l'ADN.

4. Conséquences des mutations de l'histidine en position 570 sur l'activité transcriptionnelle des récepteurs des androgènes sauvage et mutant T575A

Afin de déterminer si la différence de protonation de l'histidine en position 570 explique les activités transcriptionnelles plus fortes observées en présence de la mutation T575A, une mutagenèse dirigée a été réalisée sur le résidu H570. Cette histidine est remplacée soit par une alanine, de manière à éliminer la charge positive, soit par une arginine afin de maintenir une charge positive (figure 69).

Par la suite, des tests luciférase ont été réalisés dans les cellules LNCaP et dans les cellules CV-1 en présence des RA sauvage et T575A, avec ou sans les mutations de l'histidine 570, dans le but de mettre en évidence d'éventuelles différences d'activation transcriptionnelle.

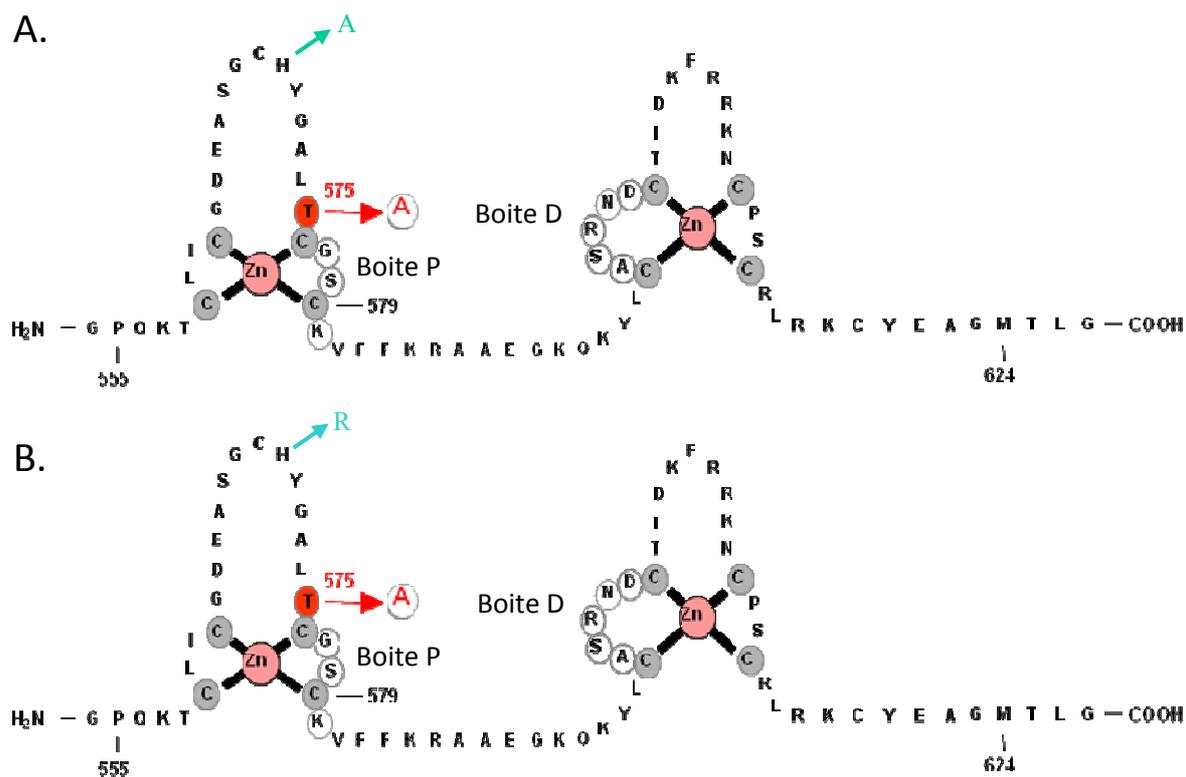


Figure 69 : Représentation des mutations de l'histidine en position 570 du domaine de liaison à l'ADN.

L'histidine en position 570 du DBD sauvage ou du DBD mutant T575A a été remplacée par mutagenèse dirigée soit par une alanine (A) dans le but d'éliminer la charge positive de ce résidu, soit en arginine (B) pour conserver la charge.

Les premiers résultats montrent que la perte de la charge positive au niveau de la position 570 (construction H570A) conduit à une nette augmentation des activités transcriptionnelles du RA sur un promoteur non spécifique des androgènes. Ainsi, comme représenté sur la figure 70, la présence de la mutation H570A au sein du RA sauvage augmente son activité de 4,9 fois sur le promoteur MMTV.

En revanche, sur ce même promoteur, la mutation H570R diminue l'activité du RA sauvage de 3,3 fois. Ainsi, il semblerait que la présence d'une charge positive différente à cette position ait un effet inhibiteur sur les activités transcriptionnelles du RA sauvage.

De même, les activités transcriptionnelles du RA portant la double mutation H570A/T575A sont légèrement plus élevées que celles du RA T575A sur le promoteur MMTV. En effet, une augmentation de 1,4 fois peut être observée en présence de la mutation H570A.

Le changement de l'histidine en position 570 en arginine (H570R) en plus de la mutation T575A conduit à une nette diminution, de 2,4 fois, des activités transcriptionnelles du RA (figure 70 A).

Lorsque la mutation T575A est présente au sein du RA, l'histidine en position 570 devient neutre. Ainsi, la mutation H570A rendant cette position neutre entraîne le même effet que la mutation T575A. En corrélation avec cette observation, nos résultats montrent bien une augmentation de l'activité transcriptionnelle sur un promoteur non spécifique des androgènes en présence de la mutation H570A. De plus, la réintroduction d'une charge positive au niveau de l'histidine 570 au sein du RA mutant T575A (construction T575A/H570R) diminue l'activité transcriptionnelle de ce RA, rapprochant cette dernière au niveau de celle du RA sauvage.

Les résultats obtenus sur le promoteur spécifique des androgènes PSA 61 sont inattendus. En effet, l'activité transcriptionnelle du RA n'est pas augmentée en présence de la mutation H570A. Elle reste quasiment inchangée alors qu'une augmentation comme celle observée précédemment sur le promoteur MMTV était attendue (figure 70 B).

La mutation H570R diminue par contre fortement les capacités d'activation transcriptionnelle du RA sur ce promoteur. En effet, une baisse de 3,5 fois pour le RA sauvage est observée.

Comme pour le RA sauvage, la mutation H570A n'augmente pas les activités transcriptionnelles du RA mutant T575A. Au contraire, une diminution de 2,1 fois est observée.

Il en est de même pour la mutation H570R qui diminue fortement (8,5 fois) les activités transcriptionnelles du RA T575A.

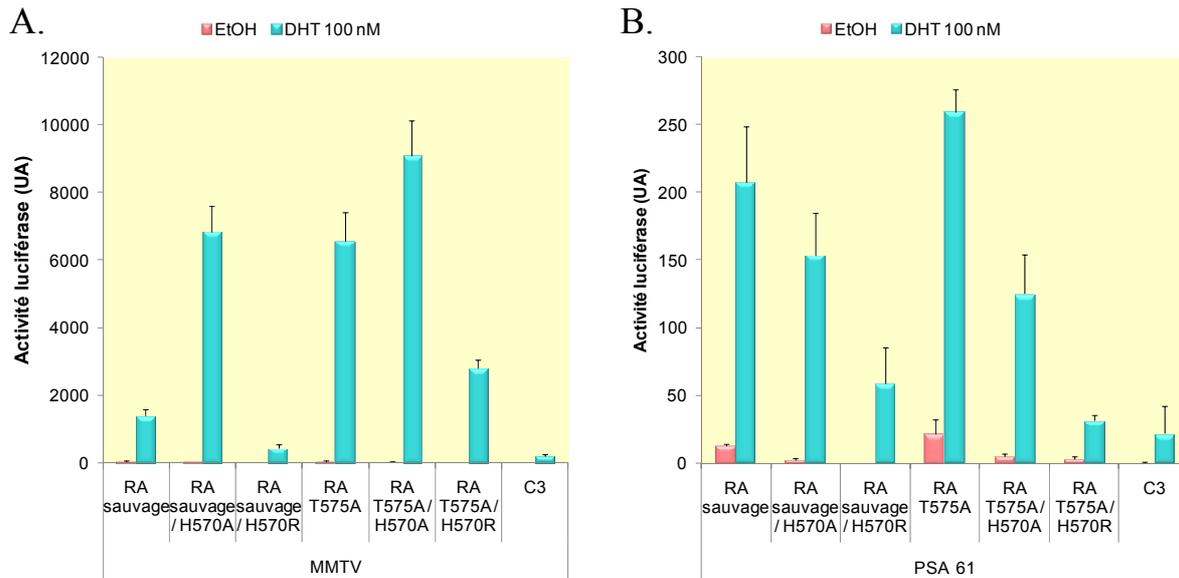


Figure 70 : Effet de deux mutations de l'histidine en position 570 du récepteur des androgènes sauvage et mutant T575A sur leurs activités transcriptionnelles dans les cellules LNCaP.

Les deux histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires, UA) obtenue après transfection des cellules LNCaP avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou du RA T575A ou un plasmide vide (C3), ainsi qu'avec le plasmide rapporteur MMTV-Luc (A) ou PSA 61-Luc (B).

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de sérum pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

D'après ces expériences, il semblerait donc que la protonation de l'histidine en position 570 joue un rôle important pour la reconnaissance de l'ADN et il est possible qu'elle soit impliquée dans le mécanisme mis en jeu en présence du RA mutant T575A.

Par la suite les mêmes tests ont été réalisés dans les cellules CV-1.

Comme indiqué sur la figure 71 A, sur le promoteur MMTV l'augmentation des activités transcriptionnelles du RA sauvage et du RA T575A en présence de la mutation H570A est retrouvée, en accord avec les résultats précédents. En effet, la

mutation H570A induit 3,7 fois l'activité transcriptionnelle du RA sauvage, et 1,9 fois celle du RA T575A.

Le remplacement de l'histidine 570 en arginine (H570R) abolit complètement les activités transcriptionnelles du RA sauvage et diminue fortement celles du RA T575A (9,8 fois).

Les activités transcriptionnelles observées sur le promoteur PSA 61 sont très faibles et peu exploitables. Toutefois, l'impact des mutations H570A et H570R sur les activités transcriptionnelles du RA sauvage et du RA mutant T575A est le même que celui observé dans les cellules LNCaP.

Ainsi, sur ce promoteur spécifique des androgènes (figure 71 B), la mutation H570A diminue légèrement les activités du RA sauvage (1,2 fois) et du RA T575A (1,3 fois). Ce résultat est en accord avec les données précédentes où une diminution de l'activité transcriptionnelle du RA mutant T575A est observée sur ce type d'éléments de réponse. Ainsi, la mutation H570A mime l'effet de la mutation T575A.

La mutation H570R quand à elle entraîne une forte diminution des activités transcriptionnelles des deux récepteurs. En effet, l'activité du RA sauvage est diminuée de 6,4 fois et celle du RA T575A est réduite 5,8 fois.

Ainsi, les résultats obtenus dans les cellules CV-1 confirment notre hypothèse selon laquelle la protonation de l'histidine 570 jouerait un rôle important dans la reconnaissance de l'ADN par le RA. La modification de sa protonation en présence de la mutation T575A pourrait expliquer les différences d'activation transcriptionnelle observées.

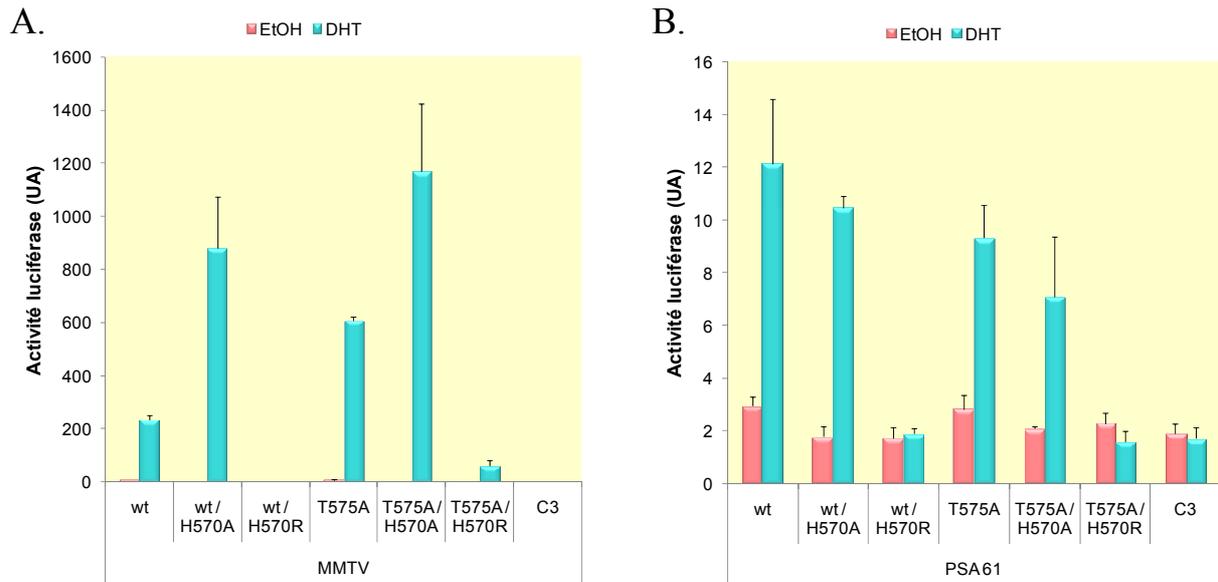


Figure 71: Effet de deux mutations de l'histidine en position 570 du récepteur des androgènes sauvage et mutant T575A sur leurs activités transcriptionnelles dans les cellules CV-1.

Les deux histogrammes présentent l'activité luciférase (en unités arbitraires, UA) obtenue après transfection des cellules CV-1 avec les vecteurs d'expression du RA sauvage ou du RA T575A ou un plasmide vide (C3), ainsi qu'avec le plasmide rapporteur MMTV-Luc (A) ou PSA 61-Luc (B).

Les cellules ont été traitées avec de l'éthanol (EtOH) ou 100 nM de DHT dans un milieu dépourvu de sérum pendant 48h. Les données représentent la moyenne de tests réalisés en triplets \pm écart-type.

Pour conclure, les études menées dans les cellules LNCaP et dans les cellules CV-1 en présence des mutations de l'histidine localisée en position 570 du RA indiquent que la protonation de cette dernière semble jouer un rôle dans le mécanisme d'action du RA mutant T575A.

En effet, dans les deux lignées cellulaires, lorsque le résidu à cette position 570 est neutre (constructions H570A sauvage, H570A/T575A et T575A), les activités transcriptionnelles du RA correspondant sont plus élevées sur le promoteur non spécifique des androgènes MMTV en comparaison aux constructions dans lesquelles la position 570 est chargée (constructions RA sauvage, H570R sauvage ou H570R/T575A).

Le remplacement de l'histidine en arginine, permettant de garder une charge positive à cette position 570, diminue dans tous les cas les activités transcriptionnelles du RA sauvage et du RA mutant T575A, quelque soit la spécificité du promoteur et la lignée cellulaire. La diminution d'activité observée en présence de l'arginine pourrait venir de la différence au niveau de la chaîne latérale des deux résidus histidine et arginine. En effet, le remplacement de ces derniers entraîne des modifications des liaisons hydrogène établies potentiellement avec l'ADN et les acides aminés voisins en présence du groupement guanidine de l'arginine en comparaison du groupement imidazole de l'histidine.

Sur un élément de réponse non spécifique des androgènes, nos résultats indiquent que les activités transcriptionnelles sont augmentées en présence d'une mutation conduisant à une position 570 neutre, suggérant que le contact avec l'ADN ou avec les acides aminés voisins est important pour les activités du RA.

Il s'agit de la première observation de l'impact de l'histidine en position 570 sur les activités transcriptionnelles du RA. En effet, aucune étude n'a été réalisée jusqu'à aujourd'hui sur le résidu histidine à cette position.

La conservation de l'histidine à cette position au sein de tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et les conséquences de ce changement de protonation sur les activités transcriptionnelles du RA ouvrent sur de nouvelles perspectives de recherche sur les récepteurs nucléaires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le test fonctionnel chez la levure élaboré au laboratoire a permis d'étudier des échantillons de CaP à des stades localisés ou métastatiques, avant et après échappement hormonal.

Mon travail de thèse s'est articulé autour d'un mutant du RA découvert chez un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique en échappement hormonal. Ce RA associe deux mutations : la mutation T575A, située dans le DBD du RA, et la mutation T877A localisée dans le LBD, formant ainsi le RA mutant T575A/T877A. Les conséquences fonctionnelles et structurales de la mutation T877A étant largement étudiées et bien connues à l'heure actuelle, mon étude s'est naturellement axée sur la simple mutation T575A et sur l'association des deux mutations T575A/T877A au sein du RA, afin de comprendre le mécanisme d'action de ce RA mutant.

Les études fonctionnelles et structurales réalisées sur les deux RA portant la mutation T575A ont permis de faire avancer les connaissances du mode d'action d'un RA portant une mutation au niveau de son DBD.

Ces études ont tout d'abord indiqué que la mutation T575A induit non seulement un changement de spécificité du RA vis-à-vis de l'ADN, mais aussi des différences de reconnaissance des éléments de réponse.

Ainsi, les études d'activation transcriptionnelle effectuées dans les cellules CV-1 ont indiqué que la mutation T575A modifie la spécificité de réponse aux hormones du RA. En effet, elle permet d'augmenter les activités transcriptionnelles du RA mutant à partir d'un promoteur non spécifique des androgènes, alors qu'au contraire les activités transcriptionnelles de ce RA mutant sont diminuées sur un promoteur spécifique. Ce résultat est retrouvé en présence d'un promoteur entier mais aussi en présence d'un promoteur minimum placé en aval de deux répétitions d'éléments de réponse spécifiques ou non spécifiques des androgènes. Cette variation de spécificité en présence de la mutation T575A est confirmée par des expériences de

retardement sur gel en présence de la protéine entière. En revanche, les tests de reconnaissance de l'ADN effectué en présence du DBD uniquement ont indiqué que le DBD mutant T575A n'interagit pas de manière plus forte que le DBD sauvage, mais qu'au contraire, il interagit plus faiblement que ce dernier, aussi bien avec des éléments de réponse spécifiques qu'avec des éléments de réponse non spécifiques des androgènes. Ce résultat est donc différent de celui observé en présence de la protéine entière, laissant penser que la conformation de toute la protéine doit rentrer en jeu pour orienter les interactions du RA avec l'ADN.

Des tests d'activation transcriptionnelle ont par la suite été réalisés dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP. Dans cette lignée, le RA mutant T575A présente des activités transcriptionnelles supérieures au RA sauvage quelque soit la spécificité du promoteur entier. Les études réalisées à partir de promoteurs minimum indiquent en revanche que la mutation T575A ne modifie pas les activités transcriptionnelles du RA à partir de ces promoteurs minimum en comparaison au RA sauvage. L'explication de ce résultat sera détaillée à la page suivante.

Par la suite, il a été observé que le RA mutant T575A se fixe de manière plus importante que le RA sauvage sur les éléments de réponse localisés au niveau du promoteur des gènes cibles *PSA* et *TMPRSS2*, entraînant un changement d'expression de ces deux gènes cibles. Ce résultat laisse supposer que le RA mutant T575A serait capable d'induire une expression différentielle des gènes comparé au RA sauvage.

Par ailleurs, nous avons vu qu'il existe plusieurs ARE au sein du promoteur des gènes *PSA* et *TMPRSS2*. Il a été montré que la formation de complexes d'activation transcriptionnelle sur le promoteur du gène *TMPRSS2* ne se fait qu'au niveau de deux des cinq sites ARE présents (Wang *et al*, 2007). Il est ainsi possible que la mutation T575A puisse conduire à la formation de complexes d'activation transcriptionnelle sur les autres éléments de réponse de ce promoteur et modifier ainsi l'expression de ce gène.

Un tel mécanisme pourrait s'appliquer pour les autres gènes androgéno-dépendants. Par ailleurs, la mutation T575A pourrait également permettre au RA de reconnaître au sein du génome des éléments de réponse qui ne le

sont pas naturellement par le RA sauvage, et conduire ainsi à une expression anormale de gènes impliqués dans la prolifération et la survie des cellules tumorales.

Afin de déterminer si la mutation T575A permet effectivement d'activer l'expression d'autres gènes, des études comparatives du transcriptome en présence du RA sauvage ou du RA mutant T575A seront réalisées. Dans cette perspective, des clones stables de cellules LNCaP exprimant le RA T575A ou le RA sauvage sont en cours de production au sein du laboratoire. Ces études permettront de mieux cerner les fonctions impliquées dans la survie et dans la prolifération des cellules cancéreuses.

Les tests d'activation transcriptionnelle réalisés dans les cellules CV-1 et dans les cellules LNCaP indiquent que la mutation T575A entraîne un impact sur les activités transcriptionnelles du RA, impact qui dépend du contexte cellulaire. De plus, bien qu'une différence d'interaction avec l'ADN existe, les différences observées entre les deux lignées cellulaires pourraient s'expliquer par des facteurs cellulaires spécifiques aux cellules LNCaP. En effet, dans les constructions minimales artificielles, seuls les éléments de réponse aux hormones sont présents, alors que dans le cas des promoteurs entiers, des sites pour d'autres facteurs pouvant influencer l'activation transcriptionnelle, comme AP-1, sont également présents, suggérant une importance des cofacteurs cellulaires dans les activités transcriptionnelles du RA mutant T575A.

Notre hypothèse à ce stade est que la mutation T575A a un impact sur la reconnaissance de l'ADN, mais qu'elle aurait également un impact sur le recrutement de cofacteurs spécifiques du RA, ou sur la formation de complexes d'activation transcriptionnelle.

Le recrutement de certains cofacteurs du RA a donc été analysé par microscopie confocale et par des tests d'activation transcriptionnelle en présence de différents cofacteurs. Les études de co-localisation du RA sauvage ou du RA mutant T575A avec trois cofacteurs ont indiqué que la présence de la mutation T575A n'entraîne pas de modification de la localisation cellulaire des co-activateurs SRC-2 et

SRC-3. Bien qu'une redistribution intranucléaire de NCoR soit observée uniquement dans les cellules exprimant le RA mutant T575A, cela n'explique pas les variations d'activité transcriptionnelle observées en présence du RA mutant.

Lors de cette étude, seuls trois cofacteurs du RA ont été analysés : SRC-2, SRC-3 et NCoR. Il serait nécessaire d'étendre l'étude de la co-localisation du RA avec d'autres co-activateurs du RA comme ARIP4, PIAS1, c-jun, ANPK, et d'autres co-répresseurs du RA comme HBO1, RelA, la calréticuline et la cycline D1 par exemple. Des études de co-localisation du RA avec des cofacteurs impliqués dans d'autres voies de signalisation permettraient de lier l'impact de la mutation T575A sur les interconnexions du RA avec ces voies de signalisation. En effet, nous pensons que des cofacteurs impliqués dans d'autres voies de signalisation pourraient expliquer les différences observées dans les cellules LNCaP entre les promoteurs entiers et les promoteurs artificiels.

L'étude des co-localisations des RA sauvage et mutant T575A avec ces autres cofacteurs sera réalisée par microscopie confocale et par des tests d'activation transcriptionnelle comme ceux réalisés pour SRC-2, SRC-3 et NCoR.

Il serait également intéressant d'étudier les interactions du RA avec ses cofacteurs. Pour cela, des études de co-immunoprécipitation doivent être réalisées. Les tests effectués jusqu'à présent se sont révélés infructueux. En effet, la technique de transfection employée ne permettant pas d'obtenir un taux de transfection suffisant (15% maximum), il n'a pas été possible de mettre en évidence une interaction entre le RA transfecté et un cofacteur cellulaire.

Dans nos expériences, nous avons observé que SRC-3 semblait entraîner une augmentation des activités transcriptionnelles ligand-indépendantes du RA sur le promoteur spécifique des androgènes PSA 61. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences d'activation transcriptionnelle en présence des cofacteurs SRC-2, SRC-3 et NCoR seront tout d'abord réalisées à partir des constructions artificielles ARE PSA-Luc et GREcs-Luc, consistant en un promoteur minimum placé respectivement en aval de deux répétitions de l'élément de réponse ARE I du gène *PSA* humain ou de deux répétitions de la séquence consensus GRE. Dans un deuxième temps, l'activité transcriptionnelle à partir des promoteurs MMTV et

PSA 61 sera étudiée en présence d'une sur-expression de SRC-3 et d'un siRNA dirigé contre le RA endogène des cellules LNCaP. Cela permettra d'éliminer la part due au RA dans l'expérience réalisée (figure 60), et ainsi de vérifier si l'activation ligand-indépendante est due au RA ou à un autre mode d'action de SRC-3. En effet, la kinase I κ K peut activer SRC-3 en le phosphorylant, ce qui va entraîner la formation d'un complexe SRC-3 / NF κ B (Yan et al, 2006) ; (figure 72). Ce complexe peut induire l'expression de l'Interleukine 6 (IL-6) qui va par la suite entraîner l'augmentation des activités transcriptionnelles ligand-indépendantes du RA. Cette observation pourrait expliquer l'effet ligand-indépendant observé dans nos expériences.

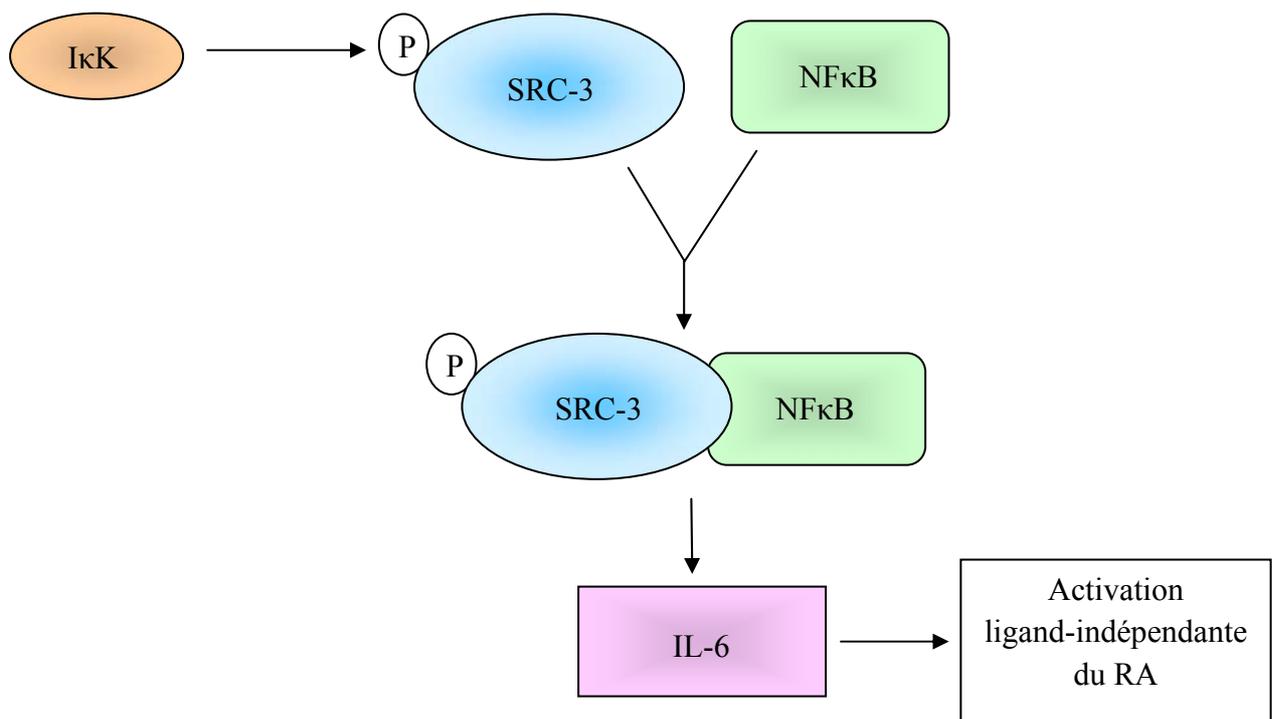


Figure 72 : Mécanisme d'activation du RA ligand-indépendant par l'intermédiaire de SRC-3.

Pour conclure, l'augmentation des activités transcriptionnelles observée dans nos expériences serait due à une modification des capacités de reconnaissance de l'ADN par le RA mutant T575A, mais aussi probablement à un recrutement différent d'un ou plusieurs cofacteurs qui restent à déterminer.

La deuxième partie de ce travail a concerné l'étude de l'impact de la mutation T575A sur la structure du RA. Ces études structurales menées en collaboration avec l'équipe du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire Structurale à l'ESBS ont permis de mieux appréhender les conséquences de la mutation T575A au sein du RA.

Ainsi, les alignements de séquences du DBD de différents récepteurs nucléaires ont indiqué que le groupement hydroxyle du résidu en position 575 du RA humain est fortement conservé, indiquant son importance au sein de la protéine.

La modélisation moléculaire effectuée indique que le résidu T575 est enfoui à l'intérieur de la structure du DBD. Cette étude a aussi suggéré que la perte du résidu thréonine en position 575 éliminerait différents contacts de Van der Waals avec des acides aminés voisins, ce qui pourrait impliquer une différence de conformation du DBD mutant.

Cependant, les études de résonance magnétique nucléaire n'ont pas montré une grande différence de conformation entre le DBD sauvage et le DBD mutant T575A.

Par contre, une variation de la protonation de l'histidine localisée en position 570 du RA a pu être mise en évidence, provenant de la perte du groupement hydroxyle en position 575 du RA. Cette histidine chargée dans le DBD sauvage, devient neutre en présence de la mutation T575A. D'après le modèle du DBD du RA en interaction avec ses éléments de réponse (Shaffer *et al*, 2004), cette histidine pourrait être en contact avec le squelette phosphate de l'ADN. L'absence de charge pourrait ainsi modifier les interactions de ce résidu avec l'ADN, et par conséquent l'interaction du DBD avec l'ADN. Dans le but de confirmer cette hypothèse, des expériences de mutagenèse dirigée modifiant ce résidu histidine en un acide aminé

neutre ou chargé ont été réalisées. Lorsque la charge positive est perdue, les activités transcriptionnelles de ce RA sont augmentées à partir d'un promoteur non spécifique des androgènes. En revanche, le maintien d'une charge positive en position 570 entraîne une diminution de ces activités transcriptionnelles. Ainsi, ces expériences indiquent que la protonation de ce résidu semble importante et impliquée en partie dans la reconnaissance de l'ADN, et pourrait expliquer les différences d'activation transcriptionnelle observées en présence du RA mutant T575A sur des éléments de réponse non spécifiques des androgènes. En effet, lorsque le RA sauvage voit son histidine muté en un résidu neutre (alanine), son activité transcriptionnelle est augmentée, mimant l'effet observé en présence de la mutation T575A. La mutation T575A met pour la première fois en évidence l'importance de l'histidine 570 pour l'interaction avec l'ADN.

Toutes ces études montrent comment le changement d'un acide aminé au sein du DBD peut entraîner des changements certes non conformationnels, mais tout de même importants pour les interactions du RA avec l'ADN. Il s'agit ici de la première description de ce type de changement dans le DBD du RA. De plus, ces études mettent en évidence l'existence probable d'un réseau entre la thréonine 575 et l'histidine 570 du RA. D'après nos résultats, il semblerait que ce réseau soit important pour les activités du RA, mais également certainement pour l'ensemble des récepteurs nucléaires.

Pour la suite de ce projet, il serait intéressant d'étudier les structures du DBD sauvage et du DBD mutant complexés à un élément de réponse spécifique des androgènes, ou avec un élément de réponse non spécifique des androgènes, afin de définir si en présence de l'ADN, la présence de la mutation T575A entraîne une variation de la conformation du DBD lié. Si tel est le cas, cela pourrait participer à la variation de la reconnaissance des éléments de réponse observée en présence du RA mutant T575A.

De plus, la présence de la mutation T877A associée à la mutation T575A dans le RA du patient a certainement un impact sur le fonctionnement de ce RA double mutant. En effet, nous avons vu une coopération des deux mutations, or la mutation T877A est connue pour élargir le spectre de sensibilité du RA vis-à-vis des hormones stéroïdes, et pour empêcher le recrutement de NCoR en présence d'un anti-androgène (Berrevoets *et al*, 2004). L'association des propriétés structurales et fonctionnelles de chacune des mutations T575A et T877A pourrait jouer un rôle déterminant dans la progression du CaP et dans l'échappement à la privation androgénique.

Dans cette optique, des études de co-localisation du RA portant la double mutation T575A/T877A seront entreprises en microscopie confocale avec dans un premier temps les cofacteurs étudiés pour la simple mutation T575A, c'est-à-dire SRC-2, SRC-3 et NCoR.

La présence des deux mutations au sein du RA du patient joue vraisemblablement un rôle physiologique. En effet, le patient chez qui ce RA double mutant a été découvert a subi de nombreuses lignes d'hormonothérapie avant d'échapper au traitement. A l'heure actuelle il n'est pas encore connu si les mutations du RA apparaissent suite au traitement, ou si ce dernier sélectionne les cellules cancéreuses exprimant un RA muté qui leur permettra de survivre au traitement. Cependant, les premiers résultats du protocole clinique qui a été développé au laboratoire semblent indiquer que des mutations sont déjà présentes dans le RA de patients atteints d'un CaP localisé avant tout traitement. En revanche, puisque les mutations sont plus courantes dans les CaP métastatiques en échappement hormonal, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que des mutations puissent apparaître en cours de traitement.

Ainsi, l'hypothèse émise est qu'il y a une coexistence des deux types de mutation. En effet, il est possible que certaines mutations du RA préexistantes soient sélectionnées par le traitement, mais également que des mutations apparaissent en cours de traitement.

Dans le cas de la double mutation T575A/T877A, il serait intéressant de connaître si les cellules exprimant ce variant ont un avantage de prolifération et de survie. Pour cela, des expériences de survie et de prolifération cellulaires doivent être entreprises. Cependant, pour effectuer correctement ces études, il est nécessaire de disposer d'une lignée exprimant de façon stable le RA mutant ou le RA sauvage pour comparaison. En effet, le taux de transfection de nos cellules étant faible, si la présence du RA mutant n'entraîne qu'un faible effet avantageux, nous ne serons pas en mesure de l'observer. D'autre part, dans le cas des transfections transitoires réalisées jusqu'à maintenant, le plasmide transfecté est expulsé par la cellule au bout d'une moyenne de 72h. Des études de prolifération ne sont donc pas envisageables dans ces conditions.

De telles lignées exprimant de façon stable le RA sauvage ou le RA mutant sont actuellement en cours de production au laboratoire. La présence d'une voie de signalisation des androgènes active étant requise pour ces études, l'utilisation de lignées n'exprimant pas de RA, comme les cellules PC-3 ou les cellules DU145, a été rejetée. La lignée cellulaire utilisée est donc la lignée LNCaP.

Toutes ces études permettront de comprendre encore mieux le mode d'action d'un RA portant une mutation au niveau de son DBD ainsi qu'une mutation au sein de son LBD. L'association des propriétés structurales et fonctionnelles de chacune des mutations T575A et T877A pourrait jouer un rôle déterminant dans la progression du cancer de la prostate et dans l'échappement à la privation androgénique.

Il est bien connu à l'heure actuelle que les mutations du RA situées au niveau du domaine de liaison du ligand et de la fonction AF-2 jouent un rôle primordial au sein des CaP. L'ensemble des travaux effectués au cours de ma thèse indique l'importance que peut prendre une mutation au niveau du DBD pour la spécificité du mode d'action du RA, et indique que des mutations au sein du DBD du RA pourraient également jouer un rôle important dans les mécanismes impliqués dans la progression des CaP.

Le travail réalisé au cours de ma thèse s'inscrit dans un projet plus vaste, dont les retombées cliniques potentielles sont nombreuses. Nous pouvons à titre d'exemple imaginer dépister régulièrement l'apparition de clones mutants chez les patients, ce qui permettrait d'inhiber la prolifération d'un clone mutant au moyen d'un antagoniste qui lui est spécifique, et au contraire d'interrompre l'administration de médicaments tels que le flutamide, le bicalutamide et les glucocorticoïdes, devenus agonistes vis-à-vis du mutant du RA détecté chez le patient.

Ce vaste programme de recherche sur la physiopathologie du récepteur des androgènes dans les cancers de la prostate a pour but d'améliorer les connaissances sur les relations structure-fonction de ce récepteur, et devrait ainsi permettre de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques, le cas échéant ciblées et adaptées au phénotype tumoral susceptibles de prolonger le contrôle hormonal de la maladie et de retarder le recours aux chimiothérapies cytotoxiques.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsson P.A. (1996). *Neuroendocrine differentiation and hormone-refractory prostate cancer*. Prostate. Suppl. 6 : 3 - 8.
- Adler A.J., Danielsen M., Robins D.M. (1992). *Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptor factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 (24) : 11660 - 11663.
- Afar D.E., Vivanco I., Hubert R.S., Kuo J., Chen E., Saffran D.C., Raitano A.B., Jakobovits A. (2001). *Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia*. Cancer Res. 61 (4) : 1686 - 1692.
- Alen P., Claessens F., Verhoeven G., Rombauts W., Peeters B. (1999). *The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription*. Mol. Cell. Biol. 19 : 6085 - 6097.
- Berrevoets C.A., Umar A., Trapman J. and Brinkmann A.O. (2004). *Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR)*. Biochem. J. 379 : 731 - 738.
- Berthon P., Valeri A., Cohen-Akenine A., Drelon E., Paiss T., Woehr 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 N.J., Lidereau R., Vogel W., Fournier G., Mangin P., Cussenot O., *et al.* (1998). *Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43*. Am J Hum Genet. 62 (6) : 1416 - 1424.

- Bevan C.L., Hoare S., Claessens F., Heery D.M., Parker M.G. (1999). *The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1*. Mol. Cell. Biol. 19 : 8383 - 8392.
- Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H., Moras D. (1995). *Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha*. Nature 375 (6530) : 377 - 382.
- Bradford T.J., Tomlins S.A., Wang X., Chinnaiyan A.M. (2006). *Molecular markers of prostate cancer*. Urol Oncol. 24 (6) : 538 - 551.
- Callewaert L., Van Tilborgh N., Claessens F. (2006). *Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor*. Cancer Res. 66 (1) : 543 - 553.
- Céraline J., Erdmann E., Erbs P., Deslandres-Cruchant M., Jacqmin D., Duclos B., Klein-Soyer C., Dufour P. et Bergerat J.P. (2003). *A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer*. Eur. J. Endocrinol. 148 (1) 99 - 110.
- Céraline J., Deslandres-Cruchant M., Erdmann E., Erbs P., Jacqmin D., Duclos B., Chopin D., Dufour P. et Bergerat J.P. (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 (1) : 152 - 157.
- Chamberlain N.L., Driver E.D., Miesfeld R.L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. Nucleic Acids Res. 22 (15) : 3181 - 3186.
- Chambon P. (2004). *How I became one of the fathers of a superfamily*. Nat Med. 10 (10) : 1027 - 1031.

- Chan J.M., Stampfer M.J., Giovannucci E., Gann P.H., Ma J., Wilkinson P., Hennekens C.H., Pollak M. (1998). *Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study*. Science. 279 (5350) : 563 - 566.
- Chang C., Saltzman A., Yeh S., Young W.J., Keller E., Lee H.J., Wang C. et Mizokami A. (1995). *Androgen receptor : an overview*. Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr. 5 : 97 - 125.
- Chang C.Y., Walther P.J., McDonnell D.P. (2001). *Glucocorticoids manifest androgenic activity in a cell line derived from a metastatic prostate cancer*. Cancer Res. 61 : 8712 - 8717.
- Chen Y., Wang J., Fraig M.M., Henderson K., Bissada N.K., Watson D.K., Schweinfest C.W. (2003). *Alterations in PMS2, MSH2 and MLH1 expression in human prostate cancer*. Int. J. Oncol. 22 : 1033 - 1043.
- Chesire D.R., Ewing C.M., Sauvageot J., Bova G.S., Isaacs W.B. (2000). *Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer*. Prostate 45 : 323 - 334.
- Claessens F., Alen P., Devos A., Peeters B., Verhoeven G., Rombauts W. (1996). *The androgen-specific probasin response element 2 interacts differentially with androgen and glucocorticoid receptors*. J. Biol. Chem. 271 (32) : 19013 – 19016.
- Claessens F., Verrijdt G., Schoenmakers E., Haelens A., Peeters B., Verhoeven G., Rombauts W. (2001). *Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 76 (1-5) : 23 - 30.
- Cleutjens K.B., van Eekelen C.C., van der Korput H.A., Brinkmann A.O., Trapman J. (1996). *Two androgen response regions cooperate in steroid*

- hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter.* J. Biol. Chem. 271 (11) : 6379 - 6388.
- Cleutjens K.B.J.M., van der Korput H.A.G.M., van Eeckelen C.C.E.M., van Rooij H.C.J., Faber P.W., 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.
 - Cook A., Bono F., Jinek M., Conti E. (2007). *Structural biology of nucleocytoplasmic transport.* Annu. Rev. Biochem. 76 : 647 - 671.
 - Cunha G.R., Cooke P.S., Kurita T. (2004). *Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses.* Arch Histol Cytol. 67 (5) : 417 - 434.
 - Cussenot O., Cancel-Tassin G. (2004). *Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate.* Med Sci. 20 (5) : 562 - 568.
 - Cutress M.L., Whitaker H.C., Mills I.G., Stewart M., Neal D.E. (2008). *Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor.* J. Cell. Sci. 121 (Pt 7) : 957 - 968.
 - di Sant'Agnesse P.A. (1998). *Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: an update.* Prostate Suppl. 8 : 74 - 79.
 - Doesburg P., Kuil C.W., Berrevoets C.A., Steketee K., Faber P.W., Mulder E., Brinkmann A.O., Trapman J. (1997). *Functional in vivo interaction between the amino-terminal, transactivation domain and the ligand binding domain of the androgen receptor.* Biochemistry 36 (5) : 1052 - 1064.
 - Dubbink H.J, Hersmus R., Pike A.C., Molier M., Brinkmann A.O., Jenster G., Trapman J. (2006). *Androgen receptor ligand-binding domain interaction*

and nuclear receptor specificity of FXXLF and LXXLL motifs as determined by L/F swapping. Mol Endocrinol. 20 (8) : 1742 - 1755.

- Duff J., Davies P., Watt K., McEwan I.J. (2006). *Structural dynamics of the human androgen receptor: implications for prostate cancer and neurodegenerative disease.* Biochem Soc Trans. 34 (Pt 6) : 1098 - 1102.
- Endogenous Hormones, Prostate Cancer Collaborative Group, Roddam A.W., Allen N.E., Appleby P., Key T.J. (2008). *Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies.* J. Natl. Cancer Inst. 100 (3) : 170 - 183.
- Evans R.M. (1988). *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.* Science 240 (4854) : 889 - 895.
- Escriva H., Delaunay F., Laudet V. (2000). *Ligand binding and nuclear receptor evolution.* Bioessays 22 (8) : 717 - 727.
- Farla P., Hersmus R., Geverts B., Mari P.O., Nigg A.L., Dubbink H.J., Trapman J., Houtsmuller A.B. (2004). *The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells.* J. Struct. Biol. 147 (1) : 50 - 61.
- Feldman B.J. et Feldman D. (2001). *The development of androgen-independent prostate cancer.* Nat Rev Cancer 1 (1), 34 - 45.
- Fournier G., Valeri A., Mangin P., Cussenot O. (2004). *Cancer de la prostate. Epidémiologie. Facteurs de risques. Anatomopathologie.* Ann Urol 38 (5) : 187 - 206.
- Fu M., Wang C., Reutens A.T., Wang J., Angeletti R.H., Siconolfi-Baez L., Ogryzko V., Avantaggiati M.L., Pestell R.G. (2000). *p300 and p300/ cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen*

- receptor at sites governing hormone-dependent transactivation.* J. Biol. Chem. 275 : 20853 - 20860.
- Garcia-Vallvé S., Palau J. (1998). *Nuclear receptors, nuclear-receptor factors, and nuclear-receptor-like orphans form a large paralog cluster in Homo sapiens.* Mol. Biol. Evol. 15 (6) : 665 - 682.
 - Garnick M.B., Fair W.R. (1996). *Prostate cancer: emerging concepts. Part II.* Ann. Intern. Med. 125 (3) : 205 - 212.
 - Germain P., Staels B., Dacquet C., Spedding M., Laudet V. (2006). *Overview of nomenclature of nuclear receptors.* Pharmacol. Rev. 58 (4) : 685 - 704.
 - Gioeli D., Ficarro S.B., Kwiek J.J., Aaronson D., Hancock M., Catling A.D., White F.M., Christian R.E., Settlege R.E., Shabanowitz J., Hunt D.F., Weber M.J. (2002). *Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites.* J. Biol. Chem. 277 (32) : 29304 - 29314. Epub 2002 May 15.
 - Görlich D., Kutay U. (1999). *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.* Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 15 : 607 - 660.
 - Gottlieb B., Beitel L.K., Wu J.H., Trifiro M. (2004). *The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update.* Hum Mutat. 23 (6) : 527 - 533.
 - Grierson A.J., Mootosamy R.C., Miller C.C. (1999). *Polyglutamine repeat length influences human androgen receptor/c-Jun mediated transcription.* Neurosci. Lett. 277 (1) : 9 - 12.
 - Haelens A., Verrijdt G., Schoenmakers E., Alen P., Peeters B., Rombauts W., Claessens F. (1999). *The first exon of the human sc gene contains an*

androgen responsive unit and an interferon regulatory factor element. Mol Cell Endocrinol. 153 (1-2) : 91 - 102.

- Haelens A., Tanner T., Denayer S., Callewaert L., Claessens F. (2007). *The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor.* Cancer Res. 67 (9) : 4514 - 4523.
- Hahn S. (2004). *Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery.* Nat. Struct. Mol. Biol. 11 (5) : 394 - 403.
- Hara T., Miyazaki J., Araki H., Yamaoka M., Kanzaki N., Kusaka M., Miyamoto M. (2003). *Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome.* Cancer Res. 63 (1) : 149 - 153.
- Harden S.V., Guo Z., Epstein J.I., Sidransky D. (2003). *Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma.* J. Urol. 169 : 1138 - 1142.
- Heemers H.V., Tindall D.J. (2007). *Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex.* Endocr. Rev. 28 (7) : 778 - 808.
- Heinlein C.A., Chang C. (2002). *Androgen receptor (AR) coregulators: an overview.* Endocr. Rev. 23 : 175 - 200.
- Hoedemaeker R.F., Vis A.N., Van Der Kwast T.H. (2000). *Staging prostate cancer.* Microsc Res Tech. 51 (5) : 423 - 429.
- Holter E., Kotaja N., Mäkela S., Strauss L., Kietz S., Jänne O.A., Gustafsson J.A., Palvimo J.J., Treuter E. (2002). *Inhibition of Androgen Receptor (AR) Function by the Reproductive Orphan Nuclear Receptor DAX-1.* Mol. Endocrinol. 16 (3) : 515 - 528.

- Huggins C., Hodges C.V. (1941). *Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate.* J Urol. 2002 Jul;168(1):9-12.
- Huang W., Shostak Y., Tarr P., Sawyers C., Carey M. (1999). *Cooperative assembly of androgen receptor into a nucleoprotein complex that regulates the prostate-specific antigen enhancer.* J. Biol. Chem. 274 (36) : 25756 - 25768.
- Ikonen T., Palvimo J.J., Jänne O.A. (1997) *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. 272 (47) : 29821 - 29828.
- Irvine R.A., Yu M.C., Ross R.K., Coetzee G.A. (1995). *The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer.* Cancer Res. 55 (9) : 1937 - 1940.
- Iyer A.K., McCabe E.R. (2004). Molecular mechanisms of DAX1 action. Mol. Genet. Metab. 83 (1-2) : 60 - 73.
- Jagla M., Fève M., Kessler P., Lapouge G., Erdmann E., Serra S., Bergerat J.P., Céraline J. (2007a). *A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions.* Endocrinology 148 (9) : 4334 - 4343.
- Jagla M. (2007b). *Etude de l'impact de mutations du domaine de liaison à l'ADN sur les fonctions du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate.* Thèse de l'Université Louis Pasteur.

- Jenster G., van der Korput H.A., Trapman J., Brinkmann A.O. (1995). *Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor*. J. Biol. Chem. 270 (13) : 7341 - 7346.
- Kim J., Coetzee G.A. (2004). *Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor*. J. Cell. Biochem. 93 (2) : 233 - 241.
- Khan O.Y., Fu G., Ismail A., Srinivasan S., Cao X., Tu Y., Lu S., Nawaz Z. (2006). *Multifunction steroid receptor coactivator, E6-associated protein, is involved in development of the prostate gland*. Mol. Endocrinol. 20 (3) : 544 - 559.
- Koivisto P., Kononen J., Palmberg C., Tammela T., Hyytinen E., Isola J., Trapman J., Cleutjens K., Noordzij A., Visakorpi T., Kallioniemi O.P. (1997). *Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer*. Cancer Res. 57 : 314 - 319.
- Kumar V., Green S., Staub A., Chambon P. (1986). *Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor*. EMBO J. 5 (9) : 2231 - 2236.
- Labrie F., Dupont A., Bélanger A., St-Arnaud R., Giguère M., Lacourcière Y., Emond J., Monfette G. (1986). *Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists*. Endocr. Rev. 7 (1) : 67 - 74.
- Lam J.S., Reiter R.E. (2006). *Stem cells in prostate and prostate cancer development*. Urol. Oncol. 24 (2) : 131 - 140.
- Lapouge G., Erdmann E., Marcias G., Jagla M., Monge A., Kessler P., Serra S., Lang H., Jacquemin D., Bergerat J.P., Céraline J. (2007). *Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor*

mutation--a new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. Int. J. Cancer. 121 (6) : 1238 - 1244.

- Lavery D.N., McEwan I.J. (2005). *Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. Biochem. J. 391 : 449 - 464.*
- Lee D.K., Duan H.O., Chang C. (2000). *From androgen receptor to the general transcription factor TFIID. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH(2)-terminal associated coactivator. J. Biol. Chem. 275 (13) : 9308 - 9313.*
- Lee D.K., Duan H.O., Chang C. (2001). *Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. J. Biol. Chem. 276 : 9978 – 9984.*
- Lee D.K., Chang C. (2003). *Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 84 : 41 – 49.*
- Li J., Fu J., Toumazou C., Yoon H.G., Wong J. (2006). *A Role of the Amino-Terminal (N) and Carboxyl-Terminal (C) Interaction in Binding of Androgen Receptor to Chromatin. Mol. Endocrinol. 20 : 776 - 785.*
- Long R.M., Morrissey C., Fitzpatrick J.M., Watson R.W.G. (2005). *Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. Clinical Science. 108 : 1 - 11.*
- Lorenzo G.D., Bianco R., Tortora G., Ciardiello F. (2003). *Involvement of growth factor receptors of the epidermal growth factor receptor family in prostate cancer development and progression to androgen independence. Clin. Prostate Cancer. 2 (1) : 50 - 57.*

- Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S. et Wilson E.M. (1988). *Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome*. Science 240 (4850) : 327 - 330.
- Luisi B.F., Xu W.X., Otwinowski Z., Freedman L.P., Yamamoto K.R., Sigler P.B. (1991). *Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA*. Nature 352 (6335) : 497 - 505.
- Lytton B. (2001). *Prostate cancer : a brief history and the discovery of hormonal ablation treatment*. J. Urol. 165 : 1859 - 1862.
- Maier C., Haeusler J., Herkommer K., Vesovic Z., Hoegel J., Vogel W., Paiss T. (2005). *Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene*. Br. J. Cancer. 92 (6) : 1159 - 1164.
- Maitland N.J., Collins A.T. (2005). *A tumour stem cell hypothesis for the origins of prostate cancer*. BJU Intern. 96 ; 1219 - 1223.
- Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. (1995). *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell 83 (6) : 835 - 839.
- Mao G.E., Morris G., Lu Q.Y., Cao W., Reuter V.E., Cordon-Cardo C., Dalbagni G., Scher H.I., deKernion J.B., Zhang Z.F. (2004). *Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer*. Cancer Detect. Prev. 28 (5) : 368 - 374.
- Marcelli M., Ittmann M., Mariani S., Sutherland R., Nigam R., Murthy L., Zhao Y., DiConcini D., Puxeddu E., Esen A., Eastham J., Weigel N.L., Lamb D.J. (2000). *Androgen receptor mutations in prostate cancer*. Cancer Res. 60 : 944 - 949.

- Marshall T.W., Link K.A., Petre-Draviam C.E., Knudsen K.E. (2003). *Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity*. J. Biol. Chem. 278 : 30605 - 30613.
- McDonnell T.J., Troncoso P., Brisbay S.M., Logothetis C., Chung L.W., Hsieh J.T., Tu S.M., Campbell M.L. (1992). *Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer*. Cancer Res. 52 (24) : 6940 - 6944.
- McEwan I.J., Gustafsson J. (1997). *Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94 (16) : 8485 - 8490.
- Monge A., Jagla M., Lapouge G., Sasorith S., Cruchant M., Wurtz J.M., Jacqmin D., Bergerat J.P., C eraline J. (2006). *Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer*. Cell. Mol. Life Sci. 63 (4) : 487 - 497.
- Mononen N., Syrjakoski K., Matikainen M., Tammela T.L., Schleutker J., Kallioniemi O.P., Trapman J., Koivisto P.A. (2000). *Two percent of Finnish prostate cancer patients have a germ-line mutation in the hormone-binding domain of the androgen receptor gene*. Cancer Res. 60 (22) : 6479 - 6481.
- Morganti G., Gianferrari L., Cresseri A., Arrigoni G., Lovati G. (1956-1957). *Clinico-statistical and genetic research on neoplasms of the prostate*. Acta Genet Stat Med. 6 (2) : 304 - 305.
- Mosquera J.M., Perner S., Demichelis F., Kim R., Hofer M., Mertz K., Paris P., Simko J., Collins C., Bismar T., Chinnaiyan A., Rubin M. (2007). *Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer*. J. Pathol. 212 (1) : 91 - 101.

- Mowszowicz I., Berthaut I., Mestayer C., Wright F., Kuttenn F. Mauvais-Jarvis P. (1995). *Les 5 alpha réductases: physiologie et pathologie*. *Annal. Endocrinol.* 56 : 555 - 559.
- Necela B.M., 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 (38) : 39279 - 39288.
- Oñate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1995). *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. *Science* 270 : 1354 - 1357.
- Ozers M.S., Marks B.D., Gowda K., Kupcho K.R., Ervin K.M., Rosier T.D., Qadir N., Eliason H.C., Riddle S.M., Shekhani M.S. (2007). *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* 46 (3) : 683 - 695.
- Paul R., Breul J. (2000). *Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: incidence and clinical significance*. *Drug. Saf.* 23 : 381 - 390.
- Petrovics G., Liu A., Shaheduzzaman S., Furasato B., Sun C., Chen Y., Nau M., Ravindranath L., Chen Y., Dobi A., Srikantan V., Sesterhenn I.A., McLeod D.G., Vahey M., Moul J.W., Srivastava S. (2005). *Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome*. *Oncogene.* 24 (23) : 3847 - 3852.
- Prins G.S., Birch L., Greene G.L. (1991). *Androgen receptor localization in different cell types of the adult rat prostate*. *Endocrinology* 129 (6) : 3187 - 3199.

- Renaud J.P., Moras D. (2000). *Structural studies on nuclear receptors*. Cell. Mol. Life Sci. 57 (12) : 1748 - 1769.
- Rizzo S., Attard G., Hudson D.L. (2005). *Prostate epithelial stem cells*. Cell. Prolif. 38 (6) : 363 - 374.
- Robinson-Rechavi M., Garcia H.E., Laudet V. (2003). *The nuclear receptor superfamily*. J. Cell Sci. 116 : 585 – 586.
- Rouleau N., Domans'kyi A., Reeben M., Moilanen A.M., Havas K., Kang Z., Owen-Hughes T., Palvimo J.J., Jänne O.A. (2002). *Novel ATPase of SNF2-like protein family interacts with androgen receptor and modulates androgen-dependent transcription*. Mol. Biol. Cell. 13 : 2106 – 2119.
- Sack J.S., Kish K.F., Wang C., Attar R.M., Kiefer S.E., An Y. Wu G.Y., Scheffler J.E., Salvati M.E., Krystek S.R. Jr, Weinmann R. et Einspahr H.M. (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.
- Salinas C.A., Austin M.A., Ostrander E.O., Stanford J.L. (2005). *Polymorphisms in the androgen receptor and the prostate-specific antigen genes and prostate cancer risk*. Prostate 65 (1) : 58 - 65.
- Schalken J.A., van Leenders G. (2003). *Cellular and molecular biology of the prostate: stem cell biology*. Urology. 62 (5 Suppl 1) : 11 - 20.
- Schoenmakers E., Alen P., Verrijdt G., Peeters B., Verhoeven G., Rombauts W., Claessens F. (1999). *Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains*. Biochem. J. 341 : 515 - 521.

- Schoenmakers E., Verrijdt G., Peeters B., Verhoeven G., Rombauts W., Claessens F. (2000). *Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses*. J. Biol. Chem. 275 (16) : 12290 - 12297.
- Schwabe J.W., Chapman L., Finch J.T., Rhodes D. (1993). *The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements*. Cell 75 (3) : 567 - 578.
- Shaffer P.L., Jivan A., Dollins D.E., Claessens F., Gewirth D.T. (2004). *Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101 (14) : 4758 - 4763.
- Shaneyfelt T., Husein R., Bubley G., Mantzoros C.S. (2000). *Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis*. J. Clin. Oncol. 18 (4) : 847 - 853.
- Shang Y., Myers M. et Brown M. (2002). *Formation of the androgen receptor transcription complex*. Mol. Cell 9 (3) : 601 - 610.
- Shen H.C., Buchanan G., Butler L.M., Prescott J., Henderson M., Tilley W.D., Coetzee G.A. (2005). *GRIP1 mediates the interaction between the amino- and carboxyl-termini of the androgen receptor*. Biol. Chem. 386 (1) : 69 - 74.
- Shimizu H., Ross R.K., Bernstein L., Yatani R., Henderson B.E., Mack T.M. (1991). *Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County*. Br J Cancer. 63 (6) : 963 - 966.
- Smith J.R., Freije D., Carpten J.D., Grönberg H., Xu J., Isaacs S.D., Brownstein M.J., Bova G.S., Guo H., Bujnovszky P., Nusskern D.R., Damber J.E., Bergh A., Emanuelsson M., Kallioniemi O.P., Walker-Daniels J., Bailey-Wilson J.E., Beaty T.H., Meyers D.A., Walsh P.C., Collins F.S., Trent J.M.,

- Isaacs W.B. (1996). *Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search*. Science. 274 (5291) : 1371 - 1374.
- Smith C.L., O'Malley B.W. (2004). *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators*. Endocr. Rev. 25 (1) : 45 - 71.
 - So A.I., Hurtado-Coll A., Gleave M.E. (2003). *Androgens and prostate cancer*. World J. Urol. 21 (5) : 325 - 337.
 - Song J.Z., Stirzaker C., Harrison J., Melki J.R., Clark S.J. (2002). *Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells*. Oncogene 21 : 1048 - 1061.
 - Stanczyk F.Z., Bretsky P. (2003). *Biosynthesis, transport, and metabolism of steroid hormones*. Livre Hormones, genes, and cancer. Hendreson B.E., Ponder B., Ross R.K. Oxford University press. Chap. 2 : 12 - 37.
 - Stocco D.M. (1997). *A StAR search: implications in controlling steroidgenesis*. Biol. Reprod. 56 : 328 - 336.
 - Sun C., Shi Y., Xu L.L., Nageswararao C., Davis L.D., Segawa T., Dobi A., McLeod D.G., Srivastava S. (2006). *Androgen receptor mutation (T877A) promotes prostate cancer cell growth and cell survival*. Oncogene. 25 (28) : 3905 - 3913.
 - Tan J.A., Hall S.H., Hamil K.G., Grossman G., Petrusz P., French F.S. (2002). *Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators*. J. Biol. Chem. 277 (19) : 16993 - 17001.

- Tannock I.F., Osoba D., Stockler M.R., Ernst D.S., Neville A.J., Moore M.J., Armitage G.R., Wilson J.J., Venner P.M., Coppin C.M., Murphy K.C. (1996). *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. 14 (6) : 1756 - 1764.
- Tannock I.F., de Wit R., Berry W.R., Horti J., Pluzanska A., Chi K.N., Oudard S., Theodore C., James N.D., Turesson I., Rosenthal M.A., Eisenberger M.A. (2004). TAX 327 Investigators. *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. N. Engl. J. Med. 351 (15) : 1502 - 1512.
- Taplin M.E., Bubley G.J., Shuster T.D., Frantz M.E., Spooner A.E., Ogata G.K., Keer H.N., Balk S.P. (1995). *Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer*. N. Engl. J. Med. 332 : 1393 - 1398.
- Taplin M.E., Bubley G.J., Ko Y.J., Small E.J., Upton M., Rajeshkumar B., Balk S.P. (1999). *Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist*. Cancer Res. 59 : 2511 - 2515.
- Taplin M.E., Rajeshkumar B., Halabi S., Werner C.P., Woda B.A., Picus J., Stadler W., Hayes D.F., Kantoff P.W., Vogelzang N.J., Small E.J. (2003). *Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer : Cancer and Leukemia Group B Study 9663*. J. Clin. Oncol. 21 (14) : 2673 - 2678.
- Thompson I.M., Pauler D.K., Goodman P.J., Tangen C.M., Lucia M.S., Parnes H.L., Minasian L.M., Ford L.G., Lippman S.M., Crawford E.D., Crowley J.J., Coltman C.A. Jr. (2004). *Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter*. N. Engl. J. Med. 350 (22) : 2239 - 2246.

- Tilley W.D., Buchanan G., Hickey T.E., Bentel J.M. (1996). *Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence*. Clin. Cancer Res. 2 : 277 - 285.
- Tomlins S.A., Rhodes D.R., Perner S., Dhanasekaran S.M., Mehra R., Sun X.W., Varambally S., Cao X., Tchinda J., Kuefer R., Lee C., Montie J.E., Shah R.B., Pienta K.J., Rubin M.A., Chinnaiyan A.M. (2005). *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. Science. 310 (5748) : 644 - 648.
- Tostain J., Rossi D., Martin P.M. (2004) *Physiologie des androgènes chez l'homme adulte*. Prog Urol. 14 (5) : 639 - 660.
- Vandebos F., Chevallier D., Michiels J.F. (2004). *Cancers de la prostate : classification histopathologique*. Oncologie 6 : 385 - 393.
- Veldscholte J., Berrevoets C.A., Ris-Stalpers C., Kuiper G.G., Jenster G., Trapman J., Brinkmann A.O., Mulder E. (1992). *The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 41 : 665 - 669.
- Verrijdt G., Schoenmakers E., Alen P., Haelens A., Peeters B., Rombauts W., Claessens F. (1999). *Androgen specificity of a response unit upstream of the human secretory component gene is mediated by differential receptor binding to an essential androgen response element*. Mol. Endocrinol. 13 (9) : 1558 - 1570.
- Verrijdt G., Haelens A., Claessens F. (2003). *Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression*. Mol. Genet. Metab. 78 (3) : 175 - 185.

- Verrijdt G., Tanner T., Moehren U., Callewaert L., Haelens A., Claessens F. (2006). *The androgen receptor DNA-binding domain determines androgen selectivity of transcriptional response*. Biochem. Soc. Trans. 34 (Pt 6) : 1089 - 1094.
- Villers A., Soulié M., Culine S. (2004). *Epidémiologie et dépistage du cancer de la prostate*. Oncologie 6 : 245-250.
- Wang M.C., Valenzuela L.A., Murphy G.P., Chu T.M. (1979) *Purification of a human prostate specific antigen*. Invest. Urol. 17 : 159 - 163.
- Wang L.G., Liu X.M., Kreis W., Budman D.R. (1999). *Phosphorylation/Dephosphorylation of Androgen Receptor as a Determinant of Androgen Agonistic or Antagonistic Activity*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 259 : 21 - 28.
- Wang C., Young W.J., Chang C. (2000). *Isolation and characterization of the androgen receptor mutants with divergent transcriptional activity in response to hydroxyflutamide*. Endocrine 12 : 69 - 76.
- Wang X., Yeh S., Wu G., Hsu C.L., Wang L., Chiang T., Yang Y., Guo Y., Chang C. (2001). Identification and characterization of a novel androgen receptor coregulator ARA267- α in prostate cancer cells. J. Biol. Chem. 276 : 40417 - 40423.
- Wang Q., Li W., Liu X.S., Carroll J.S., Jänne O.A., Keeton E.K., Chinnaiyan A.M., Pienta K.J., Brown M. (2007). *A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth*. Mol. Cell. 27 (3) : 380 - 392.

- Warnmark A., Treuter E., Wright A.P., Gustafsson J.A. (2003). *Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation*. Mol. Endocrinol. 17 (10) : 1901 - 1909.
- Weisburger J.H. (2000). Eat to live, not live to eat. Nutrition. 16 (9) : 767 - 773.
- Wong Y.C., Wang Y.Z. (2000). *Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development*. Int. Rev. Cytol. 199 ; 65 - 116.
- Yeh C.C., Lee C., Dahiya R. (2001). *DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 285 : 409 - 413.
- Yeh S., Chang C.(1996). *Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93 : 5517 - 5521.
- Yu X., Suzuki K., Wang Y., Gupta A., Jin R., Orgebin-Crist M.C., Matusik R. (2006). *The role of forkhead box A2 to restrict androgen-regulated gene expression of lipocalin 5 in the mouse epididymis*. Mol. Endocrinol. 20 (10) : 2418 - 2431.
- Zeegers M.P., Kiemeny L.A., Nieder A.M., Ostrer H. (2004). How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13 (11 Pt 1) : 1765 - 1771.
- Zhao X.Y., Boyle B., Krishnan A.V., Navone N.M., Peehl D.M., Feldman D. (1999). *Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a*. J. Urol. 162 : 2192 - 2199.

- Zhao X.Y., Malloy P.J., Krishnan A.V., Swami S., Navone N.M., Peehl D.M., Feldman D. (2000). *Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor*. Nat. Med. 6 : 703 - 706.
- Zhang J., Gao N., Kasper S., Reid K., Nelson C., Matusik R.J. (2004). *An androgen-dependent upstream enhancer is essential for high levels of probasin gene expression*. Endocrinology. 145 (1) : 134 - 148.
- Zheng Z., Cai C., Omwanicha J., Chen S.Y., Baslan T., Shemshedini L. (2006). *SUMO-3 enhances androgen receptor transcriptional activity through a sumoylation-independent mechanism in prostate cancer cells*. J. Biol. Chem. 281 (7) : 4002 - 4012.
- Zhou Z.X., Sar M., Simental J.A., Lane M.V., Wilson E.M. (1994). *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. 269 (18) : 13115 – 13123.
- Zhou J.R., Gugger E.T., Tanaka T., Guo Y., Blackburn G.L., Clinton S.K. (1999). *Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor angiogenesis in mice*. J. Nutr. 129 (9) : 1628 - 1635.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS
PERSONNELLES**

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES

1. Publications

a. Articles concernant le travail de thèse

- *The T575A AR mutation by altering interactions with cofactors modifies AR transcriptional activities.*
Monge A, Jagla M, Céraline J, and Bergerat J-P. (2008). En cours de rédaction.
- *Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer.*
Monge A, Jagla M, Lapouge G, Sasorith S, Cruchant M, Wurtz JM, Jacqmin D, Bergerat JP et Céraline J. (2006) Cell. Mol. Life Sci. 63 (4) : 487-497.

b. Autres articles

- *Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harbouring a new class of androgen receptor mutation – A new paradigm for cooperation among prostate tumour cells.*
Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, Jagla M, **Monge A**, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP and Céraline J. (2007). Int J Cancer. Sep 15 ; 121 (6) : 1238-44.
- *A new class of androgen receptor mutations may contribute to prostate cancer progression.*
Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, Jagla M, **Monge A**, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP and Céraline J. (2007). Soumis à *Molecular Endocrinology*

2. Communications

a. *Communications orales*

- *Analyse des relations structure-fonction du récepteur des androgènes mutant T575A.* **Monge A.** Réunion ARTP, décembre 2006, Paris.
- *Analyse des relations structure-fonction du récepteur des androgènes mutant T575A/T877A.*
Monge A. Réunion ARTP, décembre 2005, Paris.
- *Etude du rôle des mutations du récepteur aux androgènes dans les mécanismes d'échappement des cancers de la prostate à la déprivation androgénique.*
Monge A. Réunion ARTP, décembre 2004, Paris.

b. *Communications de type posters*

- *Impact of a mutation located in the androgen receptor DNA-Binding Domain on DNA interaction, cofactors recruitment and transcriptional activities.*
Monge A, Jagla M, Bergerat JP et Céraline J. 1^{er} forum du canceropôle du Grand-Est, 19 octobre 2007, Vittel.
- *Structural and functional consequences of a mutation located in the DNA-Binding Domain of the androgen receptor.*
Monge A, Jagla M, Wurtz JM, Bergerat JP et Céraline J. Colloque "Nature-CNIO conference", 3-6 octobre 2007, Madrid.
- *The T575A mutation changes AR transcriptional activities by modifying cofactors recruitment.*
Jagla M, **Monge A,** Lobstein J, Kessler P, Bergerat JP et Céraline J. Colloque "Androgens 2006", 25-27 septembre 2006, Cambridge.
- *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.*
Jagla M, Lapouge G, Orbillot C, Erdmann E, **Monge A,** Bergerat JP, and Céraline J. Forum de Cancérologie 2006, Paris.

- *Specific transcriptional activities of c-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer.*
Lapouge G, Erdmann E, Jagla M, **Monge A**, Klein-Soyer C, Bergerat JP et Céraline J. FEBS congress, 2-7 Juillet 2005, Budapest.

- *Structural and functional consequences of the double T575A/T877A mutation in the androgen receptor.*
Jagla M, **Monge A**, Lapouge G, Sassorith S, Klein-Soyer C, Cruchant M, Wurtz JM, Jacquemin D, Moras D, Bergerat JP et Céraline J. Colloque “Androgens 2004”, 7-8 Octobre 2004, Berlin.

- *Altered DNA binding of the androgen receptor to hormone responsive elements due to the T575A mutation : implications for androgen-independent prostate cancer.*
Monge A, Jagla M, Lapouge G, Sassorith S, Klein-Soyer C, Cruchant M, Wurtz JM, Jacquemin D, Moras D, Bergerat JP et Céraline J. 11^{ème} congrès annuel de l’EuCC (European Cancer Center), 14 Mai 2004, Ecomusée d’Alsace, Ungersheim.

Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer

A. Monge, M. Jagla, G. Lapouge, S. Sasorith, M. Cruchant, J.-M. Wurtz, D. Jacqmin, J.-P. Bergerat, and J. Céraline

Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, Vol. 63, Pages 487–497

Pages 202-.... :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'ULP peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1007/s00018-005-5471-y>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

ANNEXE

RESUME

Avec plus de 62 000 nouveaux cas par an, le cancer de la prostate (CaP) représente le premier cancer de l'homme en France devant le cancer du poumon, et arrive au deuxième rang des décès par cancer chez l'homme dans les pays occidentaux après le cancer bronchique. La voie de signalisation des androgènes, en soutenant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses, est impliquée dans le CaP. Cette dépendance vis-à-vis des androgènes est mise à profit dans l'hormonothérapie des CaP. Dans 70 à 80% des cas, les patients répondent bien à l'hormonothérapie mais tous les patients rechutent après une durée médiane de rémission de 12 à 18 mois. La physiopathologie de cet échappement à la privation androgénique est encore mal connue et peut faire appel à plusieurs types de mécanismes. L'un d'eux est l'émergence de mutations au niveau du gène du récepteur des androgènes (RA), permettant aux cellules cancéreuses de survivre et de proliférer malgré le faible taux d'androgènes.

Le RA mutant T575A/T877A a été détecté au laboratoire à partir d'un échantillon prostatique provenant d'un patient en échappement hormonal. Mon travail de thèse a consisté à étudier les propriétés fonctionnelles apportées au RA par ces deux mutations, mais également les conséquences de la mutation T575A sur la structure du DBD et sur la reconnaissance de l'ADN par le RA mutant. Les conséquences fonctionnelles de la mutation T877A étant connues, le RA simple mutant T575A a été étudié en parallèle au RA double mutant afin d'appréhender les modifications des propriétés du RA dues à cette mutation dans le contexte double mutant T575A/T877A.

Les études fonctionnelles et structurales du RA mutant T575A/T877A ont permis de mettre en lumière une coopération de deux mutations présentes au sein du même RA. Nous avons également vu que la mutation T575A induit un changement de spécificité du RA vis-à-vis des différents éléments de réponse aux hormones présents dans le promoteur / enhancer de gènes cibles, en orientant le RA vers des séquences non spécifiques des androgènes. Nous proposons un modèle selon lequel le RA mutant T575A pourrait reconnaître des séquences de liaison du RA différentes de celles reconnues habituellement par le RA sauvage au niveau du promoteur / enhancer de gènes cibles, mais également des séquences de liaison du RA localisées au niveau de promoteurs / enhanceurs de gènes non reconnus naturellement par le RA sauvage, et conduire ainsi à une expression différentielle de gènes nécessaires à la survie des cellules tumorales. De plus, les études structurales de la mutation T575A indiquent que la présence de la mutation T575A au sein du DBD du RA ne modifie pas drastiquement la structure de ce dernier, mais en revanche entraîne une différence de protonation d'un résidu en contact avec le squelette phosphate de l'ADN, expliquant en partie les effets cellulaires observés.

Par ailleurs, la présence de la mutation T877A associée à la mutation T575A dans le RA du patient a certainement un impact sur le fonctionnement de ce RA. En effet, nous avons vu une coopération des deux mutations, or la mutation T877A est connue pour élargir le spectre de sensibilité du RA vis-à-vis des hormones stéroïdes, et pour empêcher le recrutement de NCoR en présence d'un anti-androgène. L'association des propriétés structurales et fonctionnelles de chacune des mutations T575A et T877A pourrait jouer un rôle déterminant dans la progression du CaP et dans l'échappement à la privation androgénique.

Cette étude montre l'importance d'un seul résidu au sein du DBD du RA vis-à-vis de ses interactions avec l'ADN, bien qu'il n'entraîne pas de modifications conformationnelles. Ce travail s'inscrit dans une étude plus vaste visant à améliorer les connaissances sur les relations structure-fonction de ce récepteur, dans le but final de permettre la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblées et adaptées au phénotype tumoral présent chez chaque patient atteint d'un CaP, permettant ainsi de prolonger le contrôle hormonal de la maladie et de retarder le recours aux chimiothérapies cytotoxiques.