

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science-Technologie-Santé
FACULTE DE PHARMACIE

Année □ 2004

Thèse n°

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES
Discipline □ Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par
Lucie AUBOURG

le 29 octobre 2004

**INTRACRINOLOGIE ET EFFET PROLIFERATIF
PARADOXAL DES ANDROGENES □
LES CELLULES LNCaP COMME MODELE DU
CARCINOME PROSTATIQUE**

Directeur de Thèse □ Pr. G. HABRIOUX

Composition du jury :

M. Hinrich GRONEMEYER
M. Jean-Claude NICOLAS
M. François-Xavier GALEN
M. Gérard HABRIOUX
Mme Marie-Odile JAUBERTEAU

DRE, ILLKIRCH
DR1, MONTPELLIER
Pr, PARIS
Pr, LIMOGES
Pr, LIMOGES

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Directeur de Thèse
Présidente du Jury

**«Le développement hyperdisciplinaire des sciences rend aveugle
à ce qui tombe entre les disciplines, et qui est l'essentiel.»**
Edgar Morin

«J'ai des questions à toutes vos réponses.»
Woody Allen

Je dédie ce travail à mes parents

Voici enfin les dernières lignes, celles que j'attendais depuis bien longtemps, tant était grand le besoin de remercier tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenue dans cette longue entreprise.

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Gérard Habrioux, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour votre soutien, pour votre disponibilité de chaque instant, et pour m'avoir laissé une grande liberté dans la conduite de ce travail. Merci aussi pour m'avoir permis de poursuivre mon travail en Alsace, et pour avoir géré toutes les tracasseries logistiques que cela imposait.

Une partie importante de ce travail a été réalisée au laboratoire de Monsieur Hinrich Gronemeyer, à l'IGBMC d'Ilkirch. J'ai pu y découvrir un monde nouveau, des techniques pointues, sans oublier les tartes flambées. Hinrich, je ne saurais trop vous remercier pour m'avoir reçue dans votre équipe, comme un membre à part entière, sans jamais chercher à m'imposer vos idées. J'espère pouvoir poursuivre notre collaboration dans le futur, pour continuer à fouiller dans la vie intime des récepteurs nucléaires.

Merci à vous, ainsi qu'à Monsieur Jean-Claude Nicolas, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je voudrais aussi exprimer ma reconnaissance aux autres membres du jury, Madame le Professeur Marie-Odile Jauberteau et Monsieur le Professeur François-Xavier Galen, qui ont accepté de juger ce travail.

J'adresse également mes remerciements aux membres des laboratoires qui m'ont accueillie pour la réalisation de ce travail ☐

- le laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de Limoges, en particulier Cécile, Jean-Christophe et Bertand,
- le Dr. Chantal Jayat-Vignole du service commun de Cytométrie en Flux de la Faculté des Sciences de Limoges,
- le Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche de la Haute-Vienne,
- le Dr. Hayat Lotfi du Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie pour son aide précieuse en GC-MS,
- l'ensemble des services communs de l'IGBMC, en particulier le service de Culture Cellulaire, ainsi que le service Informatique (mention spéciale à Antoine, Agathe et Jonathan pour les astuces et dépannages multiples),
- un grand merci aussi aux membres du laboratoire du Dr. H. Gronemeyer, grâce auxquels je me suis acclimatée à un nouvel environnement et à de nouvelles méthodes ☐ merci surtout à Manou et Michèle, pour m'avoir initiée à la RPA et au Cytomètre de Flux, à Cathie pour tout ce qui a à voir avec l'ADN, à Astrid et Audrey pour un tas de petits conseils et de protocoles, à Pierre pour son aide, sa relecture, et pour avoir un peu été à l'origine de ma venue à l'IGBMC, à Valérie pour les cogitations entrecoupées de fous rires, et enfin à Claudine pour nos longues discussions sur la philosophie et les astuces des CHIP.
- je n'oublie pas Aurélie et Sylvie pour leur accueil et leur aide, pour un certain déménagement aussi, et Julie pour m'avoir tout appris des Western Blot.

De ces laboratoires, certains sont déjà partis vers de nouveaux horizons, mais je tiens à les remercier pour avoir accompagné mes débuts ☐ Raphaël et Igor, les «Petits poulets» de Limoges, merci pour tout, pour les soirées bien arrosées, les champignons du Limousin, les ris-de-veau prohibés, et surtout pour la capture d'un certain félin psychopathe...j'espère vous revoir bientôt, l'Alsace et la Lorraine ne sont pas si éloignées, il y a encore des spécialités culinaires à découvrir. Ana, ta bonne humeur et ton goût pour la vie me manquent beaucoup, je ne désespère pas de parvenir un jour à te faire distinguer le v et le b, le u et le ou français, et je te propose qu'on s'envoie un pigeon voyageur pour planifier le prochain rendez-vous à Madrid, en Alsace ou dans le Berry. Muchas gracias para tu ayuda, y hasta la victoria, siempre ☐

Et puis il y a la famille aussi...qui compte beaucoup, beaucoup...

Mes parents d'abord, je leur ai déjà dédié ce travail, mais ça ne m'empêche pas de leur dire merci à nouveau, j'aurais beau me répéter, ça serait encore insuffisant, tant ce que je leur dois est énorme ☐ merci pour m'avoir permis de poursuivre ces longues études depuis la Fac, pour les sacrifices que ça représente, pour votre soutien sans faille, pour toutes les bonnes choses du jardin qui font que mon Berry me semble un peu moins loin. Merci pour avoir toujours été là dans les moments difficiles, et pour m'avoir souvent démontré les bienfaits de la calino-thérapie.

Merci à mon grand frère Sébastien pour m'avoir initiée à la biologie dès l'enfance, dans un grenier transformé en laboratoire exceptionnel...tu vois, je m'y suis mise à la Biologie Moléculaire, en revanche la Bio-Informatique reste un grand mystère. Merci pour ton aide dans la découverte des ARE de c-myc. Et puis surtout merci à toi et à Sandrine pour nous avoir donné un joli rayon de soleil prénommé Raphaël, qui m'a détrônée de ma place de «Petite dernière» (mais je ne lui en veux pas, les meilleurs choses ont une fin).

Je pourrais remercier tous les membres de la famille, mais la place va manquer, j'aurais juste une pensée reconnaissante pour Elise, Cathy et Nini, pour le soutien, les rires, la complicité, et une générosité inégalables.

On dit souvent que chacun d'entre nous a eu un jour un professeur qui a changé les choses, qui a marqué l'esprit définitivement. Francine, tu as été l'un de ceux-là, en plus de m'apprendre à prendre des notes, tu as bouleversé certaines de mes idées d'adolescente naïve, tu m'as fais voir bien des choses sous un autre angle, tu as contribué à forger mon esprit (aye), et puis surtout tu es devenue au fil du temps l'une de mes plus grandes amies, avec qui je peux partager beaucoup de choses, de la politique à Mozart et les soucis aussi. Merci à toi et au Grosjean pour tout ça, restez tels que vous êtes, rebelles, grincheux, empêcheurs de tourner en rond, moi c'est comme ça que je vous aime.

Je sais que ça devient long, mais mes amis occupent une telle place dans ma vie que je ne peux les négliger.

Emilie, ma petite Miloche, tu as ta place aussi, même si ton planning de formation ne nous arrange vraiment pas. Merci pour ta bonne humeur presque permanente, pour ton humour terrible, pour avoir supporté ma tête des sales jours, ma mémoire défaillante (le mot est faible), pour les bonnes soirées cinéma, et pour une mémorable initiation au squash. Il te reste encore beaucoup de restaurants et de bars à me faire connaître, alors je compte sur toi. Ton tour à toi viendra aussi, et on verra alors si tu arrives à suivre une conversation pendant plus de cinq minutes.

Pierrot, ma petite caille, notre passage commun à Limoges me laissera de nombreux souvenirs, je ne rentrerai pas dans certains détails, tu vois ce que je veux dire...merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble, pour avoir répondu à mon appel à l'aide

après une séance mémorable chez un dentiste-boucher, et pour nos soirées pastis-télé. Que la Force soit avec toi petit padawan...et Virginie aussi.

Sandra, ma petite «Poulette», nous avons partagé beaucoup plus qu'un bureau pendant quelques mois, ton soutien et nos longues discussions pas toujours scientifiques m'ont beaucoup apporté, merci pour ton enthousiasme inaltérable et pour avoir su me secouer les puces quand il le fallait.

Raquel, je te remercie pour ta générosité, pour ton rire débordant de vie, tes fabuleuses recettes de morue que j'attends toujours, et tous tes conseils évidemment. Bonne chance à toi dans ton aventure sur les récepteurs nucléaires.

Marie, on se fâche souvent sur la politique Mc'Do, mais je sais bien que tu n'es pas encore totalement contaminée (c'est scientifiquement prouvé). Depuis toutes ces années je ne compte plus les fois où tu m'as consolée, engueulée, épaulée, alors continues comme ça, c'est parfait... je n'oublie pas tes hommes, cela va de soit...et je vois pas comment caser «Monoclaste» alors j'abandonne.

Cyrille et Alain, je sais qu'un jour j'ai commis une terrible erreur, mais j'espère que ça ne me suivra pas jusqu'à la fin de mes jours. Merci pour tout, les fous rire sans fin, les soirées, les réveillons, toutes les fêtes qui sont encore à venir. Pour m'avoir permis de franchir certains obstacles qui me semblaient insurmontables, et toujours avec le sourire. Cyrille, c'est toi le prochain, alors bouges!

Yves, je suis désolée que les factures de téléphone t'aient ruiné, mais tu n'imagines pas à quel point nos discussions m'ont souvent rassurée et détendue, surtout dans les derniers temps de la rédaction. Bientôt je te dirai que tu avais raison, que ça n'est qu'une formalité, mais je n'en suis pas encore là. Ta rigueur et ta droiture d'esprit sont exemplaires, ta franchise aussi...merci infiniment pour ton aide, ta lucidité et ton amitié, et surtout ne te laisses pas bouffer par les cartes électroniques ou les effluves d'hélium.

Manue...ouh la la...combien reste-t-il de pages autorisées! pas assez de toute façon. La vie a fait qu'après mon DEA, tu auras assisté (supporté!) la fin de ma Thèse. Sans toi, ce manuscrit serait encore à l'état embryonnaire, même pas digne d'un mémoire de maîtrise. Je ne pourrai jamais te remercier assez pour toute l'aide que tu m'as apportée, tous les conseils, toutes les soirées sacrifiées sur l'autel de la science. Je sais bien que je t'avais aidée à vérifier ta biblio, mais là tu me le rends au centuple. Les soirées, le cinéma, tous ces moments qu'on a partagés sont pour moi très précieux. Merci de tout mon cœur pour tout ce que tu m'as apporté. Et n'oublies pas!no pasaran!

Karine, depuis les bancs de la Fac tu as toujours été là, et les épisodes sporadiques d'incompréhension ne laisseront pas de trace dans ma mémoire, sois en sûre. Il est rare d'avoir quelqu'un sur qui on peut toujours compter, quoi qu'il arrive, et je sais que tu fais partie de ceux-là...et puis ta recette de sangria est tellement légendaire qu'à l'heure de la retraite tu verras que je serais encore dans tes pattes. Merci infiniment, ainsi qu'à Laurent pour avoir stoïquement supporté que je monopolise fréquemment son téléphone et son épouse.

J'oublie probablement certaines personnes, le temps me manque, j'espère être pardonnée.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide financière de la Région Limousin, de la Ligue Nationale contre le Cancer, et de l'Association pour la Recherche contre le Cancer.

Enfin, la musique a contribué à rendre la rédaction de ce manuscrit un peu moins laborieuse, et un peu plus légère. Merci à W.A Mozart pour ces instants de bonheur.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	5
AVANT-PROPOS	6
INTRODUCTION.....	8
I. LES ANDROGENES.....	8
I.1- Présentation générale.....	8
I.2- Biosynthèse et bio-transformations des androgènes surrénaliens et testiculaires.....	8
I.2-1. Des androgènes surrénaliens aux androgènes actifs.....	8
I.2-2. Bio-transformations et élimination des androgènes	9
I.3- Notion d’Intracrinologie□importance des précurseurs surrénaliens	9
I.3-1. Le principe de l’Intracrinologie	9
I.3-2. Importance des androgènes surrénaliens	11
I.4- Fonction physiologique des androgènes□un aperçu	12
I.5- Le Récepteur aux Androgènes (AR).....	13
I.5-1. Présentation et structure de la protéine.....	13
I.5-2. Les anti-androgènes.....	14
I.5-3. Mécanismes de l’activation de l’AR	16
I.5-4. Intéraction de l’AR avec les Facteurs Généraux de Transcription (GTF).....	17
I.5-5. Intéactions de l’AR avec des co-régulateurs	19
I.5-6. Régulation par l’AR de la transcription de gènes-cibles	21
I.5-7. Les effets non génomiques des androgènes.....	23
I.5-8. Régulation de l’activité de l’AR	24
II. ROLE DES ANDROGÈNES DANS LA PHYSIO-PATHOLOGIE DE LA PROSTATE	26
II.1 Expression de l’AR et rôle des androgènes dans le développement de la prostate normale	26
II.2 Le cancer de la prostate	27
II.2-1. Un peu d’épidémiologie	27
II.2-2. Rôle des androgènes et de l’AR dans le cancer de la prostate	28
II.2-3. Thérapie du cancer de la prostate.....	30
II.2-4. Echappement à la thérapie anti-hormonale et évolution vers l’androgéno-indépendance	32
III. LE PROTO-ONCOGÈNE C-MYC.....	36
III.1- Historique.....	36
III.2- Organisation du gène <i>c-myc</i>	36
III.3- Organisation de la protéine <i>c-myc</i>	37
III.4- Fonctions de <i>c-myc</i> □régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaires.....	38
III.4-1. <i>C-myc</i> et la transformation cellulaire	38
III.4-2. <i>C-myc</i> et le cycle cellulaire	39
III.4-3. <i>C-myc</i> et la différenciation cellulaire	40
III.4-4. <i>C-myc</i> et l’apoptose	41
III.5- Les gènes-cibles de <i>c-myc</i>	41
III.6- <i>C-myc</i> et la transition G1-S	43
III.7- Régulation de l’expression de <i>c-myc</i>	44
III.7-1. Régulation de l’initiation de la transcription.....	44
III.7-2. Régulation de l’élongation du transcrit.....	46
III.7-3. Régulations post-transcriptionnelles.....	46

III.8- C-myc, les androgènes et le cancer de la prostate.....	46
III.8-1. Place de c-myc dans l'étiologie du carcinome prostatique	46
III.8-2. Régulation de c-myc par les androgènes dans les cellules cancéreuses prostatiques	47
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	48
1^{ère} PARTIE METABOLISME DES ANDROGENES SURRENALIENS PAR LES CELLULES LNCaP ET EFFETS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE	50
I. Etude du métabolisme des androgènes surrénaliens par les cellules LNCaP.....	50
I.1 Observations préliminaires	50
I.1-1 Notion de rendements.....	50
I.1-2 Analyse des profils d'éluion des standards radiomarqués.....	52
I.2 Stabilité des substrats	53
I.2-1 Analyse quantitative	53
I.2-2 Analyse qualitative	53
I.3 Métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP.....	54
I.3-1 Distribution des différentes formes de métabolites.....	54
I.3-2 Analyse qualitative des métabolites formés.....	56
I.4 Conclusions.....	68
II. Effets des androgènes surrénaliens sur la prolifération des cellules LNCaP	76
II.1 Effets de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP	76
II.1-1 Effets de la DHT en milieu à 10% de SVF complet.....	76
II.1-2 Effets de la DHT en milieu à 10% de DCC-SVF	77
II.2 Influence de la DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP	79
II.2-1 Effets de la DHEA en milieu à 10% de SVF complet	79
II.2-2 Effets de la DHEA en milieu à 10% de DCC-SVF	79
II.3 Influence du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP	81
II.3-1 Effets du S-DHEA en milieu à 10% de SVF complet	81
II.3-2 Effets du S-DHEA en milieu à 10% de DCC-SVF.....	82
III. Conclusions et discussion	83
2^{ème} PARTIE. MECANISMES DE L'EFFET ANTI-PROLIFERATIF DES ANDROGENES. IMPLICATION DU PROTO-ONCOGENE C-MYC.....	89
I. Effets d'un androgène synthétique, le R1881, sur la prolifération des cellules LNCaP...	89
II. Effets du R1881 sur la distribution des cellules LNCaP dans le cycle cellulaire.....	91
III. Absence d'effet cytotoxique du R1881 sur les cellules LNCaP	93
IV. Modifications morphologiques induites par le R1881 sur les cellules LNCaP	94
V. Implication du Récepteur aux Androgènes dans l'arrêt prolifératif des cellules LNCaP en réponse au R1881	95
V.1 Réponse au R1881 de cellules AR-négatives.....	96
V.2 Réponse au R1881 de la lignée LNCaP-FAR	97
V.3 Effets des antagonistes de l'AR sur la répression de la prolifération induite par le R1881.....	99
VI. Effets du R1881 sur les régulateurs du cycle cellulaire	100
VI.1 Régulation des médiateurs du cycle cellulaire par le R1881 au niveau de l'expression des protéines.....	100
VI.1-1 Régulation de l'expression des cyclines	100
VI.1-2 Régulation de l'expression des cdk	101
VI.1-3 Régulation de l'expression des inhibiteurs des cdk.....	102
VI.1-4 Régulation de la phosphorylation de Rb.....	104
VI.2 Régulation des médiateurs du cycle cellulaire par le R1881 au niveau de l'expression de leur ARNm.....	105

VII. Régulation du niveau d'ARNm du TGF- β 1 par le R1881	107
VIII. Effets du R1881 sur l'expression du proto-oncogène c-myc	108
VIII.1 Régulation de c-myc par le R1881 dans les cellules LNCaP	109
VIII.1-1 Au niveau de la protéine.....	109
VIII.1-2 Au niveau de l'ARNm	110
VIII.2 Influence de l'AR sur l'expression de c-myc en réponse au R1881.....	111
VIII.2-1 Régulation de c-myc en réponse au R1881 dans des lignées androgéno- indépendantes	111
VIII.2-2 Régulation de c-myc en réponse au R1881 dans la lignée LNCaP-FAR.....	111
VIII.2-3 Effets des antagonistes de l'AR sur la répression de c-myc en réponse au R1881	113
IX. Mécanismes de la régulation négative de l'expression de c-myc par le R1881	113
IX.1 Activité du promoteur de c-myc.....	114
IX.2 Acétylation des Histones H3 du promoteur de c-myc	116
IX.3 Recrutement des Histones Déacétylases au niveau du promoteur de c-myc.....	118
IX.4 Effets de la TSA sur l'acétylation du promoteur de c-myc en réponse au R1881 .	119
IX.5 Recrutement de la RNA Polymérase II au niveau du promoteur de c-myc.....	121
IX.6 Recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc	122
X. Corrélation entre prolifération, régulation de l'ARNm, et recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP en présence de DCC-SVF données préliminaires.....	124
X.1 Déprivation en androgènes et retour en sérum complet.....	124
X.2 Déprivation en androgènes et addition de R1881 c-myc et l'effet biphasique.	127
XI. Conclusions et discussion	130
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	153
MATERIELS ET METHODES	160
I. Lignées cellulaires.....	160
II. Ligands et inhibiteurs.....	160
III. Culture cellulaire	161
III.1 Milieux de culture	161
III.2 Sérum	161
III.3 Entretien des lignées	162
IV. Métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP.....	162
IV.1 Substrats radiomarqués	162
IV.2 Incubation des cellules avec les substrats radiomarqués	162
IV.3 Extraction des produits du métabolisme	163
IV.3-1 Extraction des formes libres.....	163
IV.3-2 Extraction des formes conjuguées	163
IV.4 Comptages.....	164
IV.5 Séparation et identification des stéroïdes par HPLC	164
IV.6 Identification des produits par GC-MS.....	164
IV.7 Préparation du 5 α -androstane-3 β /3 α -diol [$^{-3}$ H] à partir de 5 α -DHT [1,2- $^{-3}$ H].....	165
IV.8 Réaction de saponification	166
V. Tests de prolifération cellulaire.....	166
VI. Analyse du cycle cellulaire en Cytométrie de Flux.....	166
VII. Western Blot	167
VII.1 Méthodologie	167
VII.1-1 Préparation d'un extrait de protéines cellulaires totales.....	167
VII.1-2 Séparation par SDS-PAGE et incubation avec les anticorps.....	167
VII.2 Anticorps.....	168

VII.3 Vérification de la spécificité des anticorps.....	169
VII.3-1 Par transfection dans les cellules COS.....	169
VII.3-2 Autres méthodes.....	170
VIII. Technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP).....	170
VIII.1 Principe.....	170
VIII.2 Méthodologie.....	171
VIII.2-1 Fixation au formaldéhyde.....	171
VIII.2-2 Lyse.....	172
VIII.2-3 Incubation avec l'Anticorps.....	172
VIII.2-4 Lavages.....	172
VIII.2-5 Elution et réversion de la fixation.....	173
VIII.2-6 Purification de la chromatine.....	173
VIII.2-7 PCR.....	173
VIII.3 Mises au point préliminaires.....	175
VIII.4 Anticorps et conditions spécifiques.....	176
IX. Extraction des ARN cellulaires totaux.....	177
X. Transcription Reverse (RT).....	177
XI. Réaction de PCR.....	178
XII. Test de Protection à la Ribonucléase (RPA) en Multiplex.....	178
XIII. Mesure de l'activité de gènes rapporteurs.....	179
XIII.1 Transfection transitoire des cellules LNCaP méthode jetPEI™.....	179
XIII.2 Lyse cellulaire.....	180
XIII.3 Mesure de l'activité Luciférase.....	180
XIII.4 Mesure de l'activité β -Galactosidase.....	181
XIV. Production et amplification de plasmides.....	181
XV. Tests statistiques.....	182
ANNEXE I. Structure des principaux stéroïdes et anti-androgènes.....	183
ANNEXE II. Le contrôle du cycle cellulaire.....	185
I. Vue générale.....	185
II. Niveaux et mode de régulation.....	186
III. Les régulateurs du cycle cellulaire sont des cibles des voies de signalisation.....	188
ANNEXE III. Structure des plasmides d'expression pX-CIP1 et p514-Rb.....	189
ANNEXE IV. Structure des plasmides rapporteurs pDel-Luc.....	190
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	191
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	217

LISTE DES ABREVIATIONS

abs	absorbance	nM	nmole/litre
A-diol	3 β /3 β -Androstanediol	pb	paire de bases
A-dione	5 β -Androstanedione	PBS	Phosphate Buffer Saline
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique	PCR	Réaction de Polymérisation en chaîne
ADNc/cDNA	ADN complémentaire	PIC	Cocktail d'Inhibiteurs de Protéases
AR	Récepteur aux Androgènes	PMSF	Phénylmethylsulfonylfluoride
ARE	Elément de réponse aux androgènes	PR	Récepteur à la Progestérone
ARN/RNA	Acide Ribonucléique	RAR	Récepteur à l'Acide Rétinoïque
ARNm	ARN messenger	RNAse	Ribonucléase
BPH	Hyperplasie Bénigne de la Prostate	RPA	Test de Protection à la Ribonucléase
BSA	Bovine Serum Albumine	rpm	rotation par minute
ChIP	Immunoprécipitation de la Chromatine	RT	Transcription Réverse
CMV	Cytomégalovirus	S-DHEA	Sulfate de Déhydroépiandrostérone
CPA	Cyprotérone Acétate	SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
DCC-SVF	Sérum de veau fœtal destéroïdé (traité au charbon-dextran)	SDS-Page	Sodium Dodécyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
DEPC	Diéthyl Pyrocarbonate	SVF	Sérum de Veau Fœtal
DHEA	Déhydroépiandrostérone	TIA	milieu MEM sans sérum+Transferrine+Insuline+BSA
DHT	5 β -Dihydrotestostérone	Tm	Température d'hybridation
DNase	désoxyribonucléase	TSA	Trichostatine A
dNTP	désoxyribonucléotide tri-phosphate	UV	Ultra-Violet
E2	17 β -oestradiol	v/v	volume à volume
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay (retard sur gel)	VDR	Récepteur à la vitamine D
ER	Récepteur aux Oestrogènes		
g/L	gramme par litre		
GC-MS	Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse		
GR	Récepteur aux Glucocorticoïdes		
h	heure		
HAT	Histone Acétyl-Transférase		
HDAC	Histone Déacétylase		
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Pression		
HSD	Hydroxystéroïde déhydrogénase		
HSOR	Hydroxystéroïde oxydo-réductase		
IP	Immunoprécipitation		
Kd	constante d'affinité		
kD	kilo Dalton		
LC-MS	Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse		
M	Moles/litre		
min	minute		
MTT	3-(5,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium		

AVANT-PROPOS

Responsable de 9000 décès chaque année en France métropolitaine, le cancer de la prostate est un cancer particulièrement redoutable et très fréquent, avec une incidence estimée à 56/100000 en l'an 2000. Sa fréquence augmente très fortement avec l'âge et compte-tenu de l'augmentation croissante de l'espérance de vie, le cancer de la prostate sera bientôt l'un des problèmes de santé publique les plus importants, d'autant que sur le plan de la prévention, aucun facteur de risque n'a encore été clairement identifié.

La principale caractéristique du cancer de la prostate est son androgéno-dépendance : les cellules cancéreuses prostatiques ont en effet besoin des androgènes circulant dans le sang (testostérone, dihydrotestostérone) pour se multiplier. Les androgènes agissent en se liant spécifiquement au Récepteur aux Androgènes (AR). L'AR est un récepteur nucléaire, il comporte un Domaine de Liaison au Ligand, et un Domaine de Liaison à l'ADN. L'activation de l'AR par son interaction avec un ligand induit sa liaison à l'ADN, au niveau de promoteurs de gènes-cibles spécifiques. L'AR est un Facteur de Transcription, qui régule directement la transcription de gènes impliqués dans différentes fonctions, comme la prolifération cellulaire.

Cette androgéno-dépendance a ouvert un vaste champ thérapeutique (Huggins et al., 1941) : l'hormono-thérapie a pour objectif de supprimer l'action des androgènes sur leur tissu cible.

La première méthode pour parvenir à cet objectif est de diminuer la production des androgènes par les testicules, par castration chirurgicale ou médicamenteuse. Cette méthode peut s'avérer insuffisante.

En effet, la seconde caractéristique du cancer de la prostate est liée à l'Intracrinologie : ce concept définit la capacité qu'ont les cellules prostatiques, normales ou cancéreuses, à synthétiser par elles-mêmes les androgènes actifs (dihydrotestostérone) à partir des précurseurs : la prostate peut donc s'affranchir des principales sources d'androgènes (testicules) pour produire localement les hormones actives dont elle a besoin. L'hormone active est donc produite par la cellule dans laquelle elle exerce immédiatement son effet biologique. D'où le terme d'effet «Intracrine».

En conséquence, un second niveau thérapeutique consiste à supprimer la production périphérique des androgènes actifs à partir des précurseurs surrénaliens (blocage surrénalien ou inhibiteurs de la stéroïdogénèse) ou à supprimer l'effet biologique des androgènes actifs au niveau des récepteurs des cellules prostatiques (anti-androgènes).

L'hormono-thérapie de façon générale donne des effets satisfaisants et son efficacité peut se prolonger pendant plusieurs années. Malheureusement, le cancer de la prostate peut, après une lente évolution, échapper à l'hormono-thérapie, car la tumeur devient progressivement androgéno-indépendante.

Bien que ce phénomène d'échappement constitue le principal obstacle à la réussite de l'hormono-thérapie, les mécanismes impliqués dans cette évolution sont encore très mal connus. Ceci rend indispensable la compréhension des voies de signalisation impliquées d'une part dans l'androgéno-dépendance des cellules cancéreuses prostatiques et d'autre part dans leur évolution vers l'androgéno-indépendance.

Des travaux antérieurs du laboratoire d'accueil ont montré dans le cadre du cancer du sein que les cellules tumorales peuvent transformer les précurseurs surrénaliens en composés actifs (oestrogènes). De ce fait, les précurseurs surrénaliens peuvent promouvoir la prolifération tumorale (Le Bail et al., 2002). Dans ce contexte, l'un de ces précurseurs, le Sulfate de

Déhydroépiandrostérone (S-DHEA), est d'une importance particulière car sa concentration plasmatique physiologique est de loin la plus élevée parmi tous les stéroïdes. Il représente donc potentiellement un important réservoir d'hormones actives, notamment vis-à-vis de la prostate. Si le concept d'Intracrinologie est unanimement admis dans le cancer de la prostate, peu d'études ont renseigné de l'effet des précurseurs surrénaliens, en particulier du S-DHEA, sur des modèles de carcinome prostatique androgéno-dépendant.

Ainsi, notre premier objectif a été de déterminer le rôle des précurseurs surrénaliens sur des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes, la lignée LNCaP, d'une part à travers une étude exhaustive et dynamique de leur métabolisme par ces cellules, et d'autre part à travers une analyse de leur effet sur la prolifération cellulaire.

Enfin, les limites de l'hormono-thérapie imposent d'approfondir la compréhension des mécanismes par lesquels les androgènes contrôlent la prolifération, mais aussi la différenciation des cellules épithéliales prostatiques. La connaissance des voies de signalisation impliquées ou des cibles transcriptionnelles des androgènes *via* l'AR serait d'une grande utilité, tant du point de vue fondamental que dans le domaine de la recherche clinique, puisque ces voies ou ces médiateurs de l'effet des androgènes pourraient constituer autant de marqueurs et/ou de cibles thérapeutiques potentiels.

Nous avons donc dans une seconde partie étudié les mécanismes par lesquels les androgènes contrôleraient la prolifération des cellules LNCaP, en nous intéressant en particulier à un phénomène déjà décrit mais très mal connu d'inhibition de la prolifération induite par les androgènes sur cette lignée. Ce développement de notre travail nous a conduit à analyser la régulation du cycle cellulaire par les androgènes, et à identifier des régulateurs du cycle dont les androgènes modulent l'expression. Enfin, nous avons montré que le proto-oncogène c-myc occupe une place importante dans ce système, en tant que médiateur de l'effet des androgènes, et nous avons analysé, au niveau moléculaire, les mécanismes d'action de l'AR sur la transcription de ce gène-cible. Nous avons ainsi émis des hypothèses mécanistiques d'une part sur les voies de signalisation impliquées dans le contrôle androgénique de la prolifération cellulaire, et d'autre part sur les mécanismes moléculaires de la répression de la transcription de c-myc par l'AR en présence d'androgènes.

INTRODUCTION

I. LES ANDROGENES

I.1- Présentation générale

La famille des stéroïdes regroupe plusieurs catégories d'hormones, qui ont pour point commun d'être synthétisées à partir du cholestérol prélevé dans la circulation sanguine. Les tissus responsables de la stéroïdogénèse sont les cortico-surrénales, les testicules et les ovaires. Les gluco-corticostéroïdes (cortisol et corticostérone) et les minéralo-corticostéroïdes (aldostérone) sont synthétisés dans les cortico-surrénales. Les oestrogènes (oestrone, 17 β -oestradiol ou E2) proviennent de l'aromatisation de certains androgènes (la Δ 4-androstènedione et la Testostérone), qui a lieu essentiellement dans les ovaires. Enfin, les androgènes sont divisés en 2 classes : les androgènes surrénaliens (la déhydroépiandrostérone ou DHEA, son ester sulfate, le S-DHEA et la Δ 4-androstènedione), qui sont produits dans la cortico-surrénale, et les androgènes d'origine testiculaires (la Testostérone et la Dihydrotestostérone ou DHT). La structure des principaux androgènes mentionnés figure en Annexe I.

I.2- Biosynthèse et bio-transformations des androgènes surrénaliens et testiculaires

I.2-1. Des androgènes surrénaliens aux androgènes actifs

A partir du cholestérol, les zones fasciculée et réticulée du cortex surrénalien dirigent la synthèse des androgènes surrénaliens (DHEA, S-DHEA et Δ 4-androstènedione), sous le contrôle de l'ACTH hypophysaire (corticotrophine, ou Adenocorticotropique Hormone). Ces androgènes précurseurs sont libérés dans la circulation, par laquelle ils atteignent (entre autres) les testicules. Dans ce 2^o tissu stéroïdogène, ces précurseurs sont transformés essentiellement en Testostérone (et accessoirement en E2), sous le contrôle de la LH (hormone lutéinisante ou Luteinizing Hormone) hypophysaire. La testostérone sécrétée est relarguée dans le sang, où elle est véhiculée dans la fraction plasmatique, soit sous forme libre, soit sous forme liée à des protéines plasmatiques plus ou moins spécifiques (Albumine, Sex Hormon Binding Globulin ou SHBG (Anderson, 1974)), les formes libre et liée étant en équilibre réversible continu. La Testostérone est ainsi distribuée dans les différents tissus-cibles périphériques, où elle exerce son effet biologique.

Dans certains tissus, dont la prostate, l'hormone active n'est pas la Testostérone, mais son métabolite réduit, la 5 α -Dihydrotestostérone ou DHT (Siiteri & Wilson, 1970).

La formation de ces composés nécessite la présence d'enzymes spécifiques.

La DHEA et le S-DHEA sont en équilibre réversible par le jeu des sulfo-transférases et sulfatases. La DHEA est ensuite oxydée irréversiblement par la 3 α -hydroxystéroïde déhydrogénase/ Δ 5,4 oxostéroïde isomérase, pour donner la Δ 4-androstènedione. Dans les testicules, la réduction de la Δ 4-androstènedione, par la 17 α -Hydroxystéroïde oxydo-réductase (17 α -HSOR) donne la Testostérone.

Alternativement, la Δ 4-androstènedione peut également être transformée de façon, irréversible en 5 α /5 α -Androstanedione par la 5 α /5 α -Réductase, et cette enzyme convertit aussi la Testostérone en DHT. Pour une revue complète de ces enzymes, voir (Bartsch et al., 1990; Baulieu, 1978).

I.2-2. Bio-transformations et élimination des androgènes

Dans l'organisme, le catabolisme des androgènes met en jeu une série de réductions et d'hydroxylations, et finalement la conjugaison d'un stéroïde avec un acide (glucuronique ou sulfurique). Les composés hydrosolubles ainsi formés sont éliminés, souvent par voie urinaire (Baulieu, 1978).

Les différentes enzymes mentionnées précédemment sont donc impliquées elles aussi dans le catabolisme des androgènes. Par exemple, une partie de la DHEA plasmatique est métabolisée en Δ 4-androstènedione au niveau du foie, qui est le principal organe du catabolisme des androgènes. Le foie forme donc aussi une certaine quantité de Testostérone, importante chez la femme, mais négligeable chez l'homme au regard de la production testiculaire.

Enfin, la 5 α /5 α -DHT est transformée en 3 α /3 α -5 α /5 α -Androstanediols, grâce à une 3 α /3 α -Hydroxystéroïde-déhydrogénase (3 α /3 α -HSD).

Une voie alternative du catabolisme des androgènes passe par la réduction de la 5 α /5 α -Androstanedione soit en Androstérone (3 α -5 α) soit en Etiocholanolone (3 α -5 α) par la 3 α -HSD.

Les 3 α -Androstanediols peuvent eux aussi être oxydés en position 17 α pour donner soit de l'Androstérone, soit de l'Etiocholanolone.

Les Androstanediols, l'Androstérone et l'Etiocholanolone sont des substrats majeurs pour les enzymes de conjugaison, glucuronosyl-transférases ou sulfo-transférases, et ils peuvent être poly-conjugués.

I.3- Notion d'Intracrinologie □ importance des précurseurs surrénaliens

I.3-1. Le principe de l'Intracrinologie

Chez l'homme, l'orchidectomie (castration) provoque une réduction de 95% des taux de testostérone plasmatique. On a donc longtemps cru que les testicules étaient chez l'homme la seule et unique source d'androgènes actifs (testostérone, DHT). Mais la concentration de DHT plasmatique ne reflète pas forcément la concentration intra-prostatique.

Ainsi, il a été montré chez l'homme que la castration provoque une diminution de seulement 50 à 70% des concentrations plasmatiques des principaux métabolites de la DHT (Androstanediols, Androstérone et leurs conjugués), suggérant que les testicules ne fournissent en fait que 30 à 50% de la DHT totale (Brochu et al., 1987).

Par la suite, le groupe de Labrie a démontré, chez le rat castré, que les cellules prostatiques sont capables de transformer elles-mêmes les androgènes surrénaliens (DHEA et $\Delta 4$ -androstènedione) en DHT (Labrie et al., 1988). Dans ce système, la DHT agit directement dans la cellule où sa synthèse a eu lieu, sans être libérée dans le milieu extracellulaire d'où la notion d'effet Intracrine, par opposition aux modes autocrine, paracrine et endocrine, dans lesquels une hormone agit à la surface de la cellule productrice (action autocrine), sur les cellules voisines (action paracrine), ou sur un organe distant qu'elle atteint *via* la grande circulation (action endocrine). La Figure 1 schématise le principe d'Intracrinologie.

Ce concept d'Intracrinologie est maintenant clairement admis les précurseurs surrénaliens (DHEA, $\Delta 4$ -Androstènedione), sont transformés par les testicules en androgènes, et par les ovaires en oestrogènes, mais certains tissus-cibles périphériques, dont la prostate fait partie, peuvent également effectuer eux-mêmes ces biotransformations, s'ils disposent des enzymes nécessaires. Les androgènes actifs sont donc formés dans et par la cellule-cible, où ils exercent alors directement leur effet biologique (Adams, 1985; Labrie et al., 1988; Labrie et al., 1993b). Les androgènes d'origine testiculaire ne représentent en fait que 60% des androgènes totaux chez l'homme. Par conséquent, après élimination des androgènes testiculaires, la concentration intra-prostatique en DHT représente environ 40% (et non 5%) de celle mesurée chez des hommes non castrés du même âge (Labrie et al., 1993a).

Notons que ce système intracrine est un mode d'action «économique», qui requiert un minimum d'hormone formée pour un maximum d'effet dans le système endocrine, la circulation systémique est impliquée, d'où un effet retardé, et les hormones sont fortement dégradées (passage dans le foie et les reins), d'où la nécessité d'une grande production pour que seule une petite fraction atteigne le tissu-cible.

Ce concept confère donc aux androgènes surrénaliens une importance considérable. On sait maintenant que de nombreux tissus périphériques (prostate, sein, endomètre, tissu adipeux, peau, placenta, cerveau) expriment les enzymes de la stéroïdogénèse (3 β /3 α -HSD, 5 β /5 α -Réductase, 17 β -HSOR, Aromatase), et sont capables d'effectuer cette biosynthèse locale d'androgènes et/ou d'oestrogènes (Labrie et al., 1993b). Les profils d'expression de ces enzymes dans différents organes crée donc un ensemble particulier de tissus plus ou moins indépendants des principaux organes de la stéroïdogénèse.

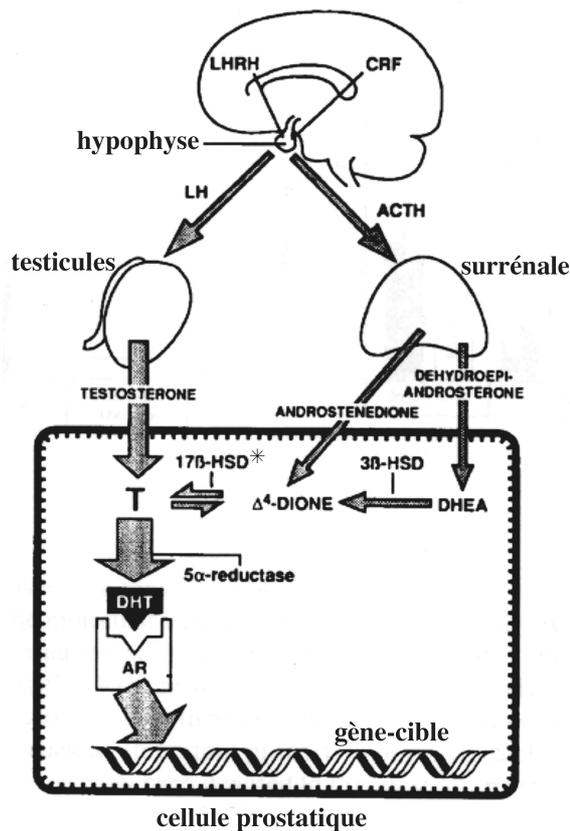


Figure 1 Schéma représentant le principe de l’Intracrinologie dans une cellule prostatique chez l’homme non castré.

Dans l’hypophyse, la LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone ou gonadolibérine) et le CRF (Corticotropin-Releasing Factor ou corticolibérine) d’origine hypothalamique, dirigent la production respectivement de LH et d’ACTH. La LH stimule la synthèse de la Testostérone par les testicules, tandis que l’ACTH dirige la synthèse des précurseurs surrénaliens (DHEA, S-DHEA et Δ^4 -Androstènedione). Dans la cellule prostatique, la Testostérone est transformée en DHT, mais ces cellules utilisent aussi directement les androgènes surrénaliens pour former la Δ^4 -Androstènedione, la Testostérone, et enfin la DHT. Celle-ci se lie spécifiquement au Récepteur aux Androgènes (AR) pour activer la transcription de gènes-cibles. * 17β -HSD= 17β -HSOR dans le texte. D’après (Labrie et al., 1993b).

I.3-2. Importance des androgènes surrénaliens

Non seulement les androgènes surrénaliens sont des précurseurs d’androgènes actifs dans la prostate, mais ils ont aussi la particularité d’être présents en très grande quantité dans le sang, en particulier le S-DHEA dont la concentration plasmatique est de l’ordre de $1-5\mu\text{M}$ (Orentreich et al., 1984).

L’espèce humaine, ainsi que certaines espèces de primates, sont les seules à présenter des taux d’hormones surrénaliennes aussi élevées les taux plasmatiques de S-DHEA étant 100 à 500 fois plus élevés que ceux de la Testostérone (Baulieu, 1960; Belanger et al., 1989), le S-DHEA constitue donc un réservoir essentiel de substrat pouvant être converti en androgènes dans la prostate et les autres tissus périphériques.

La seconde particularité du S-DHEA est que sa concentration plasmatique diminue avec l'âge. Elle atteint son maximum entre 20 et 30 ans (1500-5500ng/ml chez l'homme, 1000-5000ng/ml chez la femme), puis diminue progressivement jusqu'à atteindre 300-2000ng/ml seulement au-delà de 60 ans (Orentreich et al., 1984). Malgré cette importante diminution, la concentration en S-DHEA chez l'homme et la femme âgés n'en demeure pas moins très élevée par rapport aux autres hormones. Concernant la DHEA, sa concentration augmente aussi jusqu'à l'âge de 20-24 ans (5-10ng/ml), mais sa diminution chez les personnes âgées est moins marquée et plus variable d'un individu à l'autre (1-5ng/ml) (Sulcova et al., 1997).

Cette diminution de la concentration plasmatique en S-DHEA a conduit des auteurs à envisager la possibilité que certains dysfonctionnements ou troubles liés à l'âge pourraient être réduits par une supplémentation en DHEA, de façon à restaurer les concentrations plasmatiques en S-DHEA à un niveau proche de celui du jeune adulte. Les travaux de Morales et al., ou de l'équipe du Pr. Baulieu ont montré que la supplémentation en DHEA à 50mg/jour sur 6 à 12 mois améliore considérablement un certain nombre de paramètres liés à l'âge. Notamment la libido, l'élasticité de la peau, la structure de l'os, et amène surtout un sentiment psychologique de « Bien-être » général (Baulieu et al., 2000; Morales et al., 1994).

I.4- Fonction physiologique des androgènes – un aperçu

Les androgènes surrénaliens sont souvent qualifiés de « précurseurs surrénaliens », pour accentuer l'idée qu'ils n'ont pas d'activité biologique propre, et constituent uniquement un réservoir circulant pour la synthèse locale des androgènes actifs.

Les androgènes « actifs » (Testostérone, DHT) ont en revanche des effets biologiques considérables. Ils exercent des effets trophiques sur les organes sexuels secondaires mâles (prostate, vésicules séminales) dont ils dirigent le développement, et ils contrôlent également la spermatogénèse au niveau des tubes séminifères. Ils permettent le développement du canal de Wolff au cours de l'embryogénèse, la différenciation fonctionnelle de l'hypothalamus, ils ont un effet anabolisant essentiel sur les muscles squelettiques et l'os, et présentent également un effet stimulant sur l'érythropoïèse.

Le mécanisme d'action cellulaire des androgènes se distingue par l'importance du métabolisme local de la testostérone au niveau des organes-cibles.

Dans certains tissus (prostate, vésicules séminales, peau) la testostérone est réduite en DHT, et c'est alors la DHT qui constitue l'hormone active, alors que la Testostérone n'est qu'une pré-hormone. A l'inverse, dans d'autres organes (reins, muscles), la quantité de DHT formée est négligeable, et l'hormone active est alors la Testostérone.

Une partie ultérieure de cette section sera consacrée spécifiquement à l'état des connaissances sur la fonction des androgènes dans la prostate normale et pathologique (chapitre II).

Les androgènes exercent la plupart de leurs effets en se liant à un récepteur spécifique, le Récepteur aux Androgènes (AR) que nous allons maintenant décrire.

I.5- Le Récepteur aux Androgènes (AR)

I.5-1. Présentation et structure de la protéine

L'AR appartient à la grande famille des récepteurs nucléaires, qui sont des facteurs de transcription activés par leur ligand spécifique. Cette famille des récepteurs nucléaires rassemble également les récepteurs aux oestrogènes (ER), à la progestérone (PR), aux glucocorticoïdes (GR), aux minéralo-corticoïdes (MR), aux rétinoïdes (RAR, RXR), aux hormones thyroïdiennes (TR), à la vitamine D3 (VDR), et d'autres pour lesquels le ligand endogène est encore inconnu.

La séquence de l'ADNc de l'AR humain et murin a été établie en 1988 (Chang et al., 1988; Tan et al., 1988; Trapman et al., 1988).

Le gène codant pour l'AR est localisé sur le chromosome X (région q11-12), il comporte 8 exons codants et son organisation structurale est similaire à celle des autres récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Brinkmann et al., 1989; Brown et al., 1989). Il code pour une protéine de 900-920 acides aminés (Chang et al., 1988; Tilley et al., 1989), dont le poids moléculaire calculé est d'environ 98kD, mais qui migre sur gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) comme une protéine de 110kD en raison de sa phosphorylation (van Laar et al., 1989).

Comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, l'AR est divisé en 4 domaines structuraux et fonctionnels (Jenster et al., 1991; Simental et al., 1991; Zhou et al., 1994) (Figure 2).

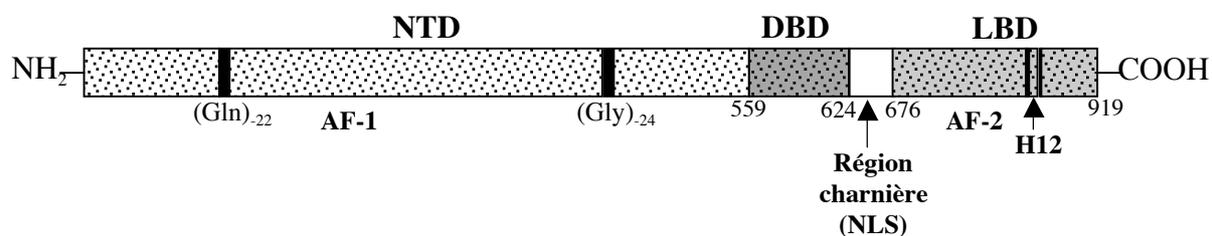


Figure 2 Schéma des domaines fonctionnels de l'AR humain.

L'AR humain contient environ 919 acides aminés, mais le nombre pour un individu donné peut varier de 900 à 920. NTD = domaine amino-terminal, DBD = domaine de liaison à l'ADN, LBD = domaine de liaison au ligand, la région charnière entre le DBD et le LBD comporte un signal de localisation nucléaire (NLS). La fonction d'activation AF-1 réside dans le NTD, et la fonction d'activation AF-2 réside dans le LBD. La localisation approximative de l'hélice 12 dans le LBD est indiquée, ainsi que les sites poly-glutamine (Gln)₂₂ et poly-glycine (Gly)₂₄ du NTD. Les domaines individuels ne sont pas à l'échelle.

1) Le domaine amino-terminal (NTD) contient les séquences d'acides aminés responsables de la transactivation des gènes-cibles. La transactivation est surtout médiée par le domaine AF-1, contrairement aux autres récepteurs nucléaires pour lesquels la région AF-2, située dans le LBD, prédomine. La fonction AF-2 de l'AR est faible, et n'est active qu'en conjonction avec AF-1. La fonction de transactivation du récepteur nécessite une interaction

ligand-dépendante entre le NTD et le LBD. Cette région amino-terminale comporte également de nombreux sites de phosphorylation (Ser81, Ser94, Ser650 entre autres), dont la fonction est encore mal définie, mais qui pourraient contribuer à la stabilité et à l'accumulation de l'AR (Jenster et al., 1994; Kempainen et al., 1992; Kuiper et al., 1993; Nazareth & Weigel, 1996), ou encore à l'effet agoniste ou antagoniste d'un ligand (Wang et al., 1999). Enfin, ce domaine révèle également un polymorphisme au niveau des sites poly-glutamine (15 à 31 résidus répétés) et poly-glycine (16 à 27 résidus répétés). La longueur du fragment poly-glycine dans la population mâle normale dépend en partie de la race et du groupe ethnique. Un fragment poly-glutamine anormalement long (42-62 résidus répétés) cause une atrophie musculaire dégénérative nommée maladie de Kennedy (La Spada et al., 1991), et provoque une réduction de la fonction de transactivation de l'AR (Tut et al., 1997). A l'inverse, un fragment poly-glycine ou poly-glutamine anormalement court est associé à une augmentation de la fonction de transactivation de l'AR (Beilin et al., 2000) et à une pré-disposition au cancer de la prostate (Giovannucci et al., 1997). Les raisons pour lesquelles ce polymorphisme affecte l'activité ou le niveau d'expression de l'AR sont encore obscures.

2) Le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain, ou DBD), contient 2 structures en «doigts de zinc», caractéristiques des récepteurs nucléaires, qui permettent la liaison du récepteur avec les éléments de réponse spécifiques des gènes-cibles, et favorisent la dimérisation de l'AR. La structure en doigt de zinc la plus proche du NTD détermine la spécificité de la liaison à la séquence d'ADN (Zilliacus et al., 1995), alors que la seconde contribue en plus à stabiliser le complexe ADN-récepteur et le dimère récepteur-récepteur (Dahlman-Wright et al., 1993). La région spécifique du promoteur sur laquelle se lie l'AR dimérisé est un Élément de Réponse aux Androgènes ou ARE.

3) Le domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain, ou LBD) est situé à l'extrémité carboxy-terminale. Ce domaine contribue également à la dimérisation du récepteur, à la répression de la transactivation, et probablement, avec le domaine N-terminal, à l'interaction avec des cofacteurs et avec le complexe de pré-initiation de la transcription. Les analyses de la structure tridimensionnelle du LBD de l'AR ont établi que ce domaine comporte 12 hélices α (Matias et al., 2000; Sack et al., 2001), et une poche hydrophobe de liaison au ligand. Lorsque l'AR n'est pas lié à son ligand, l'hélice 12, la plus externe, est éloignée de la poche de liaison. L'insertion du ligand agoniste provoque un changement de conformation tel que l'hélice 12 revient au-dessus du site de liaison du ligand, en le piégeant, et en exposant un sillon qui interagit alors avec le NTD. L'interaction entre le NTD et le LBD permet également la liaison d'un co-activateur sur le NTD, et cette liaison joue un rôle important dans l'activation de l'AR en réponse à l'agoniste (He et al., 1999; Ikonen et al., 1997).

4) La région charnière, entre le LBD et le DBD, contient un site de localisation nucléaire (NLS), nécessaire à la translocation de l'AR du cytoplasme vers le noyau.

I.5-2. Les anti-androgènes

Ce sont des ligands synthétiques qui interfèrent, suivant différents modes, avec l'effet biologique des androgènes. Ils sont utilisés en clinique pour le traitement de nombreuses pathologies androgéno-dépendantes (acné, alopecie, hirsutisme) et surtout pour le traitement du cancer prostatique hormono-dépendant (Namer, 1988).

Il existe des anti-androgènes stéroïdiens, comme le Cyprotérone Acétate (CPA) ou le RU486 (Mifepristone), et des anti-androgènes non stéroïdiens, comme le Flutamide (ou son métabolite actif, l'hydroxy-flutamide), le Nilutamide (Anandron ou RU23908) ou le Bicalutamide (ICI 176334 ou Casodex). Ces différents anti-androgènes sont actuellement utilisés dans le domaine clinique, avec une préférence pour les anti-androgènes non stéroïdiens, dont les effets secondaires sont plus limités et mieux tolérés. La structure de ces principaux anti-androgènes figure en Annexe I.

Des études de liaison à l'AR et de compétition avec le R1881 radiomarqué ont permis de déterminer l'IC50 des anti-androgènes par rapport à l'AR, et d'en déduire leur Affinité Relative de Liaison (RBA) par rapport au R1881. Ainsi, il a été montré que les RBA des principaux anti-androgènes sont classées de la façon suivante : R1881 100% > CPA 5,64% > Hydroxy-flutamide 0,44% >> Bicalutamide (<<0,16%) (Song et al., 2004; Veldscholte et al., 1992a). Sachant que le R1881 présente un Kd de l'ordre de 0,1nM vis-à-vis de l'AR sauvage, ces données suggèrent donc que les affinités des anti-androgènes sont véritablement faibles en comparaison avec le R1881.

Il faut savoir que le CPA, le RU-486, et dans une moindre mesure l'Hydroxy-Flutamide présentent des effets antagonistes et agonistes partiels sur l'activité transcriptionnelle de l'AR sauvage (Kuil et al., 1995; Kuil & Mulder, 1994; Song et al., 2004), et ils ont également des effets partiels sur les récepteurs à la Progestérone ou aux Glucocorticoïdes. Ils ne sont donc pas considérés comme des anti-androgènes purs. A l'inverse, les anti-androgènes non stéroïdiens (Nilutamide et Bicalutamide) sont des anti-androgènes purs (Furr et al., 1987; Neumann & Topert, 1986; Raynaud & Ojasoo, 1986).

Par ailleurs, certaines mutations de l'AR ont un impact énorme sur l'effet biologique des anti-androgènes, et ceci est d'une importance fondamentale dans la fonction biologique de l'AR. Par exemple, la lignée de cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate, (Horoszewicz et al., 1983)) possède un AR fonctionnel, dont le gène est muté sur le codon 877 (ACG-GCT) ce qui conduit au remplacement d'un résidu Thréonine par un résidu Alanine dans la protéine (Veldscholte et al., 1990a; Veldscholte et al., 1990b). Cette substitution d'un seul acide aminé, situé dans le LBD du récepteur, a un effet considérable sur la spécificité du récepteur vis-à-vis de différents ligands, et donc sur sa fonction de transactivation. L'AR muté a un spectre de liaison plus large, il peut se lier avec une affinité accrue aux Oestrogènes, à la Progestérone ou aux androgènes surrénaliens (Schuurmans et al., 1990; Veldscholte et al., 1990a; Veldscholte et al., 1990b). Par ailleurs, il présente, par rapport à l'AR sauvage, une affinité plus élevée pour la plupart des anti-androgènes, dont le CPA et l'hydroxy-Flutamide, et ces anti-androgènes ont alors un effet agoniste beaucoup plus fort en termes de transactivation (Song et al., 2004; Veldscholte et al., 1992b). L'hydroxy-Flutamide ou le CPA sont des agonistes/antagonistes mixtes vis-à-vis de cet AR muté. Ils sont capables d'augmenter l'activité d'un gène rapporteur *via* l'AR muté, de stimuler l'expression de l'ARNm du PSA et la prolifération cellulaire, mais ils conservent également le pouvoir d'antagoniser l'effet positif de la DHT sur l'expression du PSA dans les cellules LNCaP (Montgomery et al., 1992; Young et al., 1991).

Seuls le Bicalutamide et le RU486 présentent des affinités de liaison identiques pour l'AR sauvage ou muté, et le Bicalutamide conserve son pouvoir antagoniste (Song et al., 2004; Veldscholte et al., 1992a).

Cette mutation n'a pas été trouvée uniquement dans les cellules LNCaP, mais aussi dans d'autres modèles de cancer prostatique. L'AR des cellules MDA PCa 2a (issues de métastases osseuses) présente 2 mutations, l'une est identique à celle des cellules LNCaP, l'autre est aussi une substitution d'un acide aminé du LBD (Leu701His), et l'activité transcriptionnelle

de cet AR est induite par la Progestérone (Zhao et al., 1999). Ce type de mutation a également été retrouvée dans des tumeurs prostatiques hormono-indépendantes, c'est-à-dire chez des patients ayant échappé à la thérapie anti-hormonale, ce qui souligne son importance fonctionnelle (Taplin et al., 1995).

Les mécanismes par lesquels les anti-androgènes inhibent l'activité de l'AR sont instructifs de la façon dont les androgènes eux-mêmes activent leur récepteur. Le modèle actuel est que les anti-androgènes peuvent lier l'AR mais ne permettent pas complètement les modifications structurales nécessaires à la dimérisation du récepteur, à sa liaison à l'ADN et/ou, selon l'anti-androgène, à son interaction avec des co-activateurs transcriptionnels. Ils agissent à différents niveaux dans la cascade d'événements qui suit leur liaison à l'AR.

Ainsi, le CPA induit la dimérisation et la liaison à l'ADN, tandis que l'hydroxy-flutamide inhibe la dimérisation et la liaison à l'ADN induites par la DHT (Wong et al., 1993). Kuil & Mulder ont montré que le RU486 permet la liaison de l'AR à l'ADN, mais cette liaison est sans effet sur la transactivation (Kuil & Mulder, 1996).

Berrevoets et al. ont aussi montré que l'activité agoniste partielle du RU486 sur l'activité de l'AR, dans les cellules CHO, peut être complètement abolie par une sur-expression d'un co-répresseur (NCoR), alors que cette sur-expression n'a pas d'effet sur l'activité de l'AR induite par le R1881 (Berrevoets et al., 2004).

Lorsque le Bicalutamide (Casodex) est lié à l'AR, l'hélice 12 du LBD reste en retrait vis-à-vis de la poche d'interaction au ligand, créant ainsi une structure qui ne permet pas l'interaction du récepteur avec le co-activateur, mais qui permet à l'inverse l'interaction de l'AR avec les co-répresseurs (NCoR, SMRT), provoquant ainsi une inhibition de la fonction transactivatrice de l'AR (Wang et al., 2001). D'autres travaux ont montré que l'AR lié au Bicalutamide est capable de transloquer dans le noyau, de se lier *in vivo* à l'ADN sur le promoteur du PSA, mais l'AR se trouve alors dans un état transcriptionnellement inactif, car l'interaction du LBD et du NTD est abolie (Masiello et al., 2002). Le Bicalutamide exerce également son rôle antagoniste en empêchant la phosphorylation de l'AR (Wang et al., 1999), ou en permettant une dégradation plus rapide de l'AR (Waller et al., 2000). Il empêche également la dissociation entre l'AR et les protéines chaperonnes (HSP 90, (Veldscholte et al., 1992a)), ce qui maintient l'AR dans une conformation inactive (Georget et al., 2002). Enfin, il a aussi été montré que la liaison de la DHT, mais pas celle du CPA, peut protéger un fragment du LBD dans un test de protéolyse ménagée, suggérant que la liaison d'un agoniste induit un changement conformationnel spécifique dans le LBD, le rendant résistant à la protéolyse, ce qui n'est pas le cas pour le CPA (Kallio et al., 1994).

Ces données ont donc fait émerger l'idée selon laquelle les agonistes et les antagonistes de l'AR et des autres récepteurs nucléaires affectent la conformation du récepteur ce qui, en retour, altère différentiellement l'interaction du récepteur avec des co-activateurs, des co-répresseurs ou d'autres composants de la machinerie transcriptionnelle (Allan et al., 1992). La structure d'un ligand, agoniste ou antagoniste, a donc un impact majeur sur la conformation du récepteur et par conséquent sur son activité.

I.5-3. Mécanismes de l'activation de l'AR

En absence d'androgènes, l'AR inactif est sequestré dans le cytoplasme cellulaire sous forme d'un complexe multi-protéique dans lequel il est associé à des protéines HSP (Heat Shock Protein) qui interagissent avec le LBD de l'AR (Marivoet et al., 1992). Les protéines

HSP auraient un rôle de chaperonnes, et seraient impliquées dans le maintien d'une structure accessible au ligand. La liaison de l'AR avec son ligand entraîne sa dissociation du complexe protéique, il subit alors un changement de conformation et une homo-dimérisation permettant l'exposition du NLS et ainsi la translocation du complexe ligand-récepteur dans le noyau de la cellule (Tyagi et al., 2000).

Dans le cas général des récepteurs nucléaires, des controverses subsistent concernant la localisation (cytoplasmique/nucléaire) du récepteur en absence de ligand.

Dans le cas spécifique de l'AR, une localisation cytoplasmique périnucléaire (Kemppainen et al., 1992) et une localisation nucléaire (Jenster et al., 1991) ont été rapportées dans des cellules transfectées en absence d'androgènes. Dans des cellules épithéliales de prostate ventrale de rat, la castration n'a pas d'effet sur la localisation nucléaire de l'AR (Husmann et al., 1990). La mise en évidence de la localisation intracellulaire de l'AR nécessitant l'utilisation d'anticorps, une lyse ou une perméabilisation des cellules pouvant introduire des artefacts, des travaux ont été effectués en transfectant des cellules avec une protéine chimère AR-GFP, résultant de la fusion entre l'AR et la Green Fluorescent Protein. Cette protéine de fusion ne modifierait pas les caractéristiques de l'AR (affinité pour le ligand, fonction de transactivation). Ces travaux sur des cellules vivantes ont montré que l'AR-GFP, transfecté dans des cellules COS-7, est majoritairement cytoplasmique en absence de ligand, et est transloqué dans le noyau après l'addition de R1881 (androgène synthétique) ou de DHT de façon ligand- et dose-dépendante (Georget et al., 1997). Des différences ont également été observées dans la localisation nucléaire de l'AR en réponse à un traitement androgénique ou anti-androgénique (Tomura et al., 2001; Tyagi et al., 2000).

L'AR transcriptionnellement actif s'accumule ensuite dans un compartiment sub-nucléaire (nuclear foci) où il interagit au niveau de séquences d'ADN spécifiques (ARE) à proximité du promoteur de gènes-cibles.

Il recrute alors un grand nombre de protéines pour former un complexe protéique capable d'interagir à son tour avec d'autres médiateurs transcriptionnels ou avec la machinerie transcriptionnelle basale pour moduler la transcription du gène-cible. Les co-régulateurs connus de l'AR ne possèdent pas la capacité de se lier directement à l'ADN. Par contre, l'AR peut aussi interagir avec différents Facteurs Généraux de Transcription (GTF), qui, eux, peuvent directement se lier à l'ADN.

I.5-4. Interaction de l'AR avec les Facteurs Généraux de Transcription (GTF)

D'une façon générale, l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires aboutit au recrutement, sur le promoteur du gène-cible, de la RNA Polymérase II, qui synthétise la majorité des ARN dans les cellules de mammifères. Le recrutement de la RNA Polymérase II est médié par l'assemblage des GTF pour former le complexe de pré-initiation de la transcription. La première étape est la liaison de la TBP (Tata-box Binding Protein) au niveau du site d'initiation de la transcription. TBP fait partie d'un complexe multi-protéique (TFIID) qui contient également différents facteurs associés à la TBP (les protéines TAF_{II}). Ceci induit le repliement de l'ADN, de façon à rapprocher de la boîte TATA les régions régulatrices plus distantes, et ce pour favoriser les interactions entre les GTF et le complexe récepteur-ligand-co-régulateur. Le complexe TFIIB se lie alors à la TBP, pour recruter ensuite le complexe TFIIF-RNA polymérase II. TFIIE, qui possède une activité ATPase et kinase, ainsi que l'Hélicase TFIIH, sont enfin recrutées sur la RNA Polymérase II, pour faciliter la séparation

des brins d'ADN, avant l'initiation de la transcription. TFIIF servira également à l'initiation et à l'élongation. Pour une revue détaillée voir (Lee & Chang, 2003).

Les récepteurs nucléaires sont donc capables d'interagir directement avec les GTF, mais ces derniers ne sont pas considérés comme des co-régulateurs, car ils influencent aussi le taux basal de transcription, de façon récepteur-indépendante.

Nous ne citerons ici que quelques exemples d'interactions entre l'AR et les GTF, pour illustrer l'importance de ces interactions sur l'effet biologique de l'AR. La Figure 3 schématise l'interaction de l'AR avec les différents GTF pour activer la transcription d'un gène-cible.

Il a été montré que le domaine NTD de l'AR est capable de recruter directement le complexe TFIIF (McEwan & Gustafsson, 1997), ainsi que TFIIH (Lee et al., 2000). TFIIH est un complexe constitué d'un cœur de 6 sous-unités (p89, p80, p62, p52, p44 et p34) et d'un ensemble protéine kinase CAK, elle-même composée de 3 sous-unités catalytiques (MAT1, cycline H et cdk7). Des expériences d'immunoprécipitation de l'AR et de la CAK endogènes des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP, ont montré que l'AR interagit avec cdk7, et des expériences de cotransfection dans des cellules cancéreuses prostatiques ont montré que l'interaction de l'AR et de la CAK augmente l'effet transcriptionnel de l'AR en réponse aux androgènes (Lee et al., 2000). On peut penser, mais cela n'a pas été prouvé, que la modulation de l'activité de l'AR par la CAK pourrait être médiée par la phosphorylation de l'AR, comme cela a été montré pour le Récepteur aux Rétinoïdes RAR α (Rochette-Egly et al., 1997), ou pour le Récepteur aux Oestrogènes ER α (Chen et al., 2000). D'ailleurs, des travaux ont montré que la phosphorylation de l'AR joue un rôle dans la régulation de son activité transcriptionnelle (Weigel, 1996). L'hypothèse alternative serait que l'interaction entre l'AR et TFIIH favoriserait la phosphorylation d'une sous-unité de la RNA polymérase II, ce qui faciliterait la transition du mode «Initiation» de la transcription au mode «Elongation» proprement dite (Lee et al., 2001).

En outre il a également été montré (co-immunoprécipitation et essai GST Pull-Down) que l'AR peut interagir directement avec une autre des sous-unités de la RNA polymérase II (nommée RPB2) ce qui accélère le passage à l'étape d'élongation (Lee et al., 2003). Enfin, une étude a montré l'interaction ligand-dépendante entre l'AR (domaine AF-2) et une des sous-unités du complexe TRAP-DRIP (faisant partie lui-même du complexe de la RNA Polymérase II), et cette association augmente la transcription médiée par l'AR (Wang et al., 2002).

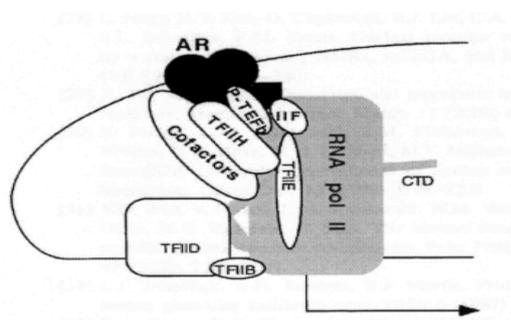


Figure 3 Représentation schématique de l'interaction de l'AR avec les facteurs généraux de la transcription sur le promoteur d'un gène-cible.

L'interaction avec l'AR a été démontrée pour TFIIF, TFIIH, RNA Polymérase II, et pTEFb (facteur de transcription interagissant avec la RNA Polymérase II). CTD = Domaine carboxy-terminal de la RNA Polymérase II. D'après (Lee & Chang, 2003).

L'ensemble de ces données suggère donc qu'une fois que le complexe ligand-AR est lié à son promoteur-cible, il établit lui-même de nombreuses communications avec la machinerie transcriptionnelle, pour accélérer la transition entre l'étape d'initiation et l'étape d'élongation du transcrit. D'autre part, l'AR interagit aussi avec des protéines co-régulatrices (co-activateur ou co-répresseur) qui participent à la régulation de son activité transcriptionnelle.

I.5-5. Interactions de l'AR avec des co-régulateurs

II.5-5.1 Les co-activateurs

Pour une description plus complète de ces co-activateurs et de leur mode d'action, voir (Heinlein & Chang, 2002a). Les co-activateurs de l'AR peuvent être divisés en 2 types fonctionnels.

- Les co-activateurs de type I fonctionnent principalement avec le récepteur au niveau du promoteur du gène-cible, pour faciliter l'occupation de l'ADN, le remodelage de la chromatine, ou le recrutement des Facteurs Généraux de Transcription et de la RNA Polymérase II. Ils serviraient à établir un pont entre le récepteur lié à l'ADN et la machine de transcription. Citons comme exemples, la protéine CBP/p300 (cAMP response element binding protein (CREB)-Binding Protein), ou les protéines SRC-1 et SRC-2/GRIP1/TIF-2 (Steroid Receptor Coactivator-1 et 2 de la famille p160). SRC-1 et CBP/p300 possèdent une activité Histone Acétyl-Transférase (HAT) permettant le remodelage de la chromatine, et sont capables d'interagir avec la machinerie transcriptionnelle basale, notamment TBP et TFIIB (Fronsdal et al., 1998; Ogryzko et al., 1996; Spencer et al., 1997).

La β -caténine, initialement identifiée pour son rôle dans l'organisation du cytosquelette, peut aussi contribuer à la transcription de certains gènes : son accumulation dans le cytoplasme, suite à l'activation de la voie Wnt et à l'inactivation de la GSK3 Kinase lui permet de former, dans le noyau, un complexe avec des facteurs de transcription de la famille Tcf/LEF, et de stimuler l'activation de la transcription des gènes-cibles de Tcf-4 (He et al., 1998; Willert & Nusse, 1998). Mais elle a aussi la capacité d'augmenter l'activité transcriptionnelle de l'AR en réponse aux androgènes, et de réduire l'effet antagoniste du Bicalutamide sur l'AR en présence d'androgènes (Truica et al., 2000). Elle est donc considérée comme un co-activateur de type I.

Parmi les régulateurs du cycle cellulaire, ont également été inclus dans cette catégorie, la protéine Rb, qui augmente l'effet transcriptionnel de l'AR (Lu & Danielsen, 1998; Yeh et al., 1998), ainsi que la cycline E (Yamamoto et al., 2000). La protéine BRCA1 (Park et al., 2000) est également caractérisée comme un co-activateur de l'AR. Les mécanismes d'action physiologique de ces protéines sont encore peu documentés.

- Les co-activateurs de type II agissent essentiellement pour permettre au récepteur d'être compétent à diriger l'expression des gènes-cibles, en modulant directement la conformation du récepteur, sa liaison au ligand, ou en facilitant l'interaction entre le NTD et le LBD. Ces actions peuvent contribuer à stabiliser le complexe ligand-récepteur, ou à influencer la distribution intracellulaire de l'AR, d'où un impact sur son activité finale. Parmi cette catégorie, figurent les protéines ARA, par exemple ARA70 (Yeh & Chang, 1996), ARA55 (Fujimoto et al., 1999), et ARA54 (Kang et al., 1999), ou la filamine, qui favorise la translocation nucléaire (Ozanne et al., 2000).

1.5-5.2 Les co-répresseurs

Si de très nombreux co-activateurs de l'AR ont été identifiés, la situation est différente en ce qui concerne les co-répresseurs, moins bien connus pour l'AR comme pour les autres récepteurs nucléaires. Les co-répresseurs ont été identifiés initialement comme les médiateurs de la répression transcriptionnelle induite par les Récepteurs aux Hormones Thyroïdiennes ou à l'Acide Rétinoïque en absence de leur ligand, ces récepteurs forment un complexe constitué du co-répresseur, du récepteur et des histones déacétylases (HDAC), qui réprime la transcription du gène-cible, et cette répression est abolie en présence du ligand du récepteur. Les co-répresseurs les plus connus sont N-CoR (Nuclear receptor Co-Repressor) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor) (Alland et al., 1997; Guenther et al., 2001; Heinz et al., 1997).

NCoR et SMRT interagissent avec et recrutent, *via* leur domaine N-terminal, des Histones Déacétylases (HDAC), qui déacétylent les résidus lysine des histones (Nagy et al., 1997), ce qui confère à la chromatine une structure très compactée, la rendant inaccessible à la machinerie transcriptionnelle.

Des progrès considérables ont été apportés dans la connaissance des co-répresseurs grâce à la technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP), qui permet d'analyser *in vivo* le recrutement de protéines particulières sur un promoteur endogène donné.

Concernant l'AR, cette technique a permis de montrer que le traitement des cellules LNCaP avec du Bicalutamide induit *in vivo* le recrutement de l'AR, de NCoR et de SMRT ainsi que des HDAC sur le promoteur (ARE I) du PSA (Prostate Specific Antigen, gène-cible typique de l'AR), antagonisant ainsi l'expression du PSA induite par la DHT (Shang et al., 2002). Par ailleurs, une étude utilisant des gènes rapporteurs a montré que la sur-expression de faibles quantités de NCoR réprime l'activité agoniste partielle du CPA sur la transactivation par l'AR, sans affecter l'activité agoniste du R1881 (Berrevoets et al., 2004). A l'inverse, si des quantités plus importantes de NCoR sont exprimées, l'activité transcriptionnelle de l'AR sur un gène rapporteur est réprimée pour tous les ligands, y compris le R1881 (Berrevoets et al., 2004). Cette même étude a montré également que la répression par NCoR de l'effet du R1881 peut être abolie par une sur-expression du co-activateur GRIP1/TIF-2, alors que cette sur-expression reste sans effet sur la répression de l'activité du CPA, suggérant que l'AR lié au R1881 a une préférence d'interaction pour le co-activateur TIF-2, alors que quand il est lié au CPA, il interagit préférentiellement avec NCoR. Ces différences d'interaction en fonction du type de ligand seraient médiées par la conformation tridimensionnelle adoptée par le récepteur selon la structure du ligand.

Enfin, des travaux ont démontré que l'AR peut interagir avec NCoR en présence d'agonistes (Cheng et al., 2002; Fu et al., 2002), et que SMRT peut interagir avec l'AR en absence de ligand (Dotzlaw et al., 2002; Liao et al., 2003), ou en présence de DHT, de R1881 et de CPA (Dotzlaw et al., 2002). Ces dernières données étendent le rôle des co-répresseurs, ils ne sont plus seulement considérés comme les médiateurs de l'effet des antagonistes, mais comme des acteurs participant également au contrôle de l'activité de l'AR en présence d'agonistes ou en leur absence l'hypothèse serait alors qu'ils participent à l'inactivation de l'AR une fois que celui-ci a rempli son rôle sur un promoteur-cible, ou qu'ils contribuent à inactiver l'AR en absence de ligand. Ces mécanismes nécessitent cependant de nombreux éclaircissements.

D'autres protéines ont été identifiées plus anecdotiquement comme interagissant avec l'AR et réprimant son activité ligand-dépendante : la calréticuline, qui inhibe la liaison de

l'AR à l'ADN induite par le R1881 (Dedhar et al., 1994) □ la cycline D1 et la protéine HBO1 qui réduisent également l'activité ligand-dépendante de l'AR (Knudsen et al., 1999; Sharma et al., 2000), ou les protéine SRY (Yuan et al., 2001), AES (Yu et al., 2001), et TR-4 (Lee et al., 1999). Les mécanismes d'action de ces co-répresseurs et leur impact physio-pathologique sont loin d'être décryptés.

I.5-6. Régulation par l'AR de la transcription de gènes-cibles

I.5-6.1 Élément de réponse aux androgènes (ARE)

L'ARE consensus est constitué de 2 demi-sites hexanucléotidiques palindromiques, séparés par 3 nucléotides et localisés en général dans les régions promotrices des gènes-cibles. Cependant, les ARE fonctionnels identifiés sur des gènes-cibles de l'AR peuvent diverger profondément de cette séquence (Tableau 1).

Tableau 1 □ Séquences des ARE fonctionnels de différents gènes régulés par les androgènes.

Gène	Élément de réponse (5'-3')	Référence
PSA, humain, ARE I proximal (brin non codant)	AGCACTtgcTGTTCCT	(Riegman et al., 1991)
PSA, humain, ARE II (brin non codant)	GAGACTcccTGATCC	(Cleutjens et al., 1996)
PSA, humain, ARE III distal (brin non codant)	GATACAataTGTTCCT	(Cleutjens et al., 1997)
Probasine, prostate ventrale rat, proximal (brin non codant)	ATACAAataGGTTCCT	(Rennie et al., 1993)
Probasine, prostate ventrale rat, distal	ATAGCAatcTGTTCCT	(Rennie et al., 1993)
C3, prostate ventrale rat	AGTACGtgaTGTTCCT	(Claessens et al., 1989)
Tyrosine aminotransférase, foie de rat	TGTACAggaTGTTCCT	(Denison et al., 1989)
Sex-limited protein (slp), souris	AGAACAaggcTGTTTC	(Adler et al., 1991)
p21 ^{waf1, cip1} , humain	AGCACGcgaGGTTCCT	(Lu et al., 1999)
Sous-unité □ de LH, humain (brin non codant)	GGTACTtggTGTAAT <i>ARE négatif ligand-dépendant (□)</i>	(Clay et al., 1993)
ARE consensus	GGA/TACAnnnTGTTCCT	(Roche et al., 1992)
MMTV □ distal I	GTTACAaacTGTTCCT	(Ham et al., 1988)
MMTV proximal II	GGTATCaaaTGTTCCT	(Ham et al., 1988)
MMTV proximal III	AGCTCTtagTGTTCCT	(Ham et al., 1988)
MMTV proximal IV	ATTTTCctaTGTTCCT	(Ham et al., 1988)

Dans un contexte génomique naturel, les ARE, pour générer la réponse à l'AR, fonctionnent en conjonction avec d'autres séquences cis-régulatrices sur lesquelles l'AR ne se lie pas directement (Ning & Robins, 1999). Par ailleurs, des études *in vitro* de liaison ADN-protéine et des études de transfection ont également montré que les Récepteurs aux Androgènes, aux Glucocorticoïdes, à la Progestérone et aux Minéralocorticoïdes peuvent reconnaître et se lier à un même élément de réponse de l'ADN, même si dans son environnement physiologique, chaque récepteur présente une forte spécificité dans la reconnaissance de ses gènes-cibles (Adler et al., 1992; Adler et al., 1991; Cato & Weinmann, 1988). La coopération du récepteur avec des facteurs régulateurs *via* des interactions protéine-protéine et/ou protéine-ADN contribue à cette spécificité du récepteur (Robins et al., 1994; Song et al., 1998).

1.5-6.2 Activation ligand-dépendante de la transcription

C'est la fonction la plus connue des récepteurs nucléaires. L'AR lié à son ligand agoniste augmente la transcription du gène-cible sur lequel il est lié. Le DBD interagit avec un ARE du gène-cible, tandis que la fonction d'activation de la transcription est médiée par les domaines AF-1 et AF-2 (AF-1 étant prépondérante). La transcription du gène est réalisée grâce à la RNA Polymérase II, associée à de nombreux cofacteurs (les facteurs de transcription basale, et facteurs généraux de transcription).

Les co-activateurs, liés au complexe ligand-récepteur, permettent d'augmenter le taux de transcription du gène-cible, notamment grâce à des activités enzymatiques, comme les HAT (Histones Acétyl Transférase). L'acétylation des résidus lysine des histones de la chromatine est en effet indispensable pour «ouvrir» la chromatine et lui conférer une structure propice à la stabilité du complexe d'initiation de la transcription.

Pour des données plus complètes, voir (Kang et al., 2002; Lee & Chang, 2003; Louie et al., 2003; Shang et al., 2002).

1.5-6.3 Transrépression - régulation négative et ligand-dépendante de l'expression d'un gène

Ce phénomène est nettement moins connu que l'activation ligand-dépendante de la transcription. Il faut le distinguer de la répression transcriptionnelle médiée par les Récepteurs aux Rétinoïdes et aux Hormones Thyroïdiennes en absence de leur ligand. Ici il s'agit au contraire d'un phénomène ligand-dépendant.

Le mécanisme de cette régulation négative est mal connu, probablement parce qu'il existe différentes voies possibles.

L'un des mécanismes potentiels serait la liaison du récepteur-agoniste sur un site de l'ADN qui inverse le paradigme de l'activation ligand-dépendante (notion d'élément de réponse négatif). Le complexe récepteur-ligand recrute sur ce site des co-répresseurs et des activités HDAC. Par exemple, lorsque le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) est lié, en absence de ligand, à cet élément négatif sur le promoteur du gène de la sous-unité β de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone), il active sa transcription. A l'inverse, la liaison du ligand au récepteur conduit au recrutement de co-répresseurs et de HDAC et à la suppression de la transcription du gène (Sasaki et al., 1999; Steinfeldt & Wondisford, 1997).

Concernant l'AR, les androgènes ont un effet négatif sur l'expression du gène de la sous-unité β de l'hormone LH humaine, et cet effet serait médié par la liaison de l'AR sur un ARE «*négatif*» (voir Tableau 1) (Clay et al., 1993). Ces hypothèses ont cependant été contredites par d'autres groupes (Heckert et al., 1997).

Dans d'autres cas, il a été postulé que le complexe ligand-récepteur se lierait à d'autres facteurs de transcription sans lier l'ADN—cette interaction conduirait à l'élimination de co-activateurs (p300, CBP) des complexes qui régulent positivement l'expression du gène. Dans ce modèle, l'élimination des facteurs positifs, présents en quantité limitante, se traduirait par la régulation négative de la transcription (Kamei et al., 1996). On parle alors d'un phénomène de «*quelching*» ou d'*interférence transcriptionnelle*.

Ce phénomène pourrait expliquer les relations entre certains récepteurs de stéroïdes et le facteur de transcription AP-1 (homodimère jun-jun ou hétérodimère fos-jun) : en effet, il a été montré qu'il existe une inhibition réciproque entre AP-1 et le Récepteur aux Glucocorticoïdes (GR) par une interaction protéine-protéine directe, qui se produit sur des régions promotrices composées de sites de liaison AP-1 et GRE adjacents (Jonat et al., 1990).

Or, il a aussi été montré que AP-1 interagit directement avec l'AR (Pfahl, 1993), et que la sur-expression de c-fos ou de c-jun inhibent l'activité de l'AR dans les cellules LNCaP (Sato et al., 1997). Réciproquement, l'AR réprime la fonction de c-jun de façon ligand-dépendante (Kallio et al., 1995; Sato et al., 1997). Cependant, contrairement à la situation observée avec GR, la présence adjacente d'ARE et de sites AP-1 n'a pas été observée, suggérant que l'AR interagit avec AP-1 mais sans se lier à l'ADN. De plus, il a été montré que l'interaction directe entre c-jun et l'AR peut réprimer (Sato et al., 1997), ou au contraire stimuler (Bubulya et al., 1996) la transactivation médiée par l'AR. Ces effets positifs ou négatifs de l'interaction suggèrent que d'autres protéines d'interaction peuvent être impliquées spécifiquement en fonction du type cellulaire ou du contexte chromosomique (Pfahl, 1993). Ainsi, l'interaction entre l'AR et AP-1 pourrait donc éliminer AP-1 du promoteur de ses gènes-cibles, d'où la perte d'un signal positif entraînant un effet négatif sur la transcription du gène. Dans les cas où une interaction protéine-protéine directe n'est pas démontrée, le mécanisme semblerait relever d'une compétition entre l'AR et AP-1 pour des quantités limitantes de co-activateurs transcriptionnels dont ces 2 acteurs ont communément besoin (par exemple, CBP/p300, (Fronsdal et al., 1998)).

I.5-7. Les effets non génomiques des androgènes

Si l'effet prédominant des androgènes est médié par l'AR, et par la régulation de la transcription de gènes-cibles, certains effets sont également induits *via* des voies non génomiques. Ces effets sont considérés comme «*non génomiques*» s'ils se produisent dans des cellules dépourvues d'un AR fonctionnel, ou en présence d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction, ou encore s'ils sont induits «*très*» rapidement pour impliquer la transcription préalable d'un gène.

Dans leur revue traitant des effets non génomiques de l'AR, Heinlein & Chang identifient différentes voies d'action possibles (Heinlein & Chang, 2002b). L'activité non génomique des androgènes implique typiquement l'induction très rapide de cascades de transduction par des seconds messagers conventionnels, notamment une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium libre, l'activation des Protéines Kinase A (PKA) ou C (PKC) ou des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase). Ces effets apparaissent dans un intervalle

de temps de quelques secondes à quelques minutes. Ces cascades peuvent au final servir à moduler l'activité de l'AR.

Certains de ces événements sont initiés au niveau intracellulaire, mais d'autres peuvent prendre naissance au niveau de la membrane plasmique—par exemple, la Testostérone ou la DHT sont véhiculées dans la circulation sous forme liée à la SHBG. La membrane plasmique possède des récepteurs à la SHBG, ces récepteurs lient uniquement la SHBG couplée à l'hormone, et ceci induit l'activation d'une réponse intracellulaire médiée par l'AMPC et la PKA.

L'effet non génomique des androgènes serait impliqué dans certains processus cellulaires notamment les communications inter-cellulaires par jonctions Gap, la relaxation aortique ou la plasticité neuronale. Cependant de nombreux travaux renseignant de ces effets utilisent des doses pharmacologiques d'hormones, et la signification physiologique ou pathologique de ces modes d'action nécessite donc encore de nombreuses investigations.

I.5-8. Régulation de l'activité de l'AR

I.5-8.1 L'AR en tant que cible de voies de signalisation cellulaires

Des données suggèrent que l'activité de l'AR peut être régulée par des voies mitogéniques impliquant des facteurs de croissance et/ou des protéines kinases.

L'activité propre de l'AR peut être modulée par des facteurs de croissance peptidiques indépendamment des androgènes. Ainsi, l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), le KGF (Keratinocyte Growth Factor), et l'EGF (Epidermal Growth Factor) peuvent activer la transcription d'un gène rapporteur AR-dépendant transfecté dans les cellules DU-145, à condition qu'un vecteur d'expression de l'AR soit co-transfecté, et cette activation est totalement inhibée en présence de Bicalutamide, ce qui prouve que la transactivation est bien médiée par l'AR (Culig et al., 1994). Cet effet se retrouve *in vivo* sur un promoteur endogène, puisque dans les cellules LNCaP, l'IGF-1 stimule la sécrétion du PSA en absence d'androgènes. Ces auteurs ont aussi montré que la combinaison du R1881 et de l'IGF-1 ne potentialise pas la transactivation par rapport à l'effet du R1881 seul, ce qui suggère que l'IGF-1 peut induire des changements de conformation de l'AR, probablement en altérant son niveau de phosphorylation, de façon à mimer la conformation qui serait induite par le ligand seul. Des résultats similaires ont été obtenus entre l'IGF-1 et ER, et seraient médiés par l'activation de kinases (Kato et al., 1995; Newton et al., 1994).

D'autres régulateurs de voies de signalisation, qui activent des protéines kinases, peuvent également affecter l'activité de l'AR. Des activateurs de la PKA (le 8-Bromo-cyclic-AMP) ou de la PKC (le PMA ou phorbol 12-myristate 13-acetate) peuvent augmenter l'effet des androgènes sur la transactivation de gènes rapporteurs AR-dépendants dans des cellules CV-1 co-transfectées avec l'AR de rat (Ikonen et al., 1994). Dans les cellules prostatiques DU-145, Culig et al. ont montré que le traitement avec de la LH-RH induit une augmentation de la concentration intracellulaire en AMP cyclique, ce qui provoque l'augmentation de la transactivation d'un gène rapporteur AR-dépendant (co-transfecté avec un plasmide d'expression de l'AR), et cet effet est encore plus fort si les cellules sont co-traitées avec des androgènes (Culig et al., 1997a).

Que la présence d'androgènes soit ou non nécessaire à l'effet des activateurs de Kinases est sujet à controverses, puisque Nazareth & Weigel ont montré qu'un autre activateur de la PKA, la Forskoline, peut activer l'AR humain dans les cellules CV-1 en absence d'hormone, et l'effet est aboli soit par un peptide inhibiteur de la PKA, soit par les anti-androgènes Bicalutamide ou Hydroxy-Flutamide (Nazareth & Weigel, 1996). Dans la xenogreffe LAPC-4 de cancer prostatique, la sur-expression de la tyrosine kinase HER-2/neu induit la prolifération tumorale et active le promoteur du PSA, de façon ligand-indépendante (Craft et al., 1999b). Une activation similaire a été observée dans les cellules LNCaP, dans lesquelles la voie des MAP Kinase serait essentielle à l'induction des gènes-cibles des androgènes (Yeh et al., 1999). Que ces phénomènes soient médiés par la phosphorylation directe de l'AR ou de ses partenaires reste à démontrer, bien que des preuves indirectes s'accumulent en ce sens.

Ces voies peuvent potentialiser l'effet des faibles doses d'androgènes, réduisant ainsi les concentrations d'androgènes nécessaires à l'obtention d'un effet biologique maximum (Culig et al., 1997a; Culig et al., 1997b). Comme nous le verrons, ceci s'avère important dans le cadre de l'échappement au traitement anti-hormonal du cancer de la prostate.

1.5-8.2 Régulation de l'expression de l'AR

Le promoteur du gène codant pour l'AR n'a pas de boîte TATA, mais il possède 2 sites d'initiation de la transcription, qui seraient utilisés avec la même efficacité dans les cellules LNCaP (Faber et al., 1993). Différentes séquences cis-régulatrices ont été observées sur ce gène, notamment des sites de liaison au facteur de transcription Sp1 (Faber et al., 1993), qui contribuerait à réguler la transcription en recrutant le complexe transcriptionnel TFIID (Pugh & Tjian, 1991). Un élément de réponse à l'AMP cyclique (c-AMP-Response Element ou CRE) a également été identifié et pourrait médier l'augmentation de la transcription du gène *via* la protéine CREB (Mizokami et al., 1994).

Retenons surtout que l'expression de l'AR est soumise à une auto-régulation du niveau de l'ARNm et de la protéine, qui est encore sujette à de nombreuses controverses.

Concernant la régulation de l'ARNm, des effets positifs et négatifs ont été observés, dépendant de la méthode d'analyse, de la lignée, du tissu, et bien sûr de l'espèce étudiés. Chez le rat, le niveau d'ARNm de l'AR (dans la prostate ventrale, les vésicules séminales, l'épididyme, le cerveau ou les reins), évalué par Northern Blot, augmente fortement après la castration, et l'addition d'androgènes supprime cette augmentation, suggérant un effet négatif des androgènes sur l'expression du gène (Blok et al., 1992; Quarmby et al., 1990a; Tan et al., 1988).

En utilisant la méthode d'hybridation *in situ*, une étude a montré également une élévation du niveau d'ARNm dans la prostate de rat après castration (Prins & Woodham, 1995), plus ou moins transitoire selon le lobe analysé, alors que Takeda et al. ont montré que la castration du rat provoque au contraire une réduction du niveau d'ARNm dans la prostate ventrale (Takeda et al., 1991). Dans la xenogreffe humaine de cancer de la prostate PC-82, l'élimination des androgènes n'affecte pas le niveau d'ARNm de l'AR (Ruizeveld de Winter et al., 1992). Dans les cellules LNCaP, l'ARNm est fortement sous-régulé par le traitement aux androgènes (Kokontis et al., 1994; Quarmby et al., 1990b), et cette régulation se produirait au niveau de l'initiation de la transcription (Wolf et al., 1993).

Dans la région 5' du cadre de lecture de l'AR, 2 demi-sites ARE seraient responsables d'un effet positif des androgènes sur l'expression de l'ARNm, dans les cellules PC-3 et DU-

145 transfectées avec l'ADNc de l'AR lié à un promoteur CMV (Dai & Burnstein, 1996; Dai et al., 1996). Dans les cellules COS-1 exprimant l'ADNc exogène de l'AR et dans les cellules LNCaP, les androgènes sous-régulent au contraire l'ARNm, mais là aussi, les séquences médiant cet effet négatif seraient localisés non pas dans le promoteur, mais dans le cadre de lecture (Burnstein et al., 1995).

Autant les données expérimentales sur le niveau de l'ARNm peuvent être contradictoires, autant elles sont claires en ce qui concerne le niveau de la protéine : dans à peu près tous les systèmes examinés, le traitement aux androgènes augmente le niveau d'expression de la protéine AR (Blondeau et al., 1982; Krongrad et al., 1991; Prins & Woodham, 1995; Ruizeveld de Winter et al., 1992; Syms et al., 1985). Le mécanisme pourrait être une stabilisation de la protéine après liaison au ligand (Kemppainen et al., 1992), mais d'autres travaux ont montré que cette élévation du niveau de l'AR nécessite la néo-synthèse de la protéine (Mora et al., 1996).

Soulignons enfin que dans des cellules LNCaP devenues androgéno-indépendantes après une très longue déprivation androgénique (lignée LNCaP-104R) le traitement aux androgènes n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de la protéine, et il a même un léger effet négatif lorsque de très fortes concentrations d'androgènes sont administrées, alors que dans la lignée parentale LNCaP, les androgènes exercent toujours un effet positif sur l'expression de la protéine AR (Kokontis et al., 1994; Kokontis et al., 1998). Ceci suggère que dans les cellules androgéno-indépendantes, le mécanisme d'auto-régulation de l'AR a divergé par rapport au mécanisme antérieur «normal». Cette adaptation à la déprivation androgénique peut s'avérer importante en termes cliniques.

II. ROLE DES ANDROGÈNES DANS LA PHYSIO-PATHOLOGIE DE LA PROSTATE

II.1 Expression de l'AR et rôle des androgènes dans le développement de la prostate normale

Le rôle essentiel des androgènes dans le développement de la prostate est évident chez des patients dont une anomalie chromosomique, liée au chromosome X, entraîne un déficit de fonction de l'AR ou de la 5 α -Réductase, l'enzyme qui convertit la Testostérone en Dihydrotestostérone (DHT). Chez ces patients génétiquement masculins, mais de phénotype féminin, le déficit des voies androgéniques se traduit cliniquement par une absence ou une atrophie de la prostate et des caractères sexuels masculins, ainsi que par une stérilité, bien que les taux de testostérone circulante soient normaux : on parle de syndrome de «féminisation testiculaire» (Bardin et al., 1973).

Ceci illustre parfaitement le fait que le développement de la prostate et le maintien de sa fonction et de sa structure chez l'adulte dépendent totalement de la DHT et d'un Récepteur aux Androgènes fonctionnel.

La prostate fonctionne comme un organe sécréteur et est schématiquement composée de 2 types cellulaires distincts, l'épithélium et le stroma. Le stroma est un tissu fibromusculaire,

qui porte le tissu épithélial. Les cellules épithéliales (basales et lumbales) délimitent le «lumen» et les canaux sécréteurs, et ce sont surtout des cellules sécrétrices (du PSA ou Antigène Spécifique de la Prostate ou encore de la Phosphatase spécifique de la Prostate etc). Au cours du développement embryonnaire, les interactions stroma-épithélium sont essentielles (Cunha, 1996; Cunha et al., 1987), car seules les cellules du stroma (mésenchyme) expriment l'AR. Elles sont stimulées par les androgènes testiculaires, produisent en retour des facteurs de croissance (IGF, KGF, EGF etc) qui sont capables d'agir de façon paracrine sur les cellules épithéliales voisines, pour induire la croissance cellulaire et le développement de la glande. Dans les premiers jours suivant la naissance, les cellules épithéliales lumbales expriment leur propre AR, et le maintien de la fonction prostatique chez l'adulte s'effectue alors par action directe des androgènes sur les cellules épithéliales.

Quand les taux d'androgènes plasmatiques s'effondrent (situation de la castration) les cellules sécrétrices épithéliales entrent en apoptose, provoquant une involution glandulaire. Le stroma et les cellules épithéliales basales résistent à cette déprivation car elles expriment moins l'AR (Chodak et al., 1992; Leav et al., 1996; Ruizeveld de Winter et al., 1991; Soeffing & Timms, 1995). Les cellules basales sont considérées comme androgéno-indépendantes pour leur survie, mais androgéno-dépendantes pour la prolifération et la différenciation, et elles représentent également des cellules souches capables de se transformer en cellules sécrétrices. Ainsi, l'apport d'androgènes après castration permet à ces cellules basales de reformer un tissu sécréteur, restaurant la structure et la fonction glandulaire (Hudson et al., 2001; Isaacs & Coffey, 1989).

Dans des conditions physiologiques normales, puisque les cellules souches basales sont stimulées par les androgènes pour subir la prolifération ou la différenciation, les cellules lumbales ayant accumulé des dommages sont éliminées par apoptose, puis remplacées par les cellules souches, et un état d'équilibre s'installe entre prolifération et apoptose, pour maintenir la fonctionnalité du tissu.

Mais dans certains cas, et surtout avec l'âge, les cellules peuvent être sur-stimulées par les androgènes et/ou des facteurs de croissance, rompant l'équilibre et aboutissant à des phénomènes de prolifération incontrôlée. Chez l'homme, le vieillissement est souvent lié à l'apparition de désordres cliniques résultant de l'Hyperplasie Bénigne de la Prostate (BPH). Les cellules épithéliales entourant les canaux sécréteurs prolifèrent exagérément, et viennent obstruer l'urètre, d'où des troubles urologiques (Isaacs & Coffey, 1989). 50% des hommes de plus de 50 ans subissent ces symptômes, qui ne relèvent pas d'un processus tumoral. Cependant, la croissance hyperplasique associée à la BPH crée un terrain favorable à la carcinogénèse des cellules de l'épithélium ou du stroma et augmente donc les risques d'apparition d'une lésion tumorale.

II.2 Le cancer de la prostate

II.2-1. Un peu d'épidémiologie

En France, l'incidence du cancer de la prostate était de 56/100000 hommes en l'an 2000. Alors que ce taux a augmenté régulièrement de 10/100000 par décennie, la mortalité par cancer de la prostate progressait également. 8234 décès en 1986, soit 10% des décès par cancer, et 9239, soit 11%, en 2000. Son incidence augmente avec l'âge, et en raison de l'augmentation de l'espérance de vie, les estimations en termes de santé publique sont pessimistes, le cancer

de la prostate apparaissant comme la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme, et la première chez l'homme de plus de 70 ans (<http://www-dep.iarc.fr>, 2000).

L'étiologie du cancer de la prostate est encore à un stade limité aux spéculations, aucun facteur de risque n'ayant été clairement identifié. Une petite proportion des patients présentent une pré-disposition génétique au cancer de la prostate, comme dans le cas du cancer du sein ou du colon (Carter et al., 1992; Spitz et al., 1991; Steinberg et al., 1990). Les études réalisées au sein de familles ont montré qu'une région du bras long du chromosome 1 (1q24-25) comporte vraisemblablement un gène de susceptibilité au cancer de la prostate (Cooney et al., 1997). L'exposition à des toxines comme le cadmium ou à des molécules à activité oestrogénique a également été suggérée comme facteur de risque potentiel (Elghany et al., 1990). Le régime alimentaire occidental avec une forte consommation de graisses et une consommation pauvre en végétaux semble être un facteur de risque supplémentaire (Adlercreutz, 1990), et il a été postulé que les facteurs alimentaires pourraient altérer le métabolisme des stéroïdes, favorisant la progression de lésions latentes vers un cancer (Montie & Pienta, 1994).

II.2-2. Rôle des androgènes et de l'AR dans le cancer de la prostate

Le rôle établi de l'AR et des androgènes dans le contrôle de la fonction et de la croissance de la prostate normale a depuis longtemps motivé l'étude de la contribution de la voie AR-androgènes dans l'initiation et/ou la progression du cancer de la prostate.

Le rôle essentiel de l'AR et/ou des androgènes dans le développement de l'hypertrophie de la prostate ou de l'adénocarcinome est évident au regard de certaines observations. D'une part, les hommes castrés (eunuques) ne développent ni BPH, ni carcinome prostatique (Wu & Gu, 1991) ; d'autre part, l'inhibition de la production de DHT grâce à un inhibiteur de la 5 α -réductase est un traitement efficace contre la BPH (Clark et al., 2004; Stoner, 1990).

Le cancer de la prostate est donc hormono-dépendant, et comparé aux autres cancers qui partagent cette caractéristique (sein, endomètre), il est le plus sensible à l'effet des hormones.

Cependant, différents travaux ont suggéré que les variations des taux plasmatiques des androgènes surrénaliens ou testiculaires ne semblent pas être des facteurs de risque prédictifs du développement ultérieur d'un cancer de la prostate (Comstock et al., 1993; Eaton et al., 1999). De plus, il existe dans la communauté scientifique un consensus assez généralisé selon lequel les mutations ou la sur-expression de l'AR ne sont pas communes dans les stades précoces du cancer de la prostate (Culig et al., 1993a; Culig et al., 1993b; Elo et al., 1995; Marcelli et al., 2000). Ainsi, le risque d'apparition d'un cancer de la prostate ne serait pas lié à une augmentation anormale des concentrations plasmatiques d'androgènes, ni à une hyperactivité de l'AR. Le système AR-androgènes n'en est pas moins nécessaire à la progression tumorale, et de nombreux groupes ont tenté d'élucider les voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation ou de l'apoptose des cellules prostatiques, bénignes ou malignes, dans différents modèles expérimentaux.

Nous ne présenterons pas dans cette section les différentes familles de protéines qui contrôlent le cycle cellulaire. Une description plus détaillée de ces protéines et de leur mode d'action figure en Annexe II.

Les effets mitogéniques de la voie AR-Androgènes passent par le contrôle des médiateurs du cycle cellulaire. Chez le rat castré, l'administration de Testostérone restaure la croissance prostatique en stimulant l'expression de cdk et cyclines contrôlant la transition G1-S (Chen et al., 1996). De même, la castration de rats porteurs de la xenogreffe humaine CWR22 cause une diminution des niveaux d'ARNm de nombreux régulateurs du cycle cellulaire (Agus et al., 1999). Dans des modèles de souris transgéniques, la sur-expression prostate-spécifique de l'AR *via* le promoteur du gène de la Probasine, provoque une augmentation de la prolifération et une néoplasie de l'épithélium prostatique (Stanbrough et al., 2001).

Les voies de signalisation impliquées dans le contrôle androgénique de la prolifération cellulaire ont également été approfondies *in vitro/in vivo* par l'utilisation de la lignée de cellules cancéreuses prostatiques LNCaP (Horoszewicz et al., 1983). Ces cellules présentent des caractéristiques majeures du carcinome prostatique : elles expriment l'AR, secrètent le PSA, et sont tumorigéniques chez le rongeur. La déprivation androgénique abolit leur croissance, et l'apport d'androgènes exogènes restaure leur croissance *in vitro* et *in vivo* (Horoszewicz et al., 1983). Cependant, elles répondent à des doses croissantes d'androgènes selon un profil de stimulation biphasique. L'ajout de DHT à des concentrations inférieures à 1nM stimule fortement la prolifération, de façon dose-dépendante, mais les concentrations supérieures à 1nM ont un effet prolifératif plus modéré (Horoszewicz et al., 1983). Cet effet prolifératif a été démontré dans d'autres lignées androgéno-dépendantes *in vitro*, mais il existe peu d'études *in vivo* (Nakhla & Rosner, 1994; Sonnenschein et al., 1989; Zhao et al., 1999).

En absence d'hormones (DCC-SVF), l'arrêt de croissance est médié par la régulation négative de nombreux médiateurs du contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire, notamment les kinases cdk2 et cdk4, la cycline D3 ou la protéine Rb, et l'ajout de DHT à faible dose restaure l'expression de ces mêmes régulateurs (Hofman et al., 2001; Knudsen et al., 1998; Lu et al., 1997). En revanche, les plus fortes concentrations en androgènes induisent une prolifération plus modérée, qui s'accompagne d'une augmentation du niveau de p27^{kip1} (un inhibiteur des cdk), une hypophosphorylation de Rb, et une sous-régulation de E2-F (Hofman et al., 2001; Tsihlias et al., 2000). L'expression de l'inhibiteur de cdk p21^{waf1,cip1} répond aux androgènes de façon paradoxale : la déprivation hormonale induit une diminution de son expression, et l'ajout de faibles doses de DHT ne restaure que partiellement son niveau d'expression (Knudsen et al., 1998). Ces observations sont surprenantes par rapport à son rôle attendu d'inhibiteur de cdk, mais elles corroborent certaines données ayant démontré *in vitro* et *in vivo* que p21 peut parfois promouvoir l'assemblage des complexes cdk4-cycline D (LaBaer et al., 1997). P21 pourrait avoir cette fonction dans les cellules LNCaP.

Les cellules LNCaP ne sont pas le seul modèle de cellules cancéreuses prostatiques dont les androgènes et/ou l'AR ralentissent la croissance : les cellules ARCaP, dérivées des liquides ascitiques d'un patient atteint d'un carcinome prostatique métastatique expriment l'AR, et les androgènes exogènes répriment la croissance cellulaire, *in vitro* et *in vivo* (Zhou et al., 1996). Dans ces mêmes cellules, la sur-expression de l'AR sauvage à un niveau similaire à celui des cellules LNCaP induit un ralentissement de la prolifération cellulaire *in vitro* en absence d'androgènes, induit également un ralentissement de la croissance de la tumeur *in vivo* chez des rats non castrés, mais permet *in vitro* de restaurer un profil biphasique de stimulation de la croissance en réponse à des doses croissantes de R1881 (Cinar et al., 2001).

L'ensemble de ces données suggère donc que l'AR joue un rôle prédominant pour réguler la prolifération, mais il faut garder en mémoire que dans l'organisme, la régulation de la croissance épithéliale par les hormones s'effectue par action directe sur les cellules épithéliales, mais aussi par des interactions épithélium-stroma, et dépend de l'angiogenèse.

II.2-3. Thérapie du cancer de la prostate

Lorsqu'il est très localisé, le carcinome prostatique est traité le plus souvent par prostatectomie et/ou radiothérapie, la chimiothérapie s'avère souvent inefficace car ces cellules prolifèrent lentement (Berges et al., 1995).

Lorsqu'il est diagnostiqué à un stade plus avancé, un autre mode de thérapie est alors préconisé, il s'agit de l'hormono-thérapie puisque les androgènes et l'AR sont nécessaires au contrôle de la croissance de la prostate normale et puisque la prostate tumorale conserve cette androgéno-dépendance, le système AR-androgènes peut constituer logiquement une cible thérapeutique majeure. En 1941, Huggins et al. ont été les premiers à montrer un effet bénéfique de la castration chez des patients atteints d'un carcinome prostatique (Huggins et al., 1941). Ces travaux ont fondé la «thérapie anti-hormonale» comme thérapie du carcinome prostatique non localisé les techniques utilisées actuellement dans l'hormono-thérapie du cancer de la prostate (comme du sein) sont surtout des techniques suppressives, essentiellement chimiques, qui visent à diminuer ou supprimer l'influence des androgènes sur la prostate (Figure 4).

1) Techniques visant à supprimer la production d'androgènes par les testicules.

- par suppression directe de la production testiculaire : castration chirurgicale (orchidectomie). Un axe de recherche actuel consiste à l'élaboration d'inhibiteurs spécifiques de la 17 β -HSOR, pour inhiber la conversion de la Δ 4-Androstènedione en Testostérone (Sam et al., 2000; Tremblay et al., 1999). Les inhibiteurs de la 5 α -réductase, qui transforme la Testostérone en DHT, sont inefficaces en monothérapie.

- par «castration médicamenteuse» : cette méthode utilise des analogues de la LH-RH. Ce sont des peptides de synthèse, plus actifs et plus stables que la LH-RH naturelle. L'administration continue à fortes doses de ces analogues, à l'inverse de la sécrétion naturelle pulsatile à faibles doses, entraîne après une phase transitoire d'hyper-sécrétion, un blocage de la sécrétion hypophysaire de LH, par une désensibilisation des récepteurs hypophysaires. Ils entraînent secondairement un arrêt de la sécrétion testiculaire, donc une castration médicale, réversible à l'arrêt du traitement (Furr, 1989). L'augmentation initiale et transitoire de l'activité de l'hypophyse et des gonades peut être contrée par la prescription concomitante d'un anti-androgène périphérique.

Ces analogues (Leuproréline, Goséréline ou Zoladex), sont présentés sous une forme à libération prolongée, permettant un traitement par administration mensuelle, et sont mieux tolérés psychologiquement par le patient, contrairement à l'orchidectomie.

- par blocage de l'axe hypophyse-gonade par un rétro-contrôle négatif :
 - les oestrogènes : ils bloquent la sécrétion hypophysaire de LH, et donc la synthèse de la Testostérone par les testicules. Les oestrogènes de synthèse comme le diéthylstilbestrol (Distilbène) sont aujourd'hui abandonnés en raison de leurs effets secondaires, essentiellement cardio-vasculaires.

- les progestatifs : ils possèdent des propriétés anti-gonadotropes par rétro-contrôle hypophysaire.

2) Techniques visant à supprimer la production des précurseurs surrénaliens.

La castration réduit de 95% le taux de testostérone plasmatique (4-8ng/ml et 0,2-0,4ng/ml chez l'homme normal et castré respectivement, (Labrie et al., 1986; Sanford et al., 1977)), mais comme nous l'avons signalé, elle ne réduit que de 60% la concentration intra-prostatique

de DHT. Ceci est lié à la conversion des androgènes surrénaliens en DHT, qui a lieu dans les cellules prostatiques (Adams, 1985; Labrie et al., 1988; Labrie et al., 1993b). D'où la nécessité de réduire la production de ces précurseurs surrénaliens, mais cette approche n'a de sens qu'après castration chirurgicale ou médicamenteuse.

- par surrénalectomie □ aujourd'hui abandonnée.
- par inhibition de la synthèse ou de la sécrétion des précurseurs surrénaliens □
 - les glucocorticoïdes □ ils exercent un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion de la DHEA et de la Δ^4 -Androstènedione par la surrénale, et entraînent une diminution de la testostéronémie.
 - le kétoconazole □ à très forte dose, il inhibe la synthèse des précurseurs surrénaliens, et de la testostérone testiculaire. Il est peu utilisé en raison des effets secondaires (neurologiques et hépatiques) liés à l'utilisation prolongée d'aussi fortes doses (1,2g/jour).

3) Techniques d'hormono-thérapie compétitive.

Cette technique met en jeu les anti-androgènes, qui interfèrent par compétition avec la liaison de la DHT à l'AR.

Lorsqu'ils sont utilisés seuls et de façon prolongée, le Flutamide ou le CPA peuvent cependant entraîner une diminution du rétro-contrôle négatif des androgènes sur leur propre sécrétion, *via* l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades, d'où une augmentation de la LH et de la Testostérone. Une augmentation de la Testostérone plasmatique peut alors diminuer l'efficacité de l'anti-androgène. L'utilisation d'antagonistes plus sélectifs au niveau périphérique permet de limiter ce phénomène □ ainsi, le Bicalutamide présente une sélectivité périphérique partielle chez l'homme, et totale chez les rongeurs, car il traverse difficilement la barrière hémato-encéphalée (Furr et al., 1987). De ce fait, il ne provoque pas cette poussée des concentrations plasmatiques en androgènes. Les rémissions obtenues grâce aux anti-androgènes sont de plus courte durée que celles observées suite à une castration.

Par la suite, ces observations ont amené l'équipe du Dr. Labrie à suggérer une thérapie de «blochage androgénique combiné» □ cette double thérapie associe une castration (chimique ou chirurgicale) et un blocage de l'effet de la DHT intra-prostatique. Ce blocage peut être effectué soit par l'administration d'antagonistes de l'AR (Flutamide, Bicalutamide, CPA), qui empêchent l'action des androgènes formés localement au niveau du Récepteur (Labrie et al., 1986), soit par l'utilisation d'inhibiteurs des activités enzymatiques qui convertissent les précurseurs surrénaliens en DHT (par exemple, inhibiteurs de la 5 α -Réductase comme le Finastéride (Labrie et al., 1991)).

Cette thérapie de blocage androgénique combiné semble présenter un intérêt clinique réel, et son efficacité a été démontrée par plusieurs groupes (Crawford et al., 1989; Dijkman et al., 1995; Janknegt et al., 1993). Ces études prospectives, randomisées et contrôlées par placebo ont confirmé une prolongation de la réponse positive et surtout ont démontré une prolongation de la survie. Une étude de l'EORTC a montré un avantage de 52% de survie chez les patients ayant reçu le Zoladex et le Flutamide comparé au groupe orchidectomie-placebo (Denis et al., 1993). Ces études ont cependant été controversées par d'autres travaux, n'ayant pas montré d'augmentation significative de la survie après un traitement combiné (Collette et al., 2001). Ce type de thérapie présente également un coût très élevé, et n'est pas encore cliniquement utilisé en traitement conventionnel.

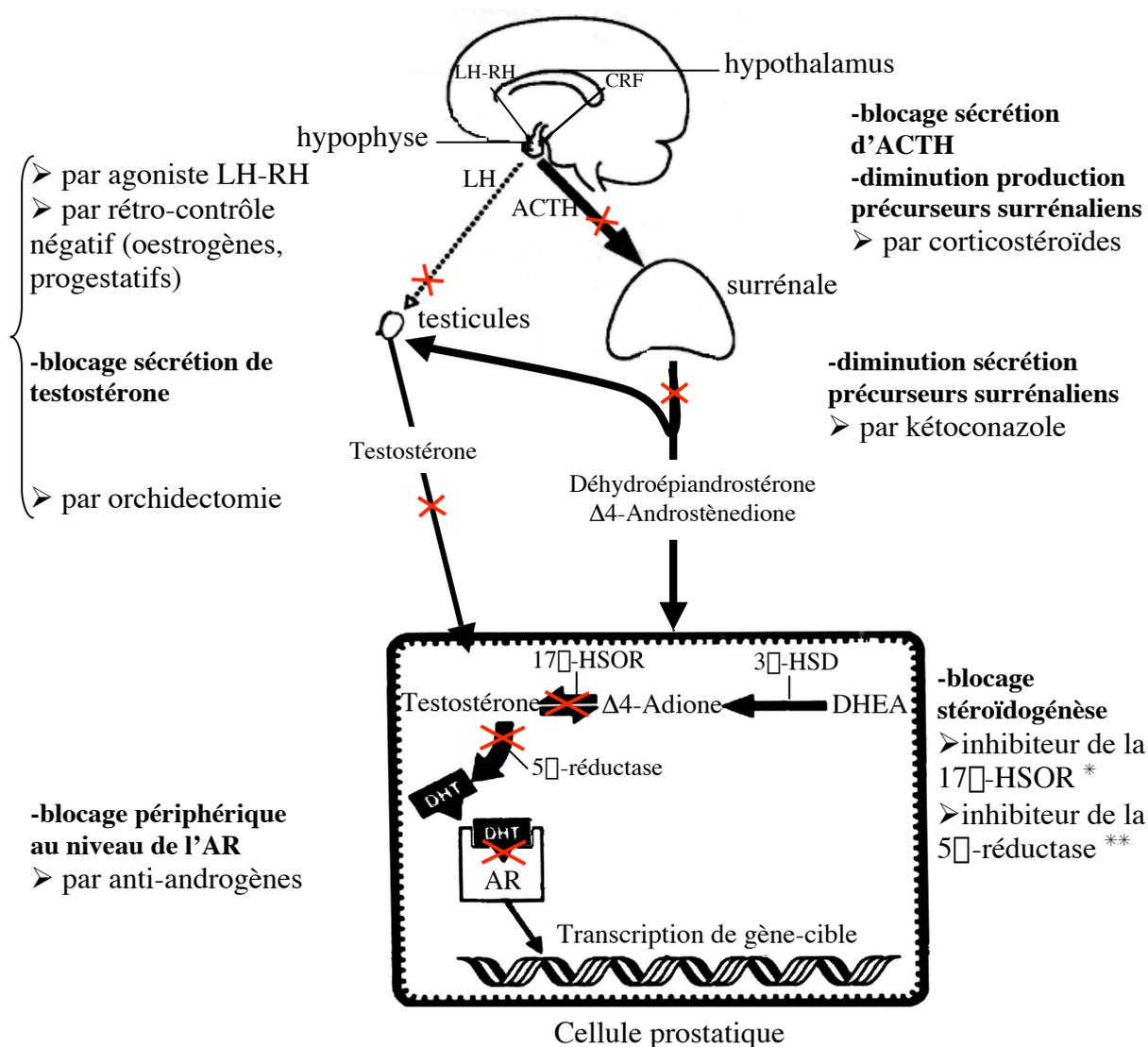


Figure 4 Schéma des différentes stratégies de l'hormono-thérapie du cancer de la prostate évolué.

X : voie métabolique supprimée par le traitement. * encore au stade de la recherche expérimentale. ** en cours de recherche clinique, en association avec castration et anti-androgènes.

II.2-4. Echappement à la thérapie anti-hormonale et évolution vers l'androgéno-indépendance

Le carcinome prostatique, après une réponse positive initiale de durée variable (18 mois à 3 ans), finit, dans la majorité des cas, par échapper à l'hormono-thérapie la tumeur devient réfractaire à la thérapie anti-hormonale, car les cellules sont «venues» en majorité hormono-indépendantes.

II.2-4.1. Mécanismes potentiels impliqués

Ce phénomène peut être lié à la présence, dans la tumeur, de populations clonales hétérogènes quant à leur dépendance aux androgènes—certains clones, androgéno-dépendants et sensibles à la thérapie anti-hormonale régressent, tandis que d'autres clones, initialement androgéno-indépendants, persistent malgré la thérapie et deviennent majoritaires, ce qui confère à la tumeur son caractère réfractaire. La pression de sélection que constitue la déprivation androgénique permettrait ainsi l'émergence des clones androgéno-indépendants (Craft et al., 1999a). Cet échappement constitue le principal obstacle à la réussite de la thérapie anti-androgénique, mais pourtant ses mécanismes moléculaires sont variés et encore loin d'être élucidés (pour une revue plus complète voir (Chatterjee, 2003; Feldman & Feldman, 2001)).

Les mécanismes envisagés peuvent être séparés en 3 catégories générales.

- D'abord, des modifications du gène codant pour l'AR (mutations, amplifications), ont été observées. Certaines de ces mutations touchent le Domaine de Liaison au Ligand (LBD) de l'AR et peuvent altérer sa réponse aux ligands, en lui conférant une affinité accrue pour les androgènes surrenaliens, les Oestrogènes, et même pour les anti-androgènes, comme le Flutamide, qui se comportent alors comme des agonistes (Taplin et al., 1999; Taplin et al., 1995; Taplin et al., 2003; Veldscholte et al., 1990a; Visakorpi et al., 1995). Une augmentation de l'activité de l'AR par l'hydroxy-flutamide a été mise en évidence pour certaines mutations de l'AR identifiées chez des patients (Fenton et al., 1997; Peterziel et al., 1995). De telles mutations entraîneraient donc un gain de fonction pour l'AR, ce qui pourrait conférer aux cellules tumorales un avantage prolifératif, les rendant capables d'utiliser ces différents ligands et de proliférer lorsque la thérapie anti-hormonale a supprimé les androgènes testiculaires. Ces mutations de l'AR seraient détectées dans environ 10 à 20% des cas de cancer de la prostate, et la fréquence des mutations semble beaucoup plus élevée dans les tumeurs réfractaires à la thérapie anti-hormonale et dans les métastases que dans les spécimens de tumeurs primaires non traitées (Kokontis & Liao, 1999).

- Une deuxième catégorie de mécanismes est basée sur l'hypothèse d'une activation androgéno-indépendante de la voie de signalisation AR dans les tumeurs réfractaires à la thérapie. Par exemple, il a été montré dans des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes que l'AR ne présente ni mutations ni amplification, mais peut être activé de façon ligand-indépendante par une augmentation de la signalisation des MAP Kinase (Mitogen-Activated Protein Kinase) médiée par des oncogènes tels que Erb-b2 ou H-ras (Craft et al., 1999b; Gioeli et al., 2002). D'autres facteurs peuvent de la même manière stimuler l'activité de l'AR en absence d'androgènes. Ainsi, Culig et al. ont montré que l'IGF-1, le KGF et l'EGF peuvent stimuler l'activité transcriptionnelle de l'AR sur un gène-cible en absence d'androgènes (Culig et al., 1996). L'intérêt porté à ces facteurs de croissance peptidiques est renforcé par certaines observations : dans les tumeurs primaires hormono-dépendantes, un schéma de stimulation paracrine prédomine (production du facteur par le stroma, action sur l'épithélium qui exprime le récepteur), alors que dans les tumeurs hormono-indépendantes, les cellules épithéliales deviennent capables de produire elles-même le facteur de croissance, qui agit alors de façon autocrine, générant ainsi une situation d'indépendance vis-à-vis du stroma. Cette évolution vers une régulation autocrine a été montrée également pour l'EGF, le TGF- β , le TGF- α , le b-FGF (Culig et al., 1996). Par ailleurs, les facteurs capables d'activer la PKA ou la PKC peuvent aussi affecter l'activité de l'AR (de Ruiter et al., 1995; Ikonen et al., 1994; Nazareth & Weigel, 1996). La voie de

signalisation de l'AR pourrait également être perturbée par une altération de l'équilibre entre les différents co-régulateurs de l'AR (Gregory et al., 2001; Li et al., 2002). La fréquence de ces altérations et leur lien clinique avec l'échappement à la thérapie restent cependant à définir.

- Enfin, la dernière catégorie de mécanismes est basée sur le concept selon lequel les fonctions de l'AR qui favorisent la croissance ou la survie peuvent être court-circuitées par des voies alternatives de telle sorte que l'AR n'est plus indispensable à la progression de la maladie. Cette hypothèse de «*contournement*» de l'AR est confortée par des travaux ayant montré que des modifications épigénétiques du gène codant pour l'AR (méthylation) conduisent à une diminution, voire à une absence d'expression de l'AR dans certains cancers hormono-indépendants (Kinoshita et al., 2000). Cependant les données concernant les variations de l'expression de l'AR au cours de l'évolution vers l'androgéno-indépendance sont controversées. Bruchovsky et al. ont aussi montré une perte d'expression de l'AR au cours de la progression vers l'androgéno-indépendance (Bruchovsky et al., 1990), mais au contraire, d'autres études ont montré *in vivo* une perte de la dépendance hormonale associée à une expression constante de l'AR (Baley et al., 1995; Rennie et al., 1988). La corrélation entre l'absence d'expression de l'AR et l'acquisition d'une androgéno-indépendance est donc encore incertaine. D'ailleurs, une étude très récente a remis en question ce concept en montrant sur des xenogreffes humaines que la résistance à la thérapie anti-androgénique est au contraire médiée par une augmentation d'expression de l'AR, mais les bases mécanistiques ne sont pas élucidées (Chen et al., 2004). Quoiqu'il en soit, il existe à l'heure actuelle un assez large consensus selon lequel le niveau d'expression de l'AR dans le tissu n'est pas un facteur prédictif du comportement du carcinome et du risque d'échappement à la thérapie anti-androgénique (Hobisch et al., 1996; Klocker et al., 1994; Sadi et al., 1991; van der Kwast et al., 1991). Enfin, une expression accrue du gène anti-apoptotique BCL2 a été observée dans des échantillons prostatiques à un stade terminal de la maladie, mais le lien fonctionnel avec la résistance à la thérapie est encore inconnu (McDonnell et al., 1992; Raffo et al., 1995).

II.2-4.2. Un cas particulier : le «*Syndrôme de retrait des anti-androgènes*»

Chez des patients atteints d'un carcinome prostatique et traités en continu par un anti-androgène, le Flutamide, associé à une castration, Kelly & Scher ont observé après un certain temps, une progression du cancer, et une augmentation des taux de PSA, indiquant un phénomène d'échappement à la thérapie. Ils ont alors constaté qu'une thérapie discontinuée au Flutamide permettait une diminution du taux de PSA souvent corrélée à une amélioration de l'état clinique du patient (Kelly & Scher, 1993). Ce «*Syndrôme de retrait des anti-androgènes*» a par la suite été observée après la cessation du traitement utilisant d'autres anti-androgènes, notamment le Bicalutamide (Small & Carroll, 1994) le Nilutamide (Small & Srinivas, 1995) ou le CPA (Sella et al., 1998). Une étude prospective de retrait du Flutamide a montré que 28% des patients bénéficient d'une diminution supérieure à 50% de leur taux de PSA, et 1/3 des patients présentent une régression mesurable de la maladie et/ou une amélioration des symptômes cliniques (Scher & Kelly, 1993). Cependant, une étude rétrospective vaste n'a pas montré de différence en termes de taux de survie après une thérapie anti-androgénique discontinuée entre les patients qui ont répondu positivement ou non au retrait de l'anti-androgène (Small & Srinivas, 1995).

Les mécanismes impliqués dans cet effet favorable du retrait de l'anti-androgène sont mal connus, mais plusieurs hypothèses peuvent être émises. Nous avons signalé précédemment que certains antagonistes de l'AR, dont le CPA ou l'hydroxy-Flutamide, possèdent une affinité accrue pour certaines formes mutées de l'AR, en particulier les mutations du Domaine de Liaison au Ligand, et ces mutations confèrent à l'anti-androgène un effet de type agoniste. Nous avons également noté que ces mutations sont rares dans les tumeurs primaires, mais beaucoup plus fréquentes dans les stades avancés et les métastases. Ceci pourrait contribuer à la prolifération d'une fraction des cellules cancéreuses présentant ce type de mutation, et sélectionnées sous l'effet de la thérapie. Une étude japonaise a montré une association directe entre les mutations de l'AR et la réponse favorable au retrait d'un anti-androgène (Suzuki et al., 1996). Cependant, il n'existe pas d'étude structurale de l'AR menée chez un échantillon plus important de patients répondant favorablement au retrait de l'anti-androgène. Mais la capacité qu'ont certains anti-androgènes à passer d'un statut antagoniste à un statut agoniste laisse penser qu'ils peuvent effectivement, tôt au tard, promouvoir la progression tumorale.

Le groupe de Liao a montré que les cellules LNCaP, initialement androgéno-dépendantes, deviennent androgéno-indépendantes (LNCaP-104R) après une très longue déprivation aux androgènes (Kokontis et al., 1994; Kokontis et al., 1998). Cette transition s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'AR, qui ne résulte pas d'une amplification du gène. De plus, la prolifération de ces cellules est fortement stimulée par le Bicalutamide, alors que celui-ci n'a pas d'effet sur la lignée parentale. En outre, la prolifération de ces cellules est fortement réprimée sous l'effet de très faibles doses d'androgènes (<1nM) et l'effet est antagonisé par le Bicalutamide. Les cellules LNCaP possèdent donc initialement une voie anti-proliférative sensible uniquement aux fortes doses d'androgènes (effet biphasique), et cette voie devient exacerbée, hyper-sensible aux faibles doses lorsque ces cellules ont été déprivées et sont devenues androgéno-indépendantes. Ce même groupe a également montré que les cellules LNCaP-104R forment des tumeurs chez la souris athymique castrée, et le traitement au Propionate de Testostérone provoque la régression des tumeurs déjà installées (Umekita et al., 1996). Ces observations ont été confirmées par un autre groupe, à partir d'un autre sous-clone de cellules LNCaP (LNCaP-Abl) ayant subi une longue déprivation androgénique. Le Bicalutamide devient alors un agoniste *in vivo* de l'AR, il stimule la croissance tumorale, alors que la Testostérone réprime *in vivo* la croissance de la tumeur (Culig et al., 1999). Ces données suggèrent donc la pertinence physiologique d'un tel phénomène de répression androgéno-induite dans des cellules réfractaires à la déprivation androgénique.

Ceci suggère un mécanisme alternatif au syndrome de retrait des anti-androgènes. Si l'anti-androgène se conduit comme un agoniste, et si les faibles concentrations d'hormones circulantes sont capables de réprimer la prolifération, alors le traitement anti-androgénique favorise la progression tumorale. A l'inverse, si l'anti-androgène est retiré, les hormones circulantes résiduelles sont libres d'exercer leur effet anti-prolifératif sur les cellules hyper-sensibles ayant émergé au cours de la déprivation.

Bien sûr, l'existence clinique de cellules hyper-sensibles à un effet anti-prolifératif des androgènes reste à démontrer chez des patients subissant une thérapie anti-androgénique. Mais il existe un autre exemple de lignée prostatique tumorale humaine, les cellules ARCaP, dont la prolifération est également réprimée par les androgènes, tant *in vitro* qu'*in vivo* (Zhou et al., 1996).

D'autres voies moléculaires pourraient être impliquées dans le changement de statut d'un anti-androgène d'un état antagoniste à un état agoniste. En particulier, une dérégulation de l'équilibre entre co-activateurs et co-répresseurs de l'AR suite au blocage androgénique

complet, ou encore une activation AR-indépendante de la voie des MAP Kinases par l'hydroxy-flutamide sont des mécanismes potentiels actuellement étudiés (Miyamoto et al., 2004).

III. LE PROTO-ONCOGENE C-MYC

III.1- Historique

Une contribution majeure dans la compréhension des mécanismes de la tumorigénèse a été la découverte des proto-oncogènes. Un proto-oncogène est un gène qui est normalement impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, et qui peut conduire au cancer quand il est anormalement exprimé dans une cellule. La version mutée d'un proto-oncogène contribuant au cancer est appelée un oncogène. A l'heure actuelle, plus de 70 oncogènes ont été identifiés.

Le gène *myc* a initialement été identifié comme l'oncogène *v-myc* (*v*iral *myc*) du virus aviaire (AMV, Avian Myelocytomatosis Virus) MC29. Ce rétrovirus induit des carcinomes, endothéliomes, sarcomes et des myélocytomatoses (désordres leucémiques) chez certains oiseaux (Sheiness & Bishop, 1979; Sheiness et al., 1978).

Le gène *c-myc* a ensuite été cloné et caractérisé chez l'Homme et les rongeurs (Dalla-Favera et al., 1982b; Hayashi et al., 1987; Stanton et al., 1984a; Stanton et al., 1984b). Par la suite, le rôle de la version mutée de l'oncogène *c-myc* comme agent transformant a été démontré dans l'étiologie de différents cancers, dont le Lymphome de Burkitt (Dalla-Favera et al., 1982a).

Peu après la découverte du gène *c-myc*, 2 autres gènes, *N-myc* et *L-myc* ont été caractérisés comme des gènes amplifiés dans le neuroblastome humain et le carcinome du poumon à petites cellules respectivement. La famille des oncogènes *myc* comprend actuellement 3 membres bien caractérisés chez l'Homme, *c-myc*, *N-myc* et *L-myc*, et 2 autres gènes, *B-myc* et *S-myc*, identifiés seulement chez les rongeurs.

III.2- Organisation du gène *c-myc*

Chez l'Homme, le gène codant pour *c-myc* est localisé sur le chromosome 8 (locus 8q24) (Taub et al., 1982). Il comporte un premier exon (exon I) qui n'est pas traduit, et 2 autres exons codants pour la protéine (exons II et III). Une représentation schématique du gène *c-myc* est montrée dans la Figure 5.

Le gène *c-myc* porte 2 promoteurs majeurs, P1 et P2, localisés dans l'exon I, et distants de 161 nucléotides. Les ARNm issus de ces 2 sites d'initiation de la transcription représentent 95% des ARNm totaux.

Il existe 2 autres promoteurs, P0, situé à 500pb en 5' de P1, et P3, situés dans l'Intron I. P0 et P3 ne forment que 5% des transcrits.

Les promoteurs P1 et P2 possèdent chacun une séquence consensus de boîte TATA, contrairement aux sites P0 et P3.

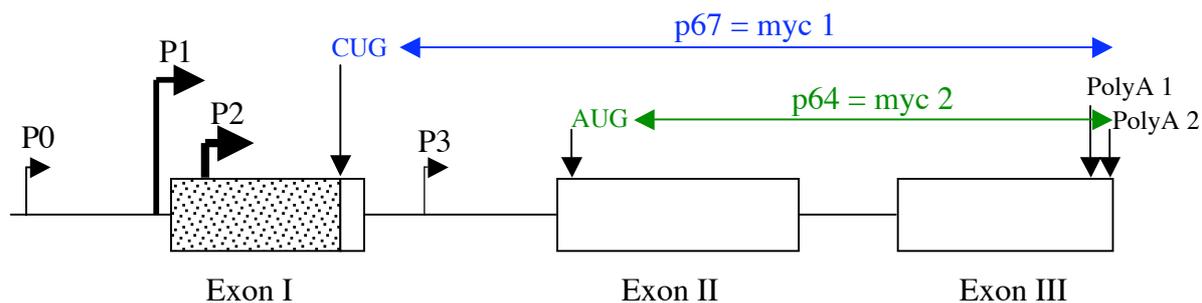


Figure 5 Schéma de la structure du gène *c-myc* humain.

Les exons I, II et III sont représentés par les rectangles. La région hachurée correspond à la partie non traduite de l'exon I. Les sites d'initiation de la transcription P0, P1, P2 et P3 sont signalés par des flèches de différentes épaisseurs selon la quantité relative de transcrits formés. CUG et AUG sont les 2 sites d'initiation de la traduction. Les 2 sites PolyA correspondant aux sites de poly-adénylation sont également montrés. Selon le site d'initiation de la traduction utilisé, 2 formes de la protéine peuvent être synthétisées, *myc 1* (p67) ou *myc 2* (p64). La taille des différents exons et introns n'est pas à l'échelle. D'après (Spencer & Groudine, 1991).

Il n'existe qu'un seul cadre de lecture (ORF) pour les ARNm de *c-myc*, mais 2 sites d'initiation de la traduction sont possibles. Le codon d'initiation AUG canonique est localisé à l'extrémité 5' de l'exon II, et code pour une protéine de 64kD. Un codon cryptique d'initiation de la traduction, CUG, est localisé à l'extrémité 3' de l'exon I, en phase avec l'ORF. La traduction à partir de ce site donne une protéine de 67kD.

La protéine *myc* p64 est constituée de 439 acides aminés, et la protéine p67 possède 14 acides aminés supplémentaires ajoutés à l'extrémité N-terminale par rapport à p64 (Hann et al., 1988). Les 2 formes de *c-myc* sont des phospho-protéines nucléaires hautement conservées, et d'une demi-vie d'environ 20-30min (Luscher & Eisenman, 1990). L'abondance relative des 2 formes varie d'un type cellulaire ou d'une lignée à l'autre, mais la forme p64 est en général majoritaire (Hann & Eisenman, 1984).

Une troisième isoforme de la protéine *myc* a également été identifiée et nommée *Myc-S* (Short) cette protéine est issue d'un site d'initiation situé à l'extrémité 3' de l'exon II, il lui manque 100 acides aminés en N-terminal, et ces résidus manquant recouvrent en fait le domaine d'activation de la transcription (Spotts et al., 1997). C'est donc une protéine inactive, agissant en inhibiteur dominant négatif de la transcription de la forme entière *c-myc*.

Il existe des séquences cis-régulatrices de la transcription du gène, leur rôle et leur localisation seront détaillés ultérieurement (chapitre III.7).

III.3- Organisation de la protéine *c-myc*

La protéine *c-myc* est un Facteur de Transcription, et à ce titre, elle comporte certains domaines caractéristiques (Facchini & Penn, 1998).

L'extrémité N-terminale comporte le domaine de Transactivation (résidus 1-143) ou TAD, qui contient 2 boîtes *Myc* (*Myc boxes*, Mb) hautement conservées MbI (résidus 45-63) et MbII (résidus 129-141). Cette dernière est essentielle à toutes les activités biologiques

connues de c-myc. La protéine contient aussi 2 séquences de localisation nucléaire (NLS), l'une en 320-328, l'autre en 364-374.

L'extrémité C-terminale contient 3 domaines importants□

- 1) la région «Basique□ (BR, 355-368) est impliquée dans la reconnaissance et la liaison à des séquences d'ADN spécifiques.
- 2) la région Helix-Loop-Helix (HLH, 368-410).
- 3) la région leucine-zipper (LZ, 411-439) responsable de l'hétéro-dimérisation de c-myc avec son partenaire Max.

La contiguité entre les régions BR, HLH et LZ est caractéristique des facteurs de transcription qui lient des séquences spécifiques d'ADN.

La protéine c-myc peut être phosphorylée par différentes kinases, en particulier les MAP Kinases (Seth et al., 1992), et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3, (Pulverer et al., 1994)). La phosphorylation de certains résidus (Thr58, Ser62) serait impliquée dans le contrôle de l'activité transactivatrice de c-myc, ou dans son pouvoir transformant (Henriksson et al., 1993).

III.4- Fonctions de c-myc□ régulation de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaires

Comme nous l'avons mentionné, c-myc appartient à une famille de facteurs de transcription qui forment des hétéro-dimères et se lient à des séquences d'ADN spécifiques sur le promoteur de gènes-cibles. Le partenaire de dimérisation de c-myc est Max (Blackwood et al., 1992), il possède lui aussi des région BR, HLH et LZ, et peut former des hétéro-dimères avec c-myc, N-myc, L-myc, avec les membres de la famille MAD, ou bien s'homo-dimériser (Pelengaris et al., 2002).

Tous ces complexes peuvent se lier aux mêmes séquences d'ADN, appelées E-box, CACGTG et CACATG et à d'autres séquences non-canoniques de plus faible affinité (Blackwell et al., 1990; Prendergast & Ziff, 1991). Schématiquement, la liaison des complexes Myc-Max aux séquences E-box induit la transactivation du gène-cible dans la plupart des cas, alors que les complexes Mad-Max ou Max-Max, qui n'ont pas de domaine de transactivation, bloquent l'effet biologique de Myc-Max par une compétition pour l'occupation de la séquence E-box.

III.4-1. C-myc et la transformation cellulaire

Les altérations génétiques conduisant à l'activation oncogénique de c-myc incluent les amplifications du gène (Abba et al., 2004), la translocation chromosomique (Magrath, 1990), l'insertion provirale (Payne et al., 1982) ou la transduction rétrovirale (Fulton et al., 1987). Des points de mutation dans la séquence codante de c-myc ont aussi été rapportés dans plusieurs tumeurs (Bhatia et al., 1993).

Une altération de l'expression de c-myc a été démontrée dans un grand nombre de tumeurs humaines, notamment le sein, le colon, le carcinome du poumon à petites cellules, le glioblastome, les leucémies myéloïdes, le Lymphome de Burkitt ou l'ostéosarcome (Cole, 1986; Marcu et al., 1992; Spencer & Groudine, 1991).

Des cellules murines transformées exprimant la forme oncogénique de c-myc forment des tumeurs chez l'animal (Keath et al., 1984), et quelques études utilisant des souris transgéniques ont suggéré un rôle important de c-myc dans la tumorigénèse (Adams et al., 1985; Stewart et al., 1984). Les mécanismes par lesquels c-myc induit la transformation sont peu connus, mais on sait que c-myc peut transactiver un certain nombre de gènes stimulant la croissance cellulaire.

III.4-2. C-myc et le cycle cellulaire

De manière générale, l'expression de c-myc est corrélée au potentiel prolifératif de la cellule. Les cellules exprimant des quantités très élevées de c-myc ont un besoin réduit de facteurs de croissance (Sorrentino et al., 1986), leur phase G1 a une durée plus courte (Karn et al., 1989) et elles ne peuvent entrer en état de quiescence (Kohl & Ruley, 1987).

Dans les cellules quiescentes, l'expression de c-myc est virtuellement indétectable. Sous l'effet de signaux mitogéniques, l'expression de l'ARNm et de la protéine augmentent rapidement et transitoirement au fur et à mesure que les cellules entrent en phase G1. Lorsque les cellules sont en phase proliférative, l'expression de c-myc diminue alors graduellement, mais elle reste détectable (Campisi et al., 1984; Kelly et al., 1983; Moore et al., 1987). Dans ces systèmes, l'augmentation de la transcription de c-myc a lieu indépendamment d'une synthèse protéique *de novo*, suggérant que c-myc est un gène de réponse immédiate, directement régulé par les signaux mitogéniques. De nombreuses études ont par ailleurs montré que l'induction de l'expression de c-myc après la stimulation de cellules quiescentes est un événement nécessaire pour la transition G0-G1 et G1-S (Eilers et al., 1989; Shichiri et al., 1993). Enfin, le retrait des facteurs de croissance ou le traitement par des agents induisant la différenciation cellulaire provoque la diminution de l'expression de c-myc jusqu'à des niveaux indétectables (Dean et al., 1986; Dotto et al., 1986). Contrairement à c-myc, son partenaire Max est exprimé à un niveau constant quelle que soit la position des cellules dans le cycle, et sa demi-vie est beaucoup plus longue (24h), ce qui implique que ce sont les variations de l'expression de c-myc qui imposent l'activité biologique des dimères Myc-Max (Blackwood et al., 1992).

Un diagramme schématique de l'expression de c-myc, Mad et Max durant le cycle cellulaire est représenté dans la Figure 6.

Le rôle de c-myc dans la transition G1-S sera discuté ultérieurement (chapitre III.6).

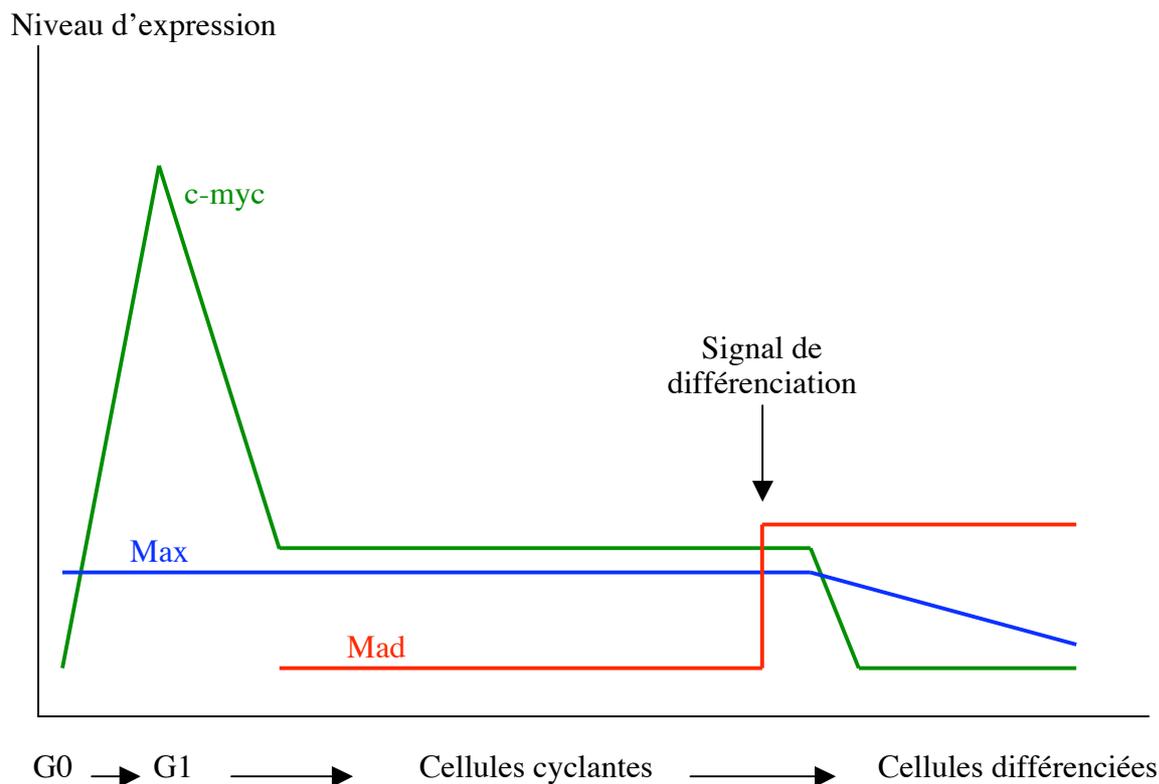


Figure 6 : Profils d'expression de c-myc et des protéines associées dans des cellules cyclantes et différenciées.

D'après (Henriksson & Luscher, 1996).

III.4-3. C-myc et la différenciation cellulaire

Dans de nombreux types cellulaires, une sous-régulation de c-myc accompagne le processus de différenciation terminale et la sortie définitive des cellules du cycle cellulaire (voir Fig.6). Le blocage de l'activité de c-myc par des oligonucléotides anti-sens, par l'expression ectopique de Max, ou par l'expression de mutants dominants négatifs de c-myc peut induire la différenciation des cellules leucémiques HL-60, des cellules F9 (tératocarcinome) ou des cellules MEL (érythro-leucémie de souris) (Canelles et al., 1997; Griep & Westphal, 1988; Holt et al., 1988; Prochownik et al., 1988). Réciproquement, des études indépendantes ont montré que l'expression ectopique de c-myc est suffisante pour abolir l'induction de la différenciation dans les cellules MEL (Prochownik & Kukowska, 1986), F9 (Onclercq et al., 1989), U-937 (lignée de monoblastes, (Larsson et al., 1988)) ou PC12 (lignée neuronale, (Maruyama et al., 1987)). Quelques exceptions ont été rapportées par exemple, la sur-expression ectopique de c-myc peut dans certains types cellulaires (myoblastes ou cellules souche de kératinocytes) diriger l'exécution du processus de différenciation (Gandarillas & Watt, 1997; Screaton et al., 1997).

Ces données suggèrent donc globalement que la suppression de c-myc pourrait être nécessaire pour induire la différenciation de certains types cellulaires, en faisant sortir les cellules du cycle.

III.4-4. C-myc et l'apoptose

Les avancées réalisées dans la connaissance des fonctions de c-myc ont permis de découvrir que paradoxalement, c-myc est capable, dans certaines circonstances, d'induire l'apoptose. Des études indépendantes effectuées sur des fibroblastes (Evan et al., 1992) ou des cellules hématopoïétiques (Askew et al., 1991) ont révélé que l'expression constitutive de c-myc nécessite la présence de facteurs de croissance ou de survie pour que les cellules puissent proliférer, et l'élimination du sérum (pour les fibroblastes) ou de l'interleukine 3 (pour les cellules hématopoïétiques) provoque l'apoptose. La fonction de c-myc serait alors de sensibiliser les cellules à ces signaux apoptotiques.

Les mécanismes de l'apoptose induite par c-myc sont peu connus, plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose (p19^{ARF}, p21, p53, Bax) contiennent dans leur promoteur des régions répondant à c-myc, mais le rôle direct de ces gènes dans ce processus de sensibilisation pro-apoptotique reste incertain.

C-myc couple la prolifération cellulaire à l'induction de l'apoptose dans certaines conditions pour lesquelles les facteurs de survie sont limitants. Pour que des cellules puissent survivre à une expression dysrégulée de c-myc, elles ont ainsi besoin soit d'un apport continu en facteurs de survie, soit de l'acquisition de mutations anti-apoptotiques supplémentaires (Sears & Nevins, 2002).

Pour résumer, ces données suggèrent un rôle critique de c-myc dans la régulation du cycle cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose. Bien que les mécanismes moléculaires conduisant à une dysrégulation de l'expression de c-myc dans les tumeurs soient maintenant identifiés, la fonction cellulaire précise de c-myc reste partiellement énigmatique.

Une vision plus nette des fonctions de c-myc peut être apportée par l'identification de ses gènes-cibles, qui sont discutés dans la section suivante.

III.5- Les gènes-cibles de c-myc

Une liste des principaux gènes-cibles de c-myc figure dans le Tableau 2.

Certains sont des gènes codant pour des régulateurs essentiels du cycle cellulaire (cycline D1, cycline A, cdk4, p15, p21), d'autres sont impliqués dans la croissance et le métabolisme (DHFR, LDH-A), dans les processus de transcription (E2F-2, eIF-2) ou enfin l'apoptose (p19^{ARF}, p53, p21). Les données concernant la cycline D1 sont très controversées, certains travaux montrent une induction (Daksis et al., 1994), d'autres une répression (Philipp et al., 1994), de l'expression de la cycline D1 par c-myc.

Tableau 2 ☐ Liste des gènes-cibles de c-myc.

gène	Effet de c-myc	Technique utilisée	Fonction cellulaire
CAD	↗	E-box	biosynthèse pyrimidine
p19 ^{ARF}	↗	correl	apoptose
p15 ^{ink4B}	↘	Inr	cycle cellulaire
p21 ^{waf1/cip1}	↘	Voir texte	cycle cellulaire
p27 ^{kip1}	↘	Inr	cycle cellulaire
cdc25A	↗	correl / E-box	cycle cellulaire
cycline A	↗	correl	cycle cellulaire
cycline D1	↗ / ↘	E-box / Inr / differ	cycle cellulaire
cycline D2	↗	E-box	cycle cellulaire
cycline E	↗	correl	cycle cellulaire
cdk4	↗	E-box	cycle cellulaire
gadd45	↘	differ	cycle cellulaire
Cul1	↗	E-box	dégradation de p27 ^{kip1}
DHFR	↗	E-box	croissance et métabolisme
E2F-2	↗	E-box	facteur de transcription
eIF-2☐	↗	correl	facteur d'initiation de la transcription
eIF-4E	↗	correl / E-box	facteur d'initiation de la transcription
p53	↗	differ / E-box	gène suppresseur de tumeur
Téломérase/hTERT	↗	correl / E-box	«☐immortalité☐»
Thrombospondine-1	↘	E-box	adhésion cellulaire / métastases
LDH-A	↗	E-box	enzyme du métabolisme
ODC	↗	E-box	biosynthèse polyamine
c-myc	↘	Inr	facteur de transcription
AR	Nd	E-box	Récepteur nucléaire

Techniques utilisées pour l'identification des gènes-cibles☐

Correl☐ l'expression du gène-candidat est corrélée à celle de c-myc lors de la transition quiescence-prolifération ou prolifération-différenciation. Importance fonctionnelle pour les phénotypes médiés par c-myc.

Differ☐ gènes différentiellement exprimés sous l'expression forcée de c-myc en absence de synthèse protéique de novo.

E-box☐ présence d'un site fonctionnel de liaison pour Myc-Max dans le promoteur ou une autre région du gène-candidat.

Inr☐ présence d'un élément initiateur fonctionnel dans le promoteur ou une autre région du gène-candidat.

↗, ↘☐ effet de c-myc sur l'expression du gène-candidat.

Nd☐ non déterminé.

CAD☐ carbamoyl phosphate synthase☐ ODC☐ ornithine decarboxylase☐ LDH☐ lactate dehydrogenase☐ DGFR☐ dihydrofolate reductase, eIF☐ eukaryotic initiation factors. AR☐ Récepteur aux Androgènes.

D'après (Bello-Fernandez et al., 1993; Bouchard et al., 1999; Daksis et al., 1994; Facchini et al., 1997; Galaktionov et al., 1996; Gartel et al., 2001; Grad et al., 1999; Hermeking et al., 2000; Jansen-Durr et al., 1993; Jones et al., 1996; O'Hagan et al., 2000; Perez-Roger et al., 1997; Philipp et al., 1994; Reisman et al., 1993; Staller et al., 2001; Yang et al., 2001).

C-myc peut aussi réguler négativement la transcription de son propre gène *via* l'élément initiateur (Inr) situé au niveau du promoteur P2 (Facchini et al., 1997).

Concernant p21, l'expression de c-myc réprime la transcription de ce gène car les complexes Myc-Max interagissent au niveau de ce promoteur avec des facteurs de transcription positifs comme Miz1 et/ou Sp1. Cette interaction empêche l'interaction de Miz1 avec son propre co-activateur (p300) de telle sorte que le promoteur de p21 ne peut être transcriptionnellement actif (Staller et al., 2001).

III.6- C-myc et la transition G1-S

L'importance de c-myc pour la transition G1-S est illustrée par le constat que des cellules c-myc *-/-* prolifèrent 3 fois moins vite que leur forme sauvage, et présentent des phases G1 et G2 très ralenties (Mateyak et al., 1997).

La promotion de la transition G1-S par c-myc a lieu essentiellement par son action sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire.

Des travaux indépendants ont prouvé que c-myc participe à l'activation des complexes cdk2-cycline E en G1 (Berns et al., 1997; Perez-Roger et al., 1997; Steiner et al., 1995). Les cellules c-myc *-/-* présentent une activité kinase cdk2 très réduite par rapport aux cellules c-myc *+/+* (Mateyak et al., 1997). Différents travaux ont suggéré que l'effet activateur de c-myc sur les complexes cdk2-cycline E serait médié par l'induction d'une protéine de séquestration de p27. D'où l'impossibilité pour p27 d'exercer son effet inhibiteur sur l'activité kinase de cdk2-cycline E (Steiner et al., 1995; Vlach et al., 1996). Comme nous l'avons mentionné précédemment, il existe des données contradictoires concernant l'effet de c-myc sur l'expression de la cycline D1, mais des travaux récents ont cependant montré que l'induction de l'expression des cyclines D par c-myc pourrait contribuer à séquestrer p27, ce qui n'exclut pas l'existence d'une autre protéine de séquestration (Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999). D'autres hypothèses ont été envisagées, sans s'exclure mutuellement. C-myc pourrait en particulier stimuler la transcription du gène de la cycline E bien qu'il ne contienne aucune E-box (Perez-Roger et al., 1997). C-myc stimule également de façon directe la transcription du gène *cdc25A*, codant pour une phosphatase qui élimine les groupements phosphates inhibiteurs sur les kinases cdk2, d'où une activité kinase cdk2 accrue (Galaktionov et al., 1996). Enfin, il a été montré que l'expression accrue de c-myc provoque une répression de la transcription du gène codant pour p27 (Yang et al., 2001). Indirectement, c-myc pourrait également diriger la dégradation de p27 par la voie Ubiquitine –Protéasome, car il stimule l'expression de Cul1 (O'Hagan et al., 2000). Or, Cul-1 fait partie du complexe SCF^{Skp2} qui participe à la poly-ubiquitination de p27 (Carrano et al., 1999).

C-myc stimule également la progression des cellules en phase G1 en contribuant à augmenter l'expression des facteurs de transcription E2F, soit indirectement en activant les kinases cdk2-cycline E (d'où hyperphosphorylation de Rb et activation de E2F qui stimule sa propre expression), soit directement en favorisant la transcription des gènes E2F-1, E2F-2 et E2F-3. Dans ce dernier cas, le mode d'action de c-myc reste inconnu, aucune E-box n'ayant été identifiée sur ces gènes à l'exception de E2F-2 (Adams et al., 2000; Leone et al., 1997).

Enfin, les effets négatifs directs de c-myc sur la transcription de p15 et p21 (inhibiteurs de cdk) et ses effets positifs sur l'expression de cdk4 et de la cycline A sont autant d'événements moléculaires favorisant la progression en G1 et le passage en phase S (voir Tableau 2).

III.7- Régulation de l'expression de c-myc

L'expression de c-myc peut être contrôlée au niveau de l'initiation de la transcription, de l'élongation du transcrit et par des processus post-transcriptionnels.

III.7-1. Régulation de l'initiation de la transcription

Comme nous l'avons mentionné précédemment, *c-myc* est transcrit à partir de sites d'initiation multiples et régulés indépendamment. Les 2 promoteurs majeurs, P1 et P2 initient 75-95% des transcrits, le reste étant initié par les sites mineurs P0 et P3, qui sont dépourvus de boîte TATA.

De nombreuses données montrent qu'il existe des séquences régulatrices éloignées en 5' du promoteur, et des sites régulateurs dans le premier intron. La Figure 7 représente schématiquement la localisation de différentes régions cis-régulatrices, identifiées soit en mesurant les effets de délétions du promoteur sur son activité (CAT, Luciférase) dans des cellules transfectées, soit par des expériences d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), soit par la mise en évidence de sites hyper-sensibles à la DNase I (Siebenlist et al., 1984; Spencer & Groudine, 1991). Le Tableau 3 résume le rôle des différentes régions régulatrices identifiées dans le gène c-myc.

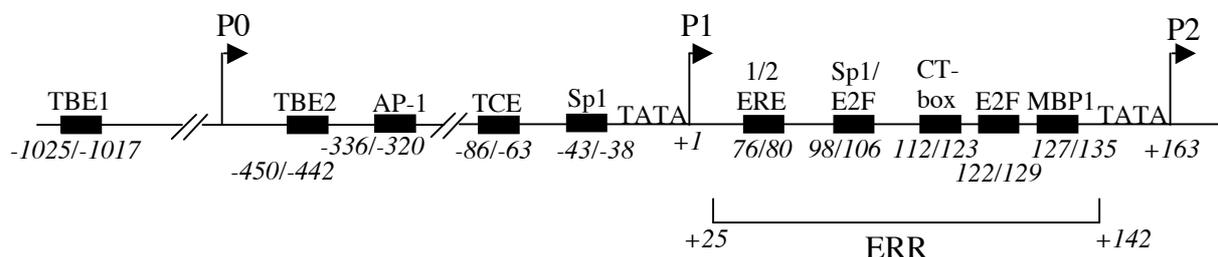


Figure 7 Représentation schématique des séquences cis-régulatrices identifiées sur le gène c-myc humain.

La position des régions régulatrices, schématisées par un rectangle noir, est relative au promoteur P1 (+1). TATA = séquences boîtes TATA; TCE = élément de contrôle par le TGF- β ; Sp1 et E2F = sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 et E2F; 1/2 ERE = demi-site d'un Élément de Réponse canonique aux Oestrogènes; CTbox = élément riche en CT; MBP-1 = site de liaison pour MBP-1 (*c-myc* promoter binding protein-1); ERR = région de réponse pour les oestrogènes.

Tableau 3 Rôle des différentes séquences cis-régulatrices identifiées sur le promoteur de c-myc.

Région cis-régulatrice	description
-60 à -37	Essentielle à la transcription à partir de P1 (Nishikura, 1986). contient une séquence riche en GC (-38 à -43) et une autre riche en CT qui lient les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (Majello et al., 1995). Des études <i>in vitro</i> de transfection ont montré que la transactivation médiée par Sp1 sur des promoteurs répondant à Sp1 est réprimée par Sp3.
5 CT-box en tandem (CCCTCCCC) situés à 101pb en 5' de P1	Promotion de l'activité de P1, et essentielles pour une activité maximale de P2. Liaison à Sp1/Sp3 (DesJardins & Hay, 1993).
1 CT-box (CCTCCCTCCCT) en orientation inversée, à 110pb en 3' de P1	Cet élément a un effet inhibiteur sur P1, et est nécessaire à la transcription de P2. Peut lier Sp1/Sp3 (DesJardins & Hay, 1993).
2 sites de liaison à E2F GATCGCGC (122-129) et GCGGGAAA (98-106)	Coopèrent avec Sp1 pour la transactivation de P2 (DesJardins & Hay, 1993; Majello et al., 1995).
Région de réponse aux oestrogènes (116pb) située de +25 à +142	Permet l'activation du promoteur de c-myc en réponse à l'oestradiol dans les cellules HeLa et MCF-7 (Dubik & Shiu, 1992). Contient un 1/2 ERE (76-80) et un site Sp1/E2F (98-106) qui peuvent coopérer pour transactiver les promoteurs répondant aux oestrogènes (Duan et al., 1998; Qin et al., 1999).
Elément de contrôle par le TGF- β 1 localisé en 5' de P1 (-86 à -63)	Inhibe l'initiation de P1, peut-être <i>via</i> la protéine Rb (Pietenpol et al., 1991).
Région de 26pb (-343 à -318)	Contribue à une régulation négative de l'expression de c-myc, mais contient aussi des sites de liaison pour le facteur de transcription AP-1 (Takimoto et al., 1989).
Séquence CGCTGAGTA (127-135) en 5' de P2	Lie la protéine MBP-1 et semble être une séquence inhibitrice de la transcription de c-myc (Ray & Miller, 1991).
TBE 1 (-1025 à -1017) et TBE 2 (-450 à -442)	Sites de liaison pour les protéines de la famille Tcf/LEF. L'activité du promoteur de c-myc est stimulée par le complexe Tcf4/ β -caténine dans des cellules de cancer colorectal (He et al., 1998).

La localisation des séquences régulatrices est relative à P1(+1).

III.7-2. Régulation de l'élongation du transcrit

Les mécanismes de contrôle de l'élongation de la transcription jouent de façon générale un rôle important dans la régulation d'un grand nombre de proto-oncogènes, incluant c-myc. Des expériences de «nuclear run-on» *in vitro* ont été réalisées pour déterminer la région du gène c-myc impliquée dans ce type de contrôle. Bentley & Groudine ont été les premiers à montrer, sur le gène c-myc humain, qu'une région de 95pb, se terminant à 35pb en 5' de la transition exon I-intron I, est suffisante pour permettre un arrêt prématuré de l'élongation, lorsque cette région est clonée en aval du promoteur HSV-tk (Bentley & Groudine, 1986; Bentley & Groudine, 1988).

De nombreux facteurs de croissance, agents mitogènes ou de différenciation, peuvent agir en altérant l'élongation des transcrits de c-myc, comme cela a été démontré dans les cellules HL-60 en réponse à la vitamine D (Simpson et al., 1987). Une augmentation du niveau d'ARNm de c-myc, partiellement due à l'arrêt du processus de blocage d'élongation, se produit dans les lymphocytes T quiescents stimulés par le PMA (phorbol myristate acetate) (Lindsten et al., 1988).

III.7-3. Régulations post-transcriptionnelles

Puisque l'ARNm et la protéine c-myc ont une demi-vie très brève (Rabbitts et al., 1985), la cellule doit en permanence synthétiser à la fois l'ARNm et la protéine, afin de maintenir un niveau fonctionnel de l'activité de c-myc.

La régulation de l'activité s'effectue aussi par des voies post-traductionnelles, qui peuvent potentialiser ou abolir l'activité de c-myc, et incluent des phénomènes de phosphorylation ou des interactions avec d'autres protéines. Des données contradictoires ont été rapportées sur la fonction de la phosphorylation de c-myc et nous n'approfondirons pas davantage le sujet (revue (Facchini & Penn, 1998)).

III.8- C-myc, les androgènes et le cancer de la prostate

Etant donnée l'importance de c-myc dans l'étiologie de certains cancers d'une part, et dans le contrôle de la prolifération ou de la différenciation cellulaire d'autre part, il semble indispensable d'examiner de façon plus approfondie le rôle de c-myc dans le contexte du cancer de la prostate et des androgènes.

III.8-1. Place de c-myc dans l'étiologie du carcinome prostatique

Le rôle de l'expression ou de l'amplification des oncogènes dans le cancer de la prostate est encore peu connu. Une sur-expression de c-myc a été observée dans des tumeurs prostatiques de grade élevé, peu différenciées et très agressives, ainsi que dans des lignées tumorales prostatiques (Buttayan et al., 1987; Rijnders et al., 1985). Enfin, une étude plus récente a également mis en évidence une amplification du gène c-myc dans un pourcentage significatif de tumeurs prostatiques métastatiques (Jenkins et al., 1997).

De façon générale, on considère à présent que la contribution de c-myc à l'initiation du cancer de la prostate est très pauvre, mais on ne peut exclure que son amplification ou un gain d'activité puisse jouer un rôle significatif dans la progression vers un stade avancé bien que des données contradictoires aient été publiées (Matusik et al., 1987).

III.8-2. Régulation de c-myc par les androgènes dans les cellules cancéreuses prostatiques

Dans la mesure où le contexte androgénique a un effet important sur la prolifération, la différenciation ou l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques, il semble indispensable d'examiner les interactions possibles entre le signal androgénique, la régulation de c-myc, et la réponse proliférative des cellules.

Des travaux réalisés sur la prostate ventrale du rat ont montré une régulation de c-myc en fonction du contexte androgénique□ la castration des rats induit l'apoptose des cellules prostatiques et une augmentation de l'ARNm de c-myc, qui peut être prévenue par l'administration d'androgènes au moment de la castration (Buttayan et al., 1987; Quarmby et al., 1987). L'expression de c-myc a été observée dans les cellules épithéliales luminales de la prostate ventrale, c'est-à-dire les cellules qui entrent en apoptose sous l'effet de la castration. Puisqu'une sur-expression de c-myc peut diriger l'apoptose dans des cellules déprivées en facteurs de croissance (Evan et al., 1992; Packham & Cleveland, 1995), il pourrait donc jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose suite à une déprivation androgénique. A l'inverse, dans des cellules humaines épithéliales prostatiques en culture primaire et non transformées (HNTEP), la DHT stimule la croissance cellulaire et l'expression de l'ARNm de c-myc (Silva et al., 2001).

Ces données *in vivo* suggèrent donc que c-myc pourrait occuper une place importante parmi les voies de signalisation impliquées dans le contrôle androgénique de la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques, mais la nature du lien entre c-myc et l'AR, ainsi que les bases mécanistiques de la régulation de c-myc par les androgènes sont encore à approfondir.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Notre Thèse, centrée sur le cancer de la prostate androgéno-dépendant, concerne d'une part l'étude de l'influence des androgènes surrénaliens, et d'autre part l'étude de voies de signalisation impliquées dans un effet paradoxal exercé par les androgènes sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques.

Le premier objectif de notre Thèse a été d'examiner si les androgènes surrénaliens, en particulier le S-DHEA, pouvaient avoir un effet androgénique sur la biologie de cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes, la lignée LNCaP.

Pour répondre à cette question, nous avons mené 2 types d'études complémentaires :

1- une étude du métabolisme cellulaire des androgènes surrénaliens

Cette étude avait pour objectif de déterminer si les cellules LNCaP sont capables de convertir les précurseurs surrénaliens, à leur concentration physiologique, en androgènes actifs. Elle a été réalisée de façon dynamique, c'est-à-dire à travers une analyse cinétique, et de façon exhaustive, afin de cerner la formation relative des androgènes actifs, mais aussi des produits de détoxification.

2- une étude de l'effet de ces androgènes surrénaliens sur la prolifération cellulaire

La comparaison de l'effet des androgènes surrénaliens à celui de la DHT (androgène actif de référence), en termes de prolifération des cellules LNCaP, nous a permis de déterminer si ces androgènes ont un effet androgénique, comparable quantitativement ou qualitativement (stimulation/répression) à celui de la DHT. En confrontant ces résultats à ceux issus de l'analyse métabolique, nous avons pu relativiser l'impact des androgènes surrénaliens sur la biologie de cellules cancéreuses prostatiques.

L'étude centrale de notre Thèse a consisté à documenter l'activité régulatrice des androgènes sur la prolifération des cellules LNCaP. Nous nous sommes intéressés en particulier à un effet paradoxal que les androgènes, naturels ou synthétiques, peuvent exercer sur la prolifération de ces cellules.

Les objectifs que nous nous étions fixés étaient d'une part, de mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans cet effet des androgènes, et d'autre part de déterminer l'implication de l'AR dans ce phénotype, et d'identifier un ou plusieurs gène-cible des androgènes.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons caractérisé l'effet des androgènes sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire, et nous avons analysé le contrôle par les androgènes de différentes protéines régulatrices du cycle cellulaire. Cette étude a été réalisée au niveau de l'expression des ARNm et des protéines.

Pour déterminer l'implication de l'AR dans cet effet, nous avons analysé la réponse aux androgènes de plusieurs lignées cellulaires, différant de par leur niveau d'expression de l'AR

(absence d'expression, ou sur-expression) et nous avons également étudié l'effet de différents antagonistes de l'AR.

Enfin, nous nous sommes focalisés sur la protéine c-myc, en tant que candidat au rôle de gène-cible direct des androgènes, médiateur de leurs effets. Nous avons ainsi analysé sa régulation en fonction du temps et de la dose d'hormone, au niveau de l'ARNm et de la protéine, et nous avons cherché à établir une corrélation entre la régulation de c-myc et celle de la prolifération.

Une analyse moléculaire par la méthode d'Immunoprécipitation de la Chromatine nous a finalement permis d'aborder les bases mécanistiques de la régulation de c-myc par l'AR, et de proposer un schéma de la répression transcriptionnelle de c-myc par l'AR en présence d'hormones agonistes.

1^{ère} PARTIE □ METABOLISME DES ANDROGENES SURRENALIENS PAR LES CELLULES LNCaP ET EFFETS SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE

1. Etude du métabolisme des androgènes surrénaliens par les cellules LNCaP

Cette étude métabolique a été réalisée en incubant les cellules LNCaP en présence d'androgènes radiomarqués à leur concentration physiologique dans le plasma humain. Les métabolites formés sont ensuite extraits et séparés selon le protocole résumé dans la Figure 8.

Nous avons analysé le métabolisme déjà décrit de la DHT (2nM), et nous l'avons comparé à celui des androgènes surrénaliens, la DHEA (10nM) et le S-DHEA (1µM). Pour chaque substrat, nous avons suivi la formation des métabolites à travers une étude cinétique.

I.1 Observations préliminaires

I.1-1 Notion de rendements

A chaque étape de l'expérimentation, des prélèvements d'aliqots ont permis le comptage de la radioactivité présente dans chaque phase, tout au long des processus d'extraction et d'hydrolyses successives (Fig.8).

Grâce à ces comptages, nous avons pu constater que la radioactivité initialement introduite au contact des cellules est supérieure à la radioactivité présente dans le milieu à la fin de l'incubation, c'est-à-dire avant toute procédure d'extraction/manipulation. La radioactivité récupérée à la fin de l'incubation représente en moyenne 86% (± 6 , n=9) de la radioactivité initiale introduite dans le milieu. Cette différence rend compte à la fois de la radioactivité encore présente au niveau intracellulaire et de la radioactivité adsorbée sur le plastique de culture. Ce pourcentage n'est pas négligeable. Pourtant, la présence de protéines dans le milieu d'incubation provoque lors des extractions la formation d'une émulsion très dense, qui gêne la séparation des phases aqueuse et organique, et entraîne à la fois des contaminations de phase, et des pertes de radioactivité. L'extraction des métabolites à partir du tapis cellulaire ne ferait qu'aggraver ce phénomène, déjà contraignant, et diminuerait les rendements. Aussi l'analyse des produits issus du métabolisme des stéroïdes n'a été réalisée qu'à partir du milieu de culture, comme cela a souvent été décrit dans la Littérature (Castagnetta et al., 1997).

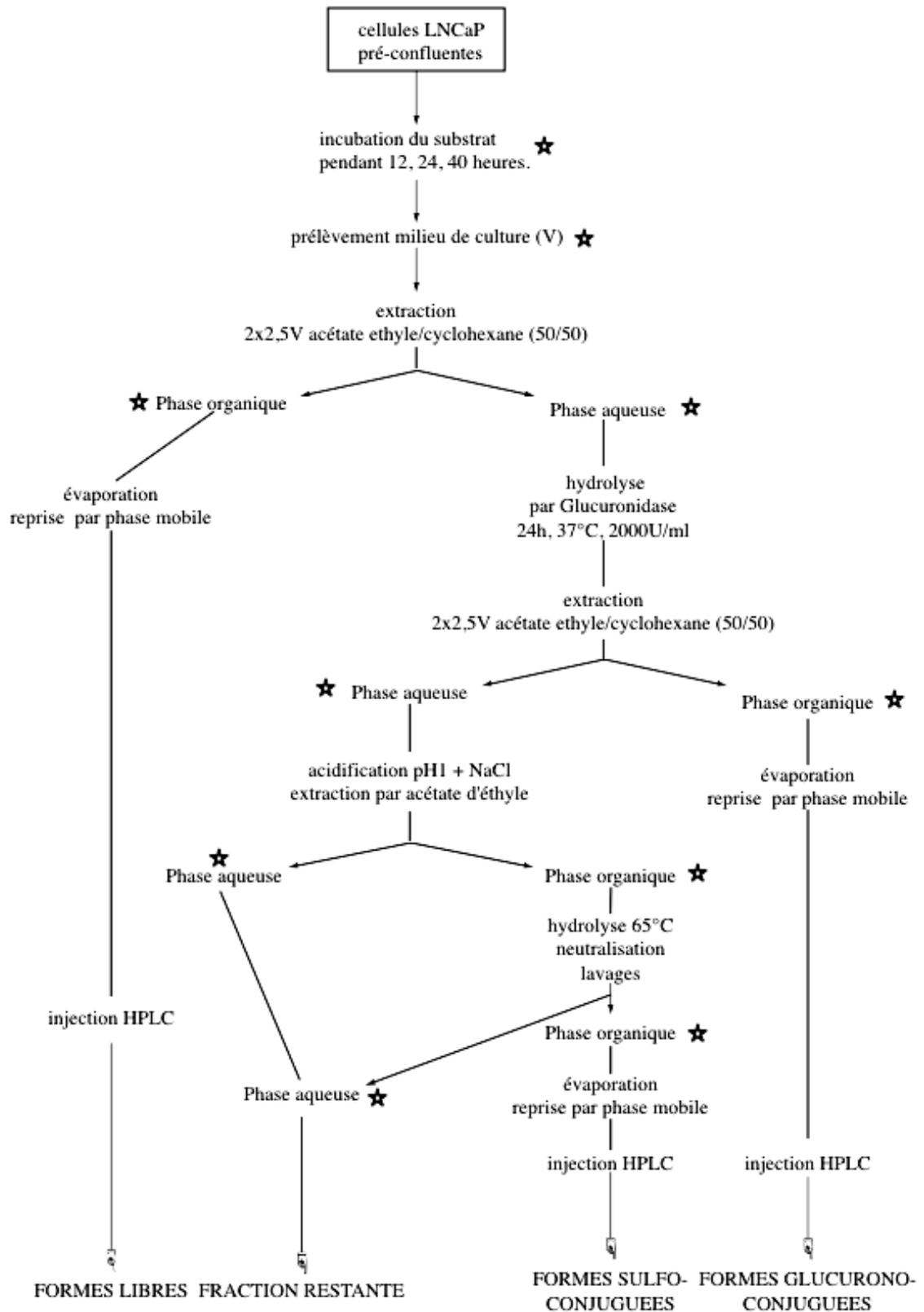


Figure 8 □ Protocole d'étude du métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP.

★ □ indique les étapes pour lesquelles un aliquot est prélevé en vue du comptage de la radioactivité.

D'autre part, ces comptages nous ont permis de déterminer le rendement de chaque étape d'extraction, calculé par le rapport entre la radioactivité totale récupérée dans les 2 phases et la radioactivité du mélange initial. Chaque étape d'extraction présente individuellement un bon rendement, celui-ci pouvant atteindre jusqu'à 95%. Cependant, comme le montre la Figure 8, de nombreuses étapes d'extraction/hydrolyse se succèdent tout au long de la procédure expérimentale, et même si chaque étape entraîne des pertes limitées de radioactivité, l'accumulation de ces étapes jusqu'à l'obtention des fractions finales engendre d'importantes pertes. Toutes expérimentations confondues (quel que soit le substrat ou sa durée d'incubation), la radioactivité perdue représente en moyenne 38% (± 9 , n=6) de la radioactivité introduite initialement dans le milieu de culture. Cette perte de radioactivité est essentiellement liée aux nombreuses manipulations effectuées dans différents types de verrerie, imposant transvasements, fuites etc.

Enfin, nous avons constaté (Fig.8) que les 3 types de formes extraites (libres, glucurono- et sulfo-conjuguées) ne correspondent pas à la totalité de la radioactivité extraite. Il reste, dans la dernière phase aqueuse obtenue, une quantité non négligeable de radioactivité, correspondant à des produits non extraits ou non hydrolysés (=fraction restante). A partir de stéroïdes purs radiomarqués, nous avons contrôlé d'une part le taux de récupération des formes libres, et d'autre part l'efficacité du processus de solvolysse. A l'issue de ces vérifications, il apparaît que cette radioactivité résiduelle correspond plutôt à des formes glucurono-conjuguées non hydrolysées, ou à d'autres formes de conjugués que nous n'avons pas étudiées (méthylation, conjugaison au glutathion).

Les calculs des proportions relatives de chaque fraction ou de chaque produit doivent tenir compte de ces notions. **La «Radioactivité totale extraite» correspondra donc à la somme [formes libres+glucurono-conjuguées+sulfo-conjuguées+fraction restante]. La proportion relative de chaque métabolite identifié sera donc calculée par rapport à cette somme.**

I.1-2 Analyse des profils d'élution des standards radiomarqués

Pour identifier les métabolites formés, nous disposons d'une gamme de stéroïdes radiomarqués purs, injectés en parallèle aux fractions de chaque série expérimentale. Le temps de rétention dans notre système HPLC de chacun de ces standards permet, par comparaison, l'identification des stéroïdes issus du métabolisme cellulaire.

Comme le montre le Tableau 4, la DHT et la DHEA, dont la structure est très proche, présentent dans notre système le même temps de rétention, ce qui rend impossible leur séparation. L'androstérone présente elle aussi un temps de rétention très proche, quoi que légèrement inférieur, et sa séparation des 2 précédents est également difficile, selon leurs quantités respectives.

Ce paramètre impose dès lors une limite à notre système, puisqu'il ne permet ni de séparer, ni de quantifier objectivement ces 3 produits.

Les autres stéroïdes standards à notre disposition présentent un profil d'élution permettant plus précisément leur séparation et leur identification.

Tableau 4 Temps de rétention moyen des différents standards radiomarqués utilisés en HPLC.

	E2	Androstérone	DHT	DHEA	DHT+DHEA	$\Delta 5$	3 β -Adiol	3 α -Adiol	$\Delta 4$	Testostérone
moy	7,5	10,4	10,6	10,7	10,6	13,2	13,8	15	15,4	20,9
EC	0,4	0,6	0,5	0,4	0,1	0,5	1,1	1,1	0,7	1,0

Temps de rétention moyen (en minutes) des différents standards radiomarqués (n=9). Moy = moyenne, EC = écart-type. E2 = 17 β -oestradiol. $\Delta 5$ = $\Delta 5$ -Androstènediol. $\Delta 4$ = $\Delta 4$ -androstènedione. 3 β -Adiol = 3 β -Androstanediol. 3 α -Adiol = 3 α -Androstanediol.

I.2 Stabilité des substrats

Dans un premier temps, nous avons étudié la stabilité des substrats, afin de vérifier si nos méthodes préparatives induisent ou non des transformations indépendantes d'un processus cellulaire. Pour cela, nous avons analysé les métabolites issus de chaque substrat radiomarqué, après une incubation de 24h à 37°C dans le milieu TIA seul, en absence de cellules.

I.2-1 Analyse quantitative

Après 24h d'incubation avec un substrat non conjugué (DHEA à 10nM ou DHT à 2nM), ou avec un substrat conjugué (S-DHEA à 1 μ M), nous constatons que des traces de radioactivité se retrouvent respectivement dans les formes conjuguées ou libres. On peut imaginer que ceci serait dû à une contamination de phases lors de l'extraction (contamination de la phase aqueuse par le substrat non conjugué, ou contamination de la phase organique par le substrat conjugué).

I.2-2 Analyse qualitative

Après 24h d'incubation à 37°C dans le milieu TIA sans cellules, nous avons constaté qu'aucun des substrats étudiés n'a subi de transformation sous l'effet du milieu TIA ou des méthodes préparatives utilisées (conditions d'hydrolyse acide etc.). La DHT, la DHEA ou le S-DHEA sont retrouvés dans les radiochromatogrammes sous leur forme initiale, sans avoir subi aucune conversion en composés dérivés. La Figure 9 montre un exemple des formes libres et conjuguées obtenues après incubation de la DHT (2nM) pendant 24h en absence de cellules.

Nous pouvons donc conclure que notre milieu d'incubation et nos protocoles expérimentaux ne modifient pas le substrat, que celui-ci est parfaitement stable, et que les produits formés après incubation en présence des cellules LNCaP résulteront exclusivement d'un métabolisme cellulaire.

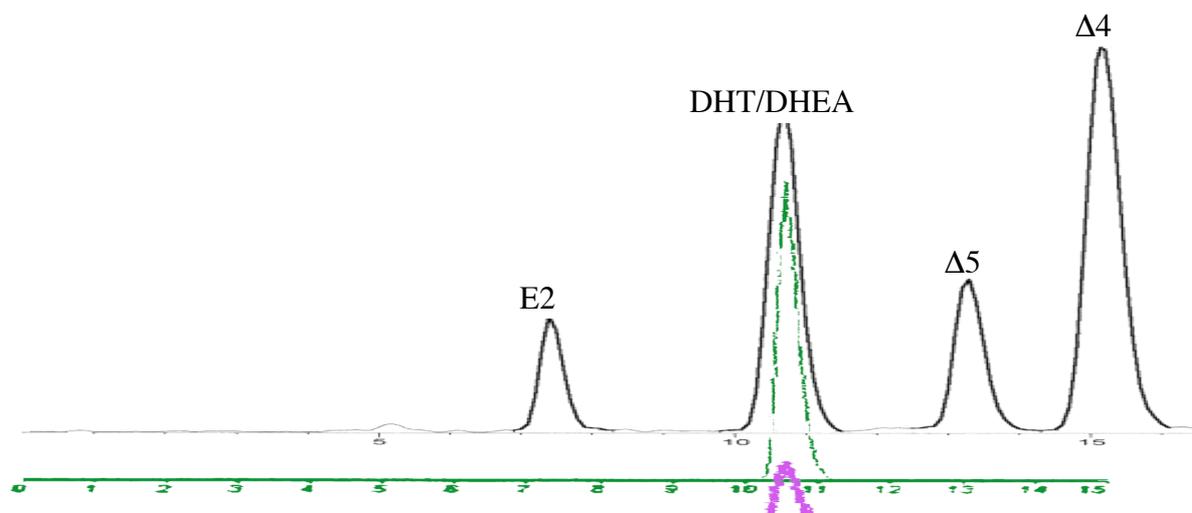


Figure 9 Radiochromatogrammes des stéroïdes libres et conjugués issus de l'incubation de la DHT (2nM) en absence de cellules.

Radiochromatogrammes des stéroïdes libres (tracé vert) et conjugués (tracé mauve) issus de l'incubation de la DHT (2nM) pendant 24h à 37°C dans du milieu TIA en absence de cellules, comparé à un radiochromatogramme de stéroïdes standards (tracé noir). En abscisses est représenté le temps d'éluion (min).

I.3 Métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP

Le métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP a été réalisé avec leur concentration physiologique comme indiqué ci-dessous

- DHT 2nM
- DHEA 10nM
- S-DHEA 1μM

Nous avons effectué une étude cinétique du métabolisme de chaque substrat, en arrêtant les incubations après 12, 24 et 40h, en suivant les mêmes protocoles expérimentaux que pour les analyses réalisées en absence de cellules.

I.3-1 Distribution des différentes formes de métabolites

Nous avons étudié dans un premier temps la répartition des formes libres, glucurono-conjuguées et sulfo-conjuguées obtenues pour chaque substrat à chaque temps d'incubation (Fig. 10).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, les valeurs indiquées correspondent à la radioactivité présente dans chaque fraction, rapportée à la radioactivité totale récupérée, c'est-à-dire en tenant compte des pertes de radioactivité.

Notons tout d'abord que les pourcentages obtenus pour chaque fraction et à partir de chaque substrat diffèrent significativement des valeurs observées précédemment après

incubation en absence de cellules. Nous sommes donc bien en présence d'un métabolisme cellulaire.

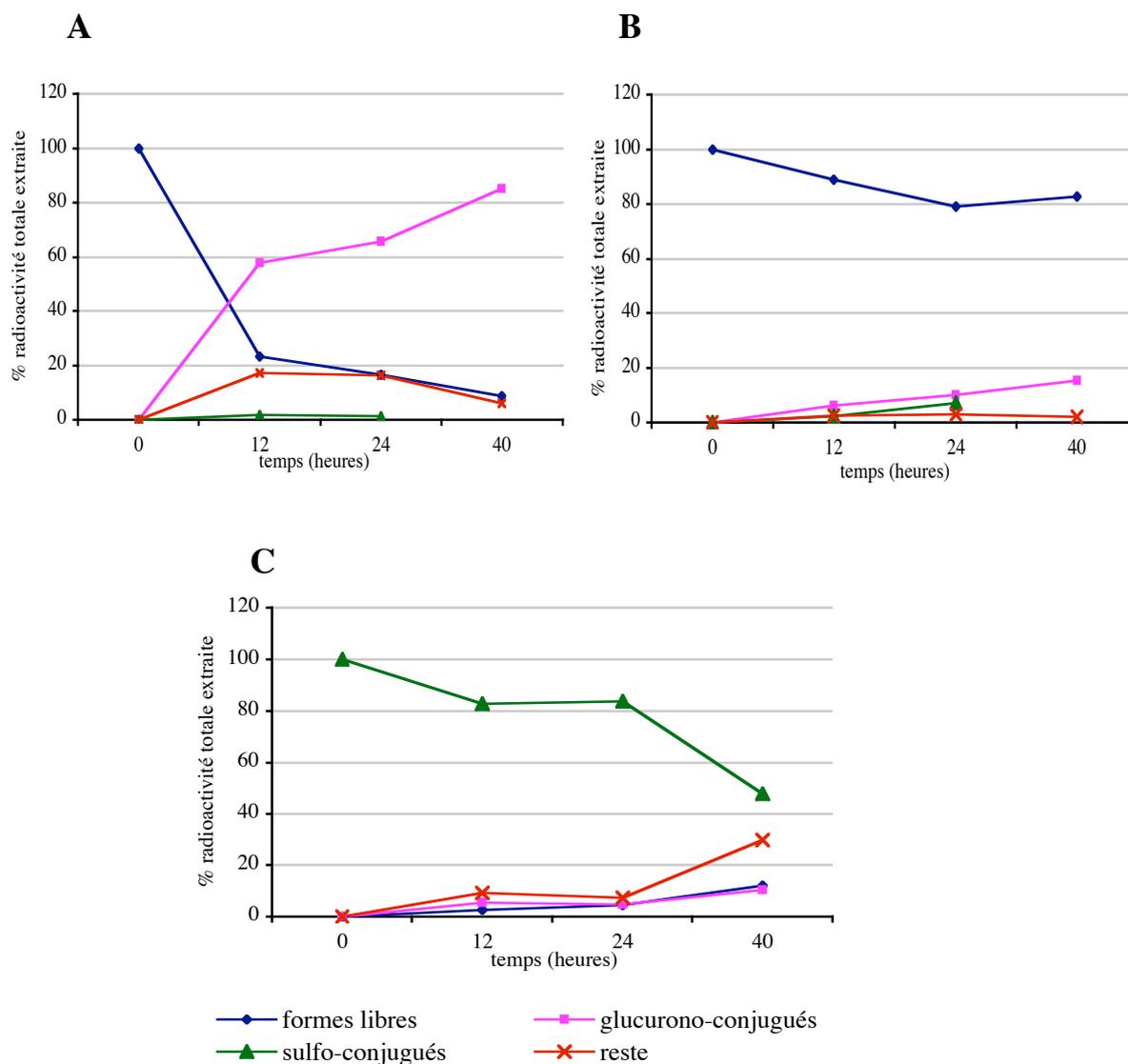


Figure 10 Répartition des différentes formes de métabolites après incubation des cellules LNCaP.

Les cellules ont été incubées à 37°C pendant des durées croissantes, en présence de 2nM de DHT (A), 10nM de DHEA (B) et 1µM de S-DHEA (C) radiomarqués.

Nous remarquons dans un premier temps que la DHT est métabolisée très rapidement par les cellules LNCaP, puisqu'en 12h, la fraction des formes libres s'effondre, au profit des formes conjuguées, en particulier les glucurono-conjuguées (Fig. 10A). A 12h d'incubation, les produits libres ne représentent déjà plus que 23% de la radioactivité. La disparition des formes libres s'aggrave dans le temps (9% à 40h), au fur et à mesure qu'apparaissent les

formes glucurono-conjuguées (85% à 40h). Contrairement aux formes glucurono-conjuguées, les produits sulfo-conjugués sont présents en très faible proportion (2% maximum).

Les formes conjuguées, très polaires, sont par définition des produits d'excrétion, éliminés dans l'organisme, notamment par voie urinaire. Leur accumulation croissante dans le temps, et la diminution concomitante des formes libres suggèrent que la fraction conjuguée contient des produits de détoxification du métabolisme. Ces données indiquent donc que la DHT, bien que très stable dans le milieu de culture, serait un stéroïde très transitoire lorsqu'elle se trouve au contact des cellules LNCaP.

Contrairement à la DHT, la DHEA est transformée essentiellement en produits extraits dans la fraction libre, qui représente 79% de la radioactivité extraite après 24h d'incubation (Fig. 10B). Ceci suggère une élimination plus lente, avec une persistance de formes libres et donc potentiellement actives dans l'environnement des cellules. Les produits conjugués sont des glucurono-conjugués, qui s'accumulent peu à peu (10% de la radioactivité extraite après 24h d'incubation), ainsi que des sulfo-conjugués (7% de la radioactivité après 24h de traitement).

Enfin, lorsque les cellules LNCaP sont incubées avec du S-DHEA, la radioactivité extraite du milieu de culture contient majoritairement des formes sulfo-conjuguées, qui représentent 48% des métabolites totaux après 40h d'incubation (Fig.10C). Les formes libres et glucurono-conjuguées sont présentes en quantité similaire dans le temps (12 et 10% respectivement à 40h). Nous remarquons, entre 24h et 40h de traitement, une brutale diminution du % des formes sulfo-conjuguées. Ce profil suggère que le métabolisme du S-DHEA est lent, ou ne se déroule pas de façon linéaire, comme si l'accessibilité du S-DHEA aux enzymes était un facteur limitant. Dans le même intervalle de temps, les fraction libre et glucurono-conjuguée augmentent très peu, c'est plutôt la fraction restante qui compense la diminution des sulfo-conjugués. Cette augmentation de la fraction restante suggère que la fraction glucurono-conjuguée est probablement sous-estimée.

L'ensemble de ces données nous permet de conclure que le métabolisme de la DHT par les cellules LNCaP d'une part est rapide, et d'autre part implique la formation de produits conjugués, libérés dans le milieu de culture et destinés à l'élimination.

En présence de DHEA, on observe également la formation de produits conjugués, mais ils demeurent minoritaires par rapport aux formes libres.

Dans les 2 cas, l'activité Glucuronosyl-transférase est quantitativement plus impliquée que l'activité Sulfo-transférase.

A l'inverse, le métabolisme du S-DHEA se traduit par la persistance de produit(s) sulfo-conjugué(s), et semble relativement lent comparé aux 2 autres.

I.3-2 Analyse qualitative des métabolites formés

I.3-2.1 Métabolisme de la DHT

La DHT est connue comme étant le principal androgène actif au niveau des cellules prostatiques. Etant donné que son métabolisme est relativement bien décrit, son analyse a permis de valider notre système expérimental pour cette étude. En analysant les profils

chromatographiques obtenus avec les différentes fractions, et aux différents temps, nous avons pu mettre en évidence les différents produits formés, leur nature, et leur quantité relative (Tableau 5). La Figure 11 montre un exemple de radiochromatogramme de la fraction libre issue du métabolisme après 12h et 24h d'incubation.

Parmi les métabolites identifiés, le 3 β - Androstanediol (pic F) et le 3 α - Androstanediol (pic G) sont les produits directs de la DHT. Ils sont présents sous forme libre (Fig.11), mais cette proportion diminue progressivement dans le temps, au fur et à mesure qu'ils sont conjugués, essentiellement sous forme glucuronide (Tableau 5 et Fig.12).

Le pic B n'a pas pu être identifié par HPLC, aucun des standards radiomarqués disponibles ne présentant le même profil d'éluion dans notre système. En revanche, une analyse GC-MS a permis de le caractériser comme étant la 5 α -Androstanedione. Elle ne représente qu'une faible quantité de la radioactivité (1,5% max), et cette proportion n'augmente pas continuellement dans le temps, ce qui suggère qu'il est à son tour métabolisé. Son élimination ne passe vraisemblablement pas par la conjugaison, puisqu'elle ne comporte aucun groupement OH libre (voir structure Annexe I), ce qui explique qu'elle n'ait pas été détectée dans l'une des fractions conjuguées.

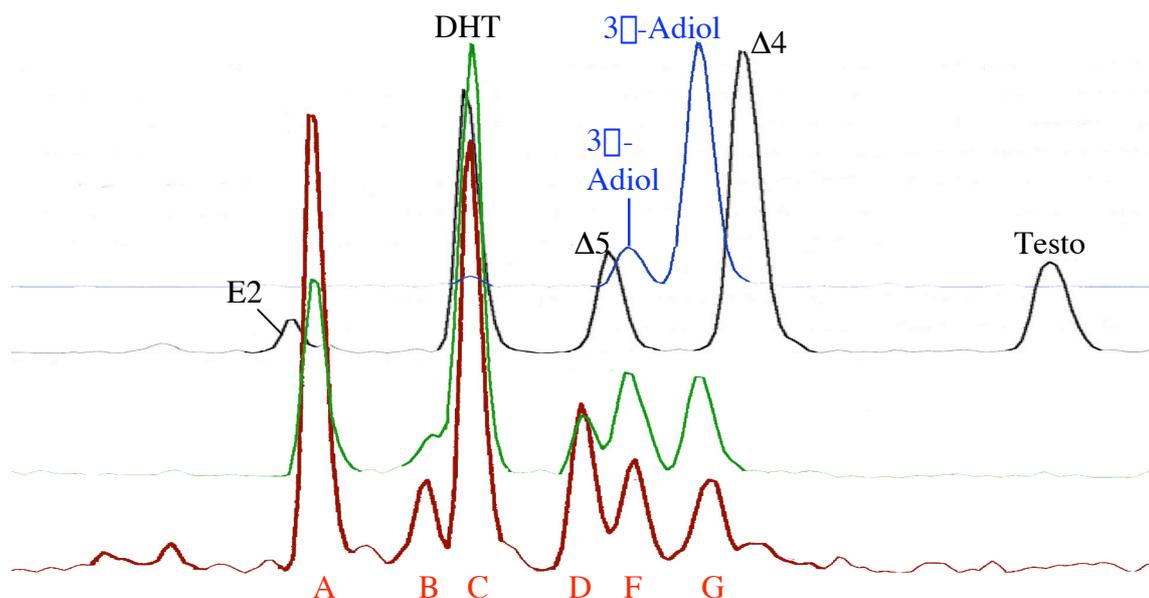


Figure 11 Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus du métabolisme de la DHT (2nM) par les cellules LNCaP.

Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus du métabolisme de la DHT par les cellules LNCaP, après 24h (tracé rouge) et 12h (tracé vert) d'incubation. Comparaison avec des standards purs (tracé noir) ou issus de la réduction de la DHT (tracé bleu). A-G identité des produits, voir Tableau 5.

Concernant le pic C, il correspond à un produit dont le temps de rétention (10,6min) est identique à celui de la DHT (Fig.11). Cependant, nous avons mentionné que l'Androstérone, la DHT et la DHEA présentent des temps de rétention très proches (Tableau 4). La formation de DHEA à partir de la DHT est peu vraisemblable, car elle nécessiterait de former une

double liaison dans le cycle. En revanche, la présence d'Androstérone est possible, d'autant que cette molécule peut être un produit direct de la 5 α -Androstanedione (pic B) (Labrie et al., 1997). L'analyse GC-MS n'a cependant pas permis d'identifier l'Androstérone, alors qu'elle a confirmé la présence de DHT.

Bien qu'on ne puisse conclure avec certitude, la diminution constante dans le temps de la proportion du pic C sous forme libre (10 % et 2,2% de la radioactivité extraite à 12h et 40h respectivement) suggère qu'il correspond plutôt à de la DHT résiduelle.

Non seulement la DHT est transformée en différents produits libres, mais elle est également conjuguée (Fig. 12), comme l'atteste la forte augmentation du pic C dans la fraction glucurono-conjuguée (Tableau 5). La présence de DHT sous le pic C dans cette fraction a par ailleurs été confirmée par GC-MS. Cette forme d'élimination de la DHT constitue en fait le métabolite majeur formé par les cellules LNCaP. Elle représente 51% de la radioactivité totale extraite à 12h d'incubation et 73% à 40h.

Comme dans la fraction libre, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que ce pic C contienne également de l'Androstérone glucurono-conjuguée (Fig.12), mais l'analyse GC-MS ne l'a pas confirmé.

Les Androstanediols, la DHT (et/ou l'Androstérone) sulfo-conjugués ne représentent qu'une fraction mineure des produits du métabolisme (Tableau 5).

Tableau 5 Métabolisme de la DHT (2nM) par les cellules LNCaP.

pic	identité	Formes libres			Glucurono-conjuguées			Sulfo-conjuguées	
		12h	24h	40h	12h	24h	40h	12h	24h
A	inconnu	4,7	5	1,2	-	-	-	-	-
B	5 α -Adione★	1	1	1,5	-	-	-	-	-
C	DHT★/androstérone	10	4,5	2,2	51,2	58	73	0,9	1
D	inconnu	1,5	2,5	1,5	-	-	-	-	-
F	3 α - Adiol	3	1,5	1,2	5,2	7	8,5	1,1	-
G	3 α - Adiol	3	1,5	1,7	0,7	1,3	3,6	-	-

Séparation par HPLC et identification par HPLC ou GC-MS (★) des métabolites formés. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale extraite à chaque temps indiqué.

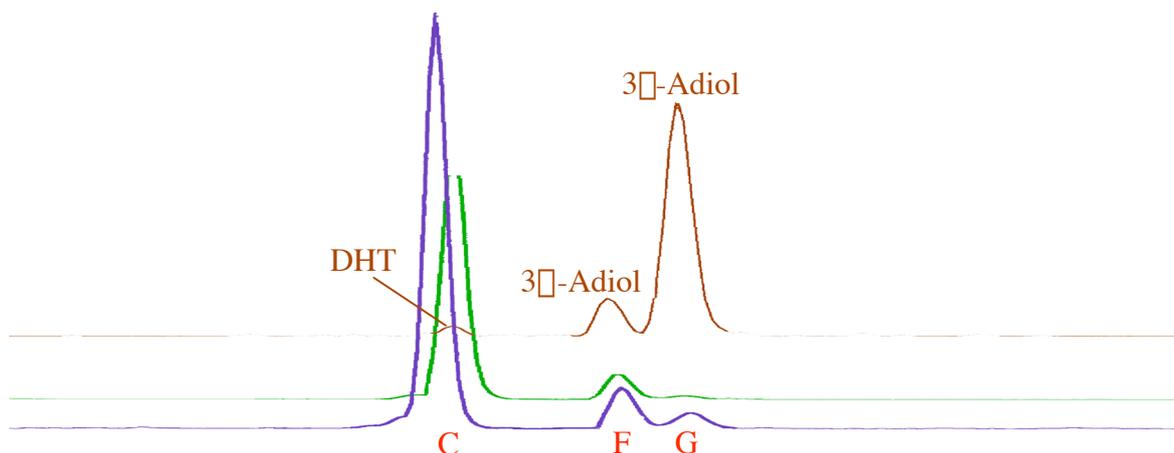


Figure 12 Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués hydrolysés issus du métabolisme de la DHT (2nM) par les cellules LNCaP.

Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués hydrolysés issus du métabolisme de la DHT par les cellules LNCaP, après 12h (tracé vert) et 40h (tracé mauve) d'incubation. Comparaison avec des standards purs issus de la réduction de la DHT (tracé marron). C-G identité des produits, voir Tableau 5.

Enfin, 2 autres pics n'ont pas pu être identifiés, ni par HPLC, ni par GC-MS le pic A présente un temps de rétention (7,7min) supérieur à celui de 17 β -oestradiol (E2, voir décalage Figure 11). Ce composé est produit en assez faible proportion (5% maximum). Le pic D (12,1min) est très minoritaire (2,5% maximum).

Il est intéressant de noter que ces 2 produits ne se retrouvent pas dans la fraction conjuguée. De plus, leur temps d'éluion, surtout celui du pic A, suggère que ce sont des composés relativement apolaires. Or, des travaux antérieurs, effectués dans notre laboratoire, ont montré que le métabolisme des androgènes par les cellules MCF-7 se traduisait par la formation d'esters d'androgènes, formés par l'association covalente entre un stéroïde et des acides gras (Le Bail et al., 2002). Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué une saponification de la fraction libre, puis extrait les stéroïdes saponifiés. Leur profil chromatographique n'a cependant révélé aucune différence avec les formes libres non saponifiées (non montré), ce qui prouve que les pics A et D ne sont pas des androgènes estérifiés.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les cellules LNCaP possèdent les activités enzymatiques suivantes : 3 β -hydroxystéroïde-déhydrogénase ou 3 β -HSD (DHT \rightarrow 3 β -Adiol), 3 α -hydroxystéroïde-déhydrogénase ou 3 α -HSD (DHT \rightarrow 3 α -Adiol), 17 β -hydroxystéroïde-oxdoréductase ou 17 β -HSOR (DHT \rightarrow 5 α -Androstanedione), 3/17-Glucuronosyl-Transférase, et 3/17-Sulfo-Transférase.

Nous avons identifié les 3 β /3 α -Androstanediols, libres et glucurono-conjugués, comme des produits finaux du métabolisme de la DHT, avec une prédominance de l'isoforme 3 β . Une part majoritaire de la DHT est également éliminée sous forme glucurono-conjuguée.

Nous avons également montré que les produits A et D, non identifiés, ne sont pas des stéroïdes estérifiés. Ils ne sont pas détectés sous forme conjuguée, et ne semblent pas être des produits finaux du métabolisme de la DHT.

Enfin, nous avons émis l'hypothèse que l'Androstérone (pic C), libre et glucurono-conjuguée, pourrait être un des produits finaux de ce métabolisme. Tout d'abord parce que son substrat (la 5 α -Androstanedione) est progressivement éliminé, mais aussi parce que l'enzyme qui transformerait la 5 α -Androstanedione en Androstérone semble être présente dans les cellules LNCaP, puisqu'il s'agit de la même enzyme qui réduit la DHT en 3 α -Androstanediol. L'analyse GC-MS n'a malheureusement pas permis de confirmer cette hypothèse. La Figure 13 résume les différents métabolites formés.

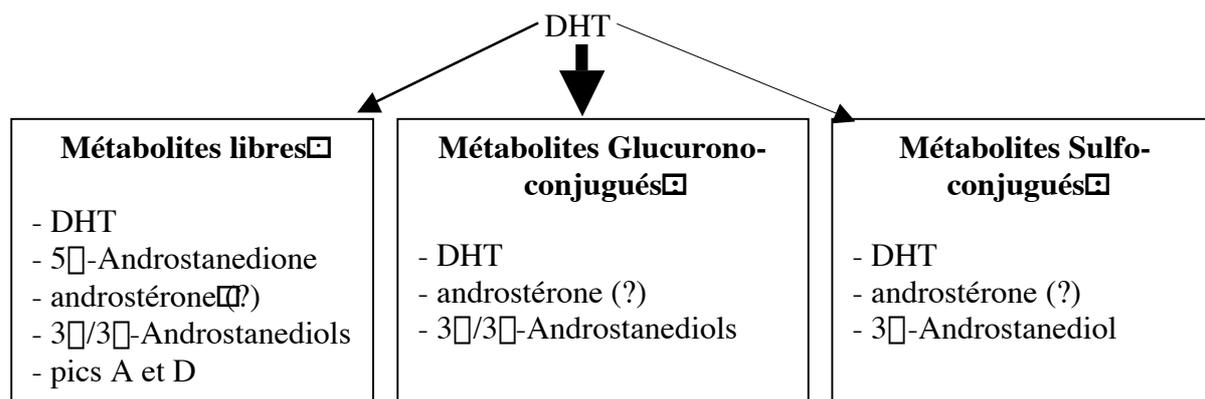


Figure 13 Schéma récapitulatif des différents métabolites formés par les cellules LNCaP à partir de la DHT.

L'épaisseur des flèches symbolise la quantité relative des différentes fractions.

1.3-2.2 Métabolisme de la DHEA

Comme pour la DHT, le métabolisme *in vivo* de la DHEA a été étudié à sa concentration physiologique (10nM).

La comparaison des profils chromatographiques issus du métabolisme de la DHT et de la DHEA (Figure 14) permet de mettre en évidence certains produits communs. Ainsi, nous constatons que parmi les métabolites libres issus de la DHEA figurent les pics A et D non identifiés, ainsi que le pic B (5 α -Androstanedione) et le pic C.

Nous remarquons (Tableau 6) que les pics A et D représentent une plus forte proportion que dans le métabolisme de la DHT (6,9% et 5,3% respectivement à 40h, contre 1,2% et 1,5% à 40h dans le métabolisme de la DHT). Là encore, ils ne sont détectés que sous forme libre, et leur quantité relative augmente puis diminue au cours de la cinétique. *A priori*, le pic A présente un temps de rétention proche de celui du 17 β -oestradiol standard (E2, Figure 14). Cependant, ce pic est également retrouvé dans le métabolisme de la DHT, qui est un stéroïde non aromatisable. En outre, l'analyse GC-MS n'a jamais permis d'identifier de l'E2 dans cette fraction.

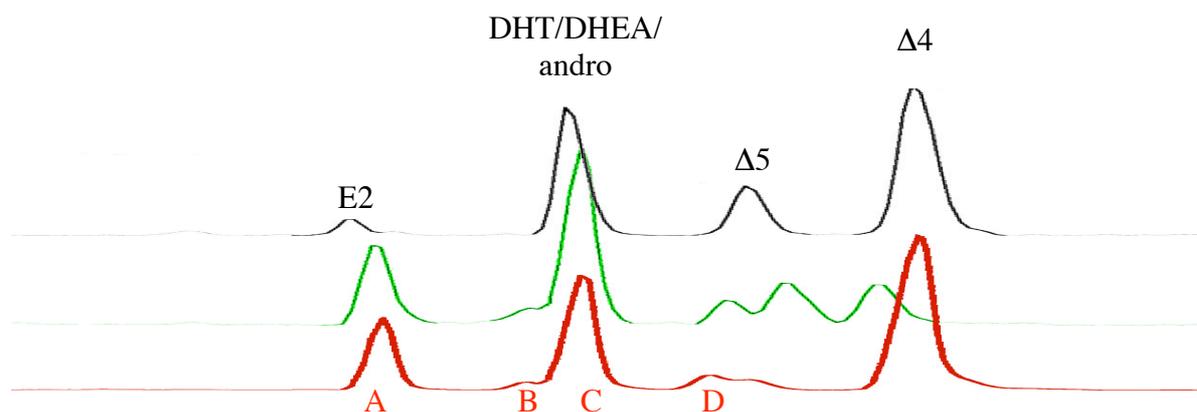


Figure 14 Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus de l'incubation des cellules LNCaP avec la DHEA (10nM) ou avec la DHT (2nM).

Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus de l'incubation des cellules LNCaP avec 10nM de DHEA (tracé rouge) ou avec 2nM de DHT (tracé vert) pendant 12h. Comparaison avec des stéroïdes standards (tracé noir). A-D Identité des produits, voir Tableau 6.

Contrairement à la DHT, la DHEA est essentiellement métabolisée en composés extraits dans la fraction libre (Tableau 6). La DHEA peut être convertie en 2 produits directs potentiels le $\Delta 5$ -Androstènediol, et la $\Delta 4$ -Androstènedione. Ces 2 produits ont effectivement été identifiés (Fig. 15), le $\Delta 5$ -Androstènediol (pic E) par HPLC, et la $\Delta 4$ -Androstènedione (pic H) par HPLC et GC-MS. De ces 2 composés, la $\Delta 4$ -Androstènedione est de loin le métabolite préférentiel de la DHEA (40,8% à 12h contre 2,4% pour le $\Delta 5$ -Androstènediol).

La proportion de $\Delta 5$ -Androstènediol libre augmente globalement, mais il apparaît peu à peu sous forme glucurono- et sulfo-conjuguée (0,1 et 0,3% respectivement à 24h).

Quant à la $\Delta 4$ -Androstènedione, sa quantité relative chute à 40h, au profit sans doute de composés dérivés, elle-même n'étant pas conjuguée. Les métabolites directs de la $\Delta 4$ -Androstènedione sont la Testostérone (pic J) et le 5α -Androstanedione (pic B), que nous avons identifiés par HPLC, et qui sont formés en proportion équivalente.

La quantité relative de 5α -Androstanedione augmente puis diminue au cours de la cinétique, ce qui suggère qu'elle est à son tour convertie, comme c'était le cas dans le métabolisme de la DHT. Il en est de même pour la Testostérone, qui est probablement transformée en autres(s) composé(s), mais qui est aussi éliminée en quantité croissante par glucurono-conjugaison (Tableau 6 et Fig. 16).

Nous pouvons supposer que la Testostérone pourrait être métabolisée en DHT, celle-ci se retrouverait alors sous le pic C. La formation des Androstanediols, que nous retrouvons exclusivement sous forme conjuguée (Fig. 16, pics F et G), est une preuve indirecte témoignant de la présence, à un moment ou à un autre, de la DHT.

L'analyse GC-MS nous a permis de mettre en évidence, dans le pic C (Fig. 15), la présence de DHEA (à 12h d'incubation), mais surtout d'Androstérone (à 24h). La diminution de la quantité relative du pic C entre 12h et 24h, suivie d'une augmentation à 40h, peut témoigner de la disparition rapide de la DHEA-substrat puis de l'apparition, plus lente, de l'Androstérone. Le décalage dans la cinétique peut s'expliquer par le fait que l'Androstérone n'est pas un produit direct de la DHEA, des intermédiaires sont nécessaires, et chaque enzyme impliquée présente sa propre cinétique de conversion. L'Androstérone mettrait donc plus de temps à être formée que n'en met la DHEA à disparaître.

Nous avons émis l'hypothèse, dans le métabolisme de la DHT, que les cellules LNCaP pouvaient être capables de former de l'Androstérone, probablement *via* la 5α -

Androstanedione. L'étude du métabolisme de la DHEA nous a donc permis de confirmer cette hypothèse.

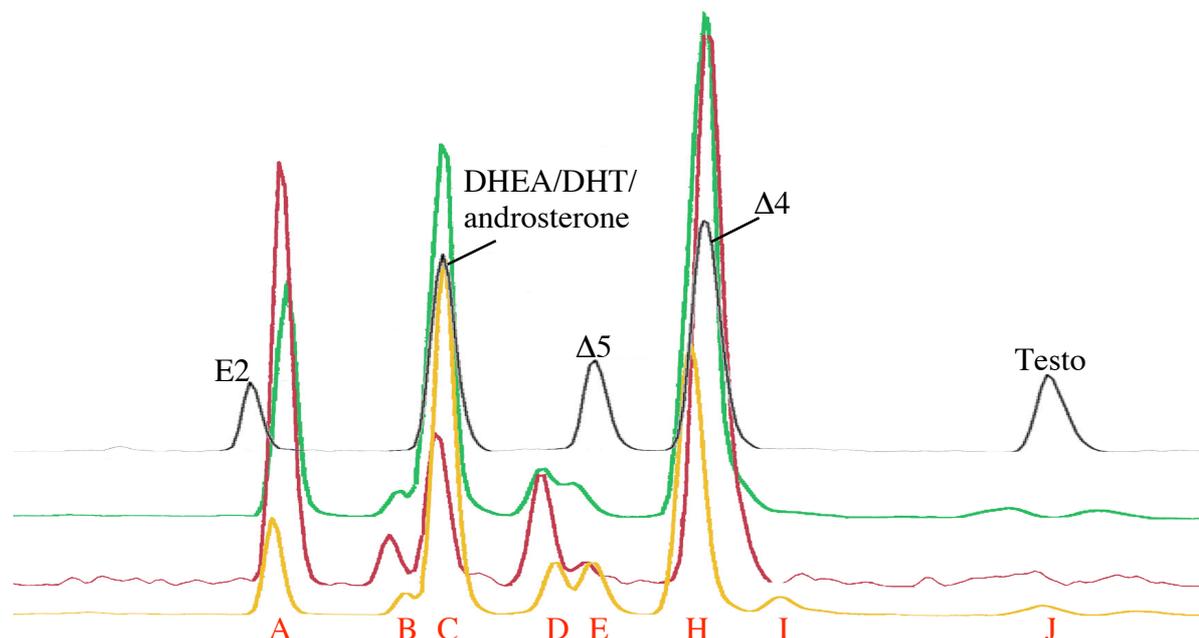


Figure 15 Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus de l'incubation des cellules LNCaP avec la DHEA (10nM).

Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus de l'incubation des cellules LNCaP avec 10nM DHEA pendant 12h (tracé vert), 24h (tracé rouge) ou 40h (tracé jaune). Comparaison avec une gamme de stéroïdes standards (tracé noir). A-J identité des produits voir Tableau 6.

Tableau 6 Métabolisme de la DHEA (10nM) par les cellules LNCaP.

pic	identité	Formes libres			Glucurono-conjuguées			Sulfo-conjuguées	
		12h	24h	40h	12h	24h	40h	12h	24h
A	inconnu	13,3	21,3	6,9	-	-	-	-	-
B	5 β -Adione	1,9	2,4	1,9	-	-	-	-	-
C	Androstérone★	-----	-----	-----	2,7	4,8	6,2	1,9	6,2
	DHT/DHEA★	-----	-----	-----	0,5	1,1	2,4		
D	inconnu	3,5	6,4	5,3	-	-	-	-	-
E	Δ 5-Androstènediol	2,4	0,7	5,1	-	0,1	0,2	0,05	0,3
F	3 β -Adiol	-	-	-	0,2	0,5	1,5	0,04	0,5
G	3 α -Adiol	-	-	-	0,4	0,2	0,4	-	-
H	Δ 4-Androstènedione★	40,8	40,3	28,3	-	-	-	-	-
I	inconnu	-	-	2,6	-	-	-	-	-
J	testostérone	1,3	-	1,4	0,8	2,8	4	-	-

Séparation par HPLC et identification par HPLC ou GC-MS (★) des métabolites formés. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale extraite à chaque temps indiqué. Le calcul de la proportion du pic C tient compte de la présence des 2 pics chevauchants dans la fraction glucurono-conjuguée.

Comme nous l'avons déjà mentionné, les profils chromatographiques obtenus avec les fractions glucurono-conjuguées (Fig.16) indiquent la présence de Glucuronide de Testostérone (pic J), de Glucuronide de 3β -Androstanediol (pic F), et de 3β -Androstanediol (pic G), le 3β - étant plus abondant (Tableau 6). Du Glucuronide et du Sulfate de $\Delta 5$ -Androstènediol (pic E) sont également formés, autant de produits d'inactivation/élimination qui s'accumulent progressivement au cours de la cinétique.

Dans la fraction glucurono-conjuguée (Fig.16), notons surtout la présence d'un pic C très large, et subdivisé en 2 fractions (chevauchement), dont les temps de rétention sont respectivement de 10,2 et 10,8min, le premier étant majoritaire. L'identification de ces produits est délicate il est peu probable que le pic à 10,2min soit de la 5α -Androstanedione, car son temps de rétention moyen est de 9,3min. De plus, la 5α -Androstanedione ne présente pas de fonction hydroxyle (OH) libre, ce qui normalement empêche toute possibilité de formation de conjugués. Par contre, l'androstérone, injectée seule, a un temps de rétention moyen de 10,4min, tandis que la DHEA et la DHT, injectées seules ou ensemble, sont éluées avec un léger décalage (10,6-10,8min). Aussi, en fonction des quantités relatives de chacun de ces composés, il est possible qu'un chevauchement soit visible, comme c'est le cas ici. On peut donc penser que le pic à 10,2min correspond essentiellement à de l'Androstérone conjuguée, et celui à 10,8min contiendrait plutôt le mélange DHEA et/ou DHT conjuguées. L'analyse GC-MS n'a pas permis de conclure. Ce pic représente pourtant globalement 8,6% de la radioactivité extraite à 40h.

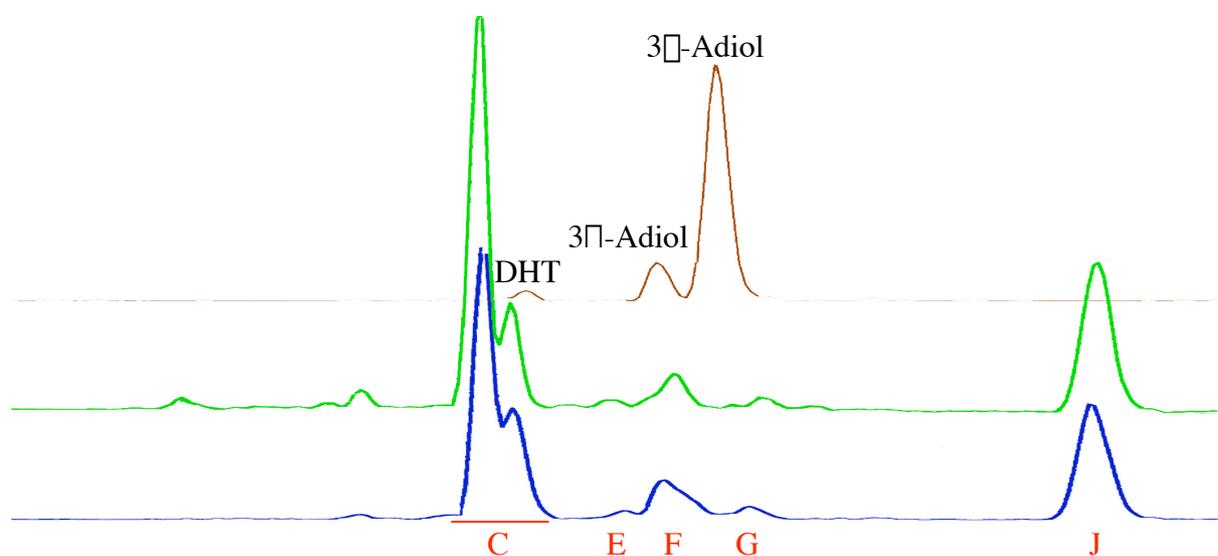


Figure 16 Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués issus de l'incubation des cellules LNCaP avec la DHEA (10nM).

Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués issus de l'incubation des cellules LNCaP avec 10nM de DHEA pendant 24h (tracé vert) ou 40h (tracé bleu). Comparaison avec une gamme de stéroïdes standards (tracé marron). C-J identité des produits, voir Tableau 6.

En résumé, ces données montrent que les cellules LNCaP sont capables de métaboliser la DHEA, à concentration physiologique, pour aboutir aux mêmes produits finaux que dans le

métabolisme de la DHT. Ces produits finaux sont les Androstanediols (conjugués), et surtout l'Androstérone, dont nous pouvons affirmer la présence, au moins sous sa forme libre.

Les produits formés sont ici plus nombreux, en raison des intermédiaires nécessaires à la synthèse des produits finaux. Parmi ces intermédiaires, la Δ^4 -androstènedione occupe une place importante, en tant que précurseur à la fois de la Testostérone et de la 5α -Androstanedione. L'élimination de la Δ^4 -Androstènedione est lente, elle persiste longtemps dans la fraction libre, et ne peut pas être conjuguée, car elle ne possède pas de groupement hydroxyle. Aussi elle maintient une forte représentativité de la fraction libre.

La voie de synthèse du Δ^5 -Androstènediol semble occuper une place mineure dans ce métabolisme par rapport à la voie de la Δ^4 -Androstènedione.

Si la formation des conjugués augmente avec le temps d'incubation, elle est toutefois moins rapide que lorsque les cellules sont incubées directement avec la DHT. La Figure 17 résume les différents métabolites formés.

Compte tenu des quantités relatives obtenues pour chaque produit, on peut estimer qu'en présence de 10nM de DHEA, les cellules LNCaP se retrouvent, après 40h, dans un milieu contenant environ 3nM de Δ^4 -Androstènedione, 0,51nM de Δ^5 -Androstènediol, 0,2nM de 5α -Androstanedione, 0,1nM de Testostérone, 0,7nM du produit A et 0,5nM du produit D non identifiés.

Ces données suggèrent que la DHEA pourrait être une source pour la synthèse de DHT, androgène-clé pour le contrôle de la prolifération des cellules prostatiques, cancéreuses ou non.

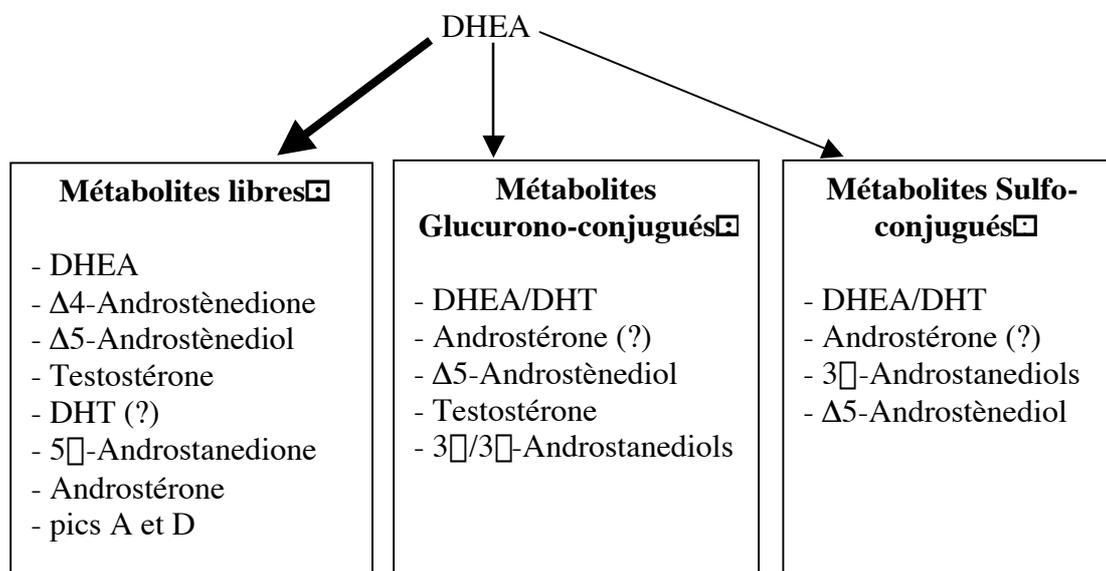


Figure 17 Schéma récapitulatif des différents métabolites formés par les cellules LNCaP à partir de la DHEA.

L'épaisseur des flèches symbolise la quantité relative des différentes fractions.

I.3-2.3 Métabolisme du S-DHEA

Le S-DHEA est un stéroïde particulier, dans le sens où sa concentration physiologique est très élevée, de l'ordre du μM . Son métabolisme par les cellules cancéreuses pourrait donc se traduire par la formation d'androgènes actifs en fortes proportions, suffisantes pour induire des effets majeurs sur le comportement de ces cellules.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la proportion des formes libres issues du S-DHEA est relativement faible (12% des métabolites à 40h d'incubation). Dans cette fraction (Fig.18), nous retrouvons le pic C comme dans le métabolisme de la DHEA, la quantité relative de ce pic augmente puis diminue au cours de la cinétique (Tableau 7), ce qui témoigne de l'élimination d'un composé (probablement la DHEA) suivie d'un enrichissement en produits dérivés (DHT/androstérone).

Parmi les produits issus du S-DHEA, nous ne retrouvons cette fois que la Δ^4 -Androstènedione (pic H), et elle n'est détectée, en très faible proportion (0,2%) qu'à 24h d'incubation. La Testostérone (pic J) apparaît dès 12h d'incubation, en faible quantité également (0,2%). La présence du produit A a également été notée jusqu'à 24h d'incubation (0,1% à 24h), mais sa présence à 40h ne peut être affirmée.

Enfin et surtout, le produit majeur de ce métabolisme, quel que soit le temps d'incubation, est le 3β -Androstanediol (pic F), formé très précocément et en quantité croissante (2,6% à 12h et 10% à 40h).

Le Δ^5 -Androstènediol et la 5α -Androstanedione n'ont pas été détectés.

Nous retrouvons donc dans cette fraction libre les produits de la voie DHEA- Δ^4 -Testostérone-(DHT)-Androstanediols.

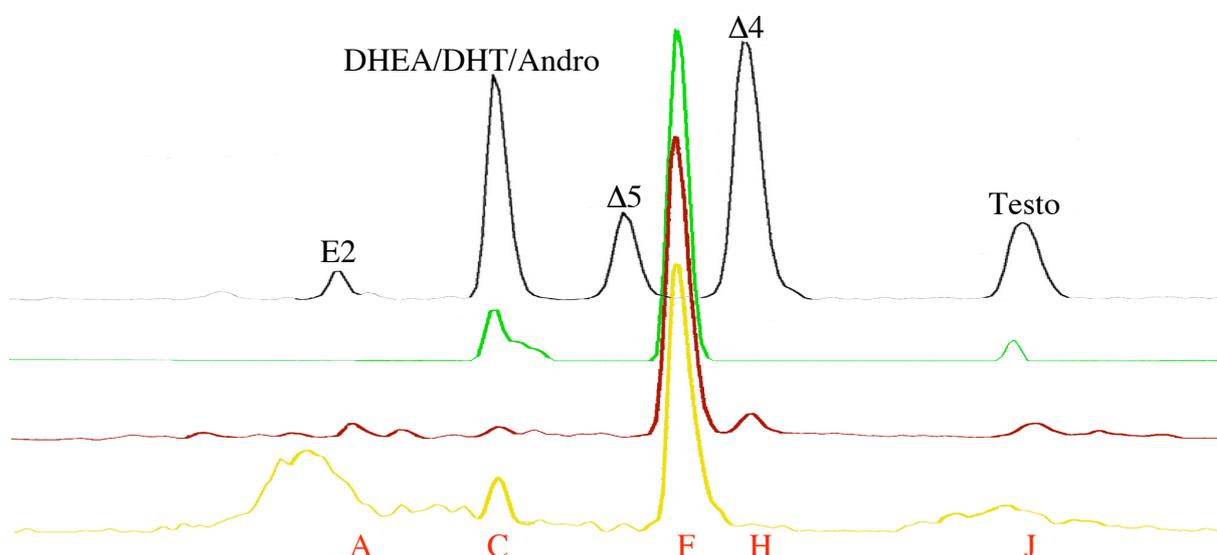


Figure 18 Radiochromatogrammes des stéroïdes de la fraction libre issus de l'incubation des cellules LNCaP avec du S-DHEA ($1\mu\text{M}$).

Radiochromatogrammes des stéroïdes de la fraction libre issus de l'incubation des cellules LNCaP avec $1\mu\text{M}$ de S-DHEA pendant 12h (tracé vert), 24h (tracé rouge) ou 40h (tracé jaune). Comparaison avec une gamme de stéroïdes standards (tracé noir). A-J identité des produits, voir Tableau 7.

Comme dans les métabolismes étudiés précédemment, l'élimination des produits formés passe par la glucurono-conjugaison (Fig.19) ces formes s'accroissent au fil de la cinétique, et représentent 5% de la radioactivité à 12h, et 10% à 40h.

Parmi ces conjugués, nous retrouvons essentiellement les Androstanediols et le pic C, tous formés en quantité croissante. Etrangement, c'est le 3 β -Androstanediol qui prédomine dans la fraction glucurono-conjugée (4,3% à 24h contre 0,04% pour le 3 α -).

Enfin, l'analyse des sulfo-conjugués (Fig.19), qui dominent tout au long de la cinétique, a permis de montrer que la radioactivité de cette fraction est exclusivement portée par le pic C, c'est-à-dire probablement par le S-DHEA résiduel, non encore métabolisé.

Tableau 7 Métabolisme du S-DHEA (1 μ M) par les cellules LNCaP .

pic	identité	Forme libres			Glucurono-conjuguées			Sulfo-conjuguées		
		12h	24h	40h	12h	24h	40h	12h	24h	40h
A	inconnu	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
B	5 β -Adione	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	DHT/DHEA/androsterone	0,3	0,06	1,1	-	0,6	0,9	83	84	48
D	inconnu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	Δ 5-Androstènediol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	3 α -Adiol	2,6	3,1	10	-	0,04	-	-	-	-
G	3 β -Adiol	-	-	-	5	4,3	9,1	-	-	-
H	Δ 4-Androstènedione	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
I	inconnu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	testostérone	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-

Séparation et identification par HPLC. Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale extraite à chaque temps indiqué.

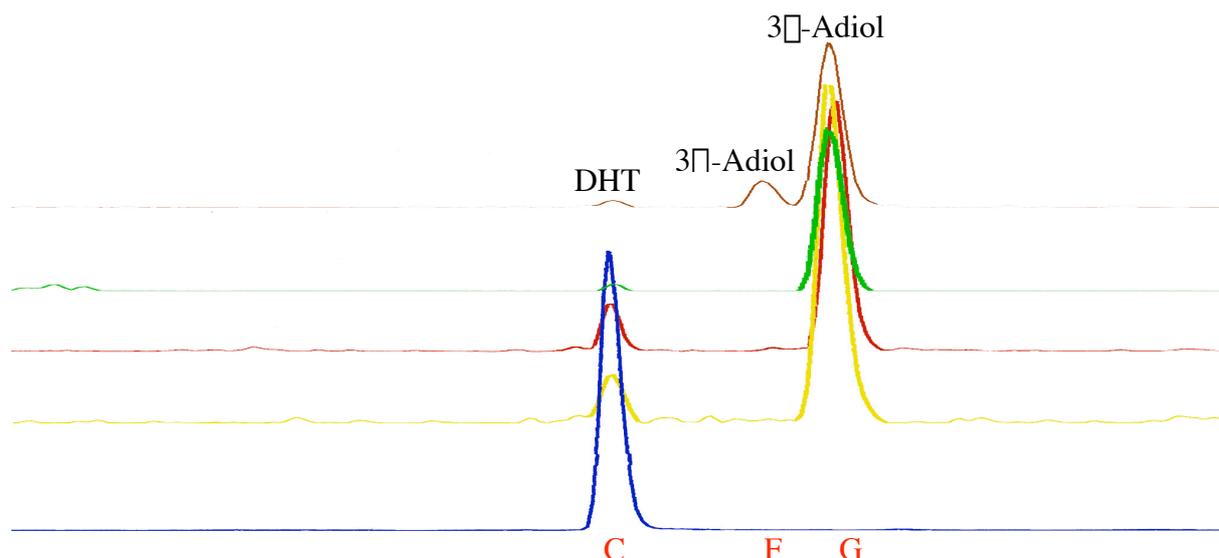


Figure 19 Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués et sulfo-conjugués issus de l'incubation des cellules LNCaP avec du S-DHEA (1 μ M).

Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués issus de l'incubation des cellules LNCaP avec 1 μ M de S-DHEA pendant 12h (tracé vert), 24h (tracé rouge) ou 40h (tracé jaune), et des stéroïdes sulfo-conjugués obtenus après 24h d'incubation (tracé bleu). Comparaison avec une gamme de stéroïdes standards (tracé marron). C-G Identité des produits, voir Tableau 7.

L'analyse du métabolisme du S-DHEA permet de conclure d'une part que le S-DHEA semble métabolisé très lentement il persiste sous forme non métabolisée dans le milieu de culture, et même après 40h d'incubation, il représente encore près de 50% de la radioactivité extraite.

Aussi la fraction libre représente une faible proportion de la radioactivité. Dans cette fraction, nous avons mis en évidence la formation de Δ 4-Androstènedione, de Testostérone, et surtout de 3 β -Androstanediol, produit final, formé très rapidement.

Il est surprenant de constater qu'ici, la Δ 4-Androstènedione est présente en faible quantité, alors qu'elle prédominait largement dans le métabolisme de la DHEA. Ici, c'est au contraire l'Androstanediol qui domine dès le début de la cinétique. On peut penser qu'ici, la Δ 4-Androstènedione est formée plus lentement, ou en plus faible quantité que dans le métabolisme de la DHEA où elle constituait un pool de substrat majeur. Aussi sa quantité n'est plus un facteur limitant vis-à-vis des enzymes disponibles, elle est convertie aussitôt, sans avoir eu le temps de s'accumuler. Il en va sans doute de même pour la Testostérone. Quant aux produits que nous n'avons pas détectés ici (Δ 5-Androstanediol, 5 β -Androstanedione, pic D), mais qui avaient été identifiés dans le métabolisme de la DHEA, on peut suggérer, de la même manière, qu'ils sont formés en faible quantité et aussitôt convertis, rendant impossible leur détection dans notre système.

Tout converge donc vers la formation des produits finaux, à savoir les Androstanediols, libres et surtout conjugués. La Figure 20 résume les différents métabolites formés.

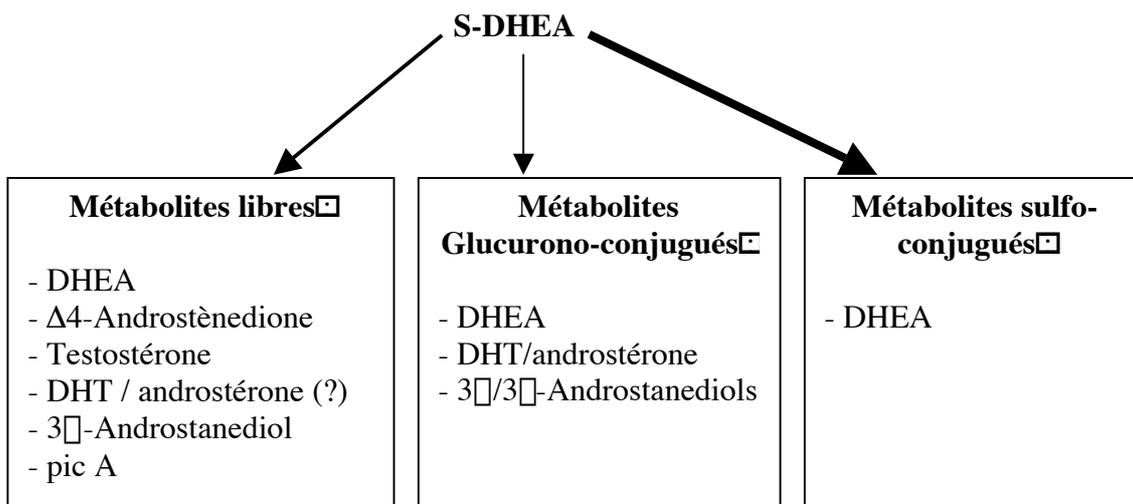


Figure 20 Schéma récapitulatif des différents métabolites formés par les cellules LNCaP à partir du S-DHEA.

L'épaisseur des flèches symbolise la quantité relative des différentes fractions.

Ainsi, nous pouvons penser que le métabolisme du S-DHEA par les cellules LNCaP se superpose qualitativement à celui de la DHEA le S-DHEA serait donc lui aussi une source potentielle d'androgènes actifs pour ces cellules. Quantitativement, ce métabolisme est plus lent, et une faible fraction de la dose initiale de S-DHEA semble effectivement convertie par les cellules, dans un intervalle de temps permettant à l'inverse le métabolisme complet de la DHT ou de la DHEA. Le fait qu'il persiste dans le milieu de culture constituerait donc un facteur limitant à sa transformation.

Cependant, même si la proportion des différents androgènes libres formés est très faible, par rapport à la totalité de la radioactivité présente, les concentrations estimées dans le milieu de culture sont loin d'être négligeables et de l'ordre de 2nM pour la Testostérone ou la Δ 4-Androstènedione, après 24h d'incubation.

En conclusion, même si le S-DHEA n'est pas complètement converti, il peut donner naissance à une quantité non négligeable de produits actifs sur le système AR et sur le comportement des cellules LNCaP.

I.4 Conclusions

L'ensemble de ces travaux nous a permis d'établir une vue d'ensemble de la façon dont les cellules LNCaP transforment différents androgènes, en particulier les androgènes surrénaliens.

Techniquement, notre méthodologie a l'avantage de permettre la distinction des différentes formes de produits formés, libres, glucurono-conjugués et sulfo-conjugués, sans introduire de biais expérimental c'est-à-dire que les étapes d'hydrolyse ou d'extraction ne modifient pas la structure initiale de ces composés. Par ailleurs, elle est beaucoup plus sensible que la technique de Chromatographie sur couches minces, souvent utilisée dans ce

type d'étude. Le recours à la radioactivité permet également une meilleure évaluation de la qualité de l'expérimentation (rendements d'extraction et efficacité d'hydrolyses mesurables), et rend l'analyse cinétique plus fiable.

En revanche, nous avons rencontré certains obstacles limitant l'interprétation des résultats. D'une part, la méthode de séparation des métabolites par HPLC ne permet pas de séparer efficacement la DHT et la DHEA. Nous avons testé d'autres systèmes d'élution (méthanol/eau) ou d'autres types de colonne (colonne en C-18 notamment), sans parvenir à un résultat pleinement satisfaisant soit le temps d'élution était beaucoup trop long pour permettre un usage efficace en routine, soit les composés étaient mal séparés, ou de façon trop peu reproductible. L'identification des produits est également limitée par le manque de standards radiomarqués commerciaux (non disponibles ou trop onéreux). Par ailleurs, une quantification plus rigoureuse des produits formés aurait nécessité l'utilisation d'un standard interne radiomarké. Ce composé devait avoir les caractéristiques suivantes i) être élué dans nos conditions HPLC, ii) être distinct des métabolites formés par les cellules, et iii) être séparé de ces métabolites en HPLC. Etant donné que nous ne disposions pas d'un stéroïde remplissant tous ces critères, nous n'avons pas pu appliquer cette stratégie de quantification.

Par ailleurs, nous avons souhaité affiner nos observations par GC-MS (Chromatographie Gazeuse couplée à de la Spectrométrie de Masse). Cette technique implique de travailler avec du matériel non radioactif, ce qui d'une part offre de meilleures conditions d'expérimentation, et d'autre part permet de disposer d'un plus grand nombre de standards. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la formation de la 5 α -Androstanedione, alors que nous ne disposions pas du standard radiomarké. Même si certains produits n'ont pu être caractérisés par cette méthode (les pics A et D), en raison de la nature complexe des mélanges, et d'un manque de sensibilité du système, nous avons malgré tout pu confirmer un grand nombre de nos résultats HPLC initiaux. Des contraintes expérimentales de même nature expliquent probablement que d'autres groupes utilisant ces technologies ont travaillé avec des concentrations pharmacologiques de substrats (Guillemette & Belanger, 1995).

Nos observations sur le métabolisme de la DHT sont globalement conformes aux données de la Littérature, ce qui valide indirectement notre approche et notre méthodologie.

Ainsi, conformément aux travaux de Damassa et al. (Damassa et al., 1991), nous avons montré dans notre système, que les cellules LNCaP sont capables de métaboliser très rapidement la DHT, à concentration physiologique, en libérant dans le milieu extracellulaire de nombreux composés conjugués. Après 40h d'incubation, la fraction libre ne représente plus que 9% de la radioactivité totale extraite, contre 85% pour les conjugués. Nous confirmons également que ces conjugués sont très majoritairement des formes Glucurono-conjuguées, alors que les formes Sulfo-conjuguées ne représentent que 2% de la radioactivité totale extraite (Belanger et al., 1991; Castagnetta et al., 1997; Guillemette & Belanger, 1995).

Ceci permet de déduire, comme cela a été rapporté par d'autres groupes, que les cellules LNCaP expriment de fortes activités Glucuronosyl-transférases, alors qu'elles sont très pauvres en activités Sulfo-transférases (Belanger et al., 1995; Guillemette et al., 1995).

L'augmentation continue des formes conjuguées au cours du temps, et la diminution parallèle des formes libres suggère que dans la fraction conjuguée figurent des produits finaux du métabolisme, c'est-à-dire des composés ne subissant plus de transformation, et destinés uniquement à l'élimination. Effectivement, nous avons mis en évidence la formation rapide des Androstanediols (3 α et 3 β) qui sont les produits de réduction directs de la DHT. Conformément à la Littérature, nous avons constaté une prédominance du 3 α -Androstanediol par rapport au 3 β -Androstanediol (Belanger et al., 1991; Guillemette & Belanger, 1995). Ces composés sont ensuite immédiatement glucurono-conjugués.

L'autre voie d'élimination de la DHT passe par la synthèse de la 5 α -Androstanedione, elle-même probablement convertie en Androstérone.

Dans la fraction des glucurono-conjugués, nous avons enfin démontré la présence de Glucuronide de DHT, et nous suspectons la présence de Glucuronide d'Androstérone, comme l'ont montré Negri-Cesi & Motta (Negri-Cesi & Motta, 1994) ou Guillemette & Bélanger (Guillemette & Belanger, 1995).

Ainsi, nous avons montré que les cellules LNCaP possèdent de nombreuses activités enzymatiques qui contribuent à une transformation rapide de la DHT (Figure 21). La voie de la Glucurono-conjugaison occupe une place essentielle, en transformant des androgènes, actifs ou non, en composés polaires, excrétés dans le milieu de culture. En parallèle, la DHT est convertie en produits finaux du métabolisme (Androstanediols, Androstérone), conjugués ou non, qui sont décrits comme totalement inactifs vis-à-vis du Récepteur aux Androgènes (Saartok et al., 1984).

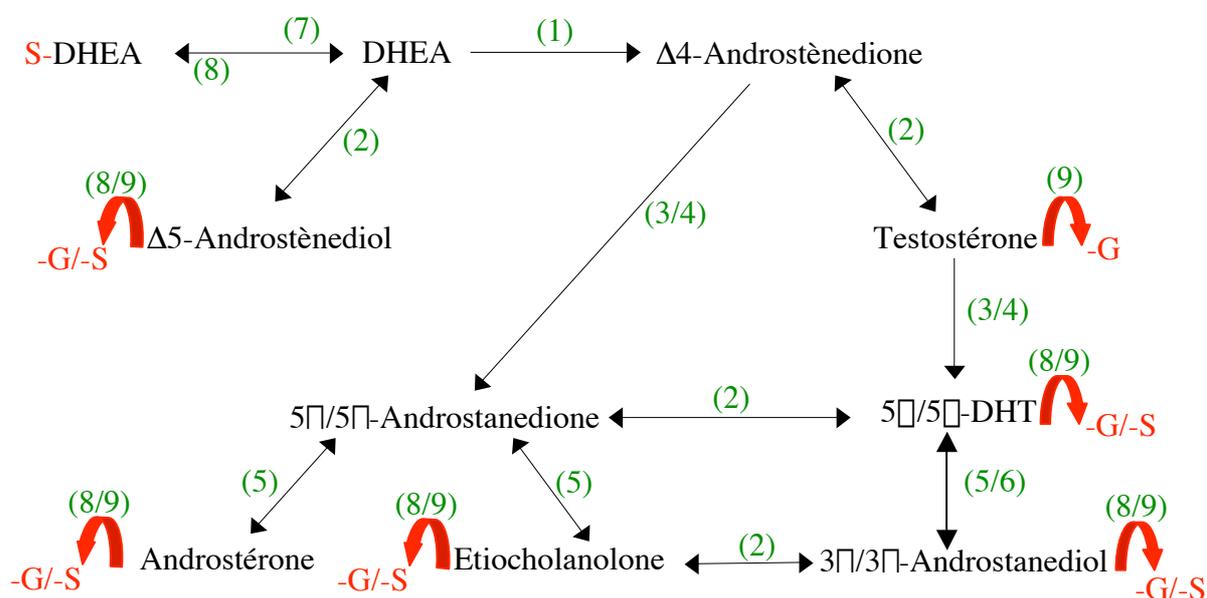


Figure 21 : Schéma du métabolisme observé dans les cellules LNCaP.

-G/-S : formation de Glucurono- (-G) ou de Sulfo-conjugués (-S). () : activité enzymatique impliquée.
Enzymes impliquées :

- (1) 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase/Δ5,4 oxostéroïde isomérase.
- (2) 17β-hydroxystéroïde oxydoréductase (17β-HSOR)
- (3) Δ4-3-oxostéroïde-5β-réductase (5β-réductase)
- (4) Δ4-3-oxostéroïde-5β-réductase
- (5) 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase (3β-HSD)
- (6) 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase (3β-HSD)
- (7) Stéroïde-sulfate Sulfatase
- (8) Stéroïde Sulfotransférase
- (9) Glucuronosyl-Transférase

Puisqu'il est avéré que la glucurono-conjugaison est une voie essentielle de l'élimination des stéroïdes par l'organisme et par la prostate (Belanger et al., 1991), les cellules LNCaP sont donc un excellent modèle pour l'étude de ce métabolisme, à l'inverse d'autres lignées

cancéreuses (PC-3, DU-145) qui forment très peu de conjugués (Koh et al., 2001; Smith et al., 1994).

Nous avons ensuite étudié le métabolisme de la DHEA à sa concentration physiologique par les cellules LNCaP. Comme pour la DHT, les cellules LNCaP transforment rapidement la DHEA, puisque à 12h d'incubation, plus de 50% de la radioactivité extraite est portée par des composés dérivés du substrat. Nous avons montré que le métabolisme de la DHEA s'oriente essentiellement vers la formation de Δ^4 -Androstènedione, plutôt que vers le Δ^5 -Androstènediol. La faible conversion de la DHEA en Δ^5 -Androstènediol (réaction de réduction) s'explique par le fait que dans les tissus prostatiques tumoraux, l'enzyme qui catalyse cette réaction (la 17β -hydroxystéroïde oxydoreductase) fonctionne essentiellement dans le sens oxydatif, alors que dans des tissus prostatiques d'hyperplasie bénigne, elle fonctionne préférentiellement dans le sens réducteur (Ghanadian et al., 1981; Smith et al., 1983). En ce sens, les cellules LNCaP présentent un métabolisme de carcinome prostatique.

La Δ^4 -Androstènedione est l'un des produits majeurs de la DHEA, et elle est progressivement dégradée, selon 2 voies : d'une part la voie Δ^4 -Androstènedione \rightarrow 5β -Androstanedione \rightarrow Androstérone, et d'autre part la voie Δ^4 -Androstènedione \rightarrow Testostérone (\rightarrow DHT) \rightarrow Androstanediols. Dans les 2 cas, certains produits sont progressivement conjugués (Androstanediols, Testostérone, Androstérone), tandis que d'autres restent sous forme libre, car ils ne possèdent pas de groupement $-\text{OH}$ libre (Δ^4 -Androstènedione, 5β -Androstanedione).

Nos résultats confirment donc la fonctionnalité, dans les cellules LNCaP, de la 3β -hydroxystéroïde déhydrogénase/ $\Delta^5,4$ oxostéroïde isomérase (DHEA \rightarrow Δ^4), de la 5β -réductase (Δ^4 \rightarrow 5β -Androstanedione; Testostérone \rightarrow DHT), de la 17β -HSOR (Δ^4 \rightarrow Testostérone; DHEA \rightarrow Δ^5) et de la $3\beta/\beta$ -HSD (DHT \rightarrow $3\beta/\beta$ -Adiol; 5β -Androstanedione \rightarrow Androstérone).

Même si la présence de DHT n'a pas pu être démontrée rigoureusement, la présence des Androstanediols en est une preuve indirecte. D'ailleurs, la mesure des taux plasmatiques des Androstanediols est considérée comme un excellent marqueur de la présence de DHT dans l'organisme (Labrie et al., 1997). La conversion de la Δ^4 en 5β -Androstanedione prouve également la présence de la 5β -reductase, et conforte l'idée que la DHT peut être formée dans notre système, par réduction de la Testostérone grâce à cette enzyme.

Les travaux de Koh et al., utilisant la DHEA comme substrat à très forte concentration (0,2-0,4mM) confortent nos observations, puisqu'ils ont montré la formation de Δ^4 -Androstènedione et de DHT dans les cellules LNCaP (Koh et al., 2001). Corroborant ces données et les nôtres, Bélanger et al. ont montré dans les cellules LNCaP que la DHEA est convertie en Δ^4 -Androstènedione et en Testostérone, que la Δ^4 -Androstènedione est convertie en Testostérone et en DHT, et enfin que la DHT est convertie en Androstanediols glucurono-conjugués (Belanger et al., 1991).

Finalement, le métabolisme de la DHEA aboutit à la formation des produits finaux que nous avons déjà observé dans le métabolisme de la DHT, à savoir l'Androstérone et les Androstanediols (conjugués). La présence de DHT glucurono-conjuguée est également fortement soupçonnée.

L'élimination par la voie des conjugués s'effectue plus lentement que dans le métabolisme de la DHT, probablement en raison du plus grand nombre d'intermédiaires nécessaires à la formation des composés finaux.

Les cellules LNCaP possèdent donc toutes les enzymes-clé du métabolisme des androgènes (Bartsch et al., 1990; Belanger et al., 1991; Bruchovsky et al., 1996), et sont donc un modèle du processus d'Intracrinologie, dans le sens où elles peuvent convertir elles-même les précurseurs surrénaliens en androgènes actifs (Labrie et al., 1993b).

Malgré la présence avérée de $\Delta 4$ -Androstènedione et de Testostérone, qui sont les substrats de l'Aromatase, nous n'avons pas mis en évidence la synthèse de 17β -oestradiol (E2) dans notre système.

Afin de tester plus directement la présence d'Aromatase dans les cellules LNCaP, nous avons incubé ces cellules avec des concentrations physiologiques de $\Delta 4$ -Androstènedione ou de Testostérone radiomarquées, qui sont les substrats directs de l'Aromatase. Dans les 2 cas, nous n'avons détecté ni Oestrone, ni Oestradiol (non montré), alors que des travaux antérieurs du laboratoire, utilisant les mêmes procédures expérimentales, ont montré la formation de ces 2 produits par les cellules MCF-7 (Le Bail et al., 2002).

Il n'existe à l'heure actuelle aucun consensus sur la présence ou l'absence d'expression de l'Aromatase dans les cellules prostatiques normales ou cancéreuses : certains auteurs ont montré l'incapacité de cellules ou de microsomes d'échantillons d'hyperplasie bénigne de la prostate à aromatiser la $\Delta 4$ -Androstènedione ou la Testostérone en oestrogènes (Bartsch et al., 1987; Brodie et al., 1989; Negri-Cesi & Motta, 1994; Smith et al., 1982). A l'inverse, des travaux ont rapporté l'expression de l'Aromatase ou son activité enzymatique dans des échantillons de tissu prostatique (Block et al., 1996; Ellem et al., 2004; Matzkin & Soloway, 1992; Stone et al., 1986). La divergence de ces résultats peut s'expliquer par l'hétérogénéité des types cellulaires prélevés (épithélium, stroma etc.), et bien sûr par le protocole d'analyse des métabolites (concentration de substrat utilisé, temps d'incubation, procédures d'extraction etc.). L'amélioration des techniques de dissection (microdissection au laser) devrait permettre une meilleure séparation des tissus et une homogénéisation des résultats. Ainsi, Ellem et al. ont pu mettre en évidence l'expression préférentielle de l'ARNm de l'aromatase dans les cellules du stroma, par rapport aux cellules épithéliales (Ellem et al., 2004).

Concernant le tissu prostatique cancéreux, les travaux de Brodie et al. n'ont pas mis en évidence la présence d'Aromatase dans des échantillons issus de carcinome prostatique (Brodie et al., 1989). En utilisant les mêmes protocoles, Negri-Cesi et al. ont montré l'absence de transcrits de l'Aromatase dans les cellules LNCaP (Negri-Cesi et al., 1998), et leur présence dans les lignées PC-3 et DU-145 (Negri-Cesi et al., 1999). Contredisant ces données mesurant l'expression des ARNm, d'autres groupes ont au contraire montré l'aromatation de la Testostérone en E2 dans les cellules LNCaP (Block et al., 1996; Ellem et al., 2004). Enfin, Castagnetta et al. ont montré que les cellules LNCaP formaient une quantité détectable d'E2 en présence de $1\mu\text{M}$ de Testostérone radiomarquée, mais pas lorsque la Testostérone est incubée à concentration physiologique (Castagnetta et al., 1997). Là aussi, les contradictions sont grandes, et la diversité des procédures expérimentales utilisées nous laisse dans l'expectative.

Corroborant certains travaux antérieurs, nos données suggèrent donc que les cellules LNCaP ne forment pas d'oestrogènes en quantité significative, lorsqu'elles sont incubées avec de la DHEA, de la Testostérone ou de la $\Delta 4$ -Androstènedione à concentration physiologique.

Par ailleurs, un point demeure obscur, à savoir la nature des composés A et D. Comme nous l'avons montré, ces composés ne sont pas issus d'une transformation de la DHT au contact du milieu de culture, ou sous l'effet des conditions expérimentales. Nous avons également démontré que ces composés ne sont pas des stéroïdes estérifiés à des acides gras. Ces composés se retrouvent dans le métabolisme de la DHT, de la DHEA et dans une moindre mesure dans celui du S-DHEA. Ils ne sont détectés que dans la fraction libre, suggérant que ce

ne sont pas des substrats privilégiés des enzymes de conjugaison, ou alors que leur structure interdit cette transformation (absence d'hydroxyle). Le fait que ces composés soient présents dans le métabolisme de la DHT limite les possibilités, car la DHT est déjà elle-même un élément situé très en aval de la chaîne du catabolisme des androgènes (voir Fig.21). Nous pouvons émettre certaines hypothèses quant à l'identité de ces produits : le métabolite le plus probable dans ce système pourrait être l'étiocolanolone (isoforme en C5 de l'androstérone), formé à partir des androstanediols ou de la 5 α -Androstanedione, sous l'effet d'une 3 α -hydroxystéroïde-oxydoréductase. La 5 α -Androstanedione pourrait être également présente, mais nous n'avons identifié que son isoforme 5 α -.

L'étiocolanolone présente une fonction hydroxyle et peut donc théoriquement être conjugué. A l'inverse, la 5 α -Androstanedione, comme son isoforme 5 β -, n'est pas un substrat de conjugaison. Puisque les composés A et D ne sont pas présents sous forme conjuguée, la présence de la 5 α -Androstanedione serait plus probable.

Aucun de ces 2 composés possibles n'a pourtant été mis en évidence dans d'autres études analysant le métabolisme de la DHEA, de la DHT, ou de la Testostérone. En l'absence de standards radiomarqués supplémentaires, il nous est difficile d'approfondir nos hypothèses sur leur identité.

Les métabolites issus de la DHEA sont formés en quantités variables : parmi les composés actifs (libres) formés, retenons la présence de Δ 5-Androstènediol (5% maximum, 0,5nM), de Testostérone (1,4% maximum, 0,1nM), et de Δ 4-Androstènedione (41% maximum, 4nM).

Ces concentrations, approximatives, se situent dans la gamme des concentrations physiologiques de ces hormones, et de leur EC₅₀ vis-à-vis de l'AR (Miyamoto & Chang, 2000; Miyamoto et al., 1998; Paris et al., 2002). Aussi leur interaction avec l'AR et l'activation de ce dernier semblent hautement probables. Cependant, il est difficile d'extrapoler par rapport à un effet physiologique éventuel : en effet, ces valeurs correspondent à celles des stéroïdes rejetés dans le milieu extracellulaire, et rien ne permet d'affirmer qu'une fois éliminés de la cellule, ces ligands potentiels vont y rentrer à nouveau, et si oui, dans quelle proportion. Par ailleurs, notre technologie ne nous permet pas d'estimer, à un instant donné, la proportion de chacun de ces ligand encore présente dans la cellule : en d'autres termes, s'il reste de la Testostérone dans la cellule, va-t-elle intégralement se lier à l'AR? quelle proportion va être immédiatement convertie en métabolites ou en conjugués?

On sait par exemple que dans les cellules prostatiques, 80% de la DHT sont localisés dans le compartiment nucléaire, sous forme liée au récepteur (Bartsch et al., 1982). Ainsi, l'AR "protège" la DHT de la dégradation, puisque les enzymes métaboliques sont cytoplasmiques, et la DHT ne pourra être dégradée que lorsqu'elle aura accompli sa fonction et sera ressortie du noyau. Mais en est-il de même pour les autres androgènes, moins actifs, moins affins vis-à-vis de l'AR?

Ces différents paramètres nous sont inaccessibles, mais l'ensemble de ces données montre clairement la formation de composés à activité androgénique à partir de la DHEA.

Etant donné que la DHEA est convertie en androgènes potentiellement actifs vis-à-vis de l'AR, il nous est apparu essentiel d'étudier le métabolisme du S-DHEA \square en effet, cet androgène surrénalien est présent dans le sang en très forte concentration (de l'ordre du μ M), et si son métabolisme se superpose à celui de la DHEA, on peut supposer que les composés formés seront présents en plus forte concentration que dans le métabolisme de la DHEA, et que les conséquences pourront être beaucoup plus importantes en termes d'activation de l'AR.

Nos travaux ont montré que le S-DHEA est converti en $\Delta 4$ -Androstènedione, en Testostérone, et majoritairement en Androstanediols (conjugués ou libres). Nous n'avons pas détecté la présence de $\Delta 5$ -Androstènediol, de 5α -Androstanedione ou d'Androstérone, quel que soit le temps d'incubation.

Par ailleurs, nous avons constaté que le S-DHEA persiste longtemps dans le milieu de culture sans être transformé. Même après 40h d'incubation, environ 50% de la radioactivité se retrouve encore dans la fraction sulfo-conjuguée, sous forme de S-DHEA uniquement, et la proportion de formes libres est très faible. Aussi les composés libres dérivés du S-DHEA ne sont présents qu'en très faible proportion à 24h d'incubation, leur concentration dans le milieu serait de l'ordre de 2nM pour la Testostérone ou la $\Delta 4$ -Androstènedione, de 31nM pour le 3α -Androstanediol, et de 0,1nM pour le composé A non identifié. Ainsi, en raison de la faible conversion du S-DHEA en composés libres, ces composés ne sont pas présents en aussi forte proportion que ce que l'on aurait pu attendre au regard des données issues du métabolisme de la DHEA, bien que le S-DHEA ait été incubé à une concentration 100 fois supérieure.

Enfin, nous pouvons nous interroger sur la raison pour laquelle le S-DHEA reste aussi longtemps dans le milieu extracellulaire sans être transformé. Pour être métabolisé, le S-DHEA doit d'une part entrer dans la cellule, et d'autre part, être hydrolysé en DHEA, qui constitue le substrat des réactions enzymatiques ultérieures. Le déficit en l'une de ces étapes pourrait expliquer que le S-DHEA soit aussi peu transformé.

La DHT ou la DHEA présentent une structure lipophile favorisant leur incorporation passive à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique. A l'inverse, du fait de sa structure conjuguée et de la charge nette négative du groupement sulfate, le S-DHEA ne peut pas traverser passivement la membrane cellulaire. De nombreux travaux se sont intéressés aux transporteurs des anions organiques tels que les sulfo-stéroïdes. Différentes familles ont été identifiées, différant par leur mode de fonctionnement, leur spécificité ou leur structure. Les transporteurs les plus étudiés sont les OATP (Polypeptides de Transport des Anions Organiques). Ce sont des transporteurs multispécifiques (sels biliaires, stéroïdes conjugués, hormones thyroïdiennes, drogues...), leur fonctionnement utilise souvent l'énergie fournie par la réduction du glutathion (pour une revue complète, voir (Hagenbuch & Meier, 2003)). D'autres transporteurs plus spécifiques ont été identifiés, notamment les pompes ABC (ATP-Binding Cassette) qui utilisent l'énergie fournie par l'ATP (Suzuki et al., 2003; Zelcer et al., 2003), ou le transporteur Soat, qui est Na^+ -dépendant (Geyer et al., 2004). Chez l'Homme comme chez le rat, ces différents types de transporteurs se retrouvent essentiellement dans les reins, le foie (détoxification), le placenta, le cerveau, la surrénale ou les testicules, et dans ces mêmes organes, ils sont souvent capables de transporter le S-DHEA avec un Km proche de sa concentration physiologique. Leur fonction biologique est souvent mal identifiée, mais si nous prenons l'exemple du placenta, il est clairement établi que l'importation du S-DHEA par les cellules placentaires *via* ces transporteurs contribue à la synthèse locale d'oestradiol (Ugele & Simon, 1999). Les travaux de Pizzagalli et al. ont mis en évidence l'expression et la fonctionnalité de différents OATP dans la glande mammaire normale humaine, et dans des lignées de cellules cancéreuses mammaires (Pizzagalli et al., 2003).

Cependant, malgré l'intérêt croissant suscité par ces transporteurs, aucune publication, à notre connaissance, n'a démontré leur expression ou leur fonctionnalité dans le tissu prostatique, normal ou cancéreux, ou dans des lignées prostatiques.

Enfin, on ignore aussi s'ils fonctionnent exclusivement dans le sens de l'importation dans la cellule ou s'ils sont également impliqués dans l'élimination du S-DHEA vers le milieu extracellulaire ceci peut dépendre en partie de la source d'énergie qu'ils utilisent, et des

gradients de concentrations impliqués. Nos données montrent que les stéroïdes conjugués peuvent être excrétés hors de la cellule, mais rien ne permet d'affirmer que le S-DHEA pénètre dans la cellule par les mêmes voies.

Le faible métabolisme du S-DHEA par les cellules LNCaP pourrait donc s'expliquer par une absence, ou un déficit d'expression de ces transporteurs, même si leur présence ne peut être exclue d'emblée.

En ce qui concerne les stéroïdes-sulfate sulfatases, leur existence a été démontrée dans de nombreux tissus, y compris la prostate humaine. Il n'existerait qu'une seule isoforme, principalement localisée dans la fraction nucléaire de l'épithélium prostatique. Les données pharmacocinétiques semblent indiquer qu'elle présente une forte activité (Bartsch et al., 1990). Les cellules LNCaP, qui sont d'origine épithéliale, sont aussi capables de transformer le sulfate d'estrone en estrone, et des microsomes issus de ces cellules hydrolysent le S-DHEA en DHEA (Selcer et al., 2002). Ces réactions sont abolies en présence d'inhibiteurs connus des stéroïdes-sulfate sulfatases, ce qui suggère la présence de ces sulfatases dans les cellules LNCaP. Cependant, ces mêmes auteurs ont montré que cette activité enzymatique est nettement plus faible dans les cellules LNCaP que dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (4,6pmol/18h/10⁶cells et 284pmol/18h/10⁶cells respectivement) (Selcer et al., 2002). Nous pouvons donc postuler que si ces activités enzymatiques sont insuffisantes par rapport à la forte concentration de S-DHEA, celui-ci pourrait alors être éliminé hors de la cellule sans avoir pu être métabolisé.

Pour conclure, nos données indiquent donc que malgré sa très forte concentration plasmatique, le S-DHEA est faiblement métabolisé par les cellules LNCaP, et la proportion d'androgènes actifs formés n'est pas plus importante que lorsque la DHEA est utilisée comme substrat. Ainsi, quels que soient les mécanismes responsables de ce métabolisme ralenti, les cellules LNCaP semblent présenter des systèmes enzymatiques limitant la forte conversion du S-DHEA en androgènes actifs.

Les cellules LNCaP présentent donc de très fortes activités d'élimination de la DHT, l'androgène le plus efficace au niveau cellulaire. Cette capacité semble être une caractéristique de la prostate tumorale par rapport à la prostate bénigne—de nombreux auteurs ont en effet montré que les cellules ou les tissus tumoraux expriment davantage les activités enzymatiques qui éliminent la DHT que celles qui la synthétisent alors que les cellules bénignes fonctionnent de façon inverse—dans les cellules bénignes, la 5 α -réductase serait plus active que dans les tissus tumoraux, et la 17 β -HSOR fonctionnerait dans le sens réducteur dans les tissus bénins alors qu'elle fonctionnerait préférentiellement dans le sens oxydatif dans le tissu malin (Klein et al., 1988; Smith et al., 1983; Smith et al., 1994).

Les activités glucuronosyl-transférases participent à ce mécanisme, elles agissent non seulement comme un mécanisme de détoxification, mais aussi comme une voie de contrôle des niveaux intracellulaires d'androgènes actifs.

Même si le taux de conversion des androgènes surrénaliens en métabolites actifs apparaît relativement faible, ces androgènes surrénaliens sont toutefois susceptibles d'influencer la prolifération cellulaire.

La suite de notre travail a donc naturellement visé à définir l'effet des androgènes surrénaliens sur la prolifération cellulaire, en utilisant les cellules LNCaP comme modèle du mode Intracrinien.

Dans cette étude, nous avons étudié l'effet prolifératif de la DHEA et du S-DHEA sur les cellules LNCaP, en le comparant à celui de la DHT, qui est l'androgène naturel le plus actif pour les cellules prostatiques, normales ou cancéreuses.

II. Effets des androgènes surrénaliens sur la prolifération des cellules LNCaP

II.1 Effets de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP

Afin d'établir les conditions les plus appropriées pour étudier la prolifération cellulaire, nous avons effectué des tests de prolifération à l'aide d'un test MTT, dans 2 types de milieux différents □ soit un milieu MEM supplémenté à 10% de SVF complet, soit un milieu MEM supplémenté à 10% de DCC-SVF. L'utilisation de DCC-SVF permet théoriquement d'éliminer les stéroïdes du sérum, qui constituent un bruit de fond gênant pour analyser l'effet des stéroïdes exogènes. Cependant, le traitement au charbon-dextran élimine en fait un grand nombre de facteurs sériques, non seulement les stéroïdes, mais aussi des peptides, facteurs de croissance, présents en faible quantité et partiellement connus, mais susceptibles eux aussi d'influencer la croissance cellulaire. Aussi nous avons étudié l'effet de la DHT dans ces 2 types de conditions.

II.1-1 Effets de la DHT en milieu à 10% de SVF complet

Nous avons réalisé une étude effet-dose de la DHT, ainsi qu'une analyse cinétique. Comme le montre la Figure 22, les faibles concentrations de DHT (0,01 et 0,1nM) n'ont pas d'effet sur la prolifération des cellules LNCaP après 3 ou 5 jours d'incubation en présence de SVF complet.

Rappelons que la concentration plasmatique physiologique de la DHT est de l'ordre de 1nM. Par conséquent, dans un milieu à 10% de SVF, la DHT sérique se retrouve à une concentration d'environ 0,1nM. L'ajout de faibles concentrations de DHT (0,01 ou 0,1nM) ne modifie donc pas sensiblement la concentration en DHT dans le milieu de culture, ce qui explique qu'il n'y ait pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire.

En revanche, à partir de 1nM, la DHT induit un très net ralentissement de la prolifération cellulaire □ à 1nM et 100nM de DHT, la prolifération cellulaire après 3 jours de traitement ne représente que 78% et 75% respectivement de la prolifération basale (100%). Ce ralentissement prolifératif est de plus en plus marqué dans le temps, puisque les cellules non traitées continuent de proliférer □ après 5 jours de traitement, le taux de prolifération n'est plus que de 67% et 63% avec 1 et 100nM de DHT respectivement. Par rapport au jour 0 de l'initiation du traitement, les cellules prolifèrent, mais beaucoup plus lentement que les cellules non traitées ou traitées avec de faibles doses d'hormone (<1nM). Ce ralentissement prolifératif en présence de 1, 10 ou 100nM de DHT est significatif par rapport aux cellules non traitées quelle que soit la durée de traitement. Notons que cette inhibition de la croissance

n'est pas réellement dose-dépendante, puisque les taux de prolifération sont relativement similaires que l'on travaille à 1, 10 ou 100nM de DHT.

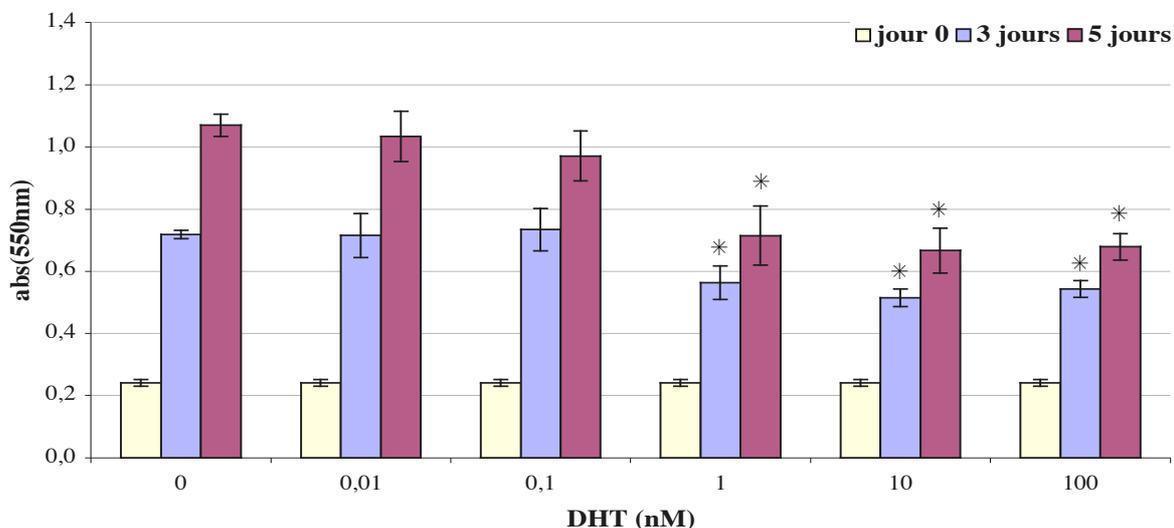


Figure 22 Effets de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 3 ou 5 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. *différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,0001$ Test Anova).

II.1-2 Effets de la DHT en milieu à 10% de DCC-SVF

Pour étudier la réponse des cellules à la DHT en milieu à 10% de DCC-SVF, les cellules ont été incubées pendant 3 jours dans ce milieu (temps de ré-adhésion) avant l'initiation du traitement. Ceci permet une déprivation totale des cellules vis-à-vis des stéroïdes intracellulaires.

Comme le montre la Figure 23, la prolifération des cellules LNCaP en DCC-SVF est tout à fait différente de celle observée en présence de SVF complet. Tout d'abord, la prolifération basale (absence de ligand exogène) est totalement abolie. Ce constat confirme le statut androgéno-dépendant de la lignée LNCaP ces cellules cessent de se multiplier lorsqu'elles sont totalement déprivées en androgènes.

Dans ces conditions de déprivation, l'addition de DHT restaure la prolifération cellulaire, selon un profil dose-dépendant par rapport aux cellules non traitées (100%), l'Abs(550nm) passe à 341% et à 438% après 7 jours en présence de 0,1 et 1nM respectivement de DHT. La stimulation de la prolifération par ces faibles doses de DHT (0,01 à 1nM) est significative par rapport aux cellules non traitées, quel que soit le temps d'incubation.

Pour les concentrations plus élevées de DHT, la stimulation de prolifération est toujours significative, mais elle est moins forte l'effet est peu visible à 10nM, mais à 100nM, la

prolifération par rapport aux cellules témoins est seulement de 287%, contre 438% à 1nM de DHT après 7 jours d'incubation, et cette réduction de la stimulation est significative.

Ce profil de stimulation biphasique en fonction de la dose de DHT a souvent été décrit dans la Littérature, et est typique des cellules LNCaP.

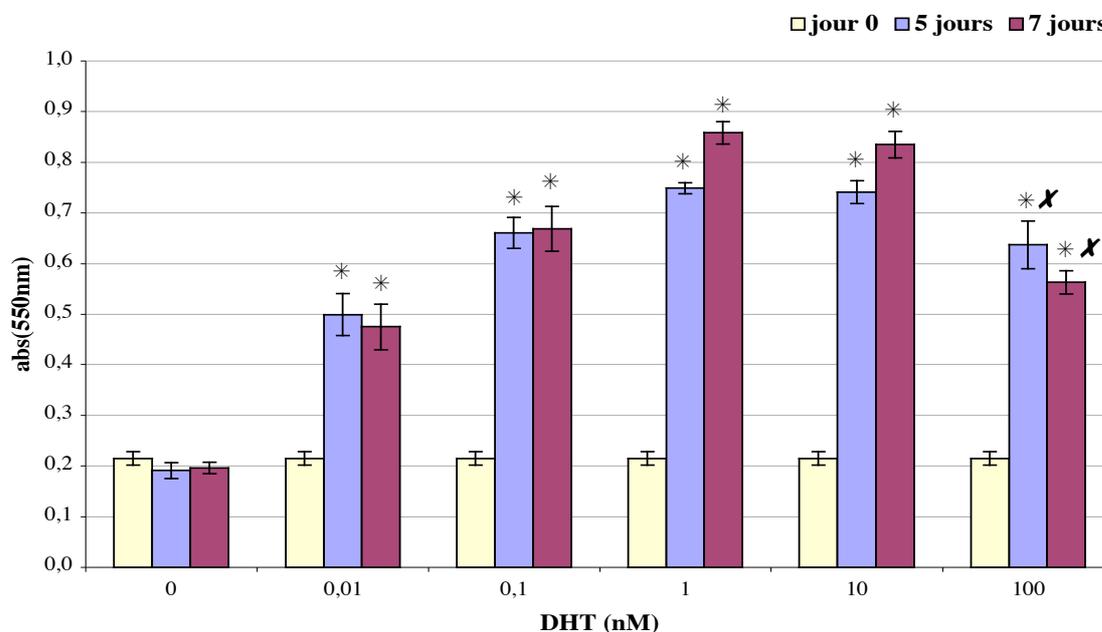


Figure 23 Effets de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% DCC-SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 5 ou 7 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ Test Anova). X différence significative par rapport à la stimulation induite à 1nM de DHT ($p < 0,05$ Test Anova).

Ces études effet-dose nous ont donc permis de montrer qu'en présence de DCC-SVF, la prolifération des cellules LNCaP est stimulée de façon dose-dépendante, pour une gamme de concentrations allant de 0,01 à 1nM. Pour les concentrations supérieures, la stimulation de la prolifération est moindre.

Ainsi, les fortes doses d'androgènes (>1nM) ont moins d'effet prolifératif que les faibles doses (<1nM) lorsque les cellules sont cultivées en présence de DCC-SVF. Ceci rejoint les observations faites en SVF complet, puisque dans ces conditions, les faibles doses d'hormones présentes dans le sérum stimulent la croissance, et l'ajout de fortes concentrations d'hormone (>1nM) ralentit cette prolifération. Il existe donc un parallèle très net entre ces 2 cas de figure.

II.2 Influence de la DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP

Nous avons ensuite étudié l'effet de la DHEA, à différentes doses, sur la prolifération des cellules LNCaP, en utilisant les mêmes conditions de culture, SVF complet ou DCC-SVF.

II.2-1 Effets de la DHEA en milieu à 10% de SVF complet

L'analyse effet-dose (Fig.24) montre que la DHEA, pour des doses de 0,1 à 100nM, ne modifie pas significativement la prolifération des cellules LNCaP, après 3 ou 5 jours de traitement.

En revanche, à 1 μ M, la DHEA ralentit significativement la croissance des cellules LNCaP, la prolifération représentant 67% de la prolifération basale après 5 jours d'incubation.

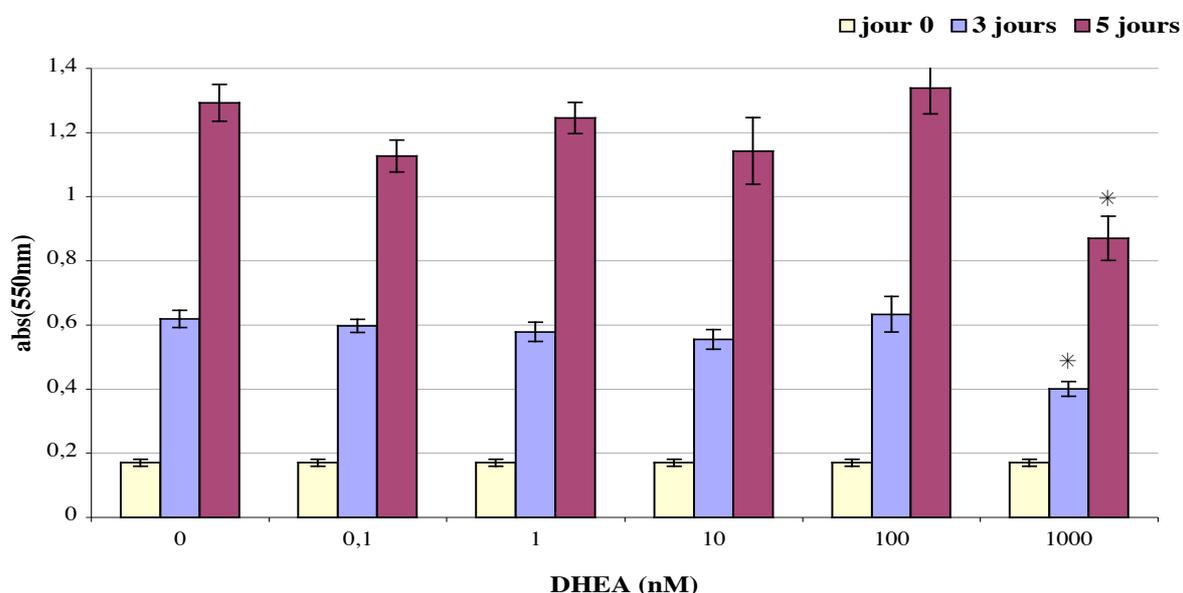


Figure 24 Effets de la DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 3 ou 5 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ Test Anova).

II.2-2 Effets de la DHEA en milieu à 10% de DCC-SVF

L'analyse effet-dose montre qu'en situation de déprivation androgénique, l'addition de DHEA de 0,1 à 10nM n'a aucun effet significatif sur la prolifération des cellules LNCaP, après 5 ou 7 jours d'incubation (Fig.25).

Pour des concentrations supérieures, la prolifération cellulaire est stimulée de façon significative : avec 100nM de DHEA, la prolifération représente 216 et 328% du niveau basal,

après 5 et 7 jours de traitement respectivement. En présence de $1\mu\text{M}$ de DHEA, la prolifération cellulaire est également augmentée (160% à 5 jours, 262% à 7 jours) de façon significative par rapport aux cellules non traitées, mais cette stimulation est significativement moins marquée qu'avec 100nM de DHEA. On retrouve donc, comme en présence de DHT, un profil de stimulation moins marquée aux plus fortes doses.

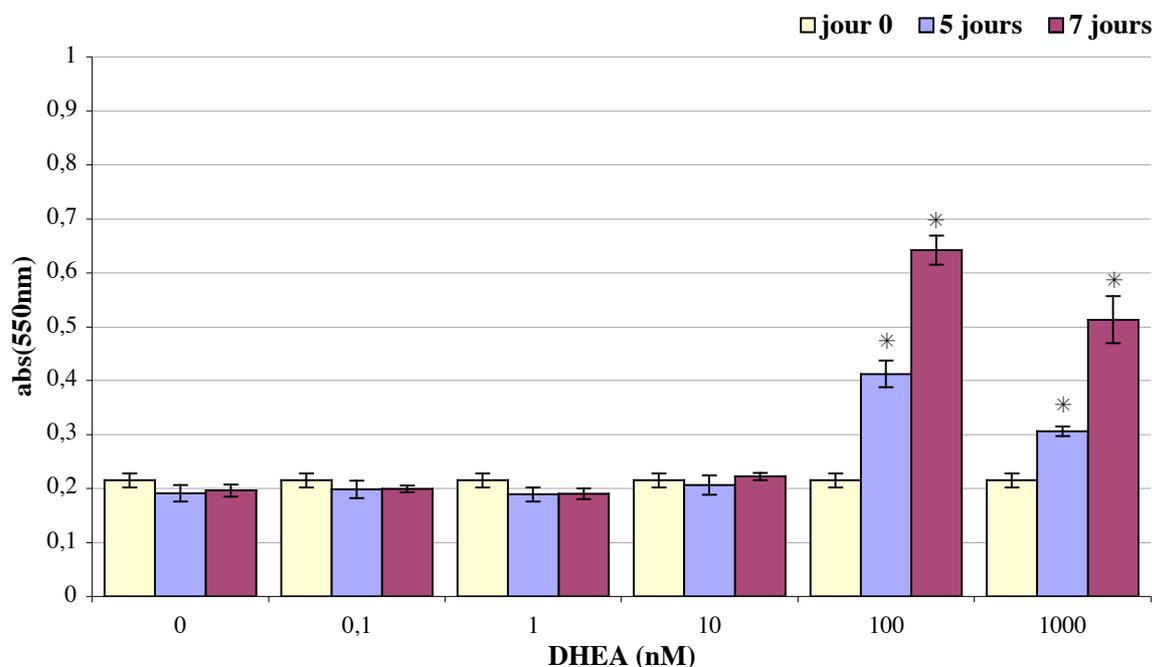


Figure 25 Effets de la DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% DCC-SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 5 ou 7 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ Test Anova).

Notons que l'amplitude de la stimulation induite par la DHEA n'atteint pas celle induite par la DHT le maximum de stimulation observé ici est de 328% (à 100nM de DHEA après 7 jours), contre 438% (à 1nM de DHT après 7 jours). Même à une concentration 100 fois plus élevée, la DHEA n'est donc pas aussi efficace sur la prolifération cellulaire que ne l'est la DHT.

Ces analyses nous permettent donc de montrer que la DHEA, à sa concentration physiologique (10nM), n'a pas d'effet significatif sur la prolifération des cellules LNCaP, quelles que soient les conditions de culture utilisées (SVF ou DCC-SVF). Seules les plus fortes concentrations ont un effet androgénique dans les 2 conditions de culture utilisées.

II.3 Influence du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP

II.3-1 Effets du S-DHEA en milieu à 10% de SVF complet

En présence de SVF complet, l'addition de S-DHEA aux plus faibles concentrations, et à concentration physiologique ($1\mu\text{M}$), ne modifie pas significativement la prolifération cellulaire sur toute la durée de l'expérimentation (Fig.26).

Seule la concentration la plus élevée ($10\mu\text{M}$) ralentit la prolifération de façon significative. La prolifération cellulaire après 5 jours d'incubation en présence de $10\mu\text{M}$ de S-DHEA représente 65% de la prolifération en absence de ligand.

A forte concentration, le S-DHEA a donc un effet androgénique sur la prolifération cellulaire, alors qu'il n'a aucun effet lorsqu'il est ajouté à sa concentration physiologique.

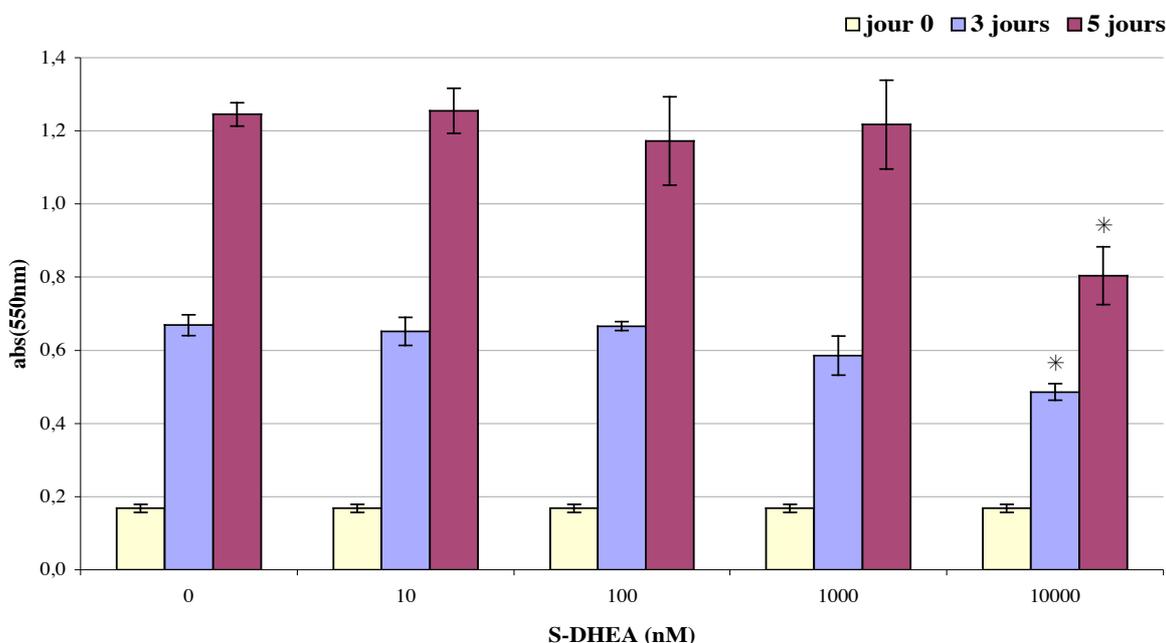


Figure 26 Effets du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 3 ou 5 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,0001$ Test Anova).

II.3-2 Effets du S-DHEA en milieu à 10% de DCC-SVF

L'effet-dose du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en présence de 10% DCC-SVF est relativement peu marqué. Aux concentrations de 10nM, 100nM ou 1 μ M, le S-DHEA n'a pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire (Fig.27).

Seule la concentration de 10 μ M permet de stimuler la prolifération des cellules LNCaP, de façon significative certes, mais néanmoins très modérée par rapport à la DHEA ou à la DHT. Le pourcentage de prolifération est en effet de seulement 147% par rapport aux cellules non traitées après 7 jours de traitement, et l'effet après 5 jours de traitement n'est pas significatif.

Ainsi, le S-DHEA présente un effet androgénique, qui se manifeste ici par une stimulation de la prolifération, mais il n'est efficace qu'à dose pharmacologique, et l'effet reste modeste.

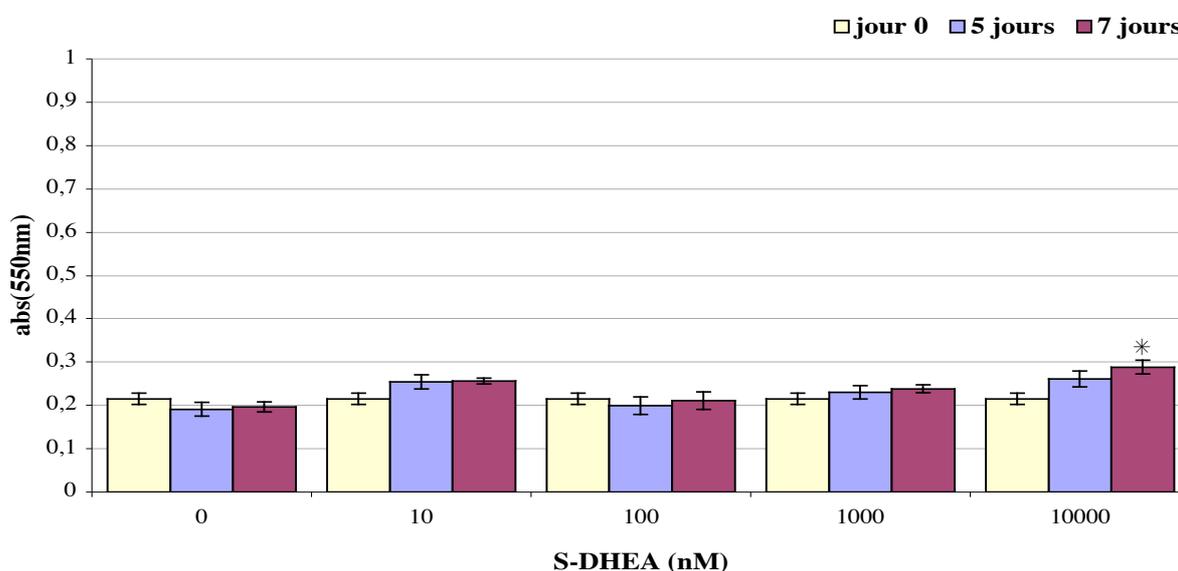


Figure 27 Effets du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% DCC-SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 5 ou 7 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * Différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ Test Anova).

Ces données nous permettent donc de conclure que le S-DHEA présente un effet androgénique potentiel mais très modéré, comparable qualitativement à celui de la DHT. Il peut ralentir la croissance des cellules LNCaP lorsque les cellules sont cultivées en présence de SVF complet, et il peut également stimuler leur prolifération lorsqu'elles sont en situation de déprivation (DCC-SVF). Cependant, quelles que soient les conditions de culture, il n'a jamais d'effet significatif lorsqu'il est administré à sa concentration physiologique. Seule une dose pharmacologique (10 μ M) est efficace.

III. Conclusions et discussion

Pour déterminer si la DHEA ou le S-DHEA influencent la prolifération des cellules LNCaP, nous avons comparé leur effet prolifératif à celui induit par la DHT, qui est l'androgène le plus actif vis-à-vis des cellules prostatiques. Pour cela, nous avons utilisé 2 contextes de culture distincts : d'une part la culture des cellules en présence de sérum complet, permettant aux cellules non traitées de proliférer normalement, sans contrainte externe ; d'autre part la culture des cellules en présence de sérum déstéroïdé, qui élimine les stéroïdes sériques, mais qui provoque aussi un blocage prolifératif total des cellules, puisqu'elles sont androgéno-dépendantes.

Dans ces conditions de culture, nous avons montré que la DHT, lorsqu'elle est administrée à des cellules proliférant normalement (10% SVF), induit, pour des concentrations supérieures ou égales à 1nM, un ralentissement significatif de la croissance.

Lorsque les cellules sont en arrêt prolifératif (DCC-SVF), l'ajout de doses physiologiques de DHT (0,01 à 1nM) stimule fortement la prolifération, en restaurant un signal androgénique perdu suite au traitement par le DCC-SVF. La prolifération est alors stimulée de façon dose-dépendante. Par contre, aux concentrations plus fortes (100nM), la DHT stimule la croissance, mais de façon moins forte qu'en présence des faibles doses : ceci définit le profil biphasique de réponse à des doses croissantes d'hormone.

Les cellules LNCaP, paradoxalement, peuvent donc répondre à un signal androgénique, soit par une stimulation (DCC-SVF + faibles doses d'hormone), soit par un ralentissement (fortes doses) de leur prolifération.

Nous avons évalué la prolifération par un test MTT, mais en raison de la faible adhérence des cellules LNCaP au plastique de culture, nous avons réalisé ces tests sans renouveler les milieux expérimentaux au cours de la cinétique. Or, comme nous l'avons montré dans les études métaboliques, les cellules LNCaP métabolisent rapidement les androgènes, et on peut se demander si le fait de ne pas renouveler les milieux expérimentaux n'introduit pas un biais dans les effets-dose observés, du fait de l'accumulation de métabolites. Pour valider les résultats des tests MTT et vérifier que le renouvellement des milieux n'a pas d'incidence sur la réponse cellulaire, nous avons effectué une expérience consistant à cultiver les cellules dans des flasques de culture (les seules permettant de renouveler le milieu sans décoller les cellules) avec du milieu supplémenté à 10% de SVF. Nous avons ensuite traité les cellules avec de la DHT (0,01nM ou 100nM) ou sans DHT, en renouvelant ou non les milieux expérimentaux tous les 2 jours. La mesure de la prolifération cellulaire a été réalisée après 3 jours ou 6 jours de traitement, par une numération au bleu Trypan des cellules viables. Cette expérience (non montrée) a prouvé que la DHT à 0,01nM n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire, alors qu'à 100nM, la prolifération est réprimée dès 3 jours de traitement sans preuve de cytotoxicité. Par ailleurs, le fait de renouveler tous les 2 jours les milieux expérimentaux n'a absolument pas modifié l'intensité de la réponse cellulaire, quelle que soit la dose de DHT. Cette expérience nous permet donc d'affirmer que la DHT à forte dose est capable de ralentir la prolifération des cellules LNCaP, et que ceci n'est pas lié à une accumulation dans le milieu de produits ou de métabolites toxiques. Nous avons ainsi validé l'utilisation du test MTT et montré que l'absence de renouvellement des milieux expérimentaux ne modifie pas la réponse des cellules.

Nous avons donc pu déterminer ensuite l'effet de la DHEA ou du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP, en utilisant les mêmes procédures expérimentales (test MTT, culture en SVF ou en DCC-SVF).

Nos travaux ont montré que la DHEA à forte concentration a un effet androgénique, dans le sens où elle ralentit la prolifération cellulaire en SVF complet (à $1\mu\text{M}$), et où elle stimule la prolifération cellulaire (à 100nM) en DCC-SVF. Comme la DHT, elle reproduit un certain profil biphasique, puisqu'à $1\mu\text{M}$, la prolifération est stimulée moins fortement qu'à 100nM en DCC-SVF.

La DHEA semble donc avoir potentiellement un pouvoir androgénique comparable qualitativement à celui de la DHT. Cependant, à sa concentration physiologique (10nM), elle n'a jamais d'effet significatif sur la prolifération des cellules LNCaP, quelles que soient les conditions de culture utilisées.

Enfin, nous avons montré que le S-DHEA a lui aussi un effet androgénique potentiel à très forte concentration ($10\mu\text{M}$), il ralentit significativement la prolifération des cellules LNCaP en présence de SVF, avec la même amplitude que la DHT à 100nM . En outre, lorsque les cellules sont déprivées en stéroïdes sériques (DCC-SVF), l'addition de S-DHEA à $10\mu\text{M}$ induit une stimulation de la prolifération, faible mais significative. Par contre, à sa concentration physiologique ($1\mu\text{M}$), le S-DHEA n'a pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire, quelles que soient les conditions de culture.

Pour conclure, les doses de DHEA ou de S-DHEA nécessaires pour induire un comportement prolifératif donné sont plus élevées que les doses de DHT nécessaires à l'obtention d'un effet similaire, et dépassent leur concentration physiologique. Les cellules LNCaP sont donc moins sensibles à l'addition de DHEA ou plus encore de S-DHEA qu'à l'addition de DHT.

Les effets prolifératifs de la DHT ou d'un androgène synthétique sur les cellules LNCaP sont très bien décrits dans la Littérature, non seulement l'effet biphasique observé en présence de DCC-SVF (Berns et al., 1986; Hofman et al., 2001; Horoszewicz et al., 1983), mais aussi l'effet anti-prolifératif induit par les fortes doses en présence de SVF complet (Tsihlias et al., 2000; Wolf et al., 1991). Dans un cas comme dans l'autre, les mécanismes impliqués ne sont que partiellement connus.

Peu d'études renseignent cependant de l'effet de la DHEA ou du S-DHEA sur les cellules LNCaP : Simard et al. ont montré que les cellules LNCaP, cultivées en présence de DCC-SVF, prolifèrent plus activement en présence de DHEA, de Testostérone, de $\Delta 4$ -androsténone, ou de $\Delta 5$ -Androsténone, et ces auteurs retrouvent un profil biphasique en fonction de la dose, le pic de stimulation étant différent pour chaque hormone (Simard et al., 1991). Conformément à nos travaux, ces auteurs ont constaté que seules les fortes doses de DHEA ($1\mu\text{M}$ ou plus) stimulent la prolifération. A notre connaissance, il n'existe aucune donnée évoquant l'effet du S-DHEA sur les cellules LNCaP, probablement parce qu'il est considéré comme un simple «réservoir» de DHEA.

De plus, peu de travaux se sont intéressés à l'effet des androgènes dans un milieu supplémenté en sérum complet à la DHT (Horoszewicz et al., 1983; Tsihlias et al., 2000), ou les androgènes synthétiques (Kokontis et al., 1994; Wolf et al., 1991), sont capables de réprimer la prolifération des cellules LNCaP en présence de sérum complet, mais l'effet d'autres androgènes dans ces conditions n'a pas été documenté à notre connaissance. Nos travaux renseignant de l'effet de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP corroborent cependant ces résultats antérieurs, et apportent des informations originales concernant les androgènes surrénaliens.

Globalement, ces tests de prolifération peuvent être mis en perspective de notre analyse du métabolisme de ces androgènes par les cellules LNCaP : nous avons montré en effet que le S-DHEA est métabolisé beaucoup plus lentement que la DHT. En termes de prolifération, ceci se traduirait donc par un effet du S-DHEA plus discret. La DHEA, qui est métabolisée plus rapidement, présente quant à elle un effet plus proche de celui de la DHT.

Le métabolisme des androgènes surrénaliens par ces cellules emprunte des voies diverses qui n'aboutissent pas intégralement à la formation de DHT (voies du $\Delta 5$ -Androstènediol, ou de l'Androstérone) la quantité de DHT produite n'est donc probablement pas équivalente à la quantité de substrat introduite, d'où un effet physiologique amoindri. En termes d'effet prolifératif, ceci se traduit donc par la nécessité d'utiliser de très fortes doses de DHEA ou de S-DHEA pour générer un effet semblable qualitativement à celui de la DHT.

On ne peut exclure que les androgènes surrénaliens, tout au moins la DHEA, puissent réguler la croissance cellulaire par eux-mêmes, indépendamment de toute bio-conversion en DHT. Il est possible en effet que la DHEA puisse lier directement l'AR, comme elle lie le Récepteur aux Oestrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires (Bruder et al., 1997; Maggiolini et al., 1999). En effet, il a été montré que la DHEA, à concentration physiologique, n'active pas un gène rapporteur AR-dépendant (MMTV-Luc) en présence de l'AR sauvage (Culig et al., 1993a; Tan et al., 1997). En revanche, certaines formes mutées de l'AR (mutation T877A des cellules LNCaP, ou mutation H874Y de la tumeur humaine xenogreffée CWR22) peuvent activer un gène rapporteur AR-dépendant en présence de 10 ou 100nM de DHEA, même si le taux d'induction est beaucoup plus faible qu'en présence de DHT (Culig et al., 1993a; Tan et al., 1997). Dans leur étude sur différentes mutations de l'AR, Steketee et al. ont obtenu des résultats similaires, mais la DHEA n'est active sur l'AR qu'à des concentrations de 1 μ M ou plus (Steketee et al., 2002).

De plus, si le pourcentage de DHT formée à partir de la DHEA ou du S-DHEA est faible, certains autres métabolites formés pourraient eux aussi activer l'AR des cellules LNCaP le $\Delta 5$ -androstènediol, que nous avons identifié comme un métabolite de la DHEA, peut activer l'AR muté des cellules LNCaP et présente un effet androgénique (sécrétion de PSA, prolifération) dans ces cellules (Mizokami et al., 2004). Nous avons montré toutefois qu'il est formé en très faible quantité dans notre système (5% des métabolites), ce qui relativise son importance en termes de prolifération. En revanche, l'un des principaux métabolites de la DHEA, la $\Delta 4$ -Androstènedione, peut activer l'AR muté des cellules LNCaP, lorsqu'il est transfecté dans les cellules PC-3, mais avec une plus faible amplitude que la Testostérone (Miyamoto & Chang, 2000). Ces données suggèrent donc que certains intermédiaires du métabolisme de la DHEA ou du S-DHEA pourraient également activer l'AR des cellules LNCaP, mais leur importance relative par rapport à la DHT reste difficile à évaluer.

Que les androgènes surrénaliens puissent activer directement l'AR ou non, il n'en demeure pas moins qu'ils sont aussi transformés en DHT par les cellules LNCaP et à ce titre, peuvent induire une réponse androgénique.

L'ensemble de nos travaux sur le métabolisme des androgènes surrénaliens et leur influence sur la prolifération des cellules LNCaP a donc permis de montrer

- que les androgènes surrénaliens peuvent être transformés en androgènes actifs par les cellules LNCaP,
- que ce métabolisme se caractérise surtout par un fort processus de détoxification *via* la formation de conjugués,
- que les androgènes surrénaliens ont potentiellement un effet androgénique sur les cellules LNCaP en termes de prolifération,

- que les androgènes surrénaliens ne sont actifs qu'à concentration pharmacologique, et restent moins efficaces que la DHT, probablement en raison de ces voies de conjugaison et d'élimination qui constituent une sorte de système de frein pour limiter leurs effets prolifératifs.

En d'autres termes, le fonctionnement intracrine des cellules LNCaP n'est pas remis en question, mais le pourcentage de DHT formé à partir de concentration physiologique de S-DHEA ne permet pas de générer un effet prolifératif quantitativement similaire à celui de la DHT lorsqu'elle est amenée seule. Les androgènes surrénaliens sont théoriquement à l'origine de 40% de la DHT intra-prostatique, mais dans notre étude métabolique, le pic C, qui correspond en partie à la DHT, ne représente jamais un tel pourcentage dans le métabolisme de la DHEA ou du S-DHEA. Ceci illustre bien que ces cellules disposent de très puissants moyens d'élimination/détoxification, de façon à limiter cette bio-conversion locale.

L'importance des androgènes surrénaliens dans l'organisme en général, et dans la prostate en particulier, prend aussi une dimension particulière au regard de l'actualité et de certaines pratiques de consommation de la DHEA en dehors d'un cadre médical.

En effet, le rôle des androgènes surrénaliens a connu un regain d'intérêt depuis que des travaux ont montré que le taux plasmatique de S-DHEA décline fortement avec l'âge, et qu'il peut être restauré par l'administration orale de DHEA. Cette «Thérapie de remplacement» pourrait avoir des effets bénéfiques sur certains dysfonctionnements/déficits liés à la vieillesse, tels que les maladies cardio-vasculaires, le diabète, le cholestérol, la fonte musculaire, la diminution de la fonction sexuelle, et certains troubles psychologiques (Morales et al., 1994; Watson et al., 1996). Les travaux du Pr. Baulieu ont aussi suggéré que la supplémentation en DHEA à des personnes âgées se traduit par un certain «Bien-être» psychologique, une amélioration du tonus de la peau, et de la vie sexuelle (Baulieu et al., 2000).

Il existe cependant assez peu d'études cliniques renseignant de l'effet à long terme de l'administration de la DHEA ou du S-DHEA sur la fonction prostatique. Les travaux de Reiter et al. (Reiter et al., 1999) ou d'Acacio et al. (Acacio et al., 2004) n'ont montré aucun effet de la DHEA sur le volume prostatique, la fonction urinaire, ou le taux de PSA. Une autre étude a montré également que la supplémentation en DHEA (100mg/jour sur 3 mois) n'altère pas la fonction urinaire, et les taux plasmatiques de PSA ou de Testostérone totale sont inchangés (Flynn et al., 1999). Chez des hommes recevant 50g de DHEA sur une période de 18 mois, les taux plasmatiques de Testostérone et de PSA, ainsi que les paramètres prostatiques, sont inchangés (Vaughn & Cox, 1998). Ces données suggèrent qu'une supplémentation en DHEA ne semble pas altérer de façon significative la fonction prostatique chez l'homme sain. Corroborant ces études cliniques, il a été montré, chez le rat intact, que l'administration de DHEA n'a pas d'incidence sur le poids et l'histologie de la prostate normale ou des testicules (Rhoden et al., 2003).

Des données cliniques ont parallèlement examiné l'effet d'une telle supplémentation en termes de métabolisme général, afin de déterminer si cette supplémentation se traduit par une élévation des concentrations d'hormones testiculaires. Ainsi, la supplémentation en DHEA chez des hommes âgés, permet de ramener la concentration en S-DHEA à un niveau similaire à celui du jeune adulte, mais dans la plupart des cas, la concentration des androgènes testiculaires est inchangée (Acacio et al., 2004; Arlt et al., 1999; Flynn et al., 1999; Morales et al., 1994; Reiter et al., 1999), suggérant que la supplémentation n'a pas entraîné une hyperactivité androgénique. Il existerait des variations en fonction du sexe, puisqu'un protocole de

supplémentation en DHEA provoque une augmentation des taux plasmatiques d'androgènes (Testostérone, DHT) uniquement chez les femmes (Morales et al., 1994). Bien que ces travaux suggèrent l'existence de barrières métaboliques contre l'apport excessif d'hormones, on retrouve souvent suite à une supplémentation en DHEA, une élévation marquée des Glucuronides d'Androstérone ou d'Androstanediols qui sont, nous l'avons vu, les métabolites majeurs des androgènes (Acacio et al., 2004; Belanger et al., 1991; Labrie et al., 1997; Morales et al., 1994). Ceci suggère donc qu'au niveau intra-tissulaire (et probablement intra-prostatique), l'activité androgénique a augmenté, mais de façon « contrôlée ». Chez le rat intact, les travaux de Rhoden et al. mentionnés précédemment ont d'ailleurs montré que la supplémentation en DHEA n'a pas d'incidence sur la croissance prostatique, et pourtant, les concentrations plasmatiques en S-DHEA et en Testostérone ont augmenté suite à la supplémentation, ce qui renforce bien l'idée que des systèmes de frein existent pour limiter l'effet des androgènes surrénaliens sur les tissus-cibles (Rhoden et al., 2003).

En situation de castration, l'effet des précurseurs surrénaliens serait différent chez le rat castré, Schiller et al. ont constaté que les androgènes surrénaliens provoquent une légère augmentation du poids de la prostate et des vésicules séminales (Schiller et al., 1991). L'administration de DHEA par voie percutanée (plus efficace que la voie orale) à des rats castrés, à des doses permettant d'atteindre des taux circulants similaires à ceux de l'homme, provoque une augmentation de la concentration intraprostatique de DHT, augmente le poids de la prostate et stimule l'expression de gènes codant pour des protéines prostatiques androgéno-dépendantes (Labrie et al., 1988; Labrie et al., 1989). Ces données suggèrent donc que chez des animaux castrés, la supplémentation en DHEA restaure une forte activité androgénique, se traduisant par des effets mitogènes sur le tissu prostatique.

Dans le cadre du cancer, différents travaux ont suggéré que ni la DHEA ni le S-DHEA ne semblent être des facteurs de risque importants pour le carcinome prostatique (Comstock et al., 1993). Les études épidémiologiques prospectives suggèrent également que les variations des taux plasmatique d'hormones surrénaliennes ne sont pas un facteur de risque prédictif de développement ultérieur d'un cancer de la prostate. Cependant, ces études prospectives montrent que les niveaux plasmatiques de glucuronides d'androstanediols (métabolites majeurs de la DHT) sont supérieurs de 5% chez les hommes développant ultérieurement un cancer de la prostate, par rapport aux hommes indemnes de cancer prostatique, et ceci peut révéler une activité androgénique intra-tissulaire supérieure chez les individus pour lesquels le cancer sera diagnostiqué (Eaton et al., 1999).

Des études épidémiologiques prospectives menées chez des femmes ont montré un lien entre des concentrations plasmatiques élevées de DHEA ou de S-DHEA et le risque de développer un cancer du sein ou des ovaires, mais ce lien pourrait varier en fonction du statut ménopausal (Gordon et al., 1990; Helzlsouer et al., 1995; Helzlsouer et al., 1992), et il n'existe pas encore de réel consensus à ce sujet (Barrett-Connor et al., 1990).

In vitro, les travaux de Huot & Shain, ont montré que le S-DHEA à 10 μ M a un effet androgénique sur la prolifération de sous-clones issus de la lignée cancéreuse prostatique de rat AXC/SSh, mais cet effet est moins marqué qu'en présence de Testostérone (Huot & Shain, 1988). *In vivo*, les androgènes surrénaliens stimulent la croissance du carcinome prostatique hormono-dépendant Dunning R3327 xenogreffé chez des rats castrés (Schiller et al., 1991). Dans ce cas, la croissance tumorale en présence des androgènes surrénaliens est presque aussi forte que celle observée chez des rats non castrés porteurs de la même tumeur, ce qui suggère que la supplémentation en précurseurs surrénaliens restaure presque totalement un signal androgénique « testiculaire ». Contredisant ces travaux, des données indiquent que l'administration de DHEA ne module pas la croissance de tumeurs prostatiques humaines

hormono-dépendantes (PC-82) transplantées chez la souris nude castrée (van Weerden et al., 1992).

Chez le rat non castré, Rao et al. ont montré que la supplémentation alimentaire en DHEA empêche l'apparition de carcinome prostatique hormono-dépendant induit par la NMU (*N*-Méthyl-*N*-Nitroso-urée), et bloque également l'évolution de tumeurs malignes déjà installées avant le début du régime alimentaire (Rao et al., 1999). Ceci suggère donc un effet protecteur de la DHEA sur le carcinome prostatique chimio-induit.

De l'ensemble de ces études animales et cliniques, il est difficile de conclure quant au risque réel de consommation de la DHEA vis-à-vis des tissus normaux ou tumoraux hormono-dépendants. L'extrapolation des données sur le rongeur à l'espèce humaine est délicate, car les rongeurs ne présentent pas des taux circulants en androgènes surrénaliens aussi élevés que chez l'Homme, et leur métabolisme hépatique est également très différent. Le manque d'homogénéité dans les méthodologies (type de carcinogénèse, animaux castrés ou entiers, procédure et dose d'administration de l'hormone) limite également la comparaison entre ces différents travaux.

Nos travaux sur les cellules LNCaP s'inscrivent dans la continuité de ces études soulignant un effet androgénique potentiel des précurseurs surrénaliens vis-à-vis de cellules cancéreuses prostatiques, mais ils relativisent néanmoins la contribution des androgènes formés en termes d'effets prolifératifs.

Toutefois, ces données suggèrent qu'un risque objectif existe, et la consommation de DHEA en France a donc été soumise à prescription médicale, alors qu'elle est en vente libre dans d'autres pays comme les Etats-Unis. N'étant pas considérée comme un médicament, mais répertoriée comme «**Supplément alimentaire**», elle échappe de ce fait aux tests cliniques. Les effets bénéfiques, très médiatisés ces dernières années (libido, bien-être etc), qu'ils relèvent d'un effet placebo ou qu'ils soient objectifs, risquent également d'entraîner une consommation accrue au-delà de la dose préconisée. Etant donnée la facilité de se procurer de la DHEA (vente libre à l'étranger, Internet), le risque d'une consommation abusive et hors contrôle pourrait aboutir à long terme à une pratique négligeante vis-à-vis du principe de précaution qui semblerait pourtant devoir s'imposer.

2^{ème} PARTIE. MECANISMES DE L'EFFET ANTI-PROLIFERATIF DES ANDROGENES. IMPLICATION DU PROTO-ONCOGENE C-MYC.

Nous avons montré précédemment que les androgènes, et particulièrement la DHT, ont sur les cellules LNCaP 2 effets possibles et opposés□ ils peuvent, selon les conditions de culture ou la dose, soit stimuler la prolifération cellulaire, soit au contraire la ralentir, et ce dernier effet est paradoxal.

La seconde partie de notre travail aura donc pour objectif d'approfondir la connaissance des mécanismes responsables du ralentissement de la prolifération des cellules LNCaP induit par les androgènes lorsque ces cellules sont cultivées dans du milieu supplémenté en sérum complet. Par comparaison entre des cellules non traitées cyclant normalement et des cellules traitées dont la prolifération est ralentie, il est possible alors de mettre en évidence les voies de signalisation induites par le traitement.

1. Effets d'un androgène synthétique, le R1881, sur la prolifération des cellules LNCaP

Pour renforcer la réponse cellulaire et obtenir des conditions optimales pour en analyser les mécanismes, nous avons d'abord étudié l'effet du R1881 (méthyltriénolone) sur la prolifération des cellules LNCaP. Le R1881 est un androgène synthétique, non métabolisable, et qui exerce un puissant effet agoniste sur l'AR.

Nous avons mesuré, par un test MTT, la prolifération des cellules LNCaP dans un milieu à 10% de SVF, sous l'effet de doses croissantes de R1881 et en fonction du temps (Fig.28A). A titre de comparaison, la Figure 28B représente l'effet de la DHT dans les mêmes conditions expérimentales.

Cette étude montre que, comme la DHT, le R1881 inhibe la prolifération des cellules LNCaP□ à 0,1nM, le R1881 semble ralentir la prolifération à 5 jours, mais l'effet n'est pas statistiquement significatif. En revanche, l'inhibition devient significative dès 3 jours de traitement en présence de 1nM de R1881.

D'un point de vue quantitatif, le pourcentage de prolifération à 3 jours de traitement est de 82% et de 60% en présence de 1nM et de 100nM de R1881 respectivement. Les cellules traitées au R1881 semblent progressivement stopper leur croissance, tandis que les cellules non traitées continuent de cycler, et par conséquent, les taux de prolifération diminuent plus encore après 5 jours (58% et 47% à 1 et 100nM de R1881 respectivement).

Enfin et surtout, nous remarquons que cette inhibition de la prolifération est plus forte sous l'effet du R1881 que de la DHT□ après 5 jours de traitement, le pourcentage de prolifération est de 47% avec le R1881 (100nM) contre 63% avec la DHT à la même dose.

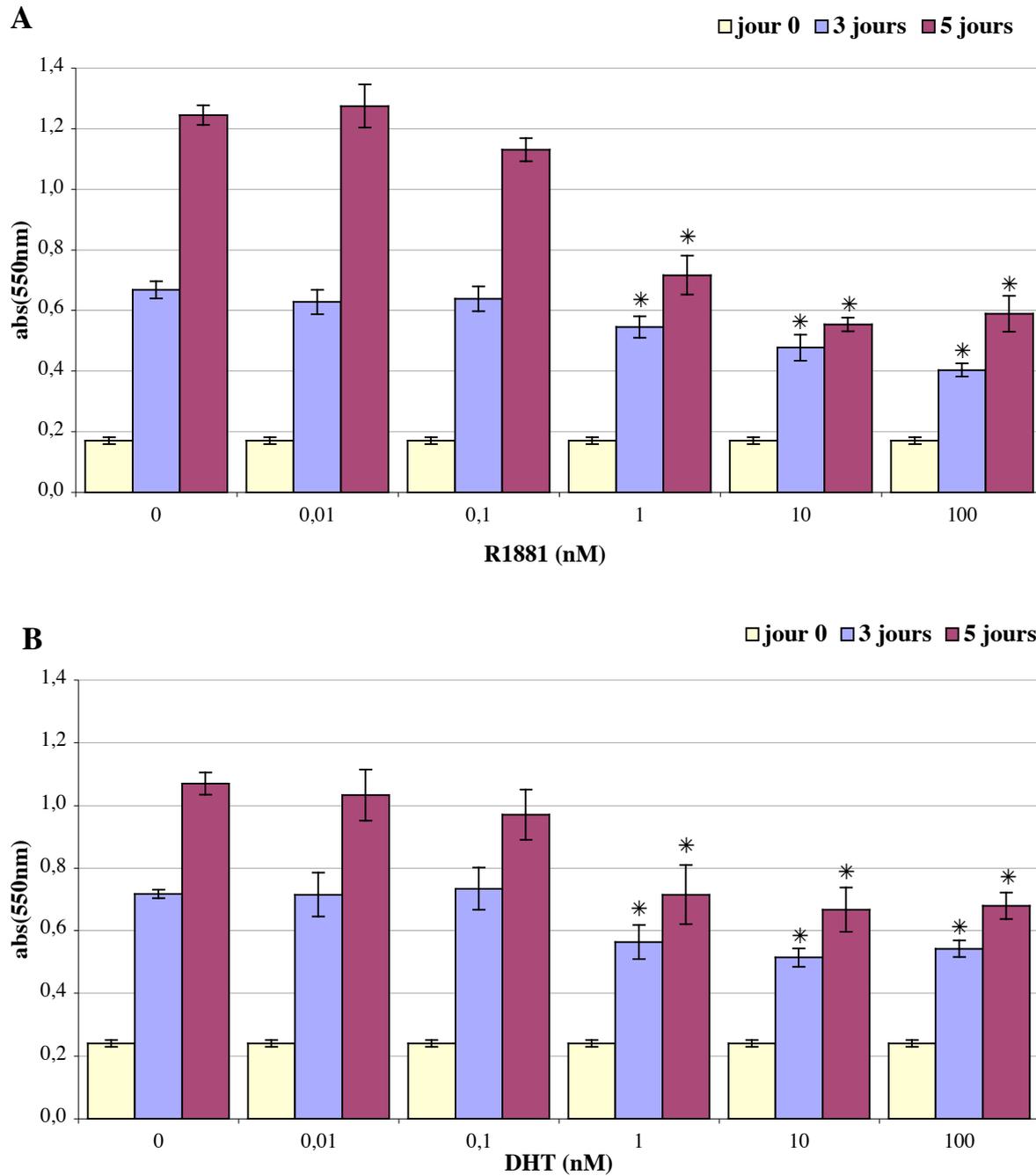


Figure 28 Effets du R1881 ou de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 0, 3 ou 5 jours de traitement par des doses croissantes de R1881 (A) ou de DHT (B). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,0001$ Test Anova).

Ainsi, le R1881 induit un ralentissement de la prolifération des cellules LNCaP, significatif à partir de 1nM, et plus marqué que celui induit par la DHT. Le fait que la DHT soit efficace à une dose de 1nM, c'est-à-dire à sa concentration physiologique, suggère qu'il ne s'agit pas là d'un effet aspécifique, lié à de trop fortes concentrations d'hormone.

Etant plus efficace que la DHT et non métabolisé, c'est le R1881 qui sera dorénavant utilisé pour caractériser les mécanismes de cette inhibition de la prolifération.

II. Effets du R1881 sur la distribution des cellules LNCaP dans le cycle cellulaire

Pour décrire plus précisément le ralentissement prolifératif observé en présence de R1881, nous avons étudié la répartition des cellules LNCaP dans le cycle cellulaire sous l'effet du traitement au R1881.

Pour cela, les cellules ont été traitées dans les mêmes conditions que pour les tests de prolifération, et soumises à une analyse du cycle cellulaire en Cytométrie de Flux. Un exemple représentatif de profil de la distribution des cellules dans le cycle en présence ou non de R1881 100nM est représenté dans la Figure 29A.

L'addition de 100nM de R1881 provoque une accumulation des cellules LNCaP dans la phase G1 du cycle cellulaire—après seulement 2 jours d'incubation, 90% ($\pm 4,8$) des cellules traitées sont en phase G1 contre 73,3% ($\pm 3,6$) pour les cellules non traitées (Fig.29B). Cette accumulation en phase G1 a lieu aux dépens des phases S et G2-M du cycle—le pourcentage de cellules en phase S passe de 11,1% ($\pm 1,4$) pour les cellules témoins à 4,6% (± 1) pour les cellules traitées au R1881, et le pourcentage de cellules en phase G2-M passe de 15,7% ($\pm 2,5$) à 5,4% ($\pm 3,9$) pour les cellules non traitées et traitées respectivement (Fig.29B).

Une étude cinétique réalisée sur des durées d'incubation plus longues a montré que l'accumulation en G1 atteint un plateau dès 2 jours de traitement (non montré).

Le R1881 à une dose de 100nM provoque donc l'arrêt des cellules LNCaP dans la phase G1 du cycle cellulaire, après seulement 2 jours de traitement.

Une étude effet-dose montre que l'accumulation en phase G1 commence avec 0,1nM de R1881 (81,9% $\pm 1,9$), mais atteint le plateau à 1nM (89% $\pm 2,8$), et cette différence est significative par rapport aux cellules non traitées (Fig.30). Ceci confirme les résultats des tests de prolifération, pour lesquels nous avons constaté que l'effet anti-prolifératif du R1881 n'est significatif qu'à partir de 1nM.

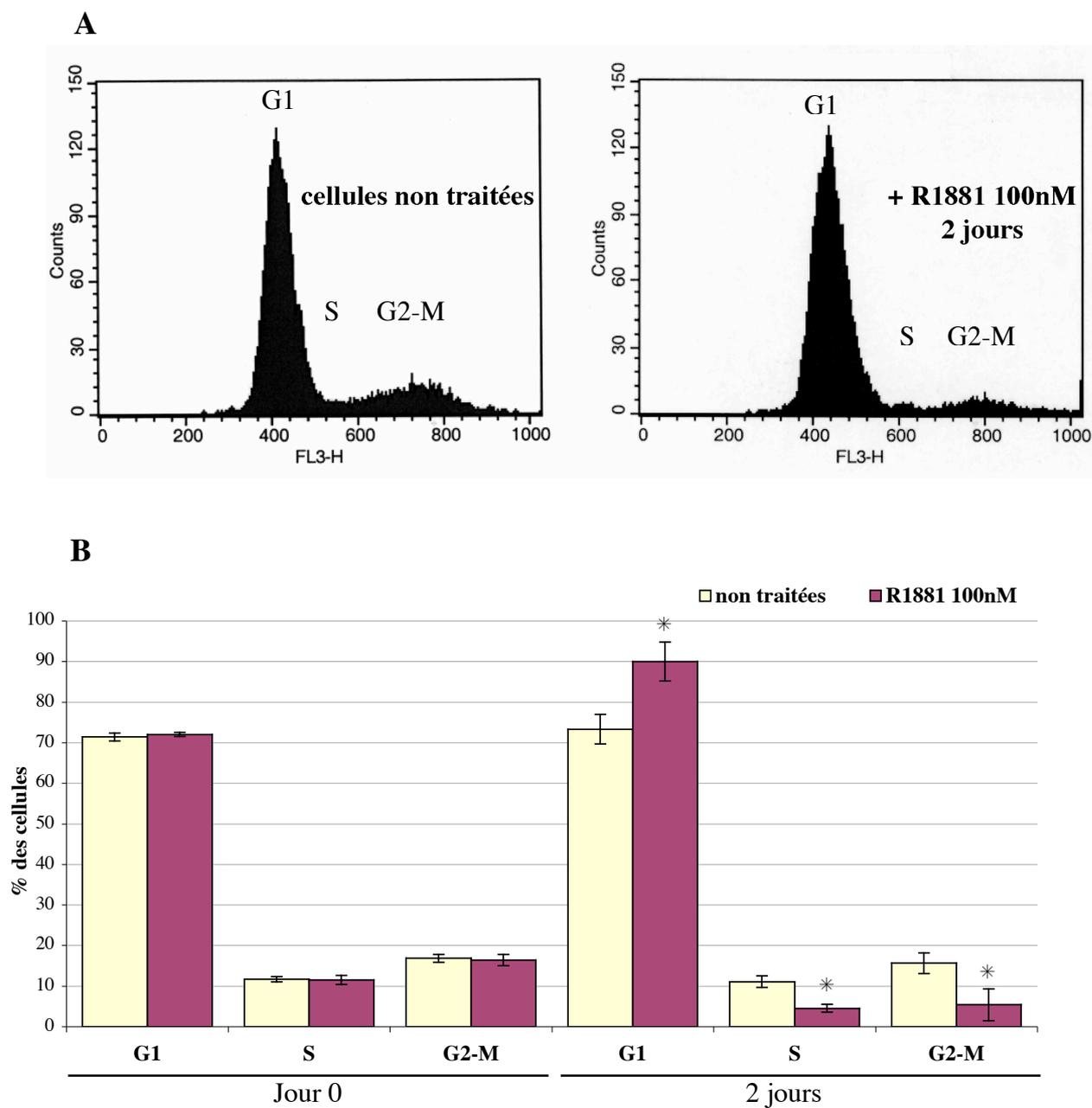


Figure 29 Répartition dans le cycle cellulaire des cellules LNCaP en réponse au R1881 100nM en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, et traitées au R1881. L'analyse du cycle cellulaire par incorporation d'Iodure de Propidium est effectuée en Cytomètre de Flux. **A** exemple représentatif du profil de la distribution des cellules LNCaP dans le cycle après 2 jours de traitement en absence (à gauche) ou en présence (à droite) de 100nM de R1881. **B** évolution de la distribution des cellules LNCaP, traitées ou non avec 100nM de R1881, dans les différentes phases du cycle après 2 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendante * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ Test Anova).

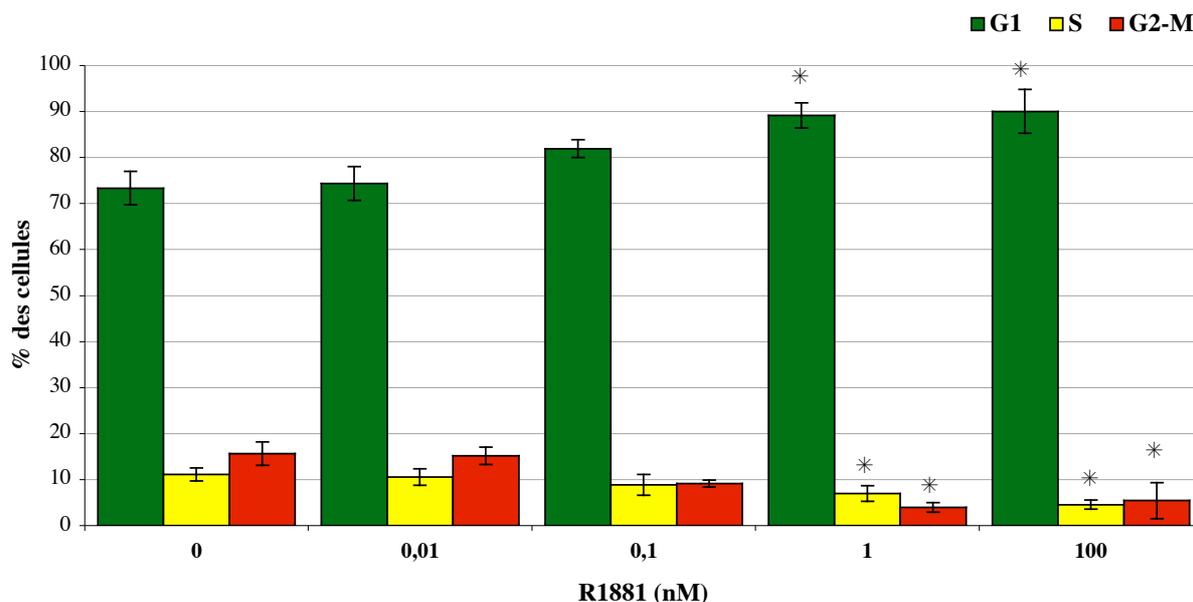


Figure 30 : Effet-dose du R1881 sur la distribution dans le cycle cellulaire des cellules LNCaP cultivées en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, puis traitées avec des doses croissantes de R1881 et l'analyse du cycle cellulaire par incorporation d'Iodure de Propidium est effectuée en Cytomètre de Flux après 2 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. *□différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ □ Test Anova).

Cette analyse du cycle cellulaire nous permet donc de mettre en évidence que le traitement au R1881, à des doses de 1nM ou plus, inhibe la prolifération cellulaire en provoquant l'accumulation des cellules LNCaP dans la phase G1 du cycle cellulaire, au détriment des phases S et G2-M.

Ce blocage en G1 est maximum après seulement 2 jours de traitement, et l'étude effet-dose du phénomène corrobore les tests de prolifération, dans la mesure où le blocage en G1 est manifeste à partir de 1nM de R1881.

III. Absence d'effet cytotoxique du R1881 sur les cellules LNCaP

Afin de déterminer si le R1881 a un effet cytotoxique sur les cellules LNCaP, nous avons d'abord mesuré la viabilité cellulaire sur cellules entières, puis nous avons évalué l'apoptose. Ces analyses de cytotoxicité ont été effectuées sur les cellules du tapis cellulaire combinées aux cellules flottant dans le milieu, afin de ne pas sous-estimer la quantité de cellules mortes ou décollées.

La mesure de la viabilité cellulaire s'effectue par la mesure de l'incorporation d'Iodure de Propidium (IP) sur cellules entières. Ce test suit le même principe que le bleu trypan □ les cellules viables sont capables d'exclure l'IP du fait de l'intégrité de leur membrane

plasmique, alors que les cellules mortes intègrent l'IP qui se fixe alors à l'ADN. Il est ainsi possible, en Cytométrie de Flux, de quantifier les cellules mortes. L'analyse a montré que les cellules IP⁺ représentent en moyenne 11,6% (± 3) des cellules non traitées, contre 16,2% (± 3) des cellules traitées avec 100nM de R1881, après 5 jours de traitement, cette différence n'étant pas significative.

La mise en évidence de l'apoptose s'effectue en mesurant par Cytométrie de Flux l'incorporation d'IP sur des cellules lysées l'apparition d'une fraction sub-G1 traduit alors l'existence de cellules apoptotiques. Cette analyse a montré que le traitement au R1881 ne provoque pas l'apparition d'une population sub-G1. La Figure 31 montre un exemple de tracé de la distribution des cellules dans le cycle, avec ou sans traitement au R1881 100nM après 2 jours de traitement, et bien que le blocage en G1 soit visible, il n'y a pas de population sub-G1 dans les cellules traitées. Les différentes expérimentations réalisées nous ont permis de montrer que la population sub-G1 représente en moyenne 1,02% ($\pm 0,43$) et 1,1% ($\pm 0,46$) de la population cellulaire totale pour les cellules non traitées et traitées avec 100nM de R1881 respectivement.

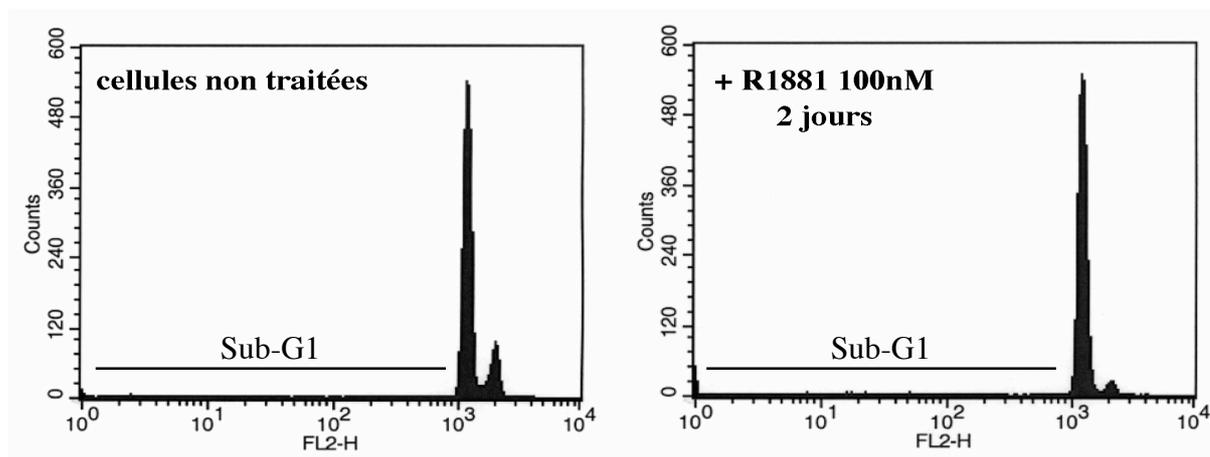


Figure 31 Analyse de la population sub-G1 sous l'effet du traitement des cellules LNCaP au R1881 en milieu 10% SVF. Exemples représentatifs.

A gauche : cellules non traitées ; à droite : cellules traitées pendant 2 jours avec 100nM de R1881.

Le R1881 à 100nM, même après plusieurs jours de traitement, n'a donc pas d'effet toxique ou apoptotique sur les cellules LNCaP.

IV. Modifications morphologiques induites par le R1881 sur les cellules LNCaP

Le blocage en phase G1 induit par le R1881 s'accompagne d'une altération de la morphologie cellulaire. La Figure 32 montre un exemple typique de cellules non traitées ou traitées au R1881.

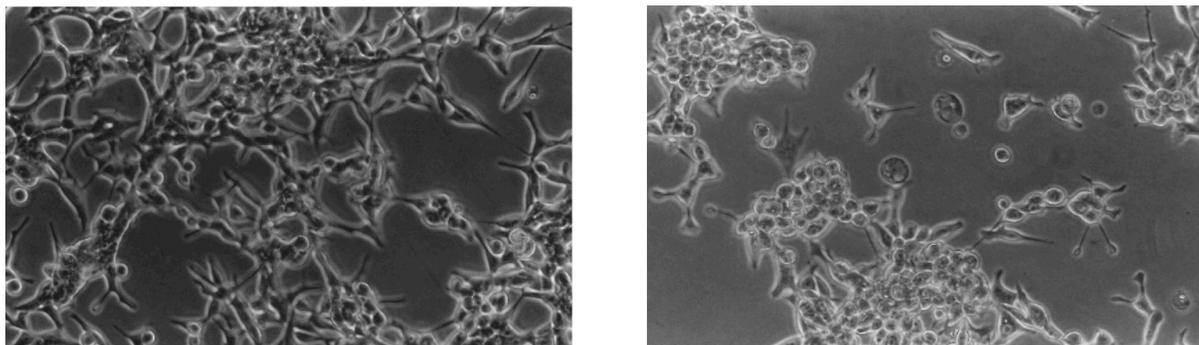


Figure 32 Photos représentatives des modifications morphologiques induites par le R1881 dans les cellules LNCaP vivantes.

A gauche : cellules non traitées. A droite : cellules traitées pendant 3 jours avec 100nM de R1881. Microscope à contraste de phase (grossissement : 20X).

Alors que les cellules non traitées forment un tapis homogène en monocouche, et sont individuellement fusiformes et bien étalées, les cellules traitées au R1881 sont au contraire très ramassées les unes sur les autres, très arrondies, et souvent plus larges et plus granuleuses.

Ce type de morphologie a souvent été associé à des processus de différenciation cellulaire (Whitacre et al., 2002). Nous ne disposons cependant pas des marqueurs nécessaires à la caractérisation d'un processus de différenciation, et notre examen n'a pas été approfondi dans cette direction.

A ce stade de notre étude, l'ensemble de nos données constitue un faisceau d'arguments qui plaident clairement en faveur d'une activité cytostatique du R1881 plutôt que d'un effet toxique.

V. Implication du Récepteur aux Androgènes dans l'arrêt prolifératif des cellules LNCaP en réponse au R1881

Pour déterminer si l'AR est impliqué dans ce blocage des cellules en phase G1, nous avons utilisé 3 types d'approche :

- Analyser la réponse au R1881 de cellules cancéreuses prostatiques n'exprimant pas l'AR.
- Analyser la réponse au R1881 de cellules LNCaP sur-exprimant l'AR.
- Analyser la réponse au R1881 des cellules LNCaP en présence d'anti-androgènes.

V.1 Réponse au R1881 de cellules AR-négatives

Cette étude a été réalisée avec les lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3 et DU-145. Elles n'expriment pas l'AR et sont considérées comme androgéno-indépendantes. Leur réponse au R1881 a été étudiée *via* l'analyse du cycle cellulaire en Cytométrie de Flux.

Comme le montre la Figure 33, représentative des expériences effectuées, le R1881 à 100nM n'a pas d'effet sur la distribution de ces 2 lignées dans le cycle cellulaire. Dans la lignée PC-3, le pourcentage de cellules en phase G1 au bout de 4 jours est de 66% et de 68% pour les cellules non traitées et traitées au R1881 100nM respectivement. Dans la lignée DU-145, ce pourcentage est de 79% et 78% pour les cellules témoins et traitées respectivement, et ce après 4 jours de traitement. La répartition des cellules dans les autres phases du cycle n'est pas non plus perturbée par le traitement.

Aucune modification morphologique n'a par ailleurs été observée dans ces lignées après un traitement en présence de R1881 100nM.

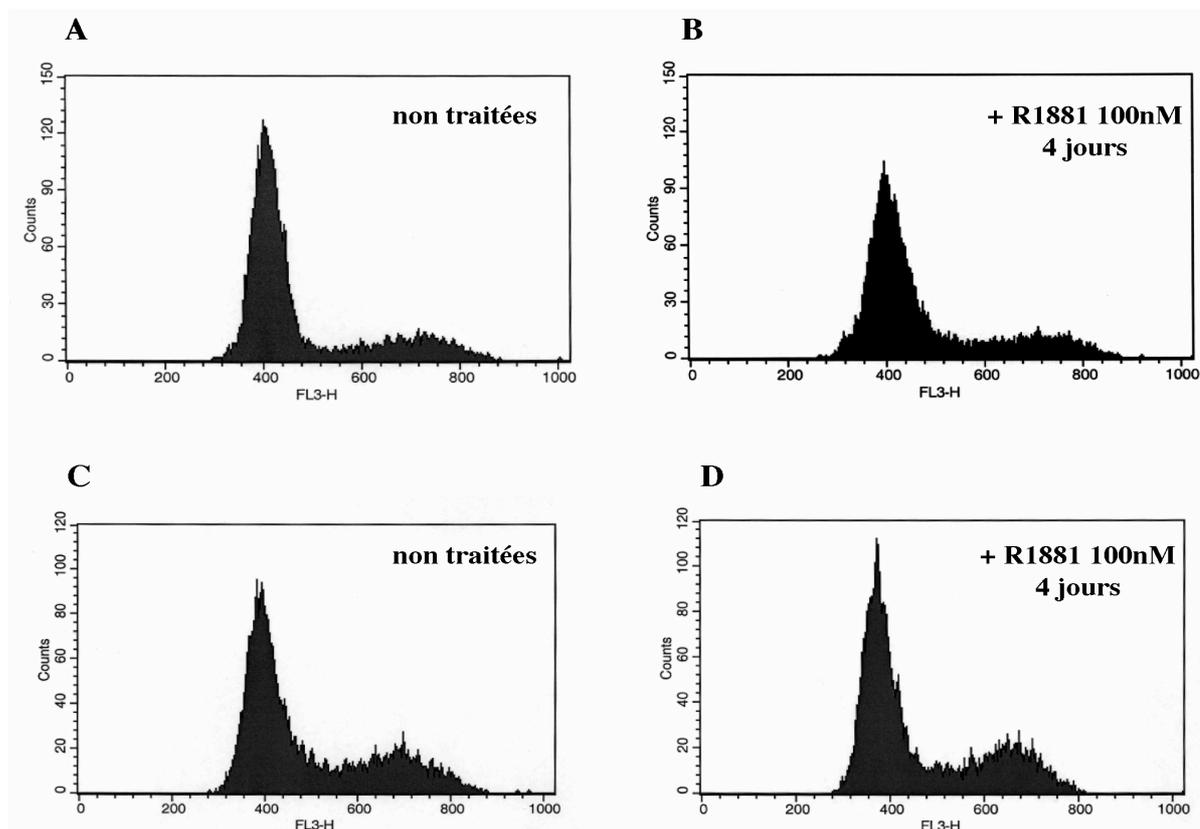


Figure 33 Répartition dans le cycle cellulaire des cellules DU-145 et PC-3 en réponse au R1881 100nM en milieu 10% SVF.

En haut, distribution dans le cycle des cellules DU-145 en absence (A) ou en présence (B) de R1881 100nM pendant 4 jours. En bas, distribution dans le cycle des cellules PC-3 en absence (C) ou en présence (D) de R1881 100nM pendant 4 jours. Exemples représentatifs.

L'utilisation de lignées n'exprimant pas l'AR nous a donc permis de constater que ces cellules ne répondent pas au R1881 en termes de distribution dans le cycle cellulaire.

V.2 Réponse au R1881 de la lignée LNCaP-FAR

Si l'AR est impliqué dans l'effet anti-prolifératif du R1881, et si son absence d'expression se traduit par une absence d'effet sur la prolifération, on peut se demander, à l'inverse, si la sur-expression de l'AR dans les cellules LNCaP peut induire un blocage plus marqué ou plus rapide de la progression des cellules dans le cycle.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé les cellules LNCaP-FAR, obtenues par transfection stable de la lignée LNCaP avec un plasmide d'expression constitutif de l'AR (forme sauvage) couplé à un peptide FLAG. L'encadré en haut à droite de la Figure 34 montre la différence d'expression de l'AR entre les cellules LNCaP, LNCaP-FAR et DU-145, évalué par Western Blot.

Nous avons donc examiné la répartition de ces cellules dans le cycle cellulaire, en Cytométrie de Flux, en réponse à des doses croissantes de R1881 administrées pendant 2 jours.

Nous avons constaté que sur ces cellules, le R1881 induit un fort blocage en phase G1, qui atteint son maximum après 2 jours de traitement, et s'effectue aux dépens des phases S et G2-M (Fig.34).

Le pourcentage de cellules en phase G1 atteint 86,8% ($\pm 1,4$) après 2 jours de traitement avec 100nM de R1881, alors que seulement 61,7% ($\pm 1,3$) des cellules non traitées sont en phase G1.

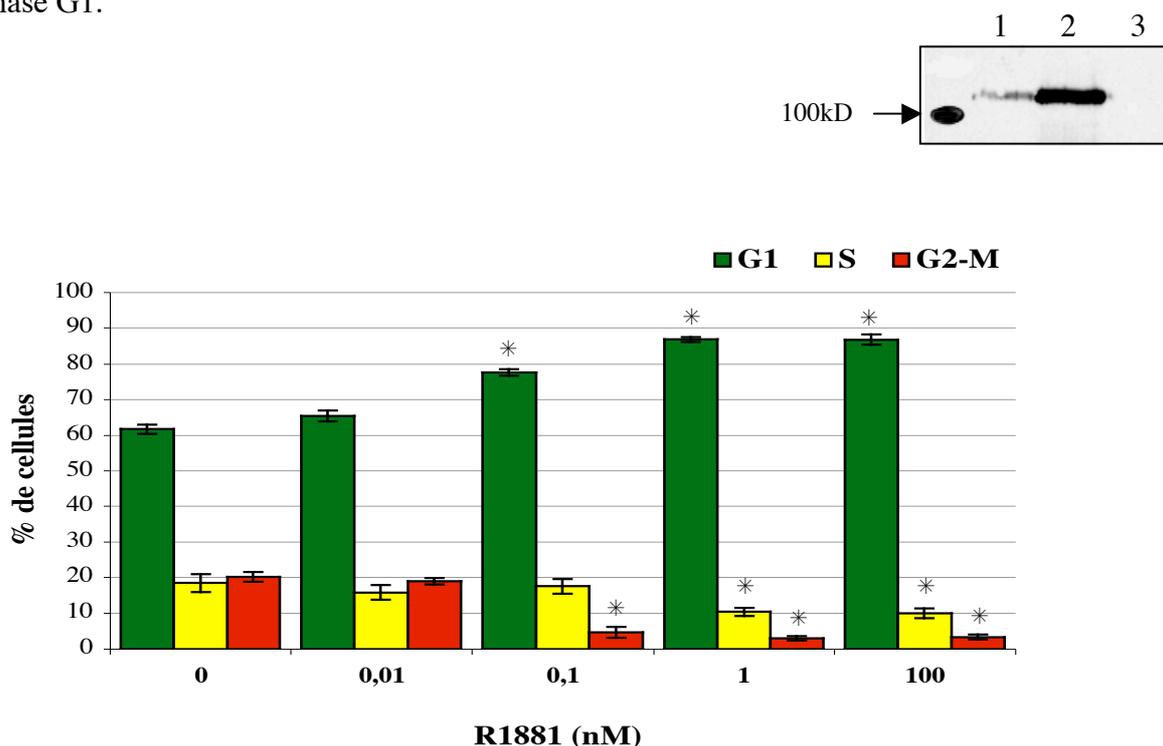


Figure 34 Répartition dans le cycle cellulaire des cellules LNCaP-FAR en réponse au R1881 en milieu 10% SVF.

Les cellules LNCaP-FAR sont traitées en milieu 10% SVF avec des doses croissantes de R1881 pendant 2 jours puis la distribution dans le cycle est analysée par incorporation d'Iodure de Propidium en Cytométrie de Flux. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. * différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ test Anova). Encadré en haut à droite comparaison du niveau d'expression basale de l'AR entre les cellules LNCaP (piste 1), les cellules LNCaP-FAR (piste 2) et les cellules AR-négatives DU-145 (piste 3), déterminé par Western Blot, à l'aide d'un anticorps anti-AR. Notons la sur-expression de l'AR dans les cellules LNCaP-FAR vs LNCaP.

Cette étude montre également que l'accumulation en phase G1 débute avec la dose de 0,1nM, mais le blocage induit par cette dose est déjà beaucoup plus marqué, par rapport à ce que nous avons observé dans les cellules LNCaP avec 0,1nM de R1881, 77,7% ($\pm 0,9$) des cellules sont en phase G1 après 2 jours, soit une augmentation de 16% par rapport aux cellules non traitées. Dans la lignée LNCaP, cette augmentation n'était que de 8,6% (voir Tableau 8).

Tableau 8 Comparaison de l'effet-dose du R1881 sur la distribution des cellules LNCaP et LNCaP-FAR dans le cycle après 2 jours de traitement.

lignée	R1881 (nM)	% G1	% S	% G2-M
LNCaP	0	73,3 \pm 3,6	11,1 \pm 1,4	15,7 \pm 2,5
	0,01	74,3 \pm 3,7	10,5 \pm 1,8	15,2 \pm 1,9
	0,1	81,9 \pm 1,9	8,8 \pm 2,2	9,1 \pm 0,8
	1	89,2 \pm 2,8 *	7 \pm 1,7 *	4 \pm 1,1 *
	100	90 \pm 4,8 *	4,6 \pm 1 *	5,4 \pm 3,9 *
LNCaP-FAR	0	61,7 \pm 1,3	18,4 \pm 2,5	20,2 \pm 1,4
	0,01	65,5 \pm 1,5	15,8 \pm 2,1	18,9 \pm 0,9
	0,1	77,7 \pm 0,9 *	17,6 \pm 2,1	4,7 \pm 1,4 *
	1	86,8 \pm 0,7 *	10,3 \pm 1,1 *	3,1 \pm 0,6 *
	100	86,8 \pm 1,4 *	10,0 \pm 1,4 *	3,4 \pm 0,7 *

Les valeurs représentent les effets-dose déjà montrés sous forme graphique et correspondent à la moyenne \pm écart-type de 3 expériences indépendantes. * \square différence significative par rapport aux cellules non traitées ($p < 0,05$ \square Test Anova).

Le pourcentage de cellules en phase G1 sous l'effet de 100nM de R1881 après 2 jours ne dépasse pas celui observé dans les mêmes conditions chez les cellules LNCaP (86,8% ($\pm 1,4$)) chez les LNCaP-FAR contre 90% ($\pm 4,8$) chez les LNCaP). Toutefois, au regard des cellules témoins, l'accumulation en G1 est nettement plus forte, puisque 73,3% ($\pm 3,6$) des cellules LNCaP non traitées sont en phase G1, alors que seulement 61,7% ($\pm 1,3$) des cellules LNCaP-FAR non traitées sont dans cette phase du cycle (Tableau 8). Par conséquent, l'accumulation en G1 dans un même intervalle de temps et pour une même dose de R1881 est beaucoup plus important dans les cellules LNCaP-FAR que dans les cellules LNCaP.

Cet écart entre les 2 lignées concernant l'état des cellules non traitées peut sembler surprenant \square il peut s'expliquer par le fait que les cellules LNCaP-FAR prolifèrent sensiblement plus vite que les cellules LNCaP, d'où un plus faible nombre de cellules en phase G1 à un instant donné dans les cellules LNCaP-FAR (les temps de doublement de la population sont d'environ 40-48h pour les cellules LNCaP contre approximativement 24-30h pour les cellules LNCaP-FAR). Par ailleurs, les cellules LNCaP-FAR forment un tapis plus uniforme, et ne s'aggrègent pas en « \square clusters \square , contrairement aux cellules LNCaP. Or, du fait de leur aggrégation, les cellules LNCaP tendent à former des zones de « \square confluence locale \square , ce qui entraîne probablement des phénomènes localisés d'inhibition de prolifération par contact, et tend donc à augmenter le nombre de cellules en phase G1, même si globalement, les cellules continuent à proliférer.

Nous pouvons donc conclure que la sur-expression constitutive de l'AR dans les cellules LNCaP-FAR permet d'amplifier la réponse des cellules au R1881. Ceci se traduit d'une part par une accumulation plus forte des cellules dans la phase G1 du cycle, et d'autre part, par une sensibilisation des cellules au R1881 à 0,1nM.

V.3 Effets des antagonistes de l'AR sur la répression de la prolifération induite par le R1881

Enfin, pour démontrer l'importance de l'AR dans la réponse des cellules LNCaP au R1881, nous avons testé la capacité des anti-androgènes à antagoniser l'arrêt prolifératif induit par le R1881.

Comme nous l'avons signalé en Introduction, l'AR dans les cellules LNCaP présente une mutation dans le Domaine de Liaison au Ligand (Thr877Ala), et cette mutation confère aux anti-androgènes un effet de type agoniste sur la transactivation de gènes rapporteurs (Veldscholte et al., 1992b). Le Cyprotérone Acétate (CPA) et l'Hydroxy-Flutamide sont ainsi considérés comme des agonistes partiels de l'AR muté des cellules LNCaP. Seul le Bicalutamide (Casodex) agit comme un antagoniste pur vis-à-vis de l'AR muté de ces cellules, mais son affinité de liaison pour l'AR est très faible, comparée à celle du CPA.

Nous avons d'abord étudié l'influence du Bicalutamide sur l'effet anti-prolifératif du R1881 (non montré). A $1\mu\text{M}$, le Bicalutamide n'a pas d'effet sur la prolifération en absence de R1881, et il antagonise légèrement l'effet du R1881 aux plus faibles doses à 1nM de R1881, le taux de prolifération passe de 47% en absence de Bicalutamide à 56% en présence de Bicalutamide après 6 jours de traitement combiné. Le Bicalutamide est cependant incapable d'antagoniser le R1881 à 10 ou 100nM.

Nous avons ensuite testé la capacité du CPA à antagoniser l'effet du R1881 sur la prolifération des cellules LNCaP. La Figure 35 montre que à $1\mu\text{M}$, le CPA n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules LNCaP en absence de R1881. Il antagonise assez bien l'effet anti-prolifératif du R1881 à 0,1 et 1nM en présence de 1nM de R1881, le pourcentage de prolifération passe de 73% en absence de CPA à 97% en présence de CPA après 3 jours de traitement. Son effet antagoniste est donc plus fort que celui du Bicalutamide. En revanche, à 10 ou 100nM de R1881, le pouvoir antagoniste du CPA est inexistant.

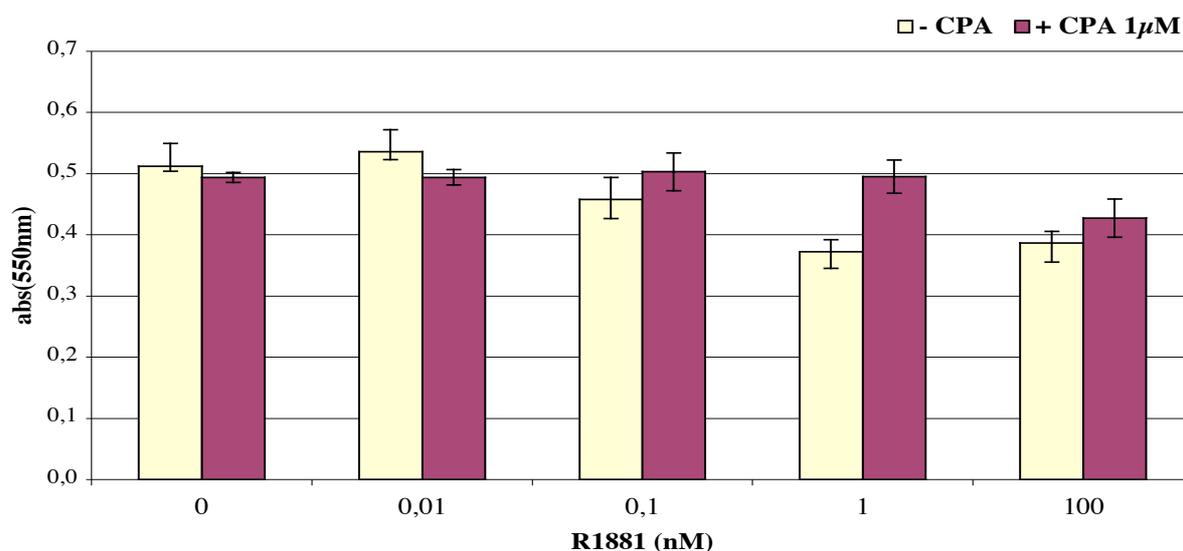


Figure 35 Effets du CPA sur la réponse proliférative des cellules LNCaP au R1881, en milieu 10% SVF.

Le test de prolifération a été réalisé en plaques 96 puits, par la méthode de réduction du MTT, après 3 jours de traitement. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes.

Ces données indiquent donc que bien que le CPA soit considéré comme un agoniste partiel sur l'AR muté des cellules LNCaP, il n'a pas d'effet sur la prolifération de ces cellules, ce qui suggère que l'effet anti-prolifératif des androgènes nécessite un agoniste puissant. Le CPA n'a donc pas un effet agoniste suffisant pour inhiber seul la prolifération comme le font la DHT ou le R1881.

En revanche, le pouvoir antagoniste partiel du CPA lui permet d'antagoniser l'effet anti-prolifératif du R1881 à 0,1 et 1nM. L'affinité du Bicalutamide pour l'AR muté de la lignée LNCaP étant plus faible que celle du CPA, le Bicalutamide a par conséquent un effet antagoniste nettement plus modéré.

En résumé, le fait que le R1881 soit inactif sur des cellules dépourvues d'AR, que la sur-expression de l'AR sensibilise les cellules à l'effet du R1881, et que les anti-androgènes soient capables d'antagoniser au moins partiellement l'effet du R1881, prouve donc l'implication de l'AR dans l'effet anti-prolifératif des androgènes.

VI. Effets du R1881 sur les régulateurs du cycle cellulaire

Ayant caractérisé le mode de répression de la prolifération des cellules LNCaP par le R1881, nous avons ensuite cherché à identifier les médiateurs cellulaires responsables de ce blocage dans le cycle. Pour cela, nous avons analysé la régulation, par le R1881, d'un grand nombre de médiateurs connus de la progression dans le cycle cellulaire. Nous nous sommes focalisés sur 3 grandes familles de régulateurs du cycle, à savoir les cdk («cyclin dependent kinases»), leurs partenaires, les cyclines, et enfin les inhibiteurs des cdk.

Nous avons donc effectué une analyse cinétique de la régulation de ces médiateurs après un traitement des cellules LNCaP en présence de 100nM de R1881. La régulation de ces médiateurs a été étudiée au niveau de leur taux d'ARNm (par RPA) et de protéines (par Western Blot).

VI.1 Régulation des médiateurs du cycle cellulaire par le R1881 au niveau de l'expression des protéines

VI.1-1 Régulation de l'expression des cyclines

Les cyclines A, E, D1 et D3 sont essentielles au déroulement de la phase G1, et au passage du Point de Restriction qui autorise l'entrée en phase S (voir Annexe II).

Comme le montre la Figure 36, le traitement des cellules LNCaP avec 100nM de R1881 induit une diminution marquée de l'expression des cyclines A, E et D1, visible à 24h de traitement, et qui s'aggrave à 72h. En revanche, l'expression de la cycline D3 n'est pas influencée par le R1881, quelle que soit la durée du traitement.

La cycline B1 n'est pas responsable de la transition G1-S, elle est plutôt nécessaire au bon déroulement de la phase G2-M. Nous constatons pourtant qu'elle est également sous-exprimée en réponse au R1881, et devient indétectable à 72h (Fig.36).

L'égalité du niveau d'actine à chaque temps de traitement atteste de l'égalité des quantités de protéines totales déposées dans chaque puits.

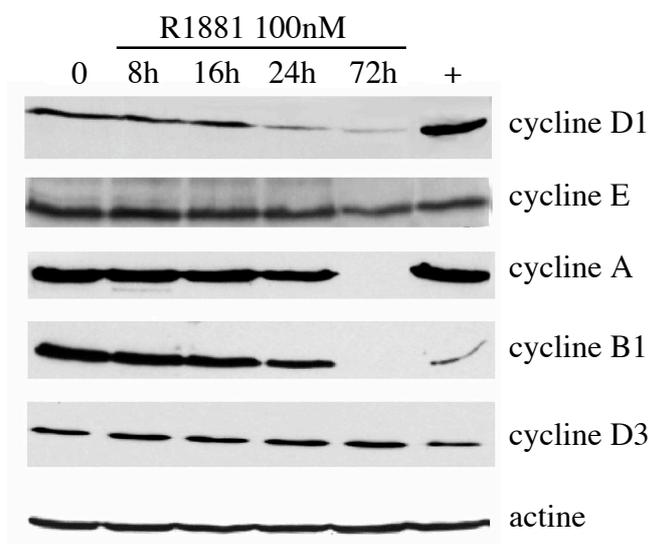


Figure 36 Régulation de l'expression des cyclines en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec 100nM de R1881, puis récoltées, et l'expression spécifique des protéines est analysée par Western Blot. + correspond au contrôle positif de chaque anticorps (voir Matériels et Méthodes).

Nous pouvons donc conclure que le R1881 (100nM) provoque une diminution d'expression des cyclines responsables du déroulement de la phase G1 et de la transition G1-S, mais aussi de celles impliquées dans le contrôle des phases S et G2-M. Seule la cycline D3 ne semble pas être régulée.

Notons enfin que ces régulations sont visibles dès 24h de traitement, et sont donc concomitantes à l'amorce de l'accumulation des cellules en phase G1.

VI.1-2 Régulation de l'expression des cdk

Les cdk sont des kinases dont l'activité enzymatique est nécessaire à la succession des étapes du cycle. Elles fonctionnent sous forme de complexe avec des cyclines spécifiques, qui jouent le rôle de sous-unités régulatrices.

La Figure 37 montre la régulation de 2 kinases essentielles—cdk2 fait partie des cdk essentielles à la transition G1-S, en partenariat avec les cyclines D, E et A, alors que cdc2 (ou cdk1) contrôle la phase G2-M, en association avec les cyclines A et B.

Nous constatons que le R1881 induit dès 16h de traitement une diminution du niveau de la protéine cdk2, qui s'amplifie dans le temps. La kinase cdc2 est elle aussi sous-réglée, mais de façon beaucoup plus tardive, puisque cette diminution n'est visible qu'à 72h de traitement.

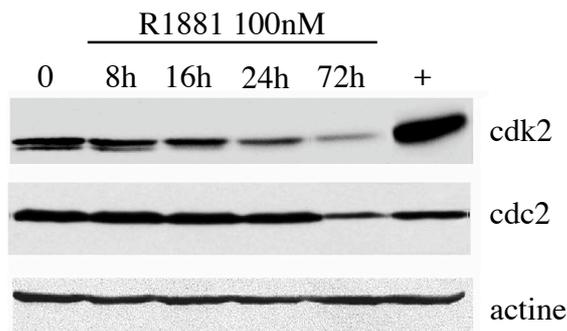


Figure 37 Régulation de l'expression des cdk en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec 100nM de R1881, puis récoltées, et l'expression spécifique des protéines est analysée par Western Blot. + correspond au contrôle positif de chaque anticorps (voir Matériels et Méthodes).

Ces données montrent donc que la protéine cdk2 est fortement sous-réglée par le R1881, selon le même profil cinétique que les cyclines. A l'inverse, la protéine cdc2, qui n'est pas impliquée dans la phase G1, n'est réglée que très tardivement, suggérant que cette diminution d'expression n'est pas causale dans l'initiation du blocage en phase G1.

VI.1-3 Régulation de l'expression des inhibiteurs des cdk

Indépendamment des niveaux d'expression des cdk ou des cyclines, l'activité enzymatique des cdk est aussi sous le contrôle d'inhibiteurs spécifiques (les CKI), codés par plusieurs familles de gènes, et dont le spectre de spécificité est plus ou moins large. Les plus connus et les plus larges en termes de spécificité sont les protéines p27 et p21, elles inhibent en particulier les activités kinase de cdk2 ou cdk4.

Comme le montre la Figure 38, le R1881 induit une forte augmentation du niveau de la protéine p27, et ce dès 16h de traitement. Cette augmentation se maintient durant toute la durée de l'expérimentation.

Concernant la protéine p21, nous constatons que son expression est réprimée en réponse au R1881, mais de façon plus tardive.

Ainsi, ces données montrent que le R1881 provoque une augmentation de l'expression de la protéine p27, et cet événement, d'un point de vue cinétique, précède les régulations des cdk et des cyclines déjà mentionnées.

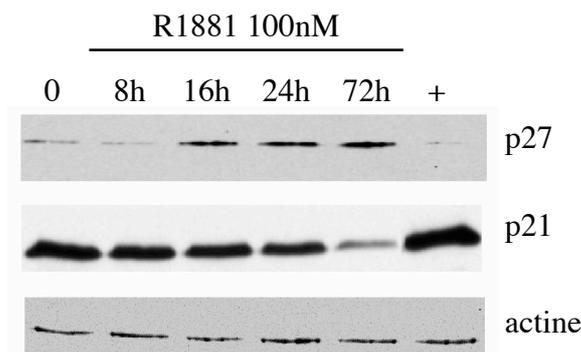


Figure 38 Régulation de l'expression des inhibiteurs de cdk p21 et p27 en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec 100nM de R1881, puis récoltées, et l'expression spécifique des protéines est analysée par Western Blot. + correspond au contrôle positif de chaque anticorps (voir Matériels et Méthodes).

L'ensemble de ces travaux portant sur la régulation des protéines de contrôle du cycle cellulaire nous a donc permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de différentes cyclines et cdk impliquées spécifiquement dans le contrôle de la transition G1-S la diminution de cdk2, des cyclines E, A et D1 est visible à partir de 24h de traitement, et accompagne donc l'accumulation des cellules en phase G1.

Précédant ces régulations, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de cdk p27, visible dès 16h de traitement. Cette régulation pourrait donc être une étape majeure dans les mécanismes aboutissant à l'arrêt prolifératif.

De plus, nous avons aussi montré une diminution des niveaux de la cycline B1 et de cdc2, qui sont plutôt impliquées dans la phase G2-M du cycle. Ces régulations sont un peu plus tardives, en particulier celle de cdc2, qui n'est visible qu'à 72h de traitement.

Enfin, nous avons montré que le R1881 induit une diminution du niveau de l'inhibiteur de cdk p21 cette baisse d'expression peut sembler surprenante au regard de son rôle d'inhibiteur des cdk. Cependant, il a été montré que p21 peut fonctionner autant comme inhibiteur de l'activité enzymatique des cdk que comme agent promoteur de cette activité selon sa stoechiométrie, p21 peut en effet favoriser l'association des complexes cdk-cyclines en phase G1, et augmenter ainsi leur activité (LaBaer et al., 1997). Des données suggèrent que ce mode d'action pourrait exister dans les cellules LNCaP (Knudsen et al., 1998). Une répression de p21 n'est donc pas contradictoire avec un blocage en phase G1, même si la cinétique de sa régulation suggère que p21 n'est pas essentiel dans l'initiation de l'arrêt en phase G1.

D'un point de vue mécanistique, nous pouvons proposer que l'augmentation du niveau de p27 et la diminution parallèle des niveaux de cdk et de cyclines pourraient donc aboutir à l'effondrement des activités kinase des cdk.

VI.1-4 Régulation de la phosphorylation de Rb

Pour vérifier que ces régulations ont effectivement un impact sur les activités kinase des cdk, nous avons étudié par Western Blot les variations du niveau de phosphorylation de la protéine Rb, qui est la cible principale des complexes cdk-cyclines pour diriger la transition G1-S : on sait en effet que l'augmentation des activités des cdk se traduit par une hyperphosphorylation de Rb, et cette étape est indispensable au passage des cellules dans la phase S.

Comme le montre la Figure 39, la phosphorylation de Rb s'effondre et devient indétectable après 24h de traitement avec 100nM de R1881. L'hypophosphorylation de Rb est donc consécutive à l'augmentation de p27 et à la diminution de l'expression des cdk et des cyclines contrôlant la transition G1-S. Ceci témoigne donc indirectement de la diminution des activités kinase des cdk.

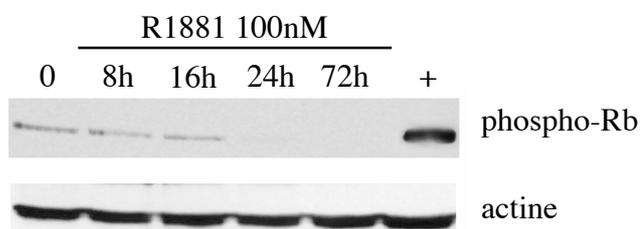


Figure 39 Régulation du niveau de phosphorylation de Rb en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec 100nM de R1881, puis récoltées, et l'expression spécifique des protéines est analysée par Western Blot. + correspond au contrôle positif de chaque anticorps (voir Matériels et Méthodes).

Pour conclure sur cette analyse des régulateurs du cycle, nous pouvons dire que de l'ensemble de ces données émerge un schéma très cohérent des mécanismes de l'arrêt en phase G1 des cellules LNCaP en réponse au R1881.

Dans un premier temps, l'expression de la protéine p27 est augmentée, ce qui contribuerait à l'inhibition de l'activité enzymatique des cdk. Par la suite, l'expression des cdk et des cyclines impliquées dans la transition G1-S s'effondre à son tour (cdk2, cyclines E, A et D1), ce qui contribue vraisemblablement à aggraver la diminution de l'activité kinase des cdk et aboutit donc, en 24h, à une baisse drastique de la phosphorylation de Rb. La synthèse des protéines nécessaires à la phase S du cycle devient impossible, et les cellules ne peuvent franchir le Point de Restriction G1-S. Après 48h de traitement, les cellules sont arrêtées en phase G1.

Parallèlement à cette accumulation progressive des cellules en G1 les régulateurs de la phase G2-M (cdc2, cycline B1), voient leur expression diminuer également.

VI.2 Régulation des médiateurs du cycle cellulaire par le R1881 au niveau de l'expression de leur ARNm.

Parallèlement à l'analyse de l'expression des protéines, nous avons cherché à déterminer si les niveaux des ARNm codant pour ces protéines sont également régulés. Notre objectif était alors d'identifier, parmi les régulateurs du cycle, un ou plusieurs gènes-cibles directs du R1881 et de l'AR. Pour cela, nous avons analysé les niveaux d'ARNm des régulateurs du cycle en utilisant la technique de RPA (Ribonucléase Protection Assay) en Multiplex. Cette méthode permet, en utilisant des kits commerciaux, d'analyser simultanément un grand nombre de gènes d'intérêt.

Nous avons montré par cette méthode (Fig.40A) que le traitement au R1881 à 100nM, induit une diminution du taux d'ARNm de *cdk2* à partir de 18h de traitement, et qui se poursuit pendant toute la durée de l'expérimentation (72h). Les kinases *cdk3* et *cdk4* ne voient pas leur taux d'ARNm modulé en réponse au traitement. En revanche, le taux d'ARNm de la kinase *cdc2* diminue sous l'effet du R1881, mais cette régulation n'apparaît qu'après 48h de traitement, et est donc très tardive par rapport à celle de *cdk2*.

Concernant les inhibiteurs de *cdk*, *p21*, *p27* et *p16*, leur niveau d'ARNm n'est absolument pas affecté par le traitement au R1881 100nM (Fig.40A). D'autres inhibiteurs de *cdk* (*p14*, *p15*, *p16*, *p18* et *p19*), analysés à l'aide d'autres kits non montrés ici, ne sont pas régulés par le R1881. Le niveau d'ARNm codant pour la protéine *Rb* n'est pas non plus affecté par le traitement au R1881 (non montré). Enfin, le R1881 ne modifie pas les taux d'ARNm des cyclines C, D1 et D3 (Fig.40B).

En revanche, le R1881, après 24 ou 48h de traitement, diminue fortement les niveaux d'ARNm des cyclines A et B (Fig.40B) et diminue légèrement le niveau d'ARNm de la cycline E après 24h de traitement (non montré).

Notons que le R1881 à 0,01nM n'a aucun effet sur les niveaux d'ARNm des différents gènes analysés.

Globalement ces données indiquent que le R1881 n'a pas d'effet majeur sur le niveau d'ARNm de la cycline D1, alors que l'expression de la protéine est diminuée. Il est possible que le contrôle de l'expression de ces cyclines se fasse plutôt au niveau (post-)traductionnel.

Il n'a pas non plus d'effet sur la transcription des inhibiteurs de *cdk*, qu'il s'agisse de *p21*, de *p27*, ou de ceux de la famille génique *INK4* (*p14*, *p15*, *p18* etc). Bien que la protéine *p27* soit induite rapidement après traitement au R1881, son absence de régulation au niveau ARNm suggère qu'elle n'est pas un gène-cible direct dont la transcription serait stimulée par l'AR.

En revanche, les niveaux d'ARNm des cyclines A et B et de *cdc2* sont diminués par le R1881, mais il s'agit d'un événement tardif qui semble plutôt consécutif à l'arrêt des cellules dans le cycle.

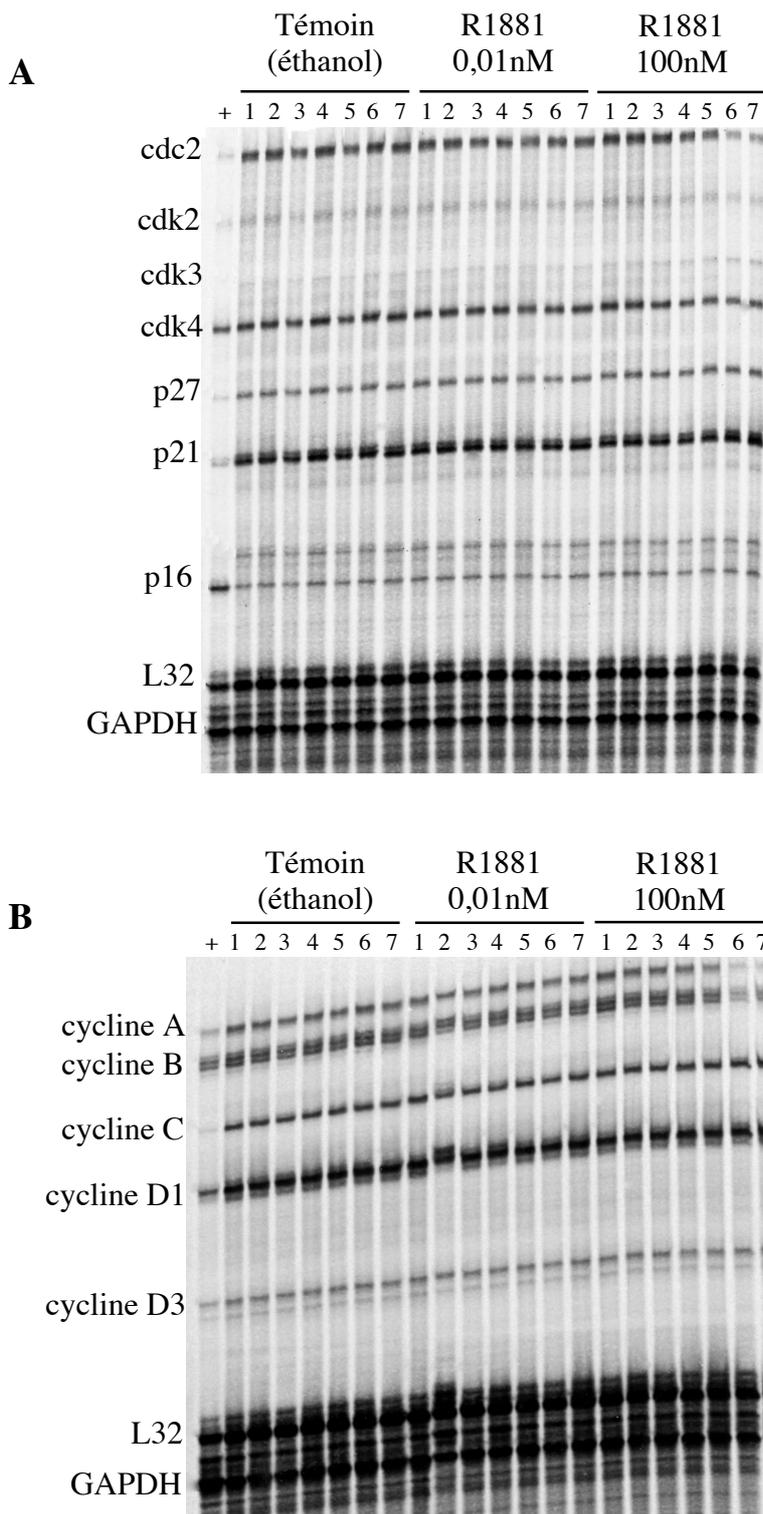


Figure 40 Régulation des niveaux d'ARNm des régulateurs du cycle cellulaire en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Après traitement des cellules, les ARN totaux sont récoltés, et les niveaux d'ARNm sont analysés par RPA à l'aide des kits hCC1 (A) et hCyc1 (B). + contrôle positif obtenu à partir d'ARN totaux de cellules HeLa. Pistes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 traitement de 4, 8, 12, 18, 24, 48 et 72h respectivement.

Enfin, parmi les médiateurs du contrôle de la phase G1, seuls cdk2 et dans une moindre mesure la cycline E sont régulés au niveau de l'ARNm par le R1881, et ces diminutions précèdent dans le temps la diminution du niveau des protéines. Cependant, cdk2 et la cycline E ne sont sous-régulés qu'à partir de 18h-24h de traitement, et cette cinétique semble trop lente pour que l'on puisse objectivement considérer cdk2 ou la cycline E comme des gènes-cibles potentiels de l'AR et du R1881. En effet, l'AR est un Facteur de Transcription, et généralement, son effet transcriptionnel sur un gène-cible est beaucoup plus rapide à titre d'exemple nous avons observé (voir Fig.43), ainsi que d'autres groupes (Wolf et al., 1992b) que le PSA, qui est un exemple typique de gène-cible de l'AR, est régulé transcriptionnellement après seulement 2-4 heures de traitement au R1881 100nM, ce qui est donc beaucoup plus rapide que la régulation de cdk2 ou de la cycline E observée ici.

Puisqu'aucun des médiateurs du contrôle du cycle cellulaire ne semble régulé transcriptionnellement et de façon précoce par le R1881, nous pouvons donc conclure que cette recherche d'un gène-cible de l'AR dans notre système n'a pas été très fructueuse, même si elle ne remet pas en question les analyses de la régulation des protéines.

Cette étude de la régulation des facteurs contrôlant le cycle cellulaire nous a permis au contraire de mettre en évidence les protéines responsables du blocage en G1, ainsi que leur mode de régulation, et l'enchaînement temporel de ces événements forme un schéma tout à fait cohérent. Mais il s'agit des médiateurs finaux de la cascade de signalisation entre le R1881, l'AR et le blocage en phase G1, et nous n'avons pas identifié le ou les intermédiaires, qui seraient directement régulés par l'AR, et qui induiraient en retour la régulation des effecteurs terminaux du contrôle du cycle.

VII. Régulation du niveau d'ARNm du TGF- β 1 par le R1881

Le TGF- β 1 est le principal facteur de croissance inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales prostatiques (Culig et al., 1996), et une étude a montré dans les cellules LNCaP en milieu DCC-SVF que l'effet biphasique est médié par l'induction du TGF- β 1 en réponse à la DHT (Kim et al., 1996) à partir de 10nM de DHT, l'expression du TGF- β 1 serait telle que son effet anti-prolifératif l'emporterait sur les signaux prolifératifs induits par la DHT, et ceci provoquerait le ralentissement de croissance observé aux fortes concentrations d'hormone. En empêchant l'action du TGF- β 1 sur son récepteur, les auteurs ont montré que l'effet biphasique de la DHT est aboli et fait place à un profil dose-dépendant de stimulation de la croissance.

Nous avons donc voulu déterminer si dans notre système, l'inhibition de croissance peut aussi être médiée par l'induction de l'expression du TGF- β 1 comme ces auteurs l'ont suggéré.

Le manque d'un anticorps suffisamment spécifique ne nous a pas permis de déterminer si le niveau de la protéine est ou non régulé par le R1881. En revanche, l'utilisation de la technique de RPA nous a permis d'analyser le niveau d'ARNm en réponse au R1881 or, comme le montre la Figure 41, nous n'avons pas détecté la présence du TGF- β 1 dans nos cellules, ni mis en évidence une augmentation sous l'effet du traitement.

La technique de RPA est pourtant très sensible et très spécifique, et le contrôle positif atteste de sa fiabilité. Il semblerait donc que le traitement au R1881 ne provoque pas l'augmentation de l'expression du TGF- β 1 dans notre système.

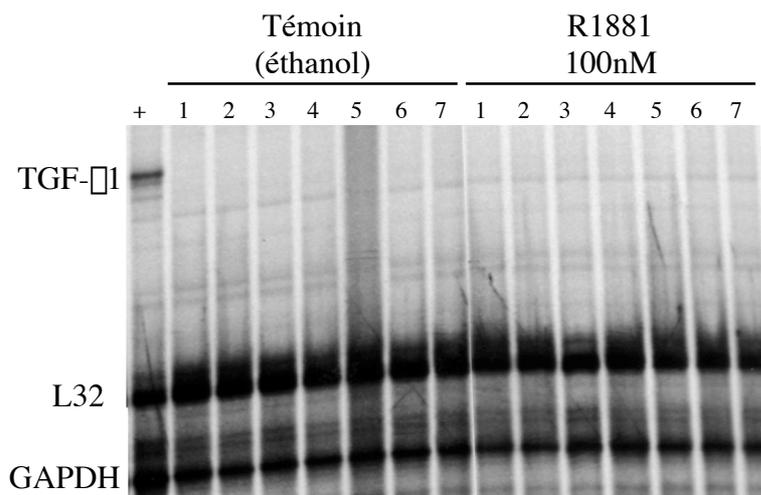


Figure 41 Régulation du niveau d'ARNm du TGF-β1 en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Après traitement des cellules, les ARN totaux sont récoltés, et les niveaux d'ARNm sont analysés par RPA à l'aide du kit hCK3. + contrôle positif obtenu à partir d'ARN totaux de cellules HeLa. Pistes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 traitement de 4, 8, 12, 18, 24, 48 et 72h respectivement.

Nos données vont donc à l'encontre des travaux de Kim et al. (Kim et al., 1996), et ne permettent pas d'affirmer que le TGF-β1 soit un médiateur de l'effet anti-prolifératif du R1881.

VIII. Effets du R1881 sur l'expression du proto-oncogène c-myc

Face à l'absence de gène-cible du R1881 clairement identifié dans notre système, nous avons émis l'hypothèse que le proto-oncogène c-myc pourrait être un bon candidat comme gène régulé précocément par les androgènes, et médiateur (au moins partiel) du blocage en phase G1.

En effet, de nombreuses études ont démontré que c-myc a un rôle prépondérant dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la mort cellulaires (Obaya et al., 1999; Sears & Nevins, 2002). Dans des systèmes cellulaires différents, une répression de l'expression de c-myc est associée à un arrêt prolifératif (Dimberg et al., 2002; Kokontis et al., 1994; Melkoumian et al., 2002), mais que la répression de c-myc soit une cause ou une conséquence du blocage en phase G1 demeure incertain. Enfin, différents auteurs ont également suggéré que c-myc pourrait être un gène-cible des androgènes (Bieche et al., 2001; Wolf et al., 1991).

Nous avons donc dans un premier temps étudié son expression suite au traitement des cellules LNCaP par le R1881.

VIII.1 Régulation de c-myc par le R1881 dans les cellules LNCaP

VIII.1-1 Au niveau de la protéine

Il apparaît que le traitement au R1881 à 100nM s'accompagne d'une très forte inhibition de l'expression de la protéine c-myc (Fig.42A) qui devient indétectable après 72h d'incubation.

Il est encore plus intéressant de constater que cette répression est visible dès 4h de traitement de toutes les protéines étudiées jusqu'alors, c-myc est donc celle qui est régulée le plus précocément.

Notons sur la Figure 42A que l'anticorps utilisé révèle en fait 2 bandes très proches il s'agit en fait des isoformes p64 et p67 de c-myc, issus de l'initiation de la traduction à partir de 2 codons possibles. Conformément à ce qui a été décrit dans d'autres systèmes (Hann & Eisenman, 1984), p64 est quantitativement majoritaire dans nos cellules, et nous nous focaliserons désormais sur cette forme.

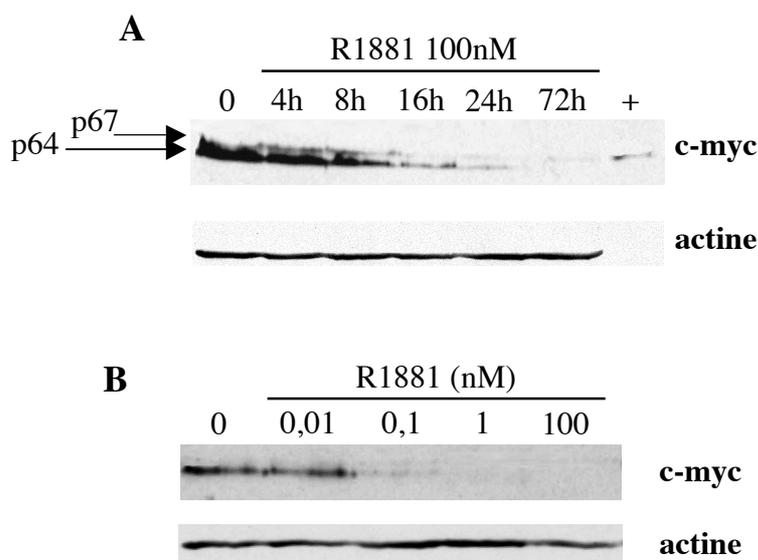


Figure 42 Régulation du niveau d'expression de la protéine c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec le R1881 puis récoltées, et l'expression spécifique des protéines est analysée par Western Blot. **A** étude cinétique de la régulation de c-myc sous l'effet de 100nM de R1881. **B** étude effet-dose de la réponse au R1881 après 48h de traitement. + correspond au contrôle positif de l'anticorps (voir Matériels et Méthodes).

L'analyse de l'effet-dose du R1881 sur l'expression de c-myc montre par ailleurs que le niveau de la protéine est diminué sous l'effet de 0,1nM de R1881, mais ne devient indétectable qu'à partir de 1nM (Fig.42B). Il existerait donc une forte corrélation entre l'effet-dose de la régulation de c-myc et celui du blocage en phase G1 en d'autres termes, à 0,1nM de R1881, l'accumulation des cellules en phase G1 et la répression de c-myc sont partiels, tandis que à partir de 1nM, le blocage en phase G1 est maximum et c-myc est indétectable.

Ceci suggère donc une relation étroite entre le niveau d'expression de la protéine c-myc et l'état des cellules dans le cycle cellulaire.

D'un point de vue cinétique cette corrélation existe aussi, puisque la «disparition» de c-myc précède l'accumulation des cellules LNCaP dans la phase G1.

VIII.1-2 Au niveau de l'ARNm

Pour déterminer si c-myc est régulé au niveau transcriptionnel par le R1881, nous avons analysé les variations du niveau d'ARNm en réponse au R1881, par la méthode de RT-PCR. En parallèle, nous avons étudié l'expression d'un gène-cible typique des androgènes, le PSA.

Comme dans les RPA, nous avons utilisé comme gène contrôle le L32, attestant de l'égalité des quantités de matériel.

La Figure 43 montre que le niveau d'ARNm de c-myc est diminué à partir de 4h de traitement avec 100nM de R1881, et la diminution se poursuit jusqu'à 72h de traitement. En présence d'éthanol (solvant) ou de R1881 à 0,01nM, le niveau d'ARNm de c-myc n'est pas affecté tout au long de l'étude cinétique.

Comme attendu, le R1881 à 100nM stimule dès 4h de traitement l'expression de l'ARNm du PSA.

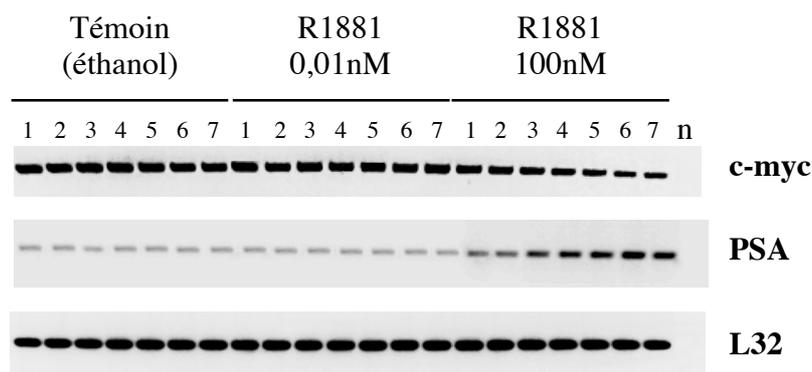


Figure 43 Régulation du niveau d'ARNm de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Après traitement des cellules, les ARN totaux sont récoltés, et les niveaux d'ARNm sont analysés par RT-PCR. n contrôle négatif de la réaction de PCR. Pistes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 traitement de 4, 8, 12, 18, 24, 48 et 72h respectivement.

Ainsi, ces données sur les niveaux d'ARNm et de protéine de c-myc indiquent clairement que le R1881 à 100nM sous-régule très rapidement l'expression de ce proto-oncogène dans les cellules LNCaP, tout comme il régule très rapidement la transcription du PSA.

La diminution des niveaux d'ARNm et de protéine est visible après 4h de traitement étant donnée la très courte demi-vie de la protéine c-myc (20 à 30 minutes (Luscher & Eisenman, 1990)), il est logique qu'il n'y ait pas un plus grand décalage de temps entre la diminution de l'ARNm et celle, consécutive, de la protéine.

Au regard de ces résultats, c-myc semble donc pouvoir être considéré comme un gène-cible potentiel du R1881 dans notre système, et pourrait avoir un rôle majeur dans l'initiation du blocage des cellules en phase G1.

Nous avons donc entrepris d'approfondir le mode de régulation de l'expression de c-myc par le R1881. La première étape consiste à déterminer si l'AR est nécessaire à cette régulation, tout comme il est nécessaire au blocage en phase G1.

VIII.2 Influence de l'AR sur l'expression de c-myc en réponse au R1881

Nous avons montré précédemment que le R1881 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules PC-3 et DU-145, qui n'expriment pas l'AR. A l'inverse, la sur-expression de l'AR dans la lignée LNCaP-FAR se traduit par une plus grande sensibilité de ces cellules à l'effet anti-prolifératif du R1881. Enfin, un anti-androgène peut antagoniser, au moins partiellement, l'effet anti-prolifératif du R1881. Nous avons donc analysé l'expression de c-myc en réponse au R1881 en utilisant ces 3 approches.

VIII.2-1 Régulation de c-myc en réponse au R1881 dans des lignées androgéno-indépendantes

Conformément aux travaux réalisés sur le cycle cellulaire, l'expression de la protéine c-myc dans les cellules PC-3 et DU-145 n'est pas influencée par le traitement au R1881 (100nM) sur toute la durée de l'expérimentation (Fig. 44).

En absence de l'AR, le R1881 n'a donc aucune influence sur l'expression de c-myc.

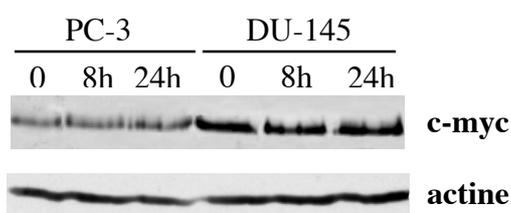


Figure 44 □ Régulation du niveau d'expression de la protéine c-myc en réponse au R1881 dans les lignées PC-3 et DU-145.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec 100nM de R1881, puis récoltées, et l'expression spécifique des protéines est analysée par Western Blot.

VIII.2-2 Régulation de c-myc en réponse au R1881 dans la lignée LNCaP-FAR

A l'inverse, l'expression de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR est réprimée fortement après le traitement au R1881. Le niveau d'ARNm de c-myc chute fortement après seulement 2h de traitement au R1881 100nM dans cette lignée (Fig.45A), et cette diminution s'aggrave au cours du temps.

L'analyse effet-dose (Fig.45B) montre que le niveau de la protéine c-myc diminue fortement en présence de 0,1nM de R1881, et devient indétectable aux doses supérieures.

De plus, si on compare l'amplitude de la répression entre les cellules LNCaP et LNCaP-FAR, on constate que la différence d'expression entre les cellules témoin (0 nM non traitées) et les cellules après 8h de traitement est nettement plus marquée dans les cellules LNCaP-FAR que dans les cellules LNCaP (Fig.45C).

En outre, l'analyse de la régulation de l'ARNm de c-myc montre que la répression est visible dès 2h de traitement avec le R1881 à 100nM dans la lignée LNCaP-FAR (Fig.45A), ce qui n'était pas le cas dans la lignée LNCaP (non montré). Ceci confirme donc que la répression de c-myc en réponse au R1881 est exacerbée lorsque l'AR est sur-exprimé, tout comme le blocage des cellules dans le cycle cellulaire.

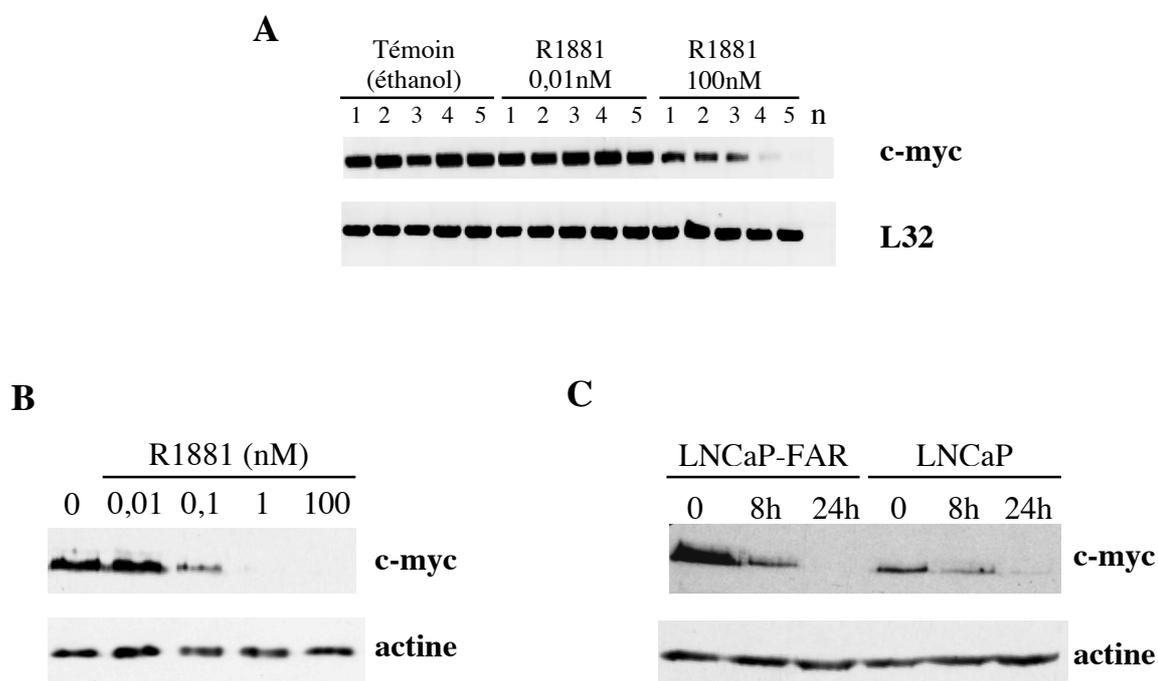


Figure 45 Régulation du niveau d'expression de c-myc en réponse au R1881 dans la lignée LNCaP-FAR en milieu 10% SVF.

A Les cellules LNCaP-FAR sont traitées au R1881 puis l'expression des ARNm est analysée par RT-PCR. n contrôle négatif de la réaction de PCR. Pistes 1, 2, 3, 4, 5 traitement de 2, 4, 8, 24 et 72h respectivement. **B** Les cellules LNCaP-FAR sont traitées avec des doses croissantes de R1881 pendant 48h, puis l'expression de c-myc est analysée par Western Blot. **C** Les cellules LNCaP et LNCaP-FAR sont traitées avec 100nM de R1881 et l'expression de c-myc est analysée par Western Blot.

L'ensemble de ces données indique donc que la diminution de l'expression de c-myc est plus marquée lorsque l'AR est sur-exprimé, et l'absence de réponse dans les cellules PC-3 et DU-145 indique que l'AR est impliqué dans cette régulation.

VIII.2-3 Effets des antagonistes de l'AR sur la répression de c-myc en réponse au R1881

Finalement, pour confirmer que l'AR est impliqué dans la répression de c-myc, nous avons testé la capacité des antagonistes de l'AR à antagoniser l'effet du R1881 sur l'expression de c-myc. Nous avons pour cela analysé le niveau d'ARNm de c-myc sous l'effet du R1881 à 1nM, en présence ou en absence de Bicalutamide ou de CPA.

Comme le montre la Figure 46, le Bicalutamide à 1 μ M antagonise partiellement la répression de c-myc induite par le R1881 à 1nM, alors que le CPA à 1 μ M antagonise totalement l'effet du R1881. En revanche, ni le Bicalutamide ni le CPA ne régulent significativement le niveau d'ARNm de c-myc en absence de R1881.

Nous retrouvons ici parfaitement l'effet des antagonistes sur la prolifération des cellules LNCaP, et cela apporte une preuve supplémentaire de l'implication de l'AR dans la répression de c-myc.

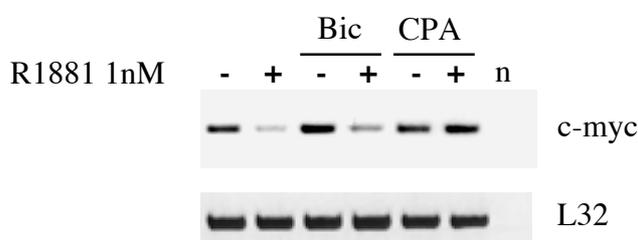


Figure 46 Effets des antagonistes de l'AR sur l'expression de l'ARNm de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées avec ou sans R1881 à 1nM, en absence ou en présence de Bicalutamide (Bic) à 1 μ M ou d'Acétate de Cyprotérone (CPA) à 1 μ M pendant 48h. Les niveaux d'ARNm sont analysés par RT-PCR. n = contrôle négatif de la PCR.

Ainsi, nous pouvons conclure qu'il existe une grande corrélation entre le blocage en phase G1 et la répression de l'expression de c-myc en réponse au R1881. L'AR joue un rôle central dans les 2 événements, et la baisse d'expression de c-myc, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine, est très précoce et précède la régulation des autres médiateurs du contrôle du cycle.

Au regard de ces données, il nous est apparu indispensable d'analyser le mode de régulation de l'expression de c-myc par l'AR et le R1881.

IX. Mécanismes de la régulation négative de l'expression de c-myc par le R1881

De nombreux travaux se sont intéressés à la régulation de l'expression de c-myc dans différents contextes cellulaires et de signalisation. La quantité d'ARNm de c-myc est contrôlée à différents niveaux soit directement à l'initiation de la transcription (Siebenlist et al., 1988), soit par un blocage de l'élongation du transcrite (Bentley & Groudine, 1986), soit

par une dégradation ou au contraire une stabilisation de l'ARNm ou de la protéine (Dani et al., 1984; Eick, 1990).

Dans les cellules LNCaP, il a été montré que la sous-régulation de c-myc par le mibolérone (androgène synthétique) se produit au niveau de l'initiation de la transcription (Wolf et al., 1992a). Cependant, à ce jour, aucun Elément de Réponse à l'AR (ARE) n'a été identifié dans le promoteur du gène codant pour c-myc.

Nous avons donc voulu déterminer si dans notre système, le R1881 agit au niveau de l'initiation de la transcription du gène c-myc.

IX.1 Activité du promoteur de c-myc

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si le traitement des cellules LNCaP par le R1881 induit une variation de l'activité du promoteur de c-myc, à l'aide d'un gène rapporteur, transfecté de façon transitoire dans ces cellules.

Nous avons utilisé le plasmide Del-1 (He et al., 1998) constitué du gène de la Luciférase placé sous le contrôle du promoteur de c-myc (2,5kb en 5' du promoteur P2 de c-myc). En parallèle, nous avons testé 3 autres constructions (Del-2, 3 et 4), obtenues par des délétions successives du promoteur de c-myc à partir de Del-1 (voir Annexe IV). Comme contrôle, nous avons utilisé le vecteur vide pBV-Luc exempt du promoteur de c-myc. Ces plasmides sont transfectés dans les cellules LNCaP de façon transitoire par la méthode du JetPEI, puis les cellules sont traitées au R1881 (100nM) et l'expression de la Luciférase est ensuite mesurée.

Comme le montre la Figure 47, le R1881 à 100nM n'a aucun effet significatif sur l'activité du promoteur entier de c-myc (Del-1). Les promoteurs plus ou moins délétés (Del-2 à 4) ont une activité basale diminuée d'environ 50% par rapport à Del-1, suggérant l'élimination de zones régulatrices, mais l'addition de R1881 reste sans effet sur leur activité.

Un autre système de constructions similaires a été testé, il s'agit des plasmides rapporteurs HBM-Luc et XMN-Luc, contenant respectivement le promoteur entier de c-myc (2,5kb) et une version tronquée placés en amont de la Luciférase (Facchini et al., 1997). Comme pour les constructions précédentes, la zone promotrice insérée ne va pas au-delà du promoteur P2 de c-myc. La transfection transitoire de ces plasmides rapporteurs dans les cellules LNCaP n'a pas permis non plus de mettre en évidence un effet répresseur du R1881 (non montré).

Enfin, puisque la réponse des cellules LNCaP-FAR à l'effet répresseur du R1881 est plus forte que dans les cellules LNCaP, nous avons voulu mesurer la réponse de ces plasmides rapporteurs dans la lignée LNCaP-FAR. Malheureusement, bien que nous ayons testé différentes méthodes, nous n'avons jamais réussi à transfecter de façon transitoire cette lignée.

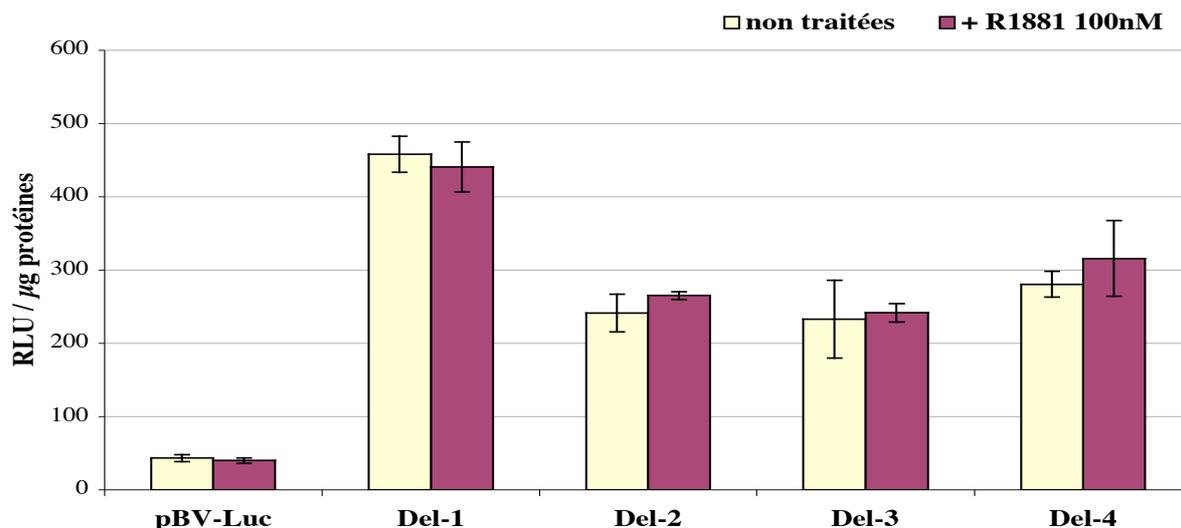


Figure 47 □ Activité du promoteur de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.

Les cellules sont transfectées de façon transitoire avec les plasmides rapporteurs pBV-Luc, Del-1, Del-2, Del-3 ou Del-4 (2µg/puits) puis traitées pendant 24h avec 100nM de R1881. Les activités Luciférase sont mesurées (RLU) et rapportées à la quantité de protéines totales dans chaque lysat.

Le résultat de cette étude ne confirme donc pas les données obtenues à partir des RT-PCR ou des Western Blot. Cependant, il s'agit là d'une méthode basée sur un promoteur exogène, et hors de son contexte chromosomique □ on peut donc penser qu'il peut exister des facteurs nucléaires nécessaires à la répression du promoteur et qui se trouvent, du fait de la transfection, en quantité déficitaire par rapport à l'excès de promoteur introduit. Nous avons bien sûr testé différentes quantités de plasmide rapporteur, afin de minimiser le déséquilibre entre plasmide introduit et facteurs endogènes, mais cela n'a pas permis d'observer une réponse de l'activité du promoteur. Cependant si la quantité de plasmide transfecté est trop faible, il est impossible d'obtenir une activité Luciférase basale qui soit mesurable, car ce plasmide est connu pour avoir une activité basale faible. Or, pour mesurer une répression de l'activité du promoteur, il faut par définition partir d'une activité de base conséquente, sans quoi le signal est perdu dans le bruit de fond et aucune répression ne peut être observée. Par ailleurs, le promoteur endogène de c-myc comporte des séquences régulatrices qui peuvent être absentes des constructions utilisées ici, notamment le premier intron, qui contient des régions régulatrices connues pour avoir un effet inhibiteur sur la transcription (Bentley & Groudine, 1986; Bentley & Groudine, 1988; Lavenu et al., 1994). Des différences de localisation cytoplasmique/nucléaire entre l'AR, le plasmide et les facteurs endogènes, ainsi qu'une structure chromatinienne du promoteur transfecté différente de celle du promoteur dans son contexte chromosomique sont aussi des biais expérimentaux possibles. Ces différents paramètres peuvent expliquer l'absence de réponse observée ici, et ne sauraient remettre en question la régulation du c-myc endogène mise en évidence par les Western Blot et les RT-PCR.

IX.2 Acétylation des Histones H3 du promoteur de c-myc

On sait que la transcription d'un gène donné dépend de la structure chromatinienne et notamment du niveau d'acétylation des histones. L'hyper-acétylation des histones ouvre la chromatine dans un état propice à la transcription, alors que la déacétylation des histones induit une configuration « fermée » destabilisant la machinerie transcriptionnelle.

Pour déterminer si le R1881 réprime l'expression de c-myc au niveau de l'initiation de la transcription, nous avons donc analysé le niveau d'acétylation des histones sur le promoteur endogène de c-myc en réponse au R1881. Pour cela, nous avons utilisé la technique de ChIP (Immunoprécipitation de la Chromatine), qui permet d'étudier *in vivo* le niveau d'une protéine donnée sur une région spécifique de l'ADN. Dans le cas présent, nous avons étudié le niveau des histones H3 acétylées, à l'aide d'un anticorps spécifique, sur le promoteur de c-myc. Pour vérifier que les variations observées sont bien spécifiques du promoteur de c-myc, nous avons analysé en parallèle le niveau d'acétylation des histones H3 sur le promoteur du gène contrôle L32.

La région du promoteur de c-myc amplifiée par PCR est représentée dans la Figure 48A, et elle a été utilisée pour toutes les analyses de ChIP présentées dans cette section.

Comme le montre la Figure 48B, le traitement au R1881 (100nM) induit une diminution de l'acétylation des histones H3 du promoteur de c-myc après 90min de traitement dans les cellules LNCaP.

Les inputs ont un niveau constant, ce qui indique que la quantité de chromatine sur laquelle chaque immunoprécipitation a été réalisée est identique d'un échantillon à l'autre. L'absence de signal dans le contrôle d'IP « sans anticorps » témoigne du bruit de fond, et indique donc qu'il n'y a pas de chromatine aspécifique détectable.

En outre, la déacétylation des histones est bien spécifique du promoteur de c-myc puisque aucune variation du niveau d'acétylation n'est observée sur le promoteur du L32, qui est transcrit de façon constitutive.

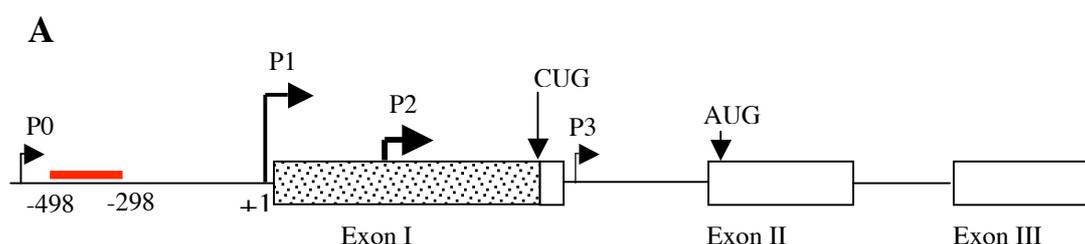
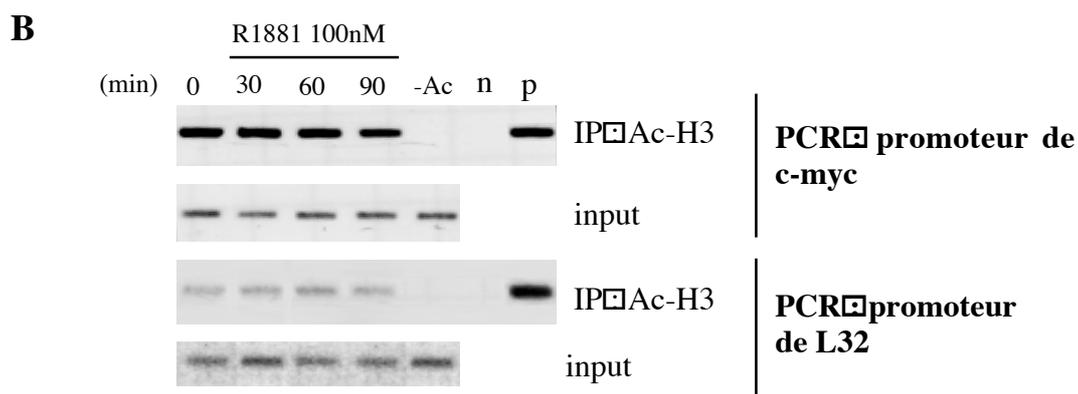


Figure 48 Effets du R1881 sur l'acétylation des histones H3 du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP.

A schéma du promoteur de c-myc indiquant la position du fragment de PCR (en rouge) amplifié pour l'ensemble des analyses ChIP. **B** les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées pendant des durées croissantes avec 100nM de R1881, puis le niveau d'acétylation des histones H3 sur le promoteur de c-myc ou du L32 est analysé par la technique de ChIP. -Ac contrôle d'une IP effectuée sans anticorps n contrôle négatif de la PCR p contrôle positif de PCR.



La déacétylation observée sur le promoteur de c-myc est cependant assez discrète, et pour confirmer plus objectivement ce phénomène, nous avons analysé le niveau d'acétylation des histones du promoteur de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP-FAR, en partant du constat antérieur que cette lignée est plus sensible à l'effet du R1881. Effectivement, nous constatons dans ces cellules une déacétylation plus nette des histones du promoteur de c-myc en réponse au R1881 à 100nM (Fig. 49).

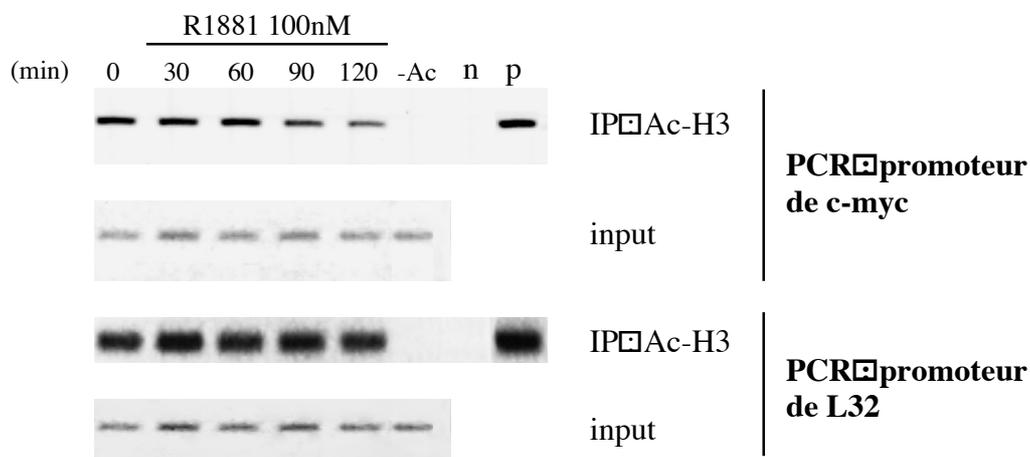


Figure 49 Effets du R1881 sur l'acétylation des histones H3 du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées pendant des durées croissantes avec 100nM de R1881, puis le niveau d'acétylation des histones H3 sur le promoteur de c-myc ou du L32 est analysé par la technique de ChIP. -Ac contrôle d'une IP effectuée sans anticorps, n contrôle négatif de la PCR, p contrôle positif de PCR.

Ces analyses nous permettent donc de conclure que le R1881 et l'AR répriment l'expression de c-myc en induisant la déacétylation des histones du promoteur du gène, ce qui accrédite l'idée d'un contrôle au niveau de l'initiation de la transcription.

IX.3 Recrutement des Histones Déacétylases au niveau du promoteur de c-myc

Le niveau d'acétylation des histones d'un promoteur donné résulte de l'équilibre entre 2 activités enzymatiques opposées—les Histones Acétyl-Transférases (HAT) d'une part, et les Histones Déacétylases (HDAC) d'autre part. La prédominance d'une des 2 activités confère à la chromatine un niveau donné d'acétylation qui favorise ou empêche la transcription du gène.

Pour déterminer si la déacétylation du promoteur de c-myc résulte d'un recrutement accru de HDAC, nous avons étudié, par ChIP, la présence de HDAC-1 sur le promoteur de c-myc en réponse au R1881. La lignée LNCaP-FAR étant plus sensible au R1881, nous avons effectué l'analyse sur cette lignée uniquement.

Comme le montre la Figure 50, le R1881 (100nM) induit une forte augmentation du recrutement de HDAC-1 sur le promoteur de c-myc. L'effet est déjà important après seulement 60min de traitement—le recrutement de HDAC-1 sur le promoteur de c-myc précède donc la diminution de l'acétylation des histones. Ce phénomène est spécifique de c-myc puisque aucune variation n'est visible sur le promoteur du gène codant pour L32.

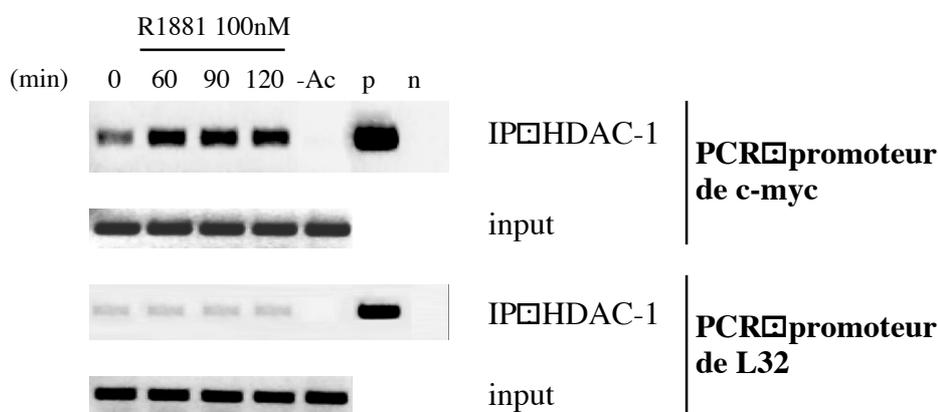


Figure 50—Effets du R1881 sur le recrutement de HDAC-1 au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées pendant des durées croissantes avec 100nM de R1881, puis le recrutement de HDAC-1 sur le promoteur de c-myc ou du L32 est analysé par la technique de ChIP. -Ac—contrôle d'une IP effectuée sans anticorps—n—contrôle négatif de la PCR—p—contrôle positif de PCR.

Nous avons également testé le recrutement de HDAC-2, mais les résultats indiquent que le R1881 n'a pas d'effet significatif sur le recrutement de cette protéine au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR (non montré).

Nous pouvons donc conclure que le R1881 provoque une augmentation du recrutement spécifique de HDAC-1 sur le promoteur de c-myc, et cet événement précède la déacétylation des histones H3.

IX.4 Effets de la TSA sur l'acétylation du promoteur de c-myc en réponse au R1881

Afin de vérifier que l'activité enzymatique des HDAC est effectivement responsable de la déacétylation des histones du promoteur de c-myc, nous avons analysé ce niveau d'acétylation lorsque les cellules LNCaP-FAR sont traitées avec du R1881 et un inhibiteur des HDAC.

L'inhibiteur utilisé dans cette étude est la Trichostatine A (TSA), l'un des plus puissants inhibiteurs de HDAC connus (Vigushin & Coombes, 2004), puisqu'elle est efficace à des doses de l'ordre du nM. La TSA n'est pas un inhibiteur spécifique d'une isoforme particulière de HDAC.

A une concentration de 10nM, la TSA est effectivement capable d'abolir la déacétylation des histones H3 du promoteur de c-myc induite par le R1881 (Fig.51), après 90 ou 120min de traitement. Une étude effet-dose (non montré) n'a pas révélé d'effet inhibiteur lorsque la TSA est utilisée à 1nM.

L'activité enzymatique des HDAC recrutées sur le promoteur de c-myc est donc responsable de la déacétylation des histones H3.

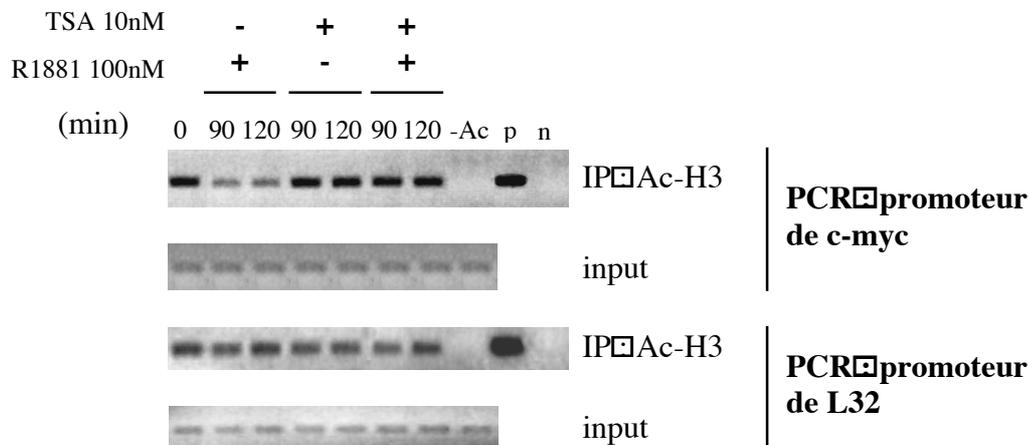


Figure 51 Effets de la TSA sur la déacétylation des histones H3 du promoteur de c-myc induite par le R1881 dans les cellules LNCaP-FAR.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées pendant des durées croissantes avec 100nM de R1881, en absence ou en présence de 10nM de TSA, puis l'acétylation des histones H3 du promoteur de c-myc ou du L32 est analysé par la technique de ChIP. -Ac contrôle d'une IP effectuée sans anticorps n contrôle négatif de la PCR p contrôle positif de PCR.

La question se pose maintenant de savoir si la déacétylation des histones du promoteur de c-myc est responsable de la répression de la transcription du gène. Pour répondre à cette question, nous avons examiné dans les cellules LNCaP-FAR le niveau d'ARNm de c-myc en réponse à un traitement associant le R1881 (100nM) et la TSA (10nM), c'est-à-dire dans des conditions où l'effet du R1881 sur l'acétylation du promoteur de c-myc est aboli.

Dans ces conditions, nous constatons que la TSA à 10nM, seule, induit une diminution du niveau d'ARNm de c-myc après 90min de traitement des cellules LNCaP-FAR, mais cette diminution est moins forte que sous l'effet du R1881 seul (Fig.52). Lorsque les 2 sont combinés, la quantité d'ARNm de c-myc diminue également, et atteint un niveau identique à celui observé en présence de la TSA seule. Ceci suggère donc que la TSA, bien qu'elle ait elle-même un effet répresseur, permet d'empêcher, au moins partiellement, la forte diminution induite par le R1881.

Cependant, puisque la TSA inhibe totalement la déacétylation induite par le R1881, il semble donc que le maintien d'un niveau d'acétylation «normal» ne suffise pas à abolir totalement l'effet du R1881 sur la transcription du gène c-myc.

Pour expliquer ce manque d'effet de la TSA, nous pouvons suggérer que le traitement au R1881 induit d'autres perturbations de la machinerie transcriptionnelle, qui se produisent indépendamment du niveau d'acétylation des histones. On peut envisager que l'AR lié au R1881 induise des modifications de la structure ou de l'organisation tridimensionnelle du promoteur, conduisant au recrutement ou au contraire au désengagement d'autres facteurs impliqués dans la régulation de la transcription, et même si la TSA inhibe les HDAC et abolit la déacétylation des histones, ces perturbations ont lieu malgré tout, et la transcription est réprimée.

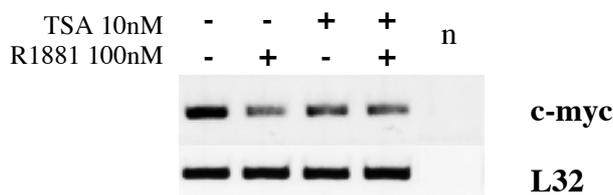


Figure 52 Effets de la TSA sur la répression de l'expression de l'ARNm de c-myc induite par le R1881 dans les cellules LNCaP-FAR.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées pendant 90min avec ou sans 100nM de R1881, en absence ou en présence de 10nM de TSA, puis l'expression de l'ARNm de c-myc ou de L32 est analysé par RT-PCR. n contrôle négatif de la PCR.

Il est surprenant que la TSA, lorsqu'elle est administrée seule, ait un effet répresseur sur l'ARNm de c-myc, car rappelons qu'elle n'avait aucun effet sur le niveau d'acétylation des histones du promoteur. Cependant, un agent aussi puissant entraîne vraisemblablement des désordres profonds dans l'organisation de la chromatine d'un gène, et dans la physiologie d'une cellule. La TSA est connue pour être très toxique, et bien que nous n'ayons observé aucune manifestation de cytotoxicité dans les cellules LNCaP-FAR, même après un traitement plus long, il est possible que la biologie de la cellule ait été affectée, et la diminution de l'ARNm de c-myc peut être une conséquence de ces désordres cellulaires.

Pour limiter ce genre d'effets secondaires, nous avons testé un autre inhibiteur de HDAC, le MS-275 (ou Mitsui), qui est moins puissant et moins toxique, mais nous n'avons jamais

observé d'effet probant de ce composé en termes d'inhibition de la déacétylation des histones (par CHIP) dans nos cellules, même en travaillant à des doses de l'ordre du μM (non montré).

IX.5 Recrutement de la RNA Polymérase II au niveau du promoteur de c-myc

Nous avons ensuite voulu déterminer si le traitement au R1881 induit d'autres modifications du recrutement de protéines sur le promoteur de c-myc, qui pourraient contribuer au blocage de la transcription indépendamment du niveau d'acétylation des histones. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la RNA Polymérase II, l'enzyme responsable de la synthèse du transcrit, et nous avons analysé les variations de son recrutement sur le promoteur de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP-FAR, par la technique de ChIP.

Comme le montre la Figure 53, le traitement au R1881 à 100nM provoque le dégagement de la RNA Polymérase II du promoteur de c-myc, et ce après seulement 60min de traitement. Le gène L32, puisqu'il est exprimé de façon constitutive, présente un niveau constant de RNA Polymérase II sur son promoteur tout au long du traitement au R1881.

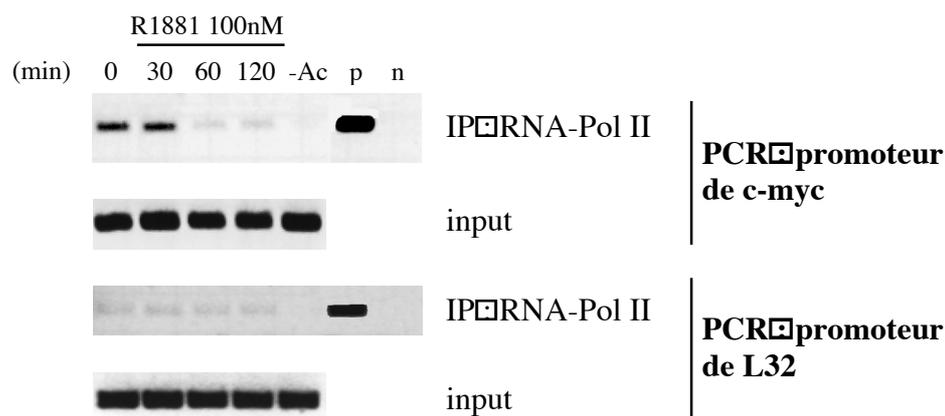


Figure 53 Effets du R1881 sur le recrutement de la RNA Polymérase II au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées au R1881 à 100nM pendant une durée croissante, puis le recrutement de la RNA-Polymérase II sur le promoteur de c-myc ou du L32 est analysé par la méthode de ChIP. -Ac contrôle d'une IP effectuée sans anticorps, n contrôle négatif de la PCR, p contrôle positif de PCR.

L'ensemble de ces données issues des expériences de ChIP nous permet donc de conclure que le traitement au R1881 dans les cellules LNCaP-FAR induit sur le promoteur de c-myc :

- Un recrutement important de HDAC-1 après 60min de traitement.
- L'élimination de la RNA Polymérase II après 60min de traitement.
- La déacétylation des histones H3 après 90min de traitement, celle-ci étant abolie en présence d'un inhibiteur de HDAC, la TSA.

Puisque la déacétylation des histones H3 n'est visible qu'après 90min de traitement, et qu'au contraire l'élimination de la RNA polymérase II se produit après seulement 60min, nous pouvons donc suggérer que l'élimination de la RNA Polymérase II ne semble pas être consécutive ou dépendante de la déacétylation des histones. Ceci pourrait expliquer que le traitement avec la TSA n'ait pas suffi à abolir la diminution de l'ARNm de c-myc en réponse au R1881.

Globalement, ces données montrent indéniablement que le R1881 et l'AR contrôlent l'expression de c-myc en bloquant l'initiation de la transcription, et non en bloquant l'élongation du transcrit.

Il reste à savoir maintenant comment l'AR agit sur ce promoteur pour répondre à cette question, nous avons analysé par CHIP le recrutement de la protéine AR sur le promoteur de c-myc en réponse au R1881.

IX.6 Recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc

Dans cette étude, nous avons analysé en parallèle le recrutement de l'AR sur la région enhancer du PSA, contenant un ARE fonctionnel des expériences de CHIP réalisées par d'autres groupes utilisant le même anticorps que nous, ont montré que la DHT induit le recrutement de l'AR dans les cellules LNCaP sur cet élément de réponse (Shang et al., 2002). L'inclusion de ce contrôle nous permet donc de valider notre protocole, tout en permettant la comparaison entre un gène-cible connu de l'AR et le gène-cible potentiel c-myc.

Dans les cellules LNCaP-FAR, le R1881 induit le recrutement de l'AR sur l'enhancer du PSA, l'effet étant maximum à 120min de traitement (Fig.54). En parallèle, l'expression de l'ARNm du PSA est fortement augmentée après seulement 120min de traitement (non montré).

A l'inverse, nous ne détectons aucun signal sur le promoteur du L32 les conditions de PCR sont pourtant plus efficaces pour ce gène que pour le PSA, comme le montrent les contrôles positifs de PCR réalisés avec des quantités croissantes d'ADN génomique (à 1ng, le signal est plus fort avec les amorces de L32 qu'avec celles du PSA). Ceci prouve donc l'absence de recrutement de l'AR sur le promoteur du gène de contrôle L32, et ceci n'est pas un artefact expérimental lié à une mauvaise efficacité de PCR.

Concernant le promoteur de c-myc, nous constatons un recrutement de l'AR en absence de R1881 (0-traitement), et l'ajout de R1881 ne modifie pas l'intensité du signal ainsi, il semblerait que l'AR soit constitutivement présent sur le promoteur de c-myc, et que le traitement au R1881 n'induit ni un recrutement accru, ni un désengagement de l'AR au niveau de ce promoteur. Comme le montrent les contrôles positifs, l'efficacité de PCR est très forte avec les amorces utilisées pour ce gène, et l'on pourrait se demander si le signal constant observé ici n'est pas plutôt lié à l'amplification de matériel génomique aspécifique (bruits de fond) ou, le contrôle d'IP réalisée sans anticorps (-Ac) témoigne au contraire de l'absence de chromatine aspécifique dans les échantillons ayant subi l'IP, puisque ce contrôle est obtenu avec la même quantité de cellules et dans les mêmes conditions de PCR. Même si il existe une certaine proportion de chromatine aspécifique, les conditions de PCR sont insuffisantes pour les amplifier, ce qui prouve que le signal visualisé dans les extraits immunoprécipités relève

bien d'un signal de recrutement spécifique, et non d'une contamination par de la chromatine aspécifique.

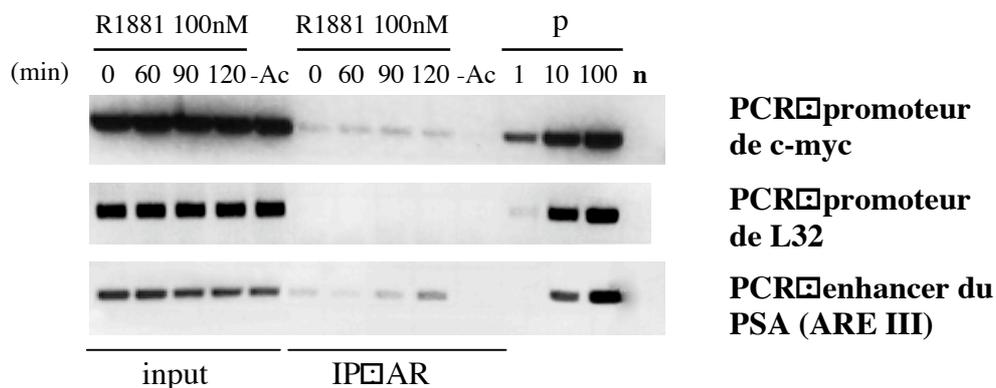


Figure 54 Effets du R1881 sur le recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.

Les cellules sont cultivées en milieu 10% SVF, traitées au R1881 à 100nM pendant une durée croissante, puis le recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc, du L32 ou sur l'enhancer du PSA est analysé par la méthode de ChIP. -Ac contrôle d'une IP effectuée sans anticorps n contrôle négatif de la PCR p contrôle positif de PCR, réalisé sur 1, 10 ou 100ng d'ADN génomique.

Ces données nous permettent donc de conclure que dans les cellules LNCaP-FAR, le traitement au R1881 induit une augmentation du recrutement de l'AR sur l'enhancer du PSA, tandis que sur le promoteur de c-myc, l'AR est constitutivement présent et le traitement au R1881 induit la répression de la transcription du gène sans altérer significativement le recrutement de l'AR. Notons qu'un profil identique a été mis en évidence dans la lignée LNCaP (non montré).

Que l'AR soit recruté en absence de ligand exogène sur le promoteur de c-myc n'est pas surprenant, dans la mesure où nous travaillons en présence de serum complet: dans l'hypothèse où c-myc est un gène-cible des androgènes, nous pouvons donc supposer que les androgènes sériques suffisent à maintenir le recrutement basal de l'AR sur ce promoteur. Pour les mêmes raisons, l'AR est aussi présent sur l'enhancer du PSA en absence de ligand exogène, mais la différence est que l'augmentation de la transcription du PSA par le R1881 est associée à une augmentation du recrutement de l'AR sur l'ARE.

L'absence d'une modification du recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc peut s'expliquer de 2 façons:

- soit le recrutement observé en absence de ligand correspond au recrutement maximum possible (contrairement au PSA), et la répression de c-myc en présence de ligand est médiée par des processus indirects.

- soit l'ajout de ligand se traduit par une modification de la quantité d'AR présente, mais la technique de ChIP n'est pas appropriée pour mettre en évidence ce phénomène: on peut imaginer que ces modifications se produisent *via* des interactions protéines-protéines (recrutement échelonné/stratifié) et non plus directement sur l'ADN. La technique de Cross-Link au Formaldéhyde fixe préférentiellement les interactions ADN-protéines, et plus les interactions protéines-protéines sont «éloignées» de l'ADN, plus elles sont difficiles à fixer stablement. Ainsi, si le R1881 induit le recrutement additif de l'AR *via* des interactions avec d'autres protéines, selon un système «stratifié», le phénomène peut être difficile à détecter.

X. Corrélation entre prolifération, régulation de l'ARNm, et recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP en présence de DCC-SVF données préliminaires.

Nous avons précédemment mis en évidence une forte corrélation entre la régulation négative de l'expression de c-myc et l'arrêt prolifératif des cellules LNCaP ou LNCaP-FAR sous l'effet d'un traitement au R1881 effectué en présence de SVF complet. La régulation négative de c-myc médierait donc le blocage des cellules dans le cycle. Dans cette situation, l'AR semble présent sur le promoteur de c-myc de manière constitutive, mais le traitement au R1881 ne modifie pas ce niveau de recrutement.

Si les androgènes sériques suffisent au recrutement maximal de l'AR sur le promoteur de c-myc, on peut penser que la déprivation en androgènes sériques (DCC-SVF) devrait conduire à l'élimination de l'AR du promoteur. Le rajout de ligand, ou le retour des cellules en présence de sérum complet devrait alors restaurer le recrutement maximal de l'AR.

A partir de cette hypothèse, on peut alors s'interroger quant à l'effet de ce contexte androgénique sur la régulation de c-myc d'une part, et sur la prolifération d'autre part.

Nous nous proposons donc, dans la dernière partie de notre travail, de vous présenter des résultats préliminaires montrant la corrélation entre le recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc, la régulation de l'ARNm, et de la prolifération, et ce en faisant varier le contexte androgénique des cellules LNCaP.

Pour cela, les cellules LNCaP ont étéensemencées dans du milieu supplémenté en DCC-SVF, et après 3 jours d'adhésion et de déprivation dans ce milieu, elles ont été soumises aux conditions suivantes

- Soit un retour en présence de SVF complet.
- Soit l'addition de doses croissantes de R1881 (0,01 à 100nM).

Pour chacune de ces nouvelles conditions, la prolifération cellulaire a été mesurée par un test MTT, la régulation de l'expression de l'ARNm de c-myc par RT-PCR, et le niveau de recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc par CHIP.

X.1 Déprivation en androgènes et retour en sérum complet

Comme le montre la Figure 55, la déprivation en androgènes sériques pendant 3 jours suffit à sous-réguler l'expression de l'ARNm de c-myc (Fig55 A, comparer pistes 1 et 2), ainsi que celle du PSA. Parallèlement, pendant ces 3 jours en présence de DCC-SVF, les cellules LNCaP ne prolifèrent plus (Fig.55B).

Inversement, lorsque le milieu est remplacé par du milieu supplémenté en SVF complet, l'expression de l'ARNm de c-myc et du PSA est augmentée, et atteint en 24h un niveau proche de celui observé sur les cellules avant la déprivation (Fig.55A, piste 3). Parallèlement, la prolifération cellulaire mesurée après plusieurs jours de retour en sérum complet est également stimulée (Fig.55B, t=6jours et t=8jours).

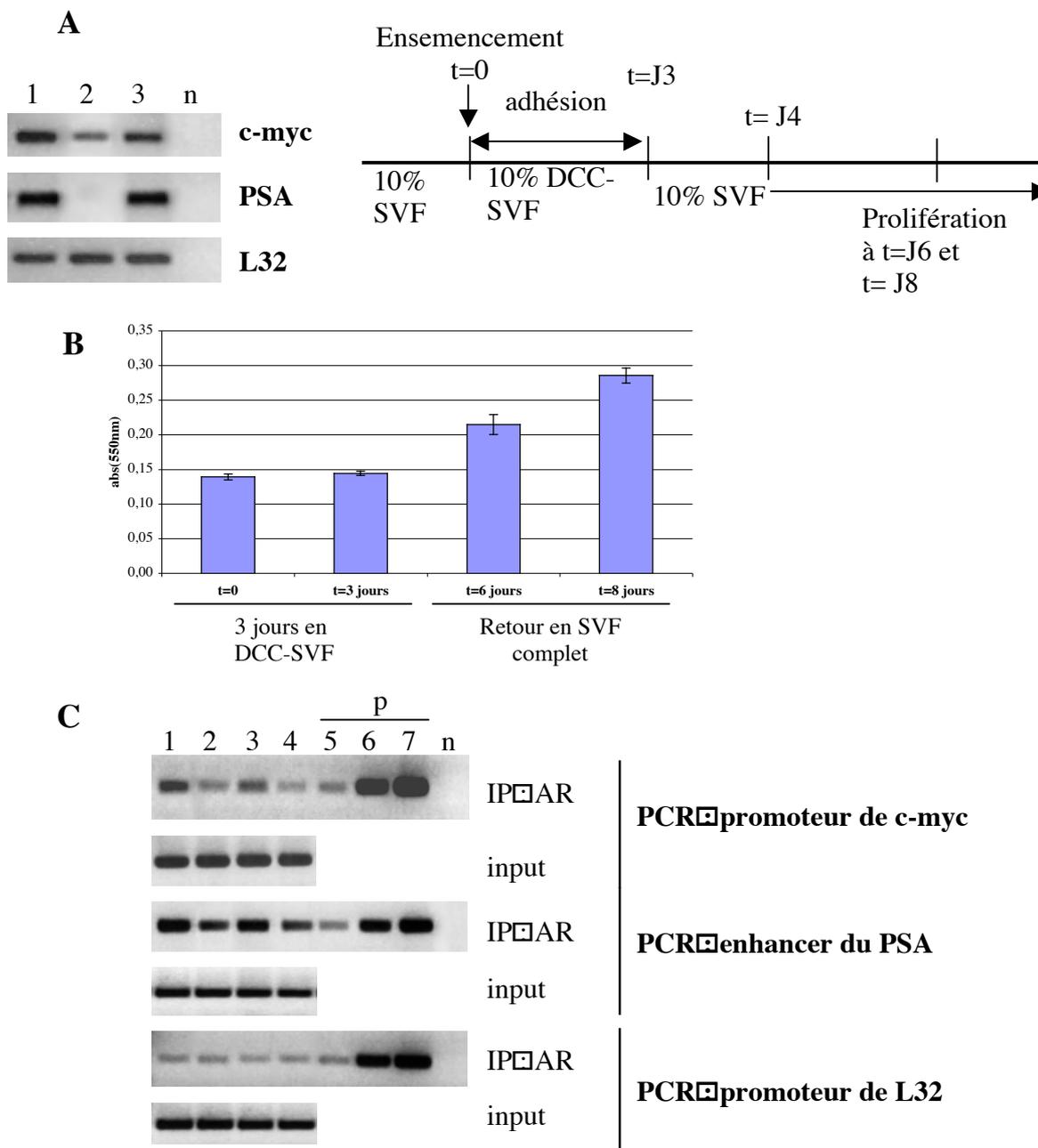


Figure 55 Effets de la déprivation puis de la restauration androgénique sur l'expression de l'ARNm de c-myc, sur la prolifération des cellules LNCaP, et sur le recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc.

Comme l'indique le schéma, les cellules LNCaP, cultivées en routine dans du milieu 10% SVF, sont ensemencées en présence de DCC-SVF 10% pendant 3 jours. A l'issue de ces 3 jours d'adhésion, le milieu est remplacé par du milieu supplémenté en SVF 10%. A l'issue de ces 3 jours de déprivation (piste 2), le milieu est remplacé pendant 2h par du milieu 10% SVF (piste 3). Les cellules sont cross-linkées au formaldéhyde, puis le recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc, du L32 et sur l'enhancer du PSA est analysé par ChIP. Piste 4 contrôle d'une IP effectuée sans anticorps. Piste 5, 6, 7 contrôles positifs (p) de PCR réalisées respectivement à partir de 1, 10 et 100ng d'ADN génomique. n contrôle négatif de PCR.

L'expression de l'ARNm du L32 est constante quelles que soient les conditions androgéniques, ce qui prouve que la sous-régulation de c-myc ou du PSA n'est pas liée à une diminution du métabolisme cellulaire, ni à un phénomène de toxicité engendrée par la déprivation.

Ces données montrent donc que l'élimination des androgènes sériques réprime la prolifération cellulaire, ainsi que l'expression de c-myc ou du PSA. A l'inverse, l'apport de sérum restaure la prolifération et l'expression de ces 2 gènes.

Concernant l'AR, nous constatons qu'après 3 jours de déprivation androgénique, il est éliminé du promoteur de c-myc (Fig.55C, comparer pistes 1 et 2), et le retour en présence de SVF complet pendant seulement 2h suffit à restaurer son recrutement à un niveau proche de celui observé avant la déprivation (Fig.55C, comparer pistes 1 et 3).

Le même profil de déplétion/recrutement suite au retrait et à l'apport d'androgènes sériques peut s'observer sur l'enhancer du PSA, le signal en présence de DCC-SVF est de même intensité que le contrôle sans anticorps (bruits de fond), ce qui témoigne bien de la déplétion totale de l'AR sur cette région (Fig.55C, comparer pistes 2 et 4).

Sur le promoteur du gène L32, le signal dans les extraits immunoprécipités ne varie pas selon les conditions expérimentales, et est surtout de même intensité que dans l'échantillon de contrôle sans anticorps (Fig 55C, pistes 1 à 4). Ceci prouve donc que le signal obtenu ici relève de la chromatine aspécifique, et ne peut pas être considéré comme un recrutement de l'AR sur le promoteur du L32.

Ces données issues des tests de prolifération, des RT-PCR et des ChIP nous permettent donc de conclure que l'élimination des androgènes sériques provoque dans les cellules LNCaP un arrêt de prolifération, accompagné d'une sous-régulation de l'expression des ARNm de c-myc et du PSA. Ce phénomène est réversible, puisque le retour en sérum complet permet de restaurer la croissance et l'expression des ARNm de ces 2 gènes. Dans ces conditions, c-myc se comporte donc comme le PSA vis-à-vis du contexte androgénique.

Parallèlement, la déprivation androgénique provoque l'élimination de l'AR présent sur le promoteur de c-myc et sur l'enhancer du PSA (le signal est proche ou égal au bruits de fond), et l'apport de SVF complet induit dans les 2 cas un recrutement très clair de l'AR sur ces 2 régions, en seulement 2 heures.

Ainsi, l'augmentation du recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc en réponse aux androgènes sériques accompagne (et médie probablement) une augmentation de son ARNm, et une stimulation de la prolifération des cellules LNCaP.

Nous allons maintenant examiner si le profil obtenu sous l'effet de la supplémentation en sérum se retrouve lorsque nous rajoutons des doses croissantes de R1881 sur ces cellules LNCaP en situation de déprivation androgénique.

X.2 Déprivation en androgènes et addition de R1881 □ c-myc et l'effet biphasique.

Cette deuxième approche a consisté à dépriver les cellules LNCaP en androgènes sériques (3 jours en DCC-SVF) et à les traiter ensuite avec des doses croissantes de R1881.

L'effet du traitement a été étudié par un test de prolifération, par l'analyse de la régulation des niveaux d'ARNm de c-myc et du PSA, et par l'analyse du recrutement de l'AR.

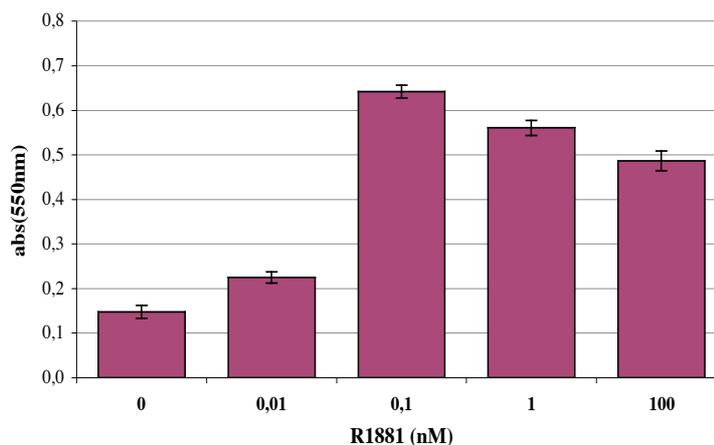
Comme nous l'avons montré auparavant, les cellules LNCaP, lorsqu'elles sont cultivées en milieu DCC-SVF, répondent à des doses croissantes d'androgènes par une stimulation biphasique de la prolifération. Nous avons observé cet effet biphasique en présence de DHT (voir Fig. 23), nous le retrouvons ici en présence de R1881 (Fig.56A) □ l'addition de faibles doses de R1881 (0,01 et 0,1nM) stimule de façon dose-dépendante la prolifération cellulaire, mais à partir de 1nM, l'amplitude de la stimulation est de moins en moins forte (le taux de prolifération par rapport aux cellules non traitées est de 435% , 380% et 330% en présence de 0,1nM, 1nM et 100nM de R1881 respectivement).

Parallèlement, l'expression de l'ARNm de c-myc, mesurée après 24h de traitement, augmente également de façon très nette en réponse aux faibles doses de R1881, et le niveau d'ARNm atteint son maximum à 0,1nM de R1881 □ le pic de stimulation de la prolifération coïncide donc avec le pic de stimulation de l'expression de c-myc (Fig.56B). En revanche, en présence de 1nM de R1881, l'expression de l'ARNm de c-myc est stimulée, mais cette stimulation est moins forte qu'à 0,1nM. Il semblerait donc qu'en DCC-SVF, la régulation de la transcription de c-myc suit également un profil biphasique en réponse au R1881. Contrairement à c-myc, l'expression de l'ARNm du PSA augmente de façon dose-dépendante, pour des doses de 0,1 à 100nM, sans révéler de profil biphasique, l'expression du L32 étant constante par ailleurs (Fig.56B).

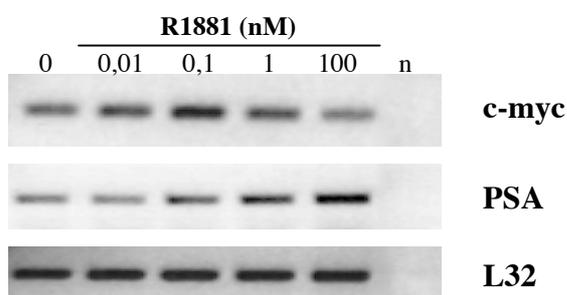
Enfin, le traitement avec 0,1nM de R1881 induit sur le promoteur de c-myc un recrutement de l'AR qui augmente progressivement à 60 puis à 120min de traitement (Fig.56C). En revanche, avec 100nM de R1881, le recrutement de l'AR augmente également, mais reste moins important qu'en présence de 0,1nM quelle que soit la durée du traitement. Sur l'ARE du PSA, le R1881 induit à l'inverse un recrutement dose-dépendant de l'AR (Fig.56C). Sur le promoteur du L32, le signal est constant quelles que soient les conditions, et est de même intensité que le contrôle réalisé sans anticorps (Fig.56C).

Le recrutement de l'AR suivrait donc lui aussi un certain profil biphasique sur le promoteur de c-myc, en réponse à des doses croissantes de R1881, lorsque les cellules LNCaP sont en situation de déprivation androgénique.

A



B



C

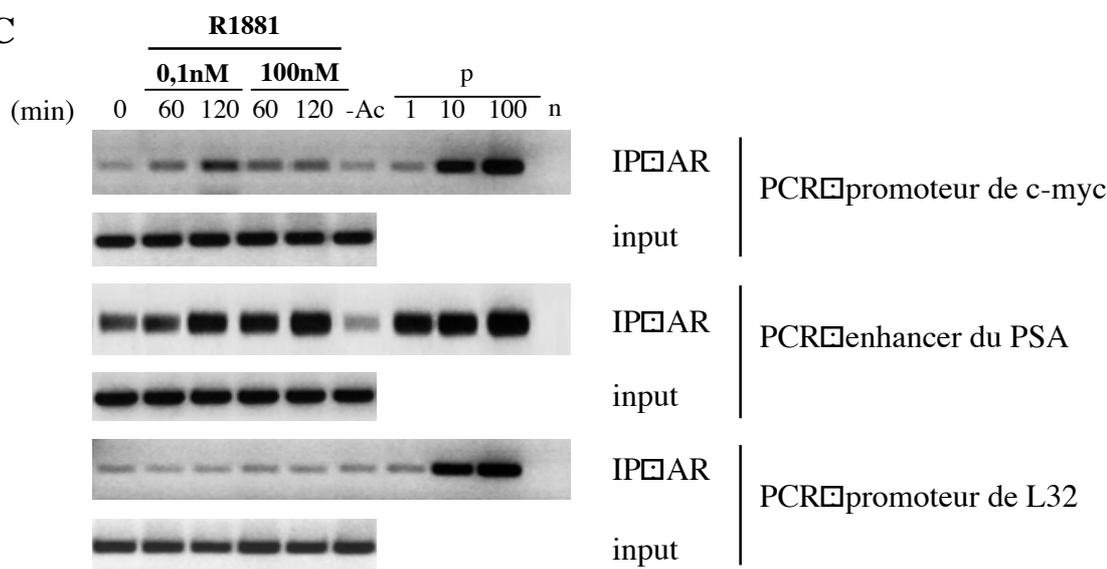


Figure 56 Effets du R1881 sur la prolifération, sur l'expression de l'ARNm de c-myc, et sur le recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc, dans les cellules LNCaP cultivées en présence de 10% DCC-SVF.

Les cellules LNCaP sont ensemencées dans du milieu 10% de DCC-SVF, et après 3 jours d'adhésion, des doses croissantes de R1881 sont ajoutées. **A** la prolifération cellulaire est mesurée par un test MTT après 8 jours de traitement. **B** Après 24h de traitement, les cellules sont récoltées, les ARN totaux sont extraits, et l'expression des ARNm de c-myc, du PSA et du L32 est analysée par RT-PCR. n contrôle négatif de PCR. **C** après 60 ou 120 min de traitement par 0,1 ou 100nM de R1881, les cellules sont cross-linkées, et le recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc, du L32 ou sur l'enhancer du PSA est analysé par ChIP. -Ac contrôle d'une IP effectuée sans anticorps. p contrôle positif de PCR, réalisée sur 1, 10 ou 100ng d'ADN génomique. n contrôle négatif de PCR.

L'ensemble de ces données préliminaires concernant le recrutement de l'AR et l'expression de c-myc en fonction du contexte androgénique suggèrent donc le schéma suivant□

➤ La déprivation en androgènes abolit à la fois la prolifération cellulaire, l'expression de l'ARNm de c-myc, et le recrutement de l'AR sur son promoteur. Réciproquement, l'apport de sérum complet restaure ces 3 paramètres. Il en est de même sur l'ARE du PSA.

➤ Lorsque les cellules sont en situation de déprivation androgénique, l'addition de R1881 à 0,1nM permet une stimulation maximale de la prolifération, une élévation des niveaux d'ARNm de c-myc et du PSA, et un fort recrutement de l'AR sur les promoteurs de ces 2 gènes. Le R1881 à 0,1nM suffit donc à reproduire l'effet d'un retour en présence de sérum complet.

➤ En revanche, pour des doses plus élevées de R1881 (100nM), la prolifération est moins stimulée et le recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc est moins fort qu'en présence de 0,1nM de R1881. L'expression de l'ARNm de c-myc est en revanche totalement abolie, puisque le niveau devient inférieur à celui des cellules non traitées. Contrairement à c-myc, l'expression de l'ARNm du PSA et le recrutement de l'AR sur son enhancer continuent d'augmenter de façon dose-dépendante.

L'utilisation de conditions de déprivation/supplémentation nous ont donc permis d'induire, artificiellement, le recrutement de l'AR que nous avons observé de façon constitutive en présence de SVF complet sur le promoteur de c-myc.

Ainsi, l'expression de c-myc et le recrutement de l'AR sur son promoteur suivent les mêmes variations que le PSA en fonction du contexte androgénique, excepté sous l'effet des fortes concentrations de R1881, pour lesquelles la transcription du PSA se poursuit, tandis que l'expression de c-myc est freinée.

Ces données restent à confirmer, mais elles suggèrent de nouveau une très forte corrélation entre les variations positives ou négatives de l'expression de c-myc et l'effet positif ou négatif sur la prolifération des cellules LNCaP en réponse à un signal androgénique. Le fait que le PSA ne subisse pas une régulation biphasique témoigne du fait que chaque gène-cible est régulé selon un profil spécifique, la régulation biphasique ne résulte pas d'un fonctionnement «□ aberrant□ de l'AR sur l'ensemble de ses gènes-cibles, mais obéit à un schéma particulier et spécifique. De ce fait, la régulation de c-myc semble encore plus intimement liée à la régulation de la prolifération, qu'elle soit positive ou négative.

XI. Conclusions et discussion

La deuxième partie de notre travail de Thèse nous a conduit à nous intéresser plus spécifiquement aux mécanismes moléculaires par lesquels les androgènes (DHT ou R1881) contrôlent la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP. Nous nous sommes intéressés en particulier à l'effet inattendu des androgènes sur la prolifération des cellules LNCaP, lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu enrichi en sérum complet.

Nous avons montré dans un premier temps que la DHT ou le R1881 induisent un arrêt de la prolifération des cellules LNCaP, à des concentrations de 1nM ou plus, les concentrations inférieures n'ayant aucun effet. Cet arrêt de la prolifération est la conséquence d'une accumulation des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire. D'un point de vue quantitatif, nous avons montré que le R1881 est plus efficace que la DHT, tant au niveau de l'arrêt prolifératif que de l'accumulation en phase G1. Cet arrêt prolifératif ne s'accompagne pas d'un phénomène de toxicité ou d'apoptose. En revanche, des modifications morphologiques peuvent suggérer un phénomène de différenciation cellulaire.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que ces effets du R1881 sont médiés par l'AR, puisque 1) dans les cellules DU-145 et PC-3, n'exprimant pas l'AR, le R1881 n'a aucun effet sur la distribution des cellules dans le cycle, 2) à l'inverse, la sur-expression stable de l'AR dans les cellules LNCaP-FAR sensibilise ces cellules à l'effet du R1881, par rapport aux cellules parentales LNCaP et 3) l'effet anti-prolifératif du R1881 à 1nM peut être antagonisé partiellement par des anti-androgènes.

Nous avons ensuite approfondi les voies de signalisation impliquées dans ce blocage en phase G1 induit par le R1881 dans les cellules LNCaP : nous avons ainsi mis en évidence une augmentation d'expression d'un inhibiteur de cdk, p27, précédant la sous-régulation de cdk et de cyclines impliquées spécifiquement dans le contrôle de la transition G1-S (cdk2, cyclines E, D1 et A). Ces processus aboutissent à la diminution de l'activité kinase des couples cdk-cyclines, attestée par la baisse consécutive de la phosphorylation de Rb. Cependant, aucun de ces régulateurs ne semble être une cible directe de l'AR, comme le suggèrent les cinétiques de régulation de leurs niveaux d'ARNm.

En revanche, nous avons montré que la diminution de l'expression du proto-oncogène c-myc pourrait médier l'effet anti-prolifératif du R1881. Plusieurs traits soulignent l'importance de c-myc dans notre système

- La sous-régulation de c-myc est aussi rapide que l'induction d'un gène-cible de l'AR, le PSA, et elle précède la régulation de toutes les autres protéines étudiées.
- Il existe une forte corrélation entre la sous-régulation de c-myc et l'accumulation des cellules en phase G1 en termes de profil effet-dose.
- Cette sous-régulation dépend de l'AR, puisqu'elle ne se produit pas dans les cellules AR-négatives, puisqu'elle est amplifiée dans les cellules LNCaP-FAR sur-exprimant l'AR, et puisqu'elle est antagonisée par les anti-androgènes.
- La régulation positive ou négative de l'expression de c-myc est corrélée à l'effet positif ou négatif des androgènes sur la prolifération des cellules LNCaP, comme le montrent les expériences réalisées cette fois en situation de déprivation androgénique (effet biphasique).

D'un point de vue mécanistique, nous avons montré *in vivo* que l'AR réprime l'expression de c-myc au niveau de l'initiation de la transcription, puisqu'il induit le désengagement de la RNA Polymérase II au niveau du promoteur de c-myc, le recrutement accru de HDAC-1, et la déacétylation des histones H3.

Enfin, nous avons montré que l'AR endogène peut être recruté *in vivo* sur le promoteur de c-myc en fonction du contexte androgénique, même si son mode d'action propre au niveau du promoteur est encore incertain.

Les cellules LNCaP étant considérées comme le principal modèle de lignée de carcinome prostatique humain hormono-dépendant, un certain nombre de travaux ont examiné l'effet des androgènes sur leur prolifération. La première publication décrivant cette lignée faisait déjà mention de la réponse proliférative de ces cellules à la DHT à la fois en présence de sérum complet et de sérum destéroïdé (DCC-SVF) □ en sérum complet, la DHT induit un ralentissement prolifératif, tandis qu'en DCC-SVF, les cellules répondent à des doses croissantes de DHT par un profil de stimulation biphasique (Horoszewicz et al., 1983). Ces profils sont inattendus, étant donné le concept unanimement accepté de l'hormono-dépendance du cancer de la prostate. Ils ont été confirmés par la suite, par nous comme par d'autres groupes, (Hofman et al., 2001; Tsihlias et al., 2000; Wolf et al., 1991), mais les voies de signalisation impliquées sont encore mal connues.

Ces effets ne sont pas ligands-dépendants, puisque d'autres androgènes induisent le même profil □ en DCC-SVF, la DHT, le R1881 mais aussi la Testostérone, la $\Delta 4$ -androsténone, la DHEA, ou le $\Delta 5$ -Androsténone diol induisent un profil de stimulation biphasique, avec un pic de stimulation obtenu à des concentrations différentes selon l'affinité de chaque hormone pour l'AR (Hofman et al., 2001; Simard et al., 1991). En présence de SVF complet, la DHT (Horoszewicz et al., 1983; Tsihlias et al., 2000), ou les androgènes synthétiques, le Mibolérone (Wolf et al., 1991), ou le R1881 (Kokontis et al., 1994) sont capables de réprimer la prolifération des cellules LNCaP, comme nous l'avons montré.

Que l'AR soit nécessaire à ces 2 profils de contrôle de la prolifération (en SVF ou en DCC-SVF) ne fait guère de doute. Lorsque les cellules LNCaP sont cultivées en présence de sérum complet, l'effet anti-prolifératif du R1881 ou d'un autre androgène peut être partiellement antagonisé par un anti-androgène, notamment le CPA (Wolf et al., 1991) ou le Bicalutamide, comme nous l'avons montré (Fig.35). L'effet biphasique du R1881 peut être partiellement antagonisé par un anti-androgène pur, le Bicalutamide, à condition qu'il soit utilisé en très large excès par rapport au R1881. Étant donné sa faible affinité pour l'AR, il lui est difficile d'antagoniser les plus fortes doses de R1881 (Veldscholte et al., 1992a; Veldscholte et al., 1994). En ce qui concerne le CPA, il a un effet agoniste partiel vis-à-vis de l'AR muté des cellules LNCaP □ en présence de DCC-SVF, il stimule donc la prolifération de façon biphasique, mais avec une efficacité moindre que le R1881 (Wilding et al., 1989) (et non montré). Lorsque le CPA est combiné au R1881, la prolifération est ramenée au niveau induit par le CPA seul, ce qui indique qu'il peut antagoniser l'effet du R1881, malgré son pouvoir agoniste partiel (Berns et al., 1986; Schuurmans et al., 1990; Warriar et al., 1994). Le CPA est donc un agoniste/antagoniste mixte.

Cette notion d'agoniste/antagoniste mixte est très relative □ en effet, bien qu'il soit un agoniste partiel de l'AR muté des cellules LNCaP, nous n'avons pas mis en évidence un effet anti-prolifératif du CPA seul sur la prolifération des cellules LNCaP cultivées en présence de SVF complet (Fig. 35). Le CPA n'a donc pas un effet agoniste assez fort pour inhiber la prolifération des cellules LNCaP en présence de SVF, alors qu'il peut stimuler leur prolifération en présence de DCC-SVF (non montré). Dans les 2 types de milieux, son pouvoir antagoniste lui permet néanmoins d'antagoniser le R1881, à condition d'être administré en très large excès.

Une autre évidence de l'implication de l'AR réside dans le fait que les cellules AR-négatives (PC-3, DU-145) ne répondent pas aux androgènes (Fig.33) (Lu et al., 1997; Schatten et al., 2000), mais il a été démontré que l'expression stable de l'AR dans les cellules PC-3 confère à la DHT (Yuan et al., 1993) ou au R1881 (Terouanne et al., 2000) un effet anti-prolifératif voire apoptotique, que l'expression de l'AR soit faible, forte ou modérée (Heisler et al., 1997). A l'inverse, l'inhibition de l'expression de l'AR dans les cellules LNCaP par un oligonucléotide anti-sens abolit fortement la prolifération basale et le profil biphasique induit par le Mibolérone (Eder et al., 2000). Enfin, nos travaux ont montré réciproquement que la sur-expression constitutive et stable de l'AR permet de sensibiliser les cellules ainsi obtenues (lignée LNCaP-FAR) à l'effet anti-prolifératif du R1881 (Fig.34 et Tableau 8).

Notons également que les différents travaux de transfection des cellules PC-3 avec l'ADNc de l'AR mentionnés ci-dessus utilisent la forme sauvage de l'AR. De même, la lignée LNCaP-FAR que nous avons présentée dans notre travail est une lignée stable obtenue par transduction de l'AR sauvage dans les cellules LNCaP. Le fait que l'effet anti-prolifératif des androgènes se retrouve dans ces lignées suggère que la mutation (Thr877Ala) de l'AR des cellules LNCaP n'est pas à l'origine de l'effet anti-prolifératif que nous avons étudié dans notre travail. De plus, puisque l'expression de l'AR est augmentée modérément suite au traitement par le R1881, comme nous l'avons constaté par Western Blot (non montré), et comme cela a déjà été prouvé (Blondeau et al., 1982; Kemppainen et al., 1992; Kokontis et al., 1998), l'effet anti-prolifératif du R1881 ne peut donc pas être imputé à une diminution de l'activité biologique de l'AR. Enfin, puisque cet effet apparaît pour des doses de DHT de l'ordre de 1nM, nous pouvons exclure définitivement qu'il s'agisse d'un effet aspécifique lié aux fortes concentrations d'hormones.

Puisque le contrôle de la prolifération s'effectue *via* la régulation de la progression des cellules dans le cycle cellulaire, nous avons voulu déterminer si l'effet anti-prolifératif des androgènes en présence de SVF est médié par un arrêt des cellules dans le cycle.

Nous avons ainsi montré que le traitement par le R1881 ou la DHT induit une accumulation des cellules LNCaP ou LNCaP-FAR dans la phase G1 du cycle cellulaire et que ce traitement n'a pas d'effet toxique ou apoptotique sur les cellules. Ainsi, l'arrêt prolifératif des cellules est médié par un blocage en phase G1, sans cytotoxicité visible sur 6 à 8 jours de traitement. Certaines modifications morphologiques (cellules plus larges, granuleuses, avec un cytoplasme dense) suggèrent en revanche un phénomène de différenciation cellulaire, bien que nous n'ayons pas pu le démontrer, faute de marqueurs spécifiques. Ces modifications morphologiques sont également rapportées par Wolf et al. en réponse au Mibolérone, mais l'analyse de ces perturbations n'est pas plus approfondie (Wolf et al., 1991). L'arrêt des cellules LNCaP en phase G1 est également démontré en réponse à la DHT, et aucune cytotoxicité n'est mise en évidence (Tsihlias et al., 2000). Les androgènes auraient donc un effet cyostatique plutôt que cytotoxique sur les cellules LNCaP.

Tsihlias et al. se sont intéressés à la régulation des protéines contrôlant la progression des cellules LNCaP dans le cycle cellulaire. Ils ont montré que le traitement avec 100nM de DHT induit une élévation de l'expression de p27, suivie d'une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine Rb (Tsihlias et al., 2000). Ils démontrent également que le traitement induit une association accrue de p27 avec les complexes cdk2-cycline E, aboutissant à l'inhibition de l'activité kinase *in vitro* de ces complexes immunoprécipités. Ceci expliquerait la diminution de la phosphorylation *in vivo* de Rb, et l'accumulation des cellules en phase G1. Lu et al. ont également observé une élévation de p27 et une diminution

de l'activité kinase de cdk2 en réponse au Mibolérone, dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres (Lu et al., 2002).

En accord avec ces travaux, nous avons montré une augmentation d'expression de p27, précédant chronologiquement la diminution de phosphorylation de Rb. En revanche, Tsihlias et al. n'ont pas observé de régulation probante des autres régulateurs du cycle, à savoir la cycline D1, cycline E, ou cdk2 (Tsihlias et al., 2000), alors que nous avons montré au contraire une diminution de l'expression de ces protéines. Cette différence peut être liée à l'utilisation dans nos travaux du R1881, plus puissant, nous l'avons constaté, que la DHT. Les effets induits peuvent donc dans notre cas être plus marqués, et plus détectables. Puisque le R1881 induit une diminution des niveaux de cdk2, des cyclines D1, A ou E, ces régulations peuvent contribuer à diminuer encore plus les activités kinase des cdk-cycline par rapport à la DHT.

Notons que nous avons observé une diminution de l'expression de cdc2 et des cyclines A et B qui contrôlent les phases S et G2-M (la cycline A est aussi impliquée dans la transition G1-S). Les cyclines sont synthétisées de façon cyclique, leur expression augmente ou diminue spécifiquement en fonction de la phase du cycle, et c'est justement leur niveau d'expression qui conditionne le déroulement et l'achèvement de la phase dans laquelle elles sont nécessaires (Annexe II). Le fait d'empêcher les cellules d'entrer dans les phases S et G2-M se traduit donc naturellement par une régulation négative des niveaux des cyclines A et B1, dont l'expression culmine normalement pendant ces 2 phases. Il a également été montré que l'arrêt des cellules dans une phase donnée du cycle se traduit par un rétro-contrôle négatif de l'expression des cdk impliquées dans d'autres phases, puisqu'elles sont devenues «inutiles» (Dalton, 1992; Welch & Wang, 1992). La baisse d'expression de cdc2, très tardive par rapport à celle de cdk2, pourrait relever d'un tel rétro-contrôle. Ces régulations de cdc2 ou des cyclines A et B peuvent donc être considérées comme des conséquences de l'arrêt en phase G1.

La diminution d'expression de la cycline D1 peut également contribuer à l'accumulation des cellules en phase G1, non seulement en diminuant les activités des cdk associées, mais aussi en réduisant la séquestration de p27 (des travaux suggèrent qu'au cours de la phase G1, la cycline D1 séquestre p27, pour tenir cet inhibiteur de cdk éloigné du couple cdk2-cycline E, qui est impliqué dans la transition G1-S (Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999). Ainsi, une sous-régulation de la cycline D1 aurait pour conséquence une augmentation de la quantité de p27 libre, et donc une inhibition accrue et consécutive de l'activité des couples cdk2-cycline E.

Concernant un autre inhibiteur de cdk, p21, nous avons observé une régulation négative de l'expression de la protéine, plus tardive par rapport à la stimulation de p27. Tsihlias et al. n'ont pas observé de variation significative de l'expression de p21, mais ils ont en revanche montré que le traitement par la DHT induit une diminution des complexes p21-cycline E-cdk2, tandis qu'en parallèle, l'association de p27 avec ces complexes augmente (Tsihlias et al., 2000). Ces données pourraient suggérer que p21 est associée aux cdk-cyclines dans les cellules cyclantes, et que sous l'effet du traitement, p21 cède la place à p27 qui inhibe alors l'activité kinase des cdk. Dans notre système, plus drastique, la diminution de l'expression de p21 pourrait s'inscrire dans ce schéma, en renforçant l'élimination de p21 des complexes cdk-cycline puis leur association inhibitrice avec p27. Ce schéma est d'autant plus cohérent qu'il rejoint certaines observations selon lesquelles p21 pourrait avoir un effet positif sur l'activité des couples cdk-cyclines, en favorisant leur association. Ceci a été suggéré dans différents types cellulaires, notamment les cellules LNCaP (Knudsen et al., 1998; LaBaer et al., 1997). Dans le cancer de la prostate, une expression élevée de p21 est d'ailleurs associée significativement à un score de Gleason élevé, à une forte proportion de cellules en phase S du cycle, et à une expression élevée des cyclines A et D, témoignant d'une forte activité

proliférative (Aaltomaa et al., 1999; Baretton et al., 1999). Ainsi, une régulation négative de l'expression de p21 pourrait contribuer à l'arrêt en phase G1, même si, d'un point de vue cinétique, p27 semble plus impliqué.

Nos travaux avec le R1881, confirmant ceux obtenus avec la DHT (Tsihlias et al., 2000) ou avec le Mibolérone (Lu et al., 2002), nous permettent donc de proposer un schéma cohérent de l'effet des androgènes sur les cellules LNCaP : l'augmentation d'expression de p27, la régulation négative de l'expression des cyclines A, E et D1, de cdk2 puis de p21 pourraient aboutir à une forte diminution de l'activité kinase des cdk-cyclines de G1. La diminution consécutive de la phosphorylation de Rb en est une preuve indirecte, et aboutit à l'arrêt en phase G1. Le traitement par le R1881 bloque donc les cellules en G1 en régulant la voie traditionnelle p27/cdk-cycline/Rb.

Il est maintenant bien admis que les androgènes contrôlent la prolifération cellulaire prostatique en régulant les médiateurs de la transition G1-S, tant dans la prostate normale que dans le tissu cancéreux.

Dans la prostate ventrale de rat *in vivo*, la castration provoque l'involution de l'épithélium prostatique non tumoral, et l'administration de Testostérone restaure la prolifération cellulaire en stimulant l'expression des cyclines D et E, de p21, de cdk2, et en réprimant l'expression de p27, les ramenant à un niveau d'expression proche de celui observé chez le rat non castré (Chen et al., 1996). Concernant le tissu tumoral, la castration provoque la régression de tumeurs prostatiques humaines CWR22 xénogreffées chez la souris, et cette régression tumorale s'accompagne d'une diminution d'expression de la cycline D1, d'une élévation de p53, et des inhibiteurs de cdk p27 et p16 (Agus et al., 1999). La déprivation en androgènes abolit la prolifération en modulant l'expression de certains régulateurs du cycle, et l'apport consécutif d'androgènes reverse donc ces processus.

In vitro, des travaux ont montré que la déprivation androgénique des cellules LNCaP (DCC-SVF) induit une diminution de l'expression de cdk2, de cdk4, et de p21, une augmentation de l'expression de p27, un effondrement de l'activité kinase des cdk, et enfin une hypophosphorylation de Rb, aboutissant à un arrêt en phase G1 (Knudsen et al., 1998). L'addition de DHT à 0,1nM (Knudsen et al., 1998) ou de R1881 à 1nM (Lu et al., 1997) stimule alors la prolifération en restaurant l'expression de ces différents régulateurs du cycle, les ramenant aux niveaux observés avant la déprivation.

Il est d'ailleurs intéressant de constater que les régulations observées suite à un retrait des androgènes sériques dans l'étude de Knudsen et al., sont quasiment identiques à celles observées dans nos travaux suite à un ajout d'androgènes en présence de SVF complet (Knudsen et al., 1998). Dans les 2 cas, le contexte androgénique aboutit à un blocage des cellules LNCaP en phase G1. Pourtant, d'un point de vue morphologique, les 2 situations semblent différer fondamentalement : dans notre cas, nous avons vu que le traitement par les androgènes rend les cellules plus rondes, plus larges, plus granuleuses, et elles sont plus amassées les unes sur les autres ; à l'inverse, la déprivation androgénique de ces cellules les rend plus fines, elles s'étirent considérablement, émettent de longs filaments, et adoptent un aspect de type neurone, typique d'une situation de stress cellulaire (non montré). Ces différences morphologiques et ces similitudes mécanistiques suggèrent donc que le blocage en G1 induit dans les 2 cas emprunte au final les mêmes voies de signalisation, mais recouvre des processus cellulaires totalement différents, l'un pouvant être lié à une quiescence (déprivation androgénique) l'autre à une différenciation (ajout d'androgènes en présence de sérum complet).

L'ensemble de ces données montre donc que le contexte androgénique (déprivation ou castration, puis supplémentation en hormones) modifie la croissance cellulaire *in vitro* ou *in vivo*, via la régulation des protéines contrôlant la progression G1-S dans le cycle. Nos travaux

renseignant de l'effet des androgènes sur la prolifération des cellules LNCaP sans déprivation montrent des schémas de régulation tout à fait similaires, impliquant au final les mêmes effecteurs cellulaires.

Tsihlias et al. placent donc p27 comme la cible principale de la DHT dans les cellules LNCaP, et notre propre analyse va également dans ce sens, tout au moins sur le plan cinétique (Tsihlias et al., 2000). Puisque ces auteurs n'ont pas examiné la régulation transcriptionnelle de ces médiateurs du contrôle du cycle, nous avons complété notre approche par une analyse de la régulation des ARNm, afin de déterminer si p27 ou un autre régulateur du cycle est effectivement une cible directe de l'AR, en tant que facteur de transcription.

Cependant, nos travaux n'ont pas montré de variation des niveaux d'ARNm de la cycline D1, de cdk4, ni des inhibiteurs de cdk (p21, p27, ou ceux de la famille INK4). Ceci suggère donc que la régulation par le R1881 de l'expression de ces médiateurs du cycle s'effectue plutôt au niveau traductionnel ou post-traductionnel dans notre système.

Des travaux ont montré effectivement que l'expression de p27 en particulier est contrôlée par des voies qui dirigent sa dégradation par le protéasome (Alessandrini et al., 1997), et dans les cellules LNCaP, le traitement par le Mibolérone réduit la dégradation de la protéine p27, en réprimant son ubiquitylation, sans affecter le niveau d'ARNm (Lu et al., 2002). La diminution de l'expression de cdk2/cycline E observée dans notre étude, peut également contribuer à augmenter la stabilité de p27 en effet, au cours de la phase G1, cdk2 phosphoryle p27 (Thr187) et cette phosphorylation est un signal pour la dégradation de p27 par le complexe ubiquitine-protéasome (Sheaff et al., 1997; Vlach et al., 1997). La diminution de l'activité cdk2 peut donc favoriser l'accumulation de p27 dans les cellules LNCaP, mais puisque l'augmentation d'expression de p27 précède la diminution de cdk2/cycline E, nous pouvons suggérer que cette voie intervient secondairement dans la chronologie.

Quoi qu'il en soit, nos données ne nous permettent donc pas de désigner p27 comme une cible transcriptionnelle de l'AR dans les cellules LNCaP traitées par le R1881.

Nous avons également montré que le traitement au R1881 induit une diminution des niveaux d'ARNm des cyclines A, B, et de cdc2, mais ces phénomènes sont assez tardifs. Ceci confirme d'autres études, ayant suggéré que le rétro-contrôle négatif (déjà mentionné) des régulateurs du cycle, dirigé par la cellule, s'effectue essentiellement au niveau transcriptionnel (Welch & Wang, 1992; Zwicker et al., 1995).

Enfin, nous avons mis en évidence une diminution du niveau d'ARNm de cdk2, et dans une moindre mesure de la cycline E, mais par rapport à un gène-cible direct et connu de l'AR (le PSA) ces effets du R1881 sur cdk2 ou sur la cycline E sont très tardifs. Nous avons en effet montré que l'ARNm du PSA augmente après seulement 2 à 4 heures de traitement avec le R1881, ce qui est beaucoup plus rapide que la régulation de ces médiateurs observée ici (18h). Nous n'avons donc pas considéré cdk2 ou la cycline E comme des cibles de l'AR dans notre système.

Globalement, cette analyse des mécanismes impliqués dans l'effet anti-prolifératif du R1881 sur les cellules LNCaP, nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de régulations, qui concourent de façon cohérente à l'accumulation des cellules en phase G1.

Nous avons également complété les données de Tsihlias et al. (Tsihlias et al., 2000), en montrant que ces différents régulateurs du cycle ne sont pas des cibles transcriptionnelles directes de l'AR. Un ou plusieurs intermédiaires entre l'AR et les régulateurs du cycle sont vraisemblablement nécessaires pour générer l'arrêt prolifératif.

Parmi les protéines qui pourraient médier l'effet du R1881 dans notre système, *via* l'activité transcriptionnelle de l'AR, les données de la Littérature nous ont orienté vers 2 candidats préférentiels : d'une part le TGF- β 1, qui est le principal facteur de croissance inhibiteur de l'épithélium prostatique (Culig et al., 1996), et d'autre part le proto-oncogène c-myc, qui est impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation dans de nombreux types cellulaires, et dont la diminution d'expression accompagne souvent un arrêt prolifératif (Dean et al., 1986; Dimberg et al., 2002; Melkounian et al., 2002).

Concernant le TGF- β 1, une étude a suggéré son implication dans l'effet biphasique des androgènes sur la prolifération des cellules LNCaP cultivées en présence de DCC-SVF : ces auteurs ont montré que le traitement par la DHT induit une augmentation dose-dépendante de l'expression du TGF- β 1, tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau de la protéine (Kim et al., 1996). A partir d'une certaine dose de DHT, correspondant à la stimulation maximale de la prolifération, la quantité de TGF- β 1 synthétisé serait telle que son effet anti-prolifératif l'emporterait sur les signaux mitogènes de la DHT (Kim et al., 1996). Nous avons donc voulu déterminer si dans notre système en présence de SVF complet, le traitement par le R1881 stimule également l'expression du TGF- β 1. L'analyse n'a pas pu être réalisée au niveau de la protéine, faute d'anticorps satisfaisant, mais au niveau de l'ARNm, la technique de RPA nous a permis de constater que le R1881 à 100nM, même après 72h de traitement, n'a pas d'effet sur l'expression de l'ARNm du TGF- β 1. Ces données contredisent donc les travaux de Kim et al., mais on ne peut exclure que cette différence soit liée aux conditions expérimentales utilisées (DCC-SVF + DHT vs SVF complet + R1881) ou à une différence de lot des cellules. Cependant, les travaux de Kim et al. n'ont pas été confirmés à notre connaissance par des groupes indépendants. De plus, des travaux ont par la suite contesté l'implication du TGF- β 1 dans le contrôle de la croissance des cellules LNCaP en raison de doutes quant à l'expression de son récepteur (Guo & Kyprianou, 1998; Joly-Pharaboz et al., 1995). L'étude du rôle du TGF- β 1 dans notre système n'a donc pas été poursuivie.

En revanche, l'étude du rôle du proto-oncogène c-myc s'est avérée beaucoup plus fructueuse. Dans un premier temps, nous avons analysé sa régulation dans les cellules LNCaP traitées avec le R1881, et nous avons constaté une diminution de son expression, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine (Fig.42 et 43). De plus, cette régulation en fonction de la dose montre une très bonne corrélation avec l'effet-dose de l'accumulation des cellules dans le cycle : la baisse d'expression de c-myc est en effet visible à partir de 0,1nM de R1881 (augmentation non significative de la quantité de cellules en phase G1), et la protéine devient indétectable à partir de 1nM (accumulation significative en phase G1). La cinétique de régulation de c-myc suggère qu'il pourrait être un gène-cible de l'AR, puisque, comme le PSA, l'expression de son ARNm est régulée après seulement 4h de traitement. Une régulation aussi rapide exclut la possibilité de l'intervention intermédiaire d'une autre protéine, et suggère plutôt un effet direct de l'AR. La régulation de c-myc précède donc celle de tous les autres médiateurs du cycle étudiés, et de ce fait, nous avons émis l'hypothèse que cette régulation est un événement causal de l'arrêt en G1.

L'AR semble nécessaire à la régulation négative de l'expression de c-myc, tout comme il est nécessaire à l'effet anti-prolifératif du R1881. Dans les cellules AR-négatives PC-3 et DU-145, le R1881 n'a aucun effet sur l'expression de c-myc, étudiée au niveau de la protéine. Dans les cellules LNCaP-FAR sur-exprimant l'AR, la régulation négative de l'expression de l'ARNm c-myc est plus rapide que dans les cellules LNCaP, et au niveau de la protéine, nous avons constaté également que la diminution d'expression est plus forte dans les cellules LNCaP-FAR que dans les cellules LNCaP pour une même dose de R1881 : ceci suggère donc

que la sur-expression de l'AR sensibilise les cellules à l'effet du R1881, tant au niveau de l'expression de c-myc qu'au niveau du blocage en phase G1. Enfin, le traitement combiné des cellules LNCaP avec le R1881 (1nM) et avec un anti-androgène en excès (1 μ M) abolit partiellement (Bicalutamide) ou totalement (CPA) l'effet du R1881 sur l'expression de c-myc. Ces résultats corroborent donc l'effet des anti-androgènes sur l'arrêt prolifératif induit par le R1881. Ils confirment également les travaux de Wolf et al. qui, eux, utilisent le Mibolérone, à la différence que dans leur système, la régulation de c-myc est tardive, puisqu'elle ne survient qu'après 12h de traitement (Wolf et al., 1992a; Wolf et al., 1991).

L'ensemble de ces données plaide donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle c-myc pourrait être un gène-cible direct des androgènes, dont la régulation négative et très rapide pourrait être à l'origine de l'arrêt prolifératif des cellules LNCaP en réponse au R1881.

Si c-myc est impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules LNCaP par les androgènes, on peut se demander si sa régulation est systématiquement corrélée à l'effet des androgènes sur la prolifération, que ces effets soient positifs ou négatifs.

Nos données préliminaires réalisées en présence de DCC-SVF suggèrent effectivement l'implication de c-myc dans la régulation de la prolifération des cellules LNCaP selon le contexte androgénique : comme nous l'avons montré, le retrait des androgènes sériques abolit la prolifération cellulaire et ceci s'accompagne d'une sous-régulation de l'ARNm de c-myc. Ces processus sont réversibles, puisque l'apport consécutif de SVF complet restaure à la fois la prolifération cellulaire et l'expression de c-myc (Fig.55).

Plus convaincante encore est la régulation de c-myc dans le cadre de l'effet biphasique induit par des doses croissantes de R1881 lorsque les cellules LNCaP sont cultivées en présence de DCC-SVF, l'ajout de faibles doses de R1881 (0,01 et 0,1nM) induit une stimulation dose-dépendante de la prolifération et de l'expression de l'ARNm de c-myc, et pour des doses de 1nM ou plus, l'effet prolifératif est moins marqué, et l'expression de c-myc diminue également (Fig. 56).

En outre, comme nous l'avons précédemment signalé, le CPA a un effet agoniste sur l'AR muté des cellules LNCaP, qui se traduit par une stimulation de la prolifération lorsque ces cellules sont cultivées en DCC-SVF (Wilding et al., 1989). Nos données préliminaires ont confirmé cet effet du CPA (1 μ M), et nous avons également constaté que le CPA induit dans ces conditions une augmentation de l'ARNm de c-myc et du PSA (non montré). En revanche, en présence de SVF complet, le CPA seul n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire ou sur l'expression de c-myc (Fig.46), alors qu'il stimule l'expression de l'ARNm du PSA (non montré). Ces données renseignant des effets du CPA témoignent bien de la corrélation étroite et spécifique entre la prolifération cellulaire et l'expression de c-myc.

Enfin, les cellules LNCaP-FAR apportent une dernière preuve expérimentale du lien existant entre l'effet prolifératif des androgènes et l'expression de c-myc dans ces cellules LNCaP-FAR, sur-exprimant l'AR, nous avons constaté qu'en présence de DCC-SVF, les cellules continuent de proliférer, et l'ajout de R1881 se traduit alors par une inhibition totale de la croissance, et ce même pour des doses très faibles de R1881 (0,01nM ou plus). Ainsi, la sur-expression de l'AR se traduit par une disparition du profil biphasique, les cellules sont hyper-sensibilisées à l'effet anti-prolifératif du R1881 (non montré), et ce profil d'inhibition de la prolifération se traduit par une sous-régulation dose-dépendante du niveau d'ARNm de c-myc (non montré). Ces données préliminaires montrent que la sur-expression de l'AR sensibilise les cellules à l'effet des hormones, d'une part en termes de prolifération, et d'autre part en termes de régulation de c-myc.

Pour résumer, l'expression de c-myc est régulée négativement dans le cas de manipulations hormonales qui abolissent ou ralentissent la prolifération (DCC-SVF \square DCC-SVF + fortes doses de R1881 \square SVF + fortes doses de R1881). A l'inverse, l'expression de c-myc est augmentée si la prolifération est stimulée (DCC-SVF + apport de SVF \square DCC-SVF + faibles doses de R1881 ou CPA). Ces données montrent donc que les androgènes ont un double rôle sur l'expression de c-myc, puisqu'ils peuvent la stimuler, ou au contraire la réprimer, selon le contexte, et cet effet est corrélé à un effet positif ou négatif sur la prolifération.

De nombreux travaux suggèrent l'importance de c-myc, d'une part dans le contrôle de la prolifération des cellules prostatiques en général, et d'autre part comme médiateur ou cible de l'effet des androgènes sur la prostate, normale ou tumorale.

Pour illustrer l'importance de c-myc comme agent-clé du contrôle de la prolifération des cellules prostatiques, signalons que la sur-expression de c-myc par infection rétrovirale induit une hypertrophie bénigne, dans un système de tissu prostatique reconstitué (Thompson et al., 1989).

Des travaux, menés *in vitro* ou *in vivo*, viennent soutenir par ailleurs l'implication de c-myc comme médiateur des effets prolifératifs selon le contexte hormonal.

Dans les cellules LNCaP, différents travaux ont montré que les androgènes peuvent stimuler ou supprimer l'expression de c-myc \square une diminution de c-myc est démontrée suite à l'ajout d'androgènes en présence de SVF complet (Kokontis et al., 1994; Wolf et al., 1992a; Wolf et al., 1991), l'effet est antagonisé par un excès d'anti-androgènes (Wolf et al., 1991) et aboli par la sur-expression rétrovirale de c-myc (Kokontis et al., 1994). L'effet anti-prolifératif et pro-apoptotique d'un oligonucléotide anti-sens c-myc a été démontré dans les cellules LNCaP (Balaji et al., 1997).

Concernant le profil biphasique, les données de Foury et al. (Foury et al., 1998) suggèrent que seule l'inhibition de la prolifération s'accompagne d'une baisse d'expression de c-myc \square ces auteurs montrent que le R1881 ou le RU56187 induit un profil biphasique de stimulation de la croissance, et les doses les plus fortes répriment l'expression de c-myc, comme nous l'avons nous-même constaté avec le R1881, ainsi que Kokontis et al. (Kokontis et al., 1994). En revanche, ils montrent que les faibles doses de R1881 ou de RU56187 stimulent la prolifération sans variation de l'expression de c-myc, ce qui va à l'encontre de nos données ou de celles de Kokontis et al. (Kokontis et al., 1994). De plus, ces auteurs montrent qu'en présence de DCC-SVF le CPA stimule à la fois la prolifération et l'expression de c-myc (Foury et al., 1998). Ces données sur le CPA corroborent nos travaux, mais il est difficile alors d'expliquer pourquoi seul le CPA stimule l'expression de c-myc, alors que l'effet prolifératif du CPA est moins fort que celui du R1881. Ces auteurs n'ont cependant analysé que les niveaux d'ARNm, et non les protéines, ce qui pourrait expliquer les discordances avec nos travaux, ou ceux de Kokontis et al. (Kokontis et al., 1994). De plus, ils ont effectué leur analyse après 4 jours de traitement, ce qui est long, et il est probable que le niveau d'ARNm de c-myc soit revenu à son niveau initial après une période de stimulation transitoire par le R1881, comme cela a été montré dans d'autres systèmes (Campisi et al., 1984; Kelly et al., 1983).

In vivo, des travaux menés sur la prostate ventrale de rat ont montré que la castration des rats induit l'atrophie de l'épithélium prostatique et une augmentation de l'ARNm de c-myc, qui peut être prévenue par l'administration d'androgènes au moment de la castration (Buttayan et al., 1988; Quarmby et al., 1987). La régulation positive de c-myc serait donc impliquée dans l'involution glandulaire. Le fait que l'augmentation de l'ARNm de c-myc puisse être

prévenue en administrant des androgènes au moment de la castration suggère également que dans ce système, les androgènes contrôlent négativement l'expression de c-myc.

L'atrophie de l'épithélium prostatique induite par la castration du rat et la re-prolifération de l'épithélium chez des rats castrés puis supplémentés en hormones sont des processus qui empruntent des voies différentes, spécifiques, mais il existe aussi un certain nombre de gènes impliqués dans les 2 phénomènes et régulés de façon opposée dans les 2 situations. c-myc fait partie de ces gènes (Furuya & Isaacs, 1993), et la supplémentation en Testostérone initiée 7 jours après la castration provoque en quelques heures une élévation de l'ARNm de c-myc dans le tissu prostatique en re-croissance (Katz et al., 1989). Ces données *in vivo* illustrent la fonction de c-myc comme cible essentielle de la régulation androgénique de la croissance prostatique.

Choo et al. ont établi une lignée épithéliale prostatique humaine (HPr-1) non tumorale et immortalisée par le papillomavirus HPV16 E6/E7 (Choo et al., 1999). Cette lignée n'exprime pas l'AR, et ne répond pas aux androgènes, mais l'infection rétrovirale des cellules permet la sur-expression stable de l'AR sauvage (lignée HPr-1AR), à un niveau supérieur à celui de la lignée LNCaP. L'addition de Mibolérone (0,01 à 100nM) en présence de DCC-SVF induit alors une inhibition dose-dépendante de la prolifération, accompagnée d'une élévation de l'expression de p27, de p21, et d'une sous-régulation de c-myc (Ling et al., 2001).

A l'inverse, dans des cellules épithéliales prostatiques humaines en culture primaire et non transformées (HNTEP), Silva et al. ont montré que la DHT (10^{-13} M) stimule la prolifération cellulaire *in vitro* ainsi que l'expression de l'ARNm de c-myc et cet effet peut être antagonisé par un anti-androgène (Silva et al., 2001). Ces auteurs n'ont pas examiné l'expression de c-myc et la prolifération pour de plus fortes concentrations de DHT.

Ces données suggèrent donc que dans le tissu prostatique normal ou tumoral, les androgènes peuvent contrôler l'expression de c-myc de façon à stimuler ou réprimer la prolifération cellulaire.

L'implication de c-myc a également fait l'objet de travaux dans le contexte de l'évolution des cellules cancéreuses prostatiques vers l'androgéno-indépendance. Rappelons que l'androgéno-dépendance sous-entend que les cellules ne prolifèrent plus en absence d'androgènes, tandis que l'androgéno-indépendance se caractérise par une prolifération active en absence d'androgènes.

Le groupe de Liao a établi, par une déprivation androgénique prolongée des cellules LNCaP, des sous-clones androgéno-indépendants nommées LNCaP-104R, qui prolifèrent en présence de DCC-SVF. L'ajout de R1881 à ces cellules réprime fortement la prolifération, y compris aux plus faibles doses (0,1nM), suggérant que la déprivation androgénique prolongée a sensibilisé les cellules à l'effet anti-prolifératif du R1881 (Kokontis et al., 1994). Dans ces cellules LNCaP-104R, Kokontis et al. ont montré que l'inhibition de croissance s'accompagne d'une forte répression de l'expression de c-myc, et l'effet anti-prolifératif peut être aboli par la sur-expression de c-myc au moyen d'une infection rétrovirale (Kokontis et al., 1994). De plus, l'effet anti-prolifératif du R1881 en présence de DCC-SVF dans ces sous-clones s'accompagne d'une élévation de l'expression de p27 et de son association avec cdk2 (Kokontis et al., 1998). *In vivo*, les cellules parentales LNCaP-104S androgéno-dépendantes sont tumorigéniques chez la souris athymique. La castration abolit la croissance tumorale, preuve de l'androgéno-dépendance du clone, et l'administration de doses physiologiques de Testostérone restaure la croissance tumorale. En revanche, les clones LNCaP-104R forment des tumeurs androgéno-indépendantes, c'est-à-dire que la masse tumorale augmente malgré la castration, et l'administration de Testostérone ou de DHT induit alors une régression

tumorale, accompagnée d'une diminution de l'ARNm de c-myc dans la tumeur, reproduisant ainsi les données *in vitro* (Umekita et al., 1996).

Les données de Foury et al. soulignent une différence entre le R1881 et le CPA en ce qui concerne la régulation négative de c-myc dans les cellules MOP androgéno-indépendantes (obtenues elles aussi par une déprivation androgénique prolongée des cellules LNCaP) □ la prolifération des cellules MOP peut être réprimée de façon dose-dépendante par le R1881 ou par le CPA, mais seul le R1881 sous-régule l'expression de c-myc, le CPA n'ayant aucun effet (Foury et al., 1998).

Enfin, une étude récente a montré que la sur-expression de c-myc par infection rétrovirale des cellules LNCaP leur confère une androgéno-indépendance et les rend capables de proliférer en absence d'androgènes (Bernard et al., 2003). Cette étude a aussi montré que l'expression de c-myc est insensible au traitement par le Bicalutamide dans les cellules AR-négatives (PC-3, DU-145). Dans les cellules 22rv-1 androgéno-indépendantes mais AR-positives, le Bicalutamide n'affecte pas l'expression de c-myc, contrairement aux cellules androgéno-dépendantes et AR-positives LNCaP et LAPC-4. En revanche, la diminution d'expression de c-myc par RNA interférence abolit la prolifération de ces différentes lignées, ce qui témoigne de l'importance de c-myc pour la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques quel que soit leur statut de dépendance hormonale et leur niveau d'expression de l'AR. Cette étude montre également que c-myc n'agit pas en régulant l'activité de l'AR, mais que c-myc est une cible de l'AR, nécessaire à la prolifération androgéno-dépendante (Bernard et al., 2003).

Si la régulation négative de c-myc est à l'origine de l'accumulation des cellules LNCaP dans le cycle, nous pouvons émettre certaines hypothèses concernant son mode d'action, bien que nous n'ayons pas de données expérimentales sur cet aspect mécanistique dans notre système. De nombreux travaux ont documenté les mécanismes par lesquels l'induction de c-myc stimule la transition G1-S, et des gènes-cibles ont été identifiés, puisque c-myc est un facteur de transcription. En revanche, dans les systèmes pour lesquels la répression de c-myc conduit à un arrêt dans le cycle, un certain nombre de régulations sont observées, mais le lien précis entre la diminution de c-myc et ces régulations n'est pas démontré expérimentalement □ on ne peut alors qu'extrapoler par rapport à la fonction de c-myc dans la promotion de la transition G1-S.

Les cyclines A et E sont des cibles de c-myc □ bien qu'aucun site E-box n'ait été mis en évidence sur leur promoteur, leur expression est corrélée positivement à celle de c-myc, suggérant un lien entre la régulation de c-myc et celle de ces cyclines (Jansen-Durr et al., 1993; Perez-Roger et al., 1997). Nos travaux vont dans ce sens, puisque l'expression des cyclines A et E diminue également (y compris au niveau de l'ARNm), de façon temporellement décalée par rapport à c-myc. L'élimination du signal positif que représente c-myc pourrait donc contribuer, directement ou non, à réprimer la transcription de ces cyclines, nécessaires à la transition G1-S et à la phase S. Dans des cellules humaines myéloïdes U-937, Dimberg et al. ont ainsi montré que le traitement par l'acide rétinoïque induit la différenciation terminale, accompagnée d'une sous-régulation très rapide de c-myc, suivie d'une diminution de l'expression de la cycline E. Dans ce système, la sur-expression constitutive de c-myc abolit l'effet de l'acide rétinoïque sur l'expression de la cycline E, suggérant que la répression de c-myc est un pré-requis pour la régulation négative de cette cycline (Dimberg et al., 2002).

Ces corrélations ne se retrouvent pas cependant en ce qui concerne 2 autres régulateurs du cycle, à savoir la cycline D1 et p21. L'expression de p21 est diminuée en réponse à c-myc dans certains systèmes, ce qui indique un effet répresseur de c-myc sur l'expression de p21 (Gartel et al., 2001). Dans notre système, l'expression de p21 diminue au contraire, tout comme celle de c-myc. Puisque l'expression de l'ARNm de p21 ne varie pas en réponse au R1881, nous pouvons penser que la diminution de c-myc n'a pas d'influence sur la transcription du gène p21 dans notre système, contrairement à ce qui a été observé dans d'autres types cellulaires. En outre, puisque le rôle de p21 dans les cellules LNCaP semble différer de son rôle traditionnel d'inhibiteur de cdk, on peut penser qu'il existe des différences en fonction du type cellulaire, et que le contrôle de la régulation de p21 obéit à des spécificités cellulaires.

Concernant la cycline D1, des données contradictoires ont été rapportées, suggérant que c-myc pourrait stimuler ou réprimer la transcription de cette cycline, *via* respectivement une E-box et un site Inr présents sur le promoteur (Daksis et al., 1994; Philipp et al., 1994). L'effet de c-myc diffère selon le contexte cellulaire, mais ces données s'accordent à souligner un effet transcriptionnel de c-myc sur l'expression de ce gène. Or, nous avons montré dans les cellules LNCaP que l'expression de la cycline D1 diminue, mais son niveau d'ARNm demeure constant tout au long du traitement par le R1881, suggérant cette fois un effet traductionnel ou post-traductionnel. Il nous est donc difficile d'établir un lien entre la sous-régulation de la cycline D1 et celle de c-myc.

L'un des principaux effets de la sous-régulation de c-myc pourrait concerner l'expression de p27, qui augmente dans notre système. Nous avons montré que la régulation de p27 ne s'effectue pas au niveau transcriptionnel, puisque l'ARNm ne varie pas au cours du traitement par le R1881. Il s'agirait donc d'un effet traductionnel ou post-traductionnel.

Or, il a été montré que pour stimuler la progression des cellules dans le cycle, c-myc pourrait diriger la dégradation de p27 par la voie Ubiquitine-Protéasome. Ce processus impliquerait un gène-cible de c-myc, Cul1 (O'Hagan et al., 2000), faisant partie du complexe SCF^{Skp2} ayant une activité ubiquitine-ligase. Etant donné le décalage temporel entre la sous-régulation de c-myc (visible à 4h) et l'augmentation de p27 (visible à 16h), on peut penser que l'augmentation de p27 dans notre système pourrait se produire *via* une diminution d'expression de Cul1, consécutive à celle de c-myc. D'où une stabilisation de p27, et non une transcription accrue.

Dans leur étude renseignant des effets du Mibolérone, Lu et al. ont montré que l'expression de p27 augmente dans les cellules LNCaP (Lu et al., 2002). Leur étude de la régulation des composants du complexe SCF^{Skp2} a montré que le traitement au Mibolérone induit une diminution de l'expression de Skp2, au niveau ARNm et protéine, alors que les autres composants du complexe (Skp1, Cul1, HRT1) ne sont pas affectés par ce traitement. Ces données suggèrent donc que le traitement androgénique des cellules LNCaP affecte la dégradation de p27, *via* Skp2. Cependant, la sur-expression de Skp2 par infection adénovirale dans les cellules LNCaP bloquées en phase G1 par le Mibolérone conduit à la diminution de l'expression de p27, mais les activités cdk2 ne sont que transitoirement restaurées, et les cellules LNCaP restent bloquées en phase G1 (Lu et al., 2002). Il semblerait donc que la baisse d'expression de Skp2 et la stabilisation de p27 ne soient pas responsables à elles seules de la diminution des activités cdk2 et du blocage en phase G1. Que Skp2 soit un gène-cible de l'AR est peu probable, d'après ces auteurs, en raison de la cinétique assez lente de sa régulation, mais il est possible qu'il soit un gène-cible de c-myc, comme Cul-1, bien que cela n'ait pas été prouvé. La présence d'une E-box dans le gène codant pour Skp2 n'a pas été démontrée, pourtant, dans les cellules LNCaP sur-exprimant c-myc par infection rétrovirale, l'expression de Skp2 n'est pas altérée suite à l'inhibition de l'AR par un antagoniste, alors que dans les cellules LNCaP non infectées, l'inhibition de l'AR induit une diminution

d'expression de Skp2 et de c-myc. Ces données suggèrent donc que Skp2 peut être un gène-cible de c-myc (Bernard et al., 2003). L'implication de protéines comme Cul1 ou Skp2 dans l'effet du R1881 et de c-myc sur les cellules LNCaP reste à démontrer ou à confirmer.

Ainsi, la sous-régulation de c-myc pourrait donc avoir des répercussions à différents niveaux, et bouleverser non pas un seul médiateur de la transition G1-S, mais plusieurs, avec des répercussions en cascade aboutissant à l'accumulation en phase G1. Ceci pourrait expliquer que la sur-expression de Skp2 (Lu et al., 2002), ou l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens de p27 (Tsihlias et al., 2000) restaurent certains processus, mais ne suffisent pas à abolir le blocage en phase G1. La restauration d'un niveau faible de p27 ne peut en effet empêcher la diminution de l'expression des cyclines A, E ou D1, et de cdk2. En revanche, des études ont montré que la sur-expression de c-myc par infection rétrovirale des cellules LNCaP abolit l'effet anti-prolifératif du R1881 en présence de SVF complet (Kokontis et al., 1994), ou protège ces cellules de l'effet anti-prolifératif du Bicalutamide (Bernard et al., 2003). Ces données confortent donc l'idée selon laquelle c-myc est un acteur déterminant situé en amont du processus d'initiation du blocage en phase G1.

L'ensemble de ces travaux suggère que la sous-régulation de c-myc pourrait contribuer, au moins partiellement, à la sous-régulation des cyclines A et E, et à la stabilisation de p27. La diminution de c-myc pourrait aussi participer à la diminution de l'activité cdk2. Etant donné que la régulation négative de c-myc précède largement les variations observées sur les médiateurs du cycle, et étant donné les nombreuses connections, directes ou indirectes démontrées entre c-myc et ces régulateurs de la transition G1-S, il apparaît clairement que la sous-régulation précoce de c-myc est un événement-clé du blocage en phase G1 induit dans les cellules LNCaP en réponse au R1881.

Nos données nous permettent donc de présenter c-myc comme un gène-cible des androgènes, pouvant jouer un rôle important tant pour induire la prolifération que pour la réprimer. Les androgènes peuvent stimuler ou inhiber l'expression de c-myc de façon à accélérer ou ralentir la prolifération cellulaire. Le fait que c-myc soit régulé aussi rapidement que le PSA, et que les anti-androgènes antagonisent l'effet du R1881 sur les 2 gènes sont autant de preuves d'un lien direct entre le gène c-myc et l'AR.

Il reste à déterminer de quelle manière l'AR agit sur la régulation de c-myc. Les travaux renseignant des connexions entre c-myc et les androgènes montrent une régulation de c-myc au niveau de l'ARNm, suggérant la mise en jeu de l'activité transcriptionnelle de l'AR *in vivo* (Quarmby et al., 1987; Umekita et al., 1996) ou *in vitro* (Foury et al., 1998; Kokontis et al., 1994; Ling et al., 2001; Wolf et al., 1991). Seule une étude a suggéré un effet (post-) traductionnel de l'AR dans l'inhibition de c-myc en réponse à un anti-androgène (Bernard et al., 2003).

Nos données plaident en faveur d'une régulation transcriptionnelle, puisque l'ARNm de c-myc peut être sous-régulé en l'espace de 2 à 4 heures, et nous avons donc entrepris d'approfondir le mode d'action de l'AR sur le promoteur de c-myc. Or, la régulation du niveau d'ARNm de c-myc peut s'effectuer soit au niveau de l'initiation de la transcription, soit au niveau de l'élongation du transcrit, qui peut être stoppée, soit enfin au niveau de la stabilité de l'ARNm (Bentley & Groudine, 1986; Bentley & Groudine, 1988; Dani et al., 1984; Sears et al., 1999; Zhou et al., 2000).

Des travaux ayant proposé un effet des androgènes au niveau de l'initiation de la transcription (Wolf et al., 1992a), nous avons utilisé la technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP), afin de déterminer de façon indirecte si le traitement par le R1881 induit

une déacétylation des histones du promoteur de *c-myc*, ce qui prouverait un effet direct de l'AR sur le promoteur, et non sur l'élongation du transcrit ou sur la stabilité de l'ARNm.

Cette analyse nous a effectivement permis de mettre en évidence, dans les cellules LNCaP cultivées en présence de SVF complet, une diminution de l'acétylation des histones H3 de la chromatine, en réponse au R1881 sur le promoteur de *c-myc* (Fig.48). Ces résultats confirment donc l'hypothèse d'une régulation directe du promoteur, visant à réprimer la transcription en verrouillant la chromatine dans un état défavorable à l'initiation de la transcription.

L'implication de l'AR dans ce phénomène devient évidente si l'on compare les lignées LNCaP et LNCaP-FAR, puisque dans la lignée LNCaP-FAR, la déacétylation des histones du promoteur de *c-myc* est plus marquée et plus rapide que dans la lignée LNCaP (Fig 49).

Poursuivant cette analyse des événements moléculaires qui accompagnent l'effet du R1881 sur le promoteur de *c-myc in vivo*, nous avons montré, dans les cellules LNCaP-FAR, que le traitement induit également un recrutement important d'une Histone Déacétylase (HDAC-1) sur le promoteur de *c-myc* (Fig.50).

Le lien causal entre le recrutement de HDAC-1 et la déacétylation est mis en évidence à travers 2 constats

-d'une part, d'un point de vue cinétique, le recrutement de HDAC-1 précède la déacétylation des histones H3 du promoteur de *c-myc*.

-d'autre part l'inhibition spécifique de l'activité enzymatique des HDAC par la TSA abolit l'effet du R1881 sur l'acétylation des histones H3, ce qui prouve que ce sont les activités HDAC qui sont responsables de la déacétylation des histones du promoteur de *c-myc* (Fig.51).

La TSA n'a pas un effet inhibiteur sur une isoforme particulière de HDAC, ce qui sous-entend que d'autres HDAC peuvent être impliquées dans la déacétylation du promoteur de *c-myc*. Nous n'avons pas détecté un recrutement accru de HDAC2 en réponse au R1881, mais ne disposant pas des anticorps dirigés contre d'autres isoformes, nous ne pouvons pas affirmer que seule HDAC1 soit responsable de la déacétylation. Que des HDAC soient recrutées et que leurs activités enzymatiques soient responsables de la déacétylation des histones H3 du promoteur de *c-myc* n'en demeure pas moins évident.

Nous avons ensuite examiné le recrutement, sur le promoteur de *c-myc*, de l'enzyme-clé de la transcription, à savoir la RNA Polymérase II. Nous avons constaté que le traitement par le R1881 provoque l'élimination de cette enzyme du promoteur de *c-myc* (Fig.53). De plus, ce désengagement de la RNA Polymérase II se produit de façon concomitante avec le recrutement de HDAC-1, et précède donc la déacétylation des histones.

Le désengagement de cette enzyme-clé nous apporte donc la preuve finale d'un effet du R1881 sur l'initiation de la transcription de *c-myc*, et la cinétique de cet événement suggère qu'il se produit indépendamment du niveau d'acétylation des histones. Ceci pourrait expliquer la diminution de l'ARNm de *c-myc* lorsque les cellules sont co-traitées avec le R1881 et la TSA, bien que nous n'ayons pas rigoureusement vérifié cette hypothèse.

Ces données *in vivo* nous permettent donc de conclure que l'effet négatif du R1881 sur l'expression de *c-myc* a lieu au niveau de l'étape d'initiation de la transcription, il est médié par un désengagement de la RNA Polymérase II, et un recrutement accru de HDAC1, qui dirige la déacétylation des histones H3 du promoteur. Ces événements se produisent dans un intervalle de temps de 90min, et précèdent donc la diminution du niveau d'ARNm de *c-myc*.

L'AR en présence de son agoniste est donc capable de recruter des HDAC et d'induire un remodelage chromatinien pour réprimer la transcription d'un gène.

Si l'AR induit de nombreuses perturbations sur le promoteur de c-myc, son propre recrutement *in vivo* ne semble pas être affecté en réponse au R1881—we nous avons montré que l'AR est présent de façon constitutive sur le promoteur de c-myc, probablement sous l'effet de l'activation par les androgènes sériques, mais la quantité d'AR présente n'est ni augmentée, ni diminuée en réponse au R1881 additif (Fig. 54). En revanche, il est fortement recruté sur un ARE du gène du PSA, et il est absent du promoteur du gène contrôle L32, ce qui prouve qu'il ne s'agit pas là d'un signal aspécifique.

Ainsi, nos données suggèrent que l'AR est présent sur le promoteur de c-myc lorsque les cellules prolifèrent normalement en SVF complet, et l'ajout de R1881 induit des perturbations de l'environnement chromatinien, sans que l'AR lui-même ne soit affecté en termes de recrutement.

Notre hypothèse d'un recrutement permanent de l'AR sur le promoteur de c-myc lorsque les cellules sont cultivées en présence de SVF complet a été vérifiée grâce à l'étude du recrutement de l'AR sur le promoteur de c-myc, lorsque les cellules sont déprivées en androgènes sériques (élimination de l'AR) puis lorsqu'elles sont replacées pendant 2 heures en présence de SVF complet (recrutement de l'AR) (Fig.55).

De plus, il nous est possible d'établir dans ces conditions (retour en sérum complet) une corrélation évidente entre le recrutement de l'AR, l'expression de c-myc et le statut prolifératif des cellules—en effet, la déprivation androgénique conduit à l'élimination de l'AR du promoteur de c-myc, suivie d'une diminution de son expression, et les cellules cessent de proliférer. L'apport de sérum complet reverse ces processus, l'AR est à nouveau recruté, l'expression de c-myc augmente et les cellules recommencent à proliférer (Fig.55).

Ce profil de recrutement et de régulation de l'expression de c-myc se retrouve parfaitement lorsque le R1881 à 0,1nM est ajouté sur les cellules déprivées en androgènes sériques—le recrutement de l'AR augmente alors, de même que l'expression de l'ARNm de c-myc. Cette dose de 0,1nM de R1881 correspond à une stimulation maximale de la prolifération cellulaire dans l'effet biphasique. Ainsi, l'addition d'une faible dose de R1881 provoque les mêmes événements cellulaires que l'apport de sérum complet, tant en termes de recrutement de l'AR qu'en termes d'expression de c-myc et de stimulation de la prolifération (Fig. 56).

En revanche, les plus fortes doses ont un effet moindre sur la prolifération, et elles répriment l'expression de c-myc—sur le promoteur de c-myc, le R1881 à 100nM induit un recrutement de l'AR, à un niveau intermédiaire entre les cellules non traitées et les cellules traitées par 0,1nM, alors que sur l'ARE du PSA, le recrutement de l'AR augmente de façon dose-dépendante. Ceci suggère que le recrutement de l'AR est strictement dose-dépendant sur le promoteur du PSA, mais pas sur celui de c-myc (Fig.56).

D'un point de vue mécanistique, nous pouvons proposer des schémas potentiels du mode d'action de l'AR sur le promoteur de c-myc en réponse aux différentes conditions androgéniques testées.

Le promoteur de c-myc contient un élément en 5' du promoteur P2 (-336/-320), et il a été montré que cet élément contient en fait 2 sites chevauchant de liaison pour la protéine AP-1 et pour une Octamer-binding Protein (Takimoto et al., 1989). Il est intéressant de noter que ce site est caractérisé comme une séquence inhibitrice de l'expression de c-myc (Hay et al., 1987; Hay et al., 1989; Takimoto et al., 1989). En raison du chevauchement des 2 sites de

liaison, la fonction précise d'AP-1 sur cette séquence n'est pas élucidée. Cependant, si ce site AP-1 est fonctionnel, nous pouvons proposer l'hypothèse d'un cross-talk entre AR et AP-1. Les complexes AP-1 peuvent interférer avec la transactivation médiée par certains récepteurs nucléaires (dont l'AR), et réciproquement, l'AR peut interférer avec l'activité AP-1 (Saatcioglu et al., 1994). Les mécanismes sont encore sujets à débat, certains travaux suggèrent une compétition entre AP-1 et l'AR lié à son ligand pour des quantités limitantes de co-activateurs (CREB, CBP/p300), alors que d'autres travaux suggèrent une interférence transcriptionnelle mutuelle par interaction directe AR/AP-1 (Fronsdal et al., 1998; Kamei et al., 1996; Sato et al., 1997). Le LBD de l'AR serait nécessaire et suffisant pour la transrépression de l'activité AP-1, alors que la capacité de liaison de l'AR à l'ADN n'est pas requise (Lobaccaro et al., 1999). Dans tous les cas, l'effet de l'AR serait ligand-dépendant, promoteur-spécifique, et dépendrait de l'abondance relative entre AR, AP-1, et des co-activateurs (CREB etc). Cependant, si le site AP-1/Oct est un élément inhibiteur de l'activité du promoteur de c-myc, et puisque la fonction précise de ces 2 protéines n'est pas décrite, il est difficile d'extrapoler quant à l'effet d'un cross-talk AR/AP-1 sur un tel élément. Le fait que la liaison de l'AR à l'ADN ne soit pas nécessaire à ce cross-talk pourrait néanmoins expliquer que le recrutement de l'AR ne soit pas affecté par le R1881 pour réprimer l'expression de c-myc.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a mis en évidence la présence d'un ARE fonctionnel sur le promoteur de c-myc. Des travaux ont suggéré l'existence d'un site GRE sur le promoteur murin de c-myc, situé dans la région 5' du promoteur, à proximité du site sur lequel nous avons observé le recrutement de l'AR. Cet élément GRE a une très faible similarité de séquence avec les autres GRE connus, et il présente *in vitro* une très faible affinité pour GR (Ma et al., 2000). Sa fonction est paradoxale, puisque l'addition de Dexaméthasone stimule un gène rapporteur contenant cet élément, alors qu'*in vivo*, les Glucocorticoïdes répriment l'expression de c-myc, sans affecter la stabilité de l'ARNm, ce qui suggère un effet négatif au niveau de l'initiation de la transcription (Eastman-Reks & Vedeckis, 1986; Ma et al., 1992; Yuh & Thompson, 1989; Zhou et al., 2000). Par ailleurs, un GRE existerait aussi dans l'Intron I du gène murin de c-myc (Forsthoefel & Thompson, 1987). La possibilité pour l'AR de se lier sur de tels éléments ne peut être exclue, bien que nous n'ayons pas retrouvé ces séquences dans le promoteur humain (n°accès NCBI D10493). De plus, dans des cellules leucémiques humaines, les glucocorticoïdes répriment l'expression de c-myc, et une analyse sur un gène rapporteur contenant le promoteur humain de c-myc a montré que les glucocorticoïdes agissent non pas sur l'Intron I, mais sur une région (2kb) située en 5' du promoteur P1 (Zhou et al., 2000). On ne peut exclure que ces 2kb contiennent un élément GRE, mais le plasmide utilisé dans cette étude (HBM-Luc) n'a pas répondu au R1881 lorsque nous l'avons transfecté dans les cellules LNCaP.

En revanche, nous avons identifié (prédiction informatique par le programme MatInspector) 2 séquences présentant une forte homologie avec l'ARE consensus

AAGGAACCGCCTGTCCTTC	distal-2072/-2054 (5' de P1)
GGTACANNNTGTTCT	ARE consensus
ATTGTGTTAATTGTTCTCT	intronique-838/854 (Intron I)

L'élément distal a d'ailleurs été identifié auparavant comme un élément de réponse à la progestérone (PRE), capable d'intégrer *in vitro* avec PR, et nécessaire à l'effet positif de la progestérone sur l'expression de c-myc (Moore et al., 1997).

Nous avons donc analysé par ChIP le recrutement de l'AR sur ces 2 régions (non montré) à l'heure actuelle, nos données préliminaires ne semblent pas montrer un recrutement de l'AR significatif sur ces 2 ARE potentiels, ni une régulation évidente dans les différentes conditions androgéniques testées (SVF complet, DCC-SVF avec ou sans R1881). Puisque ces 2 régions sont très distantes du site TBE (-450) sur lequel nous avons montré le recrutement de l'AR, nous pouvons supposer que ces résultats ne sont pas biaisés par la longueur des fragments de chromatine générés par sonication. L'implication de ces ARE/PRE putatifs nous semble donc *a priori* peu probable dans notre système.

Il existe cependant une hypothèse qui attire davantage notre attention la région analysée par ChIP du promoteur de c-myc contient à proximité du site AP-1 un élément de liaison au facteur Tcf4 (TBE2, -450/-442) (He et al., 1998). Or, Tcf-4 est un facteur de transcription qui agit comme un effecteur terminal de la voie Wnt/ β -caténine (Hurlstone & Clevers, 2002) en absence de β -caténine nucléaire, les protéines Tcf répriment la transcription en se liant à des co-répresseurs transcriptionnels de la famille Groucho/TLE (Brantjes et al., 2001). Lorsque la voie de signalisation Wnt est activée, la β -caténine est stabilisée et s'accumule dans le noyau, où elle interagit directement avec Tcf-4 (Omer et al., 1999; Rubinfeld et al., 1996) elle stimule alors l'activité transcriptionnelle de Tcf-4, en recrutant de nombreux co-activateurs transcriptionnels comme CPB/p300, Brg1 ou CARM1 (Koh et al., 2002; van de Wetering et al., 1997).

Une stabilisation inappropriée de la β -caténine *via* différents mécanismes a été observée dans de nombreux cancers par exemple la diminution de la dégradation de la β -caténine due à une perte de la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) est à l'origine de certaines formes héréditaires de cancer du colon (Korinek et al., 1997). Ainsi, une expression accrue de la β -caténine peut être à l'origine d'une expression incontrôlée de c-myc et de désordres prolifératifs.

Des études ont montré par ailleurs que la β -caténine est un co-activateur de l'AR (Truica et al., 2000), elle augmente l'activité transcriptionnelle de l'AR en réponse au ligand, l'association physique AR- β -caténine augmente de façon ligand-dépendante dans les cellules LNCaP, et l'AR peut permettre la translocation de la β -caténine dans le noyau cellulaire de façon ligand-dépendante (Mulholland et al., 2002; Yang et al., 2002).

Tcf-4 peut lier la β -caténine et il peut lier aussi les co-répresseur Groucho/TLE. L'AR peut interagir directement avec Tcf-4 (Amir et al., 2003), avec la β -caténine (Yang et al., 2002), et avec le co-répresseur AES (Amino-terminal Enhancer of Split), qui est lui-même un membre de la famille Groucho/TLE (Yu et al., 2001). L'interaction de l'AR avec ces 3 protéines est ligand-dépendante.

Ainsi, la capacité de l'AR à interagir directement et en réponse au ligand avec les différents membres du réseau Tcf/ β -caténine/ Groucho suggère que l'un des modes d'actions de l'AR pourrait résulter d'un cross-talk important entre l'AR et les membres de ce réseau, sur le promoteur de certains gènes. Ces 3 dernières années, de nombreuses publications ont effectivement rapporté des cross-talks entre la voie de signalisation AR et la voie Tcf/ β -caténine. La parution quasiment simultanée de certaines d'entre elles et la diversité des modèles cellulaires utilisés rend difficile la comparaison des résultats présentés et de nombreuses données sont contradictoires. Le schéma général qui émerge de l'ensemble de ces travaux suggère l'existence d'une interférence entre l'AR et Tcf-4, par compétition pour la β -caténine. Ce phénomène serait promoteur-spécifique, et ligand-dépendant.

Des essais de transfection ont montré que l'AR+DHT réprime l'activité d'un gène rapporteur répondant à Tcf/ β -caténine, et inversement, la co-transfection de Tcf/ β -caténine

réprime l'activité DHT-induite d'un gène rapporteur AR-dépendant (MMTV) dans des cellules neuronales (Pawlowski et al., 2002).

Dans des cellules cancéreuses prostatiques (22rv-1, LAP-C4 et DU-145), la transcription médiée par Tcf/ β -caténine sur un promoteur artificiel est inhibée par les androgènes, de façon AR-dépendante (Chesire & Isaacs, 2002). La répression par le couple AR-ligand de l'activité de Tcf/ β -caténine sur un gène rapporteur peut être abolie par une sur-expression de Tcf-4 dans les cellules 22rv-1 (Chesire & Isaacs, 2002), ce qui suggère effectivement un phénomène de compétition.

Consolidant cette hypothèse de compétition, il a été montré que la sur-expression de Tcf-4 diminue l'interaction AR/ β -caténine et l'activité transactivatrice AR-dépendante du gène rapporteur MMTV, et qu'en absence de β -caténine, l'AR n'a pas d'effet en présence de ligand sur l'activité transcriptionnelle de Tcf-4 (Song et al., 2003).

Cet effet répresseur de l'AR-ligand sur l'expression Tcf-dépendante n'est vraisemblablement pas médiée par une diminution de l'expression de la β -caténine ou de Tcf (Mulholland et al., 2003; Pawlowski et al., 2002).

Plus contradictoires sont les données renseignant du mécanisme de la compétition entre ces différents partenaires, puisque les sites d'interaction sont encore sujets à controverses. Des données indiquent que la β -caténine interagit avec l'AR au niveau du LBD exclusivement (Song et al., 2003; Yang et al., 2002), ou que le DBD et le LBD sont nécessaires (Mulholland et al., 2002). Certains groupes ont montré que le LBD de l'AR peut à lui seul interférer avec la transcription médiée par Tcf/ β -caténine, en présence de ligand (Mulholland et al., 2003; Song et al., 2003), tandis qu'un autre groupe a montré que la présence du DBD est indispensable pour obtenir le même effet (Chesire & Isaacs, 2002).

Si le DBD de l'AR participe à l'interaction avec la β -caténine, et si le DBD est indispensable pour réprimer l'activité Tcf, cela peut signifier que la répression de la transcription est médiée exclusivement par l'interaction AR- β -caténine. Cependant, il a été montré par la suite que le DBD de l'AR permet aussi l'interaction directe avec Tcf-4 (Amir et al., 2003), de façon ligand-dépendante. Si il y a compétition entre l'AR et Tcf-4 pour des quantités limitantes de β -caténine, il est donc difficile de dire si cette compétition se produit ou non par le biais d'une interaction directe entre l'AR et Tcf-4. Cependant, dans les cellules SW480 transfectées avec l'AR, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que le traitement par la DHT induit une diminution de l'association Tcf/ β -caténine et une augmentation de l'association AR/ β -caténine, alors que les complexes Tcf/AR sont visibles mais leur association ne semble pas affectée par le traitement (Mulholland et al., 2003).

Nos données concernant la répression de l'expression de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en présence de SVF pourraient relever d'un tel scénario. Sous l'effet du R1881, l'AR est activé et transloque dans le noyau en grande quantité, il est alors en excès par rapport à Tcf-4, et par compétition, il récupère la β -caténine. La transcription de c-myc est alors abrogée par élimination d'un signal positif, qui laisse la place aux co-répresseurs. L'AR co-activé par la β -caténine peut alors se lier à des gènes-cibles spécifiques, comme le PSA, et augmenter leur transcription de façon dose-dépendante. Cet effet répresseur de l'AR pourrait expliquer que la quantité d'AR recrutée sur le promoteur de c-myc ne soit pas affectée par le traitement, puisque ce serait l'AR transloqué en excès qui serait en compétition avec Tcf-4 (Fig.54 et Fig.57C). Ceci corroborerait les travaux de Mulholland et al., qui ont montré l'existence de complexes immunoprécipités AR/Tcf-4, sans que le traitement par la DHT ne module leur quantité (Mulholland et al., 2003).

D'autre part, conformément à ce que nous avons constaté, il a été montré que le Bicalutamide peut antagoniser l'effet inhibiteur de l'AR-ligand sur un gène rapporteur Tcf-sensible, en empêchant l'association DHT-induite de l'AR avec la β -caténine, et en empêchant la dissociation DHT-induite de Tcf-4 avec la β -caténine (Mulholland et al., 2003).

L'absence d'effet agoniste du CPA sur l'expression de c-myc dans notre système en présence de SVF complet vient renforcer cette hypothèse de l'interférence AR/Tcf. Des travaux ont montré que l'AR sauvage ou muté, lié au CPA, peut transloquer dans le noyau, mais il est incapable de se lier à la β -caténine (Amir et al., 2003; Chesire & Isaacs, 2002; Masiello et al., 2004; Pawlowski et al., 2002). L'AR-CPA est donc incapable d'entrer en compétition avec Tcf-4 pour la β -caténine, ce qui explique qu'il ne puisse pas réprimer à lui seul l'expression de c-myc et la prolifération (Fig.35, Fig.46 et Fig.57E). En revanche, il stimule l'expression du PSA, ce qui montre bien d'une part qu'il est transcriptionnellement actif sur l'AR, et d'autre part que l'interférence AR/Tcf est promoteur-spécifique. Enfin, le CPA serait capable d'antagoniser l'effet du R1881, probablement en se liant à l'AR et en abolissant sa liaison avec la β -caténine.

Ainsi, ces données suggèrent fortement que dans notre système, la répression de c-myc induite par le R1881 dans les cellules LNCaP en SVF complet passe par une inhibition de l'activité Tcf-4 en compétition avec l'AR pour la β -caténine.

Bien que de nombreux travaux se soient intéressés à cet effet inhibiteur de l'AR sur la voie Tcf, il s'agit le plus souvent de données utilisant un gène rapporteur constitué d'un promoteur artificiel (par exemple β -TOPFLASH) β ce promoteur est en fait constitué de plusieurs sites TBE juxtaposés, contrôlant l'expression de la Luciférase (Mulholland et al., 2003). Peu de travaux ont utilisé un promoteur naturel entier, et aucune publication à notre connaissance, n'a utilisé un gène rapporteur constitué du promoteur de c-myc.

En dehors de promoteurs artificiels, le modèle le plus souvent utilisé pour ces tests d'activité de gène rapporteur montrant l'inhibition AR/Tcf est en fait un autre gène-cible connu de Tcf-4, la Cycline D1. Or, nous avons montré dans notre système que le traitement des cellules LNCaP par le R1881 diminue l'expression de la Cycline D1, de façon tardive par rapport à c-myc, et surtout, cette répression n'a pas lieu au niveau transcriptionnel, puisque les taux d'ARNm de la cycline D1 sont inchangés β puisque la cycline D1 et c-myc sont 2 gènes-cibles de Tcf-4, il est surprenant, dans l'hypothèse d'une compétition AR-Tcf, que seul c-myc soit concerné. Dans leurs travaux utilisant un gène rapporteur cycline D1-Luc, Mulholland et al. ont observé une répression AR-induite de l'activité de ce rapporteur dans des cellules de cancer du colon mais pas dans les cellules prostatiques, alors que dans les 2 types de lignée, l'AR réprime l'activité du gène rapporteur TOPFLASH (Mulholland et al., 2003) β d'après les auteurs, ce résultat paradoxal peut s'expliquer par une différence d'activité de la cycline D1, beaucoup plus forte dans les cellules du colon que dans les cellules prostatiques. L'activité de la cycline D1 dans la prostate n'est pas constitutive, et la faible activité Tcf dans les cellules prostatiques par rapport au colon pourrait expliquer que dans la prostate, la cycline D1 ne soit pas une cible majeure de l'antagonisme Tcf-AR.

Les cellules de cancer du colon sont considérées comme un excellent modèle de l'étude de ce cross-talk car elles expriment des niveaux très élevés de Tcf et de β -caténine, contrairement aux cellules prostatiques β la faible expression de Tcf dans les cellules prostatiques, (Mulholland et al., 2003), pourrait également expliquer l'absence de réponse des gènes rapporteurs (Del-1, -2, -3 et -4) utilisés dans notre travail (Fig.47).

Mais comment expliquer alors le recrutement basal de l'AR sur ce promoteur en présence de SVF complet, et l'augmentation du recrutement et de la transcription lorsque les cellules sont déprivées puis supplémentées en hormones β

Nous pouvons imaginer qu'en présence de SVF complet, l'AR est recruté sur le promoteur de *c-myc* en se liant à Tcf-4 (Fig.57B). De ce fait, l'élimination des androgènes sériques inactiverait l'AR, qui se détacherait du promoteur, et inversement, la supplémentation en sérum permettrait de nouveau son recrutement (Fig.57 A et B). Nos données de CHIP en DCC-SVF sont en faveur de cette hypothèse (Fig. 55 et Fig.56).

La faible quantité de Tcf présente dans les cellules LNCaP rend difficile son immunoprécipitation, comme d'autres auteurs l'ont constaté—cependant, dans la lignée LAP-C4, exprimant davantage de Tcf, le traitement par la DHT en présence de DCC-SVF se traduit par une augmentation des complexes AR/Tcf co-immunoprécipités (Amir et al., 2003), ce qui plaide en faveur de notre hypothèse. Ces auteurs montrent également que dans les cellules LNCaP traitées par la DHT en présence de DCC-SVF, l'AR est recruté sur le promoteur de *c-myc* (région TBE), mais l'expression de *c-myc* dans ces conditions n'est pas mentionnée. Ces travaux, bien que réalisés sur 2 lignées distinctes, suggèrent donc qu'en situation de déprivation androgénique, comme nous l'avons constaté, l'AR interagit davantage avec Tcf-4 en réponse au R1881, et peut alors se lier au promoteur de *c-myc*, *via* le site TBE.

Puisque dans ces conditions l'expression de *c-myc* est stimulée, nous pouvons proposer que l'interaction AR-Tcf en situation de supplémentation en hormones (à faible dose) ne provoque pas une compétition avec la β -caténine, mais favoriserait au contraire l'activation du promoteur de *c-myc* (Fig.57 B ou D). Il pourrait exister un équilibre entre les quantités de Tcf et d'AR, de telle sorte que la β -caténine ne serait plus un facteur limitant. Puisque l'AR peut lier certains co-répresseurs de Tcf (Groucho/AES), il est possible aussi qu'il empêche ces co-répresseurs de se lier à Tcf, par encombrement stérique, permettant l'activité basale du promoteur. La stimulation de *c-myc* serait alors indépendante de la β -caténine. En revanche, au-delà d'une certaine dose d'hormone, de plus grandes quantités d'AR sont transloquées, et la compétition AR/Tcf entre en jeu, aboutissant à la diminution de l'expression de *c-myc* dans l'effet biphasique.

Là encore, l'effet du CPA peut renforcer cette hypothèse—en DCC-SVF, le CPA peut transloquer dans le noyau et activer l'AR, et dans ces conditions, nous avons constaté qu'il stimule la prolifération, l'expression du PSA mais aussi celle de *c-myc*—ceci pourrait suggérer qu'effectivement, la compétition pour la β -caténine n'est pas impliquée dans la stimulation ligand-induite de l'expression de *c-myc*, puisque l'AR lié au CPA ne s'associe pas à la β -caténine (Fig.57D). Il existerait donc une coopération AR/Tcf pour stimuler l'expression de gènes-cibles, et la perturbation de cet équilibre au-delà d'une certaine dose d'hormone contribuerait à la diminution d'expression de *c-myc* et à l'effet anti-prolifératif du R1881.

La perturbation du système Tcf/ β -caténine joue un rôle physio-pathologique reconnu, en particulier dans le cancer colo-rectal (Morin et al., 1997; van de Wetering et al., 1997). Les interactions mutuelles entre la voie Tcf/ β -caténine et certains récepteurs nucléaires ont été démontrées, notamment pour les récepteurs à l'acide rétinoïque (Easwaran et al., 1999) ou les récepteurs des hormones thyroïdiennes (Miller et al., 2001).

L'implication de *c-myc* dans ces interactions semble également émerger, pour l'AR comme pour d'autres récepteurs nucléaires, à l'image du récepteur PPAR—qui en présence de son ligand sous-régule l'expression de *c-myc* *via* le blocage de l'activité de Tcf-4, ce qui conduit à l'apoptose dans des cellules leucémiques (Yamakawa-Karakida et al., 2002). L'hypothèse d'une interférence AR/Tcf n'exclut pas cependant l'implication du site AP-1—une compétition entre Tcf et l'AR d'une part, et entre AP-1 et l'AR d'autre part pourraient participer conjointement à la répression de l'activité du promoteur de *c-myc*.

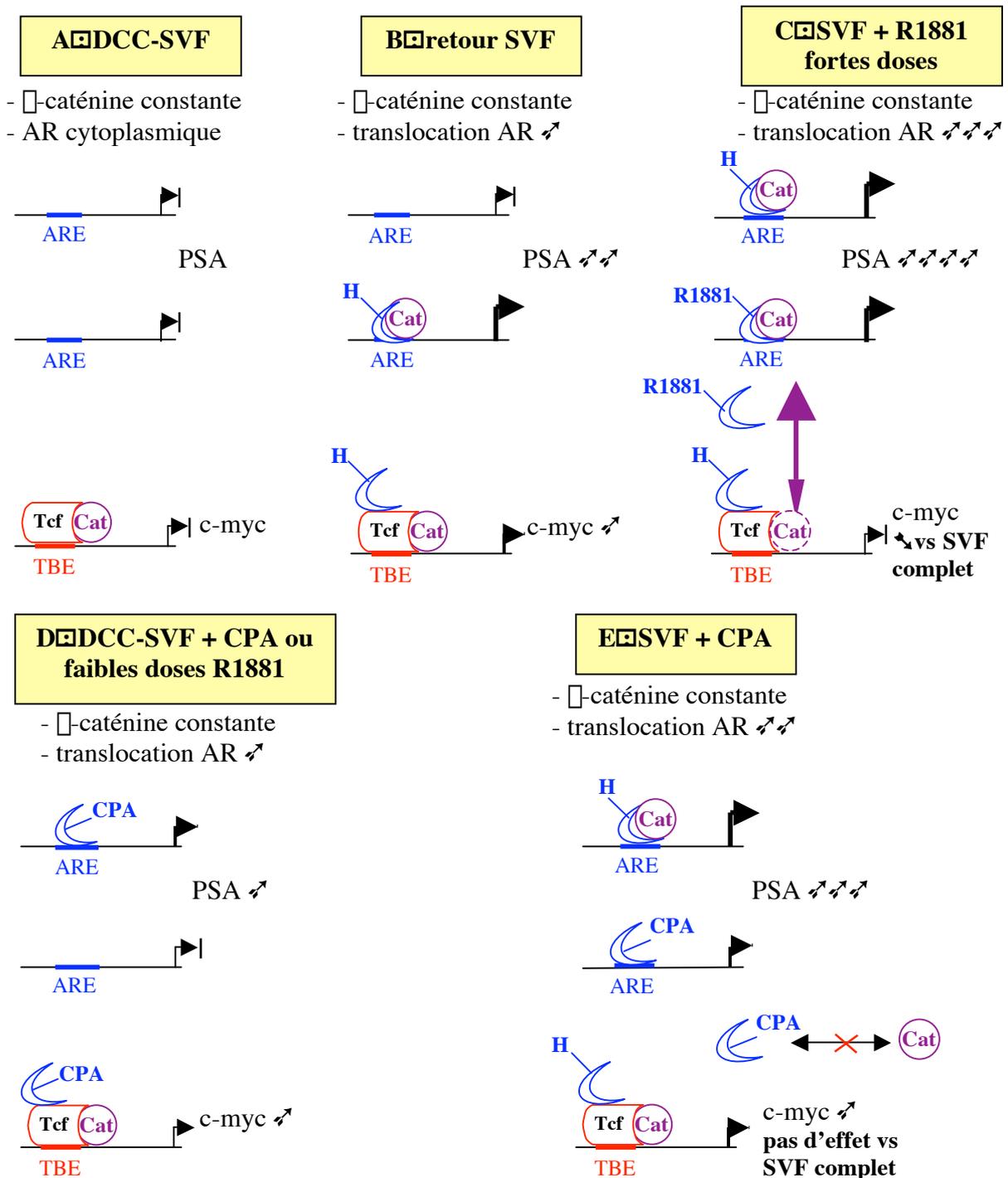


Figure 57 Mécanismes potentiels impliqués dans le contrôle de l'expression de c-myc par la voie AR/Tcf/ β -caténine dans les cellules LNCaP.

TBE \square site de liaison à Tcf. ARE \square élément de réponse aux androgènes. Les flèches \nearrow ou \nwarrow symbolisent quantitativement l'augmentation ou la diminution de l'expression de c-myc ou du PSA, exprimées par rapport à la situation A. **A** en absence d'hormones (DCC-SVF), l'activité Tcf est minimale sur le promoteur de c-myc et le PSA n'est pas transcrit. **B** la supplémentation en SVF complet active l'AR, qui stimule l'expression du PSA et stimule l'expression de c-myc. **C** l'ajout de fortes doses de R1881 amène à la translocation d'une quantité excessive d'AR, et il se produit alors une compétition entre AR et Tcf pour la β -caténine (Cat), au profit de l'AR, ce qui peut permettre une expression accrue du PSA. **D** le CPA, ajouté en présence de DCC-SVF, permet la translocation de l'AR et l'activation β -caténine-indépendante de la transcription de c-myc et du PSA. **E** en présence de SVF complet, l'AR activé par les androgènes sériques (H) stimule toujours la transcription de c-myc, et l'AR activé par le CPA, étant incapable de lier la β -caténine, ne stimule que la transcription du PSA.

Cependant, aucune des 2 hypothèses ne permet d'expliquer de façon convaincante le recrutement accru de HDAC-1 et le désengagement de la RNA Polymérase II en réponse au R1881. Il est possible que l'élimination d'éléments activateurs (comme CBP/p300 dans le cas d'une interférence avec AP-1) puisse favoriser le recrutement d'éléments répresseurs, mais cela reste à démontrer. Dans des tests de transfection transitoire, le promoteur de c-myc peut être réprimé par différents facteurs de transcription, notamment MBP-1 (Chaudhary & Miller, 1995), Mxi (Lee & Ziff, 1999), PU.1 (Kihara-Negishi et al., 2001) ou Blimp-1 (Yu et al., 2000), et la plupart sont capables d'interagir avec des HDAC. L'importance *in vivo* de ces facteurs est peu connue, et aucun lien fonctionnel avec l'AR n'a été démontré à notre connaissance.

Le schéma d'action du R1881 dans notre système suggère un phénomène de répression active, puisqu'il implique le recrutement de HDAC et le désengagement de la RNA Polymérase II. Pourtant, nos 2 hypothèses mettent en jeu à l'inverse un mécanisme passif, par interférence avec un mécanisme activateur.

Aucune publication, à notre connaissance, n'a établi un profil actif de répression transcriptionnelle médié par un récepteur nucléaire et son ligand agoniste, en absence *à priori* d'élément de réponse. Les travaux sur la répression médiée par TR pourraient représenter un modèle proche de notre situation, puisque le récepteur TR peut stimuler ou réprimer la transcription du gène codant pour la sous-unité β de la TSH, en induisant par lui-même soit le recrutement d'activateurs transcriptionnels, soit au contraire le recrutement de co-répresseurs et de HDAC, et ce sous l'effet de la liaison avec le ligand (Sasaki et al., 1999; Steinfeldt & Wondisford, 1997). Mais ces effets seraient médiés par un élément de réponse négatif. Dans notre cas, la présence d'un ARE de faible affinité ne peut être exclue, ni l'implication des GRE/PRE potentiels, mais leur fonctionnalité n'a pas été démontrée *in vivo*, et nos données préliminaires ne suggèrent pas leur implication. Dans le cas de l'AR, il peut réprimer en présence de DHT la transcription du gène codant pour la sous-unité β de l'hormone LH, et ce gène contient un ARE de forte affinité. Néanmoins, la répression serait indépendante de la liaison AR-ADN, elle serait plutôt médiée par une interférence avec des facteurs de transcription positifs (c-jun, ATF2) par une interaction protéine-protéine directe, sans intervention d'activités HDAC (Heckert et al., 1997; Jorgensen & Nilson, 2001).

Sur un plan plus fondamental, nos travaux ouvrent donc des voies intéressantes sur le phénomène peu connu de la répression transcriptionnelle (par transrépression ou interférence) médiée par les récepteurs nucléaires en présence de leur agoniste.

L'utilisation de c-myc comme modèle d'un tel phénomène permet également d'établir un lien fonctionnel entre l'AR, c-myc et la croissance cellulaire, dans un contexte clinique plus général, associant le contrôle de la transcription et le contrôle de la prolifération.

C-myc, l'AR et le complexe Tcf/ β -caténine ne sont certainement pas impliqués à mesure égale dans le cancer de la prostate, en termes d'étiologie et/ou d'évolution.

Dans le cancer de la prostate, des mutations de la β -caténine ou des aberrations au niveau de sa localisation nucléaire ont été mis en évidence dans des échantillons de tumeurs primaires (Cheshire & Isaacs, 2002), et des mutations de l'exon 3 du gène de la β -caténine, contrôlant la stabilité de la protéine, ont été retrouvées dans 5% des tumeurs primaires (Voeller et al., 1998). Concernant c-myc, sa sur-expression a été démontrée dans un nombre significatif de tumeurs avancées, métastatiques, peu différenciées et dans des tumeurs réfractaires à la thérapie anti-hormonale (Buttayan et al., 1987; Kaltz-Wittmer et al., 2000).

Contrairement à la β -caténine, l'expression de c-myc serait donc plutôt impliquée dans l'évolution du carcinome prostatique, comme un marqueur en terme d'agressivité.

Dans ce contexte, il serait donc intéressant de poursuivre l'analyse fonctionnelle de la voie AR/Tcf/ β -caténine vis-à-vis de c-myc.

Les cellules LNCaP représentent pour cela un bon modèle, puisqu'elles sont androgéno-dépendantes, et qu'elles peuvent devenir androgéno-indépendantes. Il serait alors possible de suivre, au cours de l'acquisition d'une androgéno-indépendance, l'évolution fonctionnelle des différents acteurs de ce système, l'évolution de leurs interactions et des effets en termes de prolifération/tumorigénicité.

Enfin, puisqu'elles représentent un modèle d'Intracrinologie, la réponse de ce système à d'autres androgènes, notamment les androgènes surrenaliens, pourrait permettre d'établir l'impact physiologique de ce système dans un contexte reproduisant artificiellement la thérapie anti-androgénique.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de notre travail a été d'examiner le rôle des androgènes surrénaliens, en particulier le S-DHEA, en tant que précurseurs d'androgènes actifs, dans un modèle de cellules cancéreuses prostatiques susceptibles de fonctionner selon un mode intracrine. Ainsi, nous avons montré que ces cellules LNCaP sont capables de convertir les précurseurs surrénaliens en androgènes actifs, notamment la DHT, mais qu'elles possèdent également une importante capacité de détoxification, au moyen d'enzymes de conjugaison (sulfo-transférases et surtout glucuronosyl-transférases). Nous avons également montré que la conversion du S-DHEA en androgènes n'est pas aussi importante que ce que nous pouvions prévoir, au regard de sa concentration physiologique très élevée. Son métabolisme est relativement faible par rapport à celui de la DHEA ou de la DHT, suggérant que la cellule dispose de moyens pour contrôler un apport aussi excessif de précurseur. Cependant, la quantité non négligeable d'androgènes formés, tant à partir de la DHEA qu'à partir du S-DHEA, pose la question de savoir quelle serait la réponse proliférative des cellules à l'apport de ces précurseurs. Nos données issues de tests de prolifération indiquent que les androgènes surrénaliens peuvent exercer un effet androgénique, comparable qualitativement à celui de la DHT, à savoir, selon les conditions expérimentales, une stimulation ou un ralentissement de la prolifération *in vitro*. Quantitativement, ces androgènes surrénaliens restent moins efficaces que la DHT, et de plus, leur effet n'est pas significatif lorsqu'ils sont utilisés à concentration physiologique. Ces données relativisent donc la portée biologique de l'Intracrinologie dans des cellules cancéreuses prostatiques, mais il n'en demeure pas moins que le rôle de ces précurseurs dans des cancers hormono-sensibles ne peut être négligé, comme l'ont montré des travaux antérieurs du laboratoire dans le cadre du cancer du sein (Le Bail et al., 2002).

Même si les effets biologiques des précurseurs surrénaliens ne sont pas aussi importants quantitativement que nous aurions pu le croire, ils présentent néanmoins un effet prolifératif potentiel qui mériterait d'être mieux défini. Nos données nécessitent d'être confirmées, par une approche plus précise et plus quantitative. Pour mieux identifier les produits formés et les voies métaboliques empruntées, nous pourrions analyser le métabolisme à des intervalles de temps plus courts et plus rapprochés, et en utilisant comme substrats des androgènes intermédiaires, et ce afin de mieux « suivre » les produits formés, pour dégager un schéma de la succession des différents produits obtenus. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certaines enzymes de la stéroïdogénèse apporterait également des précisions quant à la nature de certains produits non encore identifiés. Une stratégie utilisant un système de GC/MS ou LC/MS permettrait de disposer d'un plus grand nombre de standards pour l'identification, et un système de quantification plus rigoureux serait également indispensable (standard interne). Pour s'affranchir des problèmes de sensibilité de notre système, nous pourrions imaginer de travailler avec de plus grandes quantités de matériel biologique (en combinant plusieurs extraits préparés en parallèle à partir de plusieurs boîtes de culture) et/ou d'utiliser un système préparatif permettant d'analyser des mélanges moins complexes, ce qui gagnerait en spécificité. Pour approfondir les effets prolifératifs des androgènes surrénaliens, et déterminer s'ils agissent directement ou par le biais de leurs métabolites, nous pourrions envisager d'analyser la réponse proliférative des cellules en présence de cocktails d'inhibiteurs enzymatiques, ce qui n'empêche pas de déterminer également, par des tests de liaison à l'AR, si une interaction directe est possible. Enfin, une approche *in vivo* permettrait de mieux renseigner des effets de la supplémentation par ces hormones sur le carcinome prostatique, chez des animaux castrés ou non. L'utilisation de modèles de tumeurs prostatiques orthotopiques permettrait de prendre en compte la dimension tissulaire des phénomènes

observés, en reproduisant au plus proche une situation clinique (interactions épithélium-stroma, angiogenèse, détoxification hépatique etc).

Puisque les cellules LNCaP semblent capables de limiter le métabolisme du S-DHEA, pour empêcher une trop forte formation d'androgènes actifs, il serait intéressant d'approfondir, sur le plan moléculaire, les mécanismes mis en œuvre. Nous avons mentionné l'hypothèse des transporteurs permettant d'importer le S-DHEA dans les cellules, et compte-tenu de la maigre Littérature renseignant de ces transporteurs dans le carcinome prostatique, il nous semble justifié d'explorer leur fonctionnalité dans notre modèle. Leur niveau d'expression dans des lignées et des tissus (androgéno-dépendants ou indépendants, sains ou malins), leur mode de fonctionnement, et surtout leur régulation seraient des paramètres d'importance. Puisque les précurseurs surrénaliens constituent un obstacle à la réussite de la thérapie anti-androgénique par castration, ces transporteurs pourraient être des cibles potentielles en vue de limiter leur conversion intracrine par les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes.

L'objectif central de notre Thèse a été de documenter les mécanismes par lesquels les androgènes, synthétiques ou naturels, peuvent induire chez les cellules LNCaP, une répression paradoxale de la prolifération cellulaire.

Nous avons montré que le traitement androgénique induit un blocage des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire, médié par des modifications de l'expression de différents régulateurs du cycle cellulaire, en particulier p27. Nous avons également prouvé l'implication de l'AR dans l'induction de ce phénotype, mais bien que l'AR soit un facteur de transcription, aucun des différents régulateurs du cycle ne semble être une cible directe de l'AR. En revanche, nous avons démontré que le proto-oncogène *c-myc* occupe une place primordiale dans les voies de signalisation androgénique, et qu'il se situe à l'interface entre les androgènes d'une part, et leur effet prolifératif ou anti-prolifératif d'autre part. Son profil de régulation nous autorise à le situer clairement comme un gène-cible des androgènes, au même titre que le PSA, à ceci près que l'expression de *c-myc* peut être induite ou réprimée transcriptionnellement par l'AR en présence d'androgènes, tandis que la transcription du PSA est toujours stimulée. Une analyse mécanistique nous a permis de mettre en évidence un schéma complexe de la répression transcriptionnelle de *c-myc* par les androgènes, impliquant le recrutement de HDAC, un remodelage chromatinien, et un désengagement de la RNA Polymérase II. L'analyse du recrutement *in vivo* de l'AR sur le promoteur de *c-myc*, dans différentes conditions de déprivation ou de supplémentation en hormones nous a amené finalement à proposer un schéma intéressant du mode d'action de l'AR pour stimuler ou réprimer l'expression de *c-myc* en présence d'agonistes.

Le phénotype anti-prolifératif induit par les androgènes, dont nous avons développé ici les mécanismes dans une lignée cellulaire particulière, ne doit pas être considéré comme une situation annexe, ou accessoire dans le cadre général du tissu prostatique. C'est une situation qui certes, va à l'encontre du schéma classique de l'hormono-dépendance du tissu prostatique, mais qui a néanmoins un sens biologique, tant dans la prostate normale que dans la prostate tumorale.

D'un point de vue physiologique, la capacité des androgènes à stimuler ou à réprimer la croissance peut refléter un double rôle dans la mesure où ils sont capables de diriger la croissance tissulaire au cours du développement, puis de maintenir l'état différencié une fois que l'organe a atteint sa maturité. Dans des études animales, la castration provoque l'atrophie

du tissu prostatique, et l'apport consécutif de Testostérone restaure la croissance tissulaire, en augmentant le nombre de cellules proliférantes, pendant un certain temps. Au-delà, malgré l'apport continu de Testostérone, le taux de cellules proliférantes diminue, et revient au même niveau que chez les animaux non castrés (Mirosevich et al., 1999). Sur le plan mécanistique, l'acquisition de la différenciation et l'arrêt de croissance des cellules épithéliales prostatiques sont associés à une élévation progressive de l'expression de p27 (après une répression initiale accompagnant la re-croissance), au fur et à mesure que le taux de cellules cyclantes diminue (Chen et al., 1996). Ainsi, une fois que le tissu a retrouvé sa fonctionnalité, les androgènes passent d'une fonction de stimulation de la croissance à une fonction de maintien de la différenciation.

Ce phénotype différencié androgéno-induit a été montré dans différents types de cellules épithéliales non tumorales immortalisées, provenant de tissu prostatique humain (Ling et al., 2001), ou de rat (Whitacre et al., 2002). Il a enfin été établi que la présence de l'AR est nécessaire à l'induction d'une différenciation par les androgènes.

Il existe donc physiologiquement une dichotomie dans la fonction des androgènes et de l'AR sur le contrôle de la croissance de l'épithélium prostatique, et l'effet négatif serait en quelque sorte la voie ultime de ce contrôle (Soto & Sonnenschein, 1991).

Les altérations génétiques conduisant à l'hypertrophie bénigne ou au cancer de la prostate peuvent dysréguler cette voie de différenciation physiologiquement induite par les androgènes, et/ou favoriser la survie et l'émergence de clones moins sensibles à ce phénomène. Il existe effectivement des données illustrant le fait que les cellules cancéreuses peuvent présenter un phénotype différencié en réponse aux androgènes. En ce sens, les cellules LNCaP ne font pas figure d'exception.

Ainsi, les lignées humaines ALVA-41 et MDA-PCa-2A expriment l'AR, et elles répondent à la DHT de façon biphasique, comme les cellules LNCaP, suggérant la persistance, dans ces lignées, du phénotype anti-prolifératif androgéno-induit (Nakhla & Rosner, 1994; Zhao et al., 1999). La fonctionnalité de cette répression androgénique a été observée avec les cellules LNCaP *in vivo*, puisque des tumeurs de cellules LNCaP implantées dans des souris nude 1) se développent lorsque les souris ne sont pas castrées, 2) ne se développent pas si elles sont castrées et 3) ne se développent pas si elles sont castrées et si elles reçoivent en plus de très fortes quantités de DHT (15mg/animal) (Sonnenschein et al., 1989). *In vitro*, les cellules LNCaP dont la prolifération est réprimée par de fortes doses d'androgènes perdent la capacité à former des colonies lorsqu'elles sont cultivées sur milieu semi-liquide, ce qui suggère également une perte du phénotype transformé (Wolf et al., 1991).

Les cellules PC-3 sont également sensibles à cet effet anti-prolifératif androgéno-induit lorsqu'elles expriment l'AR de façon stable (Heisler et al., 1997; Terouanne et al., 2000; Yuan et al., 1993), ce qui démontre l'implication de l'AR dans ce processus.

Les cellules cancéreuses peuvent donc elle aussi exprimer cette réponse binaire aux androgènes, ce qui suggère que l'acquisition androgéno-induite d'une différenciation peut être une caractéristique du tissu prostatique sain, pouvant être perdue puis restaurée artificiellement dans des cellules cancéreuses *in vivo/ in vitro*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le processus de cancérisation rend les cellules moins sensibles à ce pouvoir de différenciation par les androgènes, ce qui expliquerait que l'effet anti-prolifératif s'observe à des doses relativement fortes.

Il existe un cas de figure expérimental dans lequel le pouvoir anti-prolifératif des androgènes sur des cellules cancéreuses prostatiques s'exerce pleinement, il s'agit de modèles de cellules exprimant l'AR et ayant acquis une androgéno-indépendance.

Les cellules LNCaP déprivées en androgènes pendant de longues périodes acquièrent un comportement androgéno-indépendant, et dans ces conditions, les androgènes répriment la prolifération *in vitro* et *in vivo* (Culig et al., 1999; Kokontis et al., 1994; Umekita et al., 1996). Au cours de la déprivation et de l'acquisition de l'androgéno-indépendance, Culig et al. ont montré que les cellules sont de plus en plus sensibles à l'effet biphasique du R1881, jusqu'à la situation extrême où même les plus faibles doses de R1881 ralentissent la prolifération (Culig et al., 1999) : ainsi, l'acquisition d'une inhibition de prolifération par les androgènes résulte d'une hyper-sensibilisation progressive à un phénomène pré-existant limité aux plus fortes doses. Cette hyper-sensibilité serait liée à une augmentation d'expression et d'activité de l'AR au cours de la déprivation sans que la séquence du gène ne soit altérée ou qu'il soit amplifié (Culig et al., 1999; Kokontis et al., 1994). D'ailleurs, nous avons constaté que la lignée LNCaP-FAR est capable de proliférer plus activement en DCC-SVF, et les androgènes exogènes répriment fortement la prolifération. Ceci confirme donc les travaux de Culig et al. ou Kokontis et al. dans la mesure où la seule sur-expression de l'AR nous a permis de générer un effet anti-prolifératif similaire à celui que ces auteurs ont observé suite à une déprivation (Culig et al., 1999; Kokontis et al., 1994).

Les cellules ARCaP représentent un autre exemple expérimental d'un tel phénotype□ elles ont été obtenues à partir des fluides ascitiques d'un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique et vraisemblablement réfractaire à la thérapie anti-androgénique. La lignée ARCaP exprime l'AR non muté, elle a été caractérisée comme tumorigénique *in vivo* et androgéno-indépendante *in vitro* et *in vivo* (Zhau et al., 1996). Plus intéressant encore, la prolifération de cette lignée est supprimée par les androgènes (R1881, testostérone, DHT), *in vitro* et *in vivo* chez la souris nude castrée (Zhau et al., 1996).

Puisque ces 2 lignées LNCaP et ARCaP proviennent de patients en échappement thérapeutique, on peut postuler que le phénotype de répression androgénique pourrait être une caractéristique d'une certaine proportion de cancers réfractaires. Le fait que les cellules LNCaP puissent passer d'un statut androgéno-dépendant à un statut androgéno-indépendant selon les conditions hormonales suggère que la cellule possède intrinsèquement les voies nécessaires aux 2 phénotypes, et qu'elles ne sont pas immuables.

Les effets anti-prolifératifs des androgènes peuvent sembler difficiles à exploiter sur le plan clinique, mais le «Syndrome de retrait des anti-androgènes□ peut constituer un cas de figure clinique où les effets paradoxaux des androgènes prennent place.

Ce «Syndrome de retrait des anti-androgènes□ a été observée en réponse à l'arrêt du traitement par différents anti-androgènes, le Bicalutamide (Small & Carroll, 1994), le CPA (Sella et al., 1998), ou le Flutamide (Kelly & Scher, 1993). Des études *in vivo* ont montré qu'une suppression intermittente des anti-androgènes permettait de rallonger significativement le délai avant l'échappement à la thérapie anti-androgénique (Sato et al., 1996; Sciarra et al., 1999), et des résultats similaires ont été démontrés à l'aide du modèle androgéno-dépendant de carcinome mammaire Shionogi (Akakura et al., 1993).

Des données expérimentales *in vitro* et *in vivo* ont montré que dans les cellules LNCaP devenues androgéno-indépendantes et dont la croissance est réprimée par les androgènes, un antagoniste pur tel que le Bicalutamide est devenu un agoniste de l'AR (Culig et al., 1999; Kokontis et al., 1998). Ainsi, le Bicalutamide stimule l'activité de l'AR et la prolifération, et

lorsque les tumeurs sont implantées chez la souris, la testostérone réprime la croissance tumorale, alors que le Bicalutamide la stimule (Culig et al., 1999).

Le fait que les antagonistes soient capables de stimuler la progression tumorale, et que les androgènes agonistes soient capables parallèlement de diriger la re-différenciation cellulaire, pourrait expliquer l'intérêt thérapeutique du retrait des anti-androgènes. Le retrait de l'anti-androgène pourrait d'une part éliminer un signal prolifératif, et d'autre part laisser aux androgènes circulants (testiculaires ou à défaut surrénaliens) le pouvoir d'induire la différenciation des clones androgéno-réprimés.

Puisque dans la tumeur, des clones androgéno-dépendants coexistent probablement avec des clones androgéno-réprimés, le seul retrait de l'anti-androgène ne peut suffire, mais la notion de thérapie anti-androgénique intermittente pourrait alors s'avérer cliniquement intéressante, en freinant aussi longtemps que possible la croissance des clones androgéno-dépendants (anti-androgène) et en dirigeant secondairement la différenciation des clones androgéno-réprimés ou des clones pour lesquels l'anti-androgène a un effet prolifératif (retrait de l'anti-androgène, répression possible par les androgènes sériques). La thérapie anti-androgénique cyclique pourrait ainsi freiner simultanément les différents types de clones présents dans la tumeur initiale, au lieu d'en éliminer certains tout en favorisant l'émergence des autres.

Le niveau d'expression de l'AR n'est pas considéré comme un facteur prédictif de l'acquisition d'une androgéno-indépendance ou d'une réponse positive à la thérapie par retrait de l'anti-androgène. En revanche, les mutations du LBD de l'AR qui augmentent son affinité pour les androgènes, surrénaliens y compris, ou qui confèrent aux antagonistes un pouvoir agoniste sont retrouvées dans 10 à 20% des cas de cancer métastatique et/ou réfractaire à la thérapie anti-hormonale (Culig et al., 1993a; Kokontis & Liao, 1999; Taplin et al., 1999; Taplin et al., 1995; Taplin et al., 2003). Aucune étude structurale vaste n'a cependant démontré une relation entre les mutations de l'AR et la réponse à la thérapie anti-androgénique intermittente.

Actuellement, les essais cliniques de thérapie anti-androgénique intermittente n'ont pas mis en évidence une réelle augmentation du taux de survie par rapport aux patients subissant une thérapie anti-androgénique continue, à l'exception des patients dont la maladie est de faible grade au début du traitement, et pour lesquels une tendance à une réponse positive a été observée (Goldenberg et al., 1995; Goldenberg et al., 1999; Klotz et al., 1986; Small & Srinivas, 1995). Si une réponse complète à ce type de thérapie fait figure d'exception, il n'en demeure pas moins, dans la mesure où elle ne diminue pas le taux de survie, qu'elle pourrait avoir un intérêt clinique, en termes de thérapie palliative, mieux tolérée car moins lourde, et moins coûteuse. Le problème est qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs prédictifs de la réponse à la thérapie anti-androgénique intermittente, de même qu'il n'existe pas vraiment de marqueur fiable de la réponse à la thérapie anti-androgénique classique. Mais il est clair que les tumeurs présentant des mutations de l'AR conférant aux anti-androgènes un effet agoniste pourraient être de très bons candidats pour ce type de thérapie.

Pour résumer, les cellules LNCaP constituent donc un modèle intéressant dans l'étude du carcinome prostatique, car elles ont «~~retenu~~» cette dichotomie dans la fonction physiologique des androgènes, et elles peuvent mimer le carcinome prostatique en évoluant vers l'indépendance androgénique.

Dans la mesure où l'effet prolifératif/anti-prolifératif des androgènes semble médié par la régulation transcriptionnelle du proto-oncogène c-myc, et dans la mesure où l'effet positif ou

négatif des androgènes pourrait avoir un sens clinique dans le carcinome prostatique (dépendance ou indépendance androgénique), il nous semble justifié d'approfondir la connaissance des liens existant entre l'AR, les androgènes, c-myc, et le contrôle de la prolifération cellulaire.

En ce sens, 2 nouveaux champs d'exploration s'ouvrent.

1- Le premier axe ouvert en termes de perspectives se rapporte au phénomène très mal connu de la répression transcriptionnelle et ligand-dépendante de l'AR sur le gène c-myc. Cette partie de notre travail nécessite d'être confirmée. Il nous semble primordial dans un premier temps de vérifier rigoureusement l'implication du système Tcf-4/ β -caténine dans la répression de c-myc. La sur-expression ectopique dans nos cellules de Tcf-4 ou de la β -caténine pourrait permettre de démontrer l'existence d'une compétition avec l'AR. La technique de ChIP-re-ChIP nous semble appropriée pour déterminer si 2 protéines d'intérêt sont recrutés simultanément sur le promoteur de c-myc, et comment ce recrutement varie selon le traitement (par exemple, les couples AR/Tcf-4, Tcf-4/ β -caténine, ou encore AR/HDAC-1). Bien sûr, d'autres médiateurs peuvent être impliqués, et il conviendrait d'examiner par exemple le recrutement de co-répresseurs en réponse au traitement.

Le fonctionnement de l'AR lié au CPA pourrait apporter des explications mécanistiques supplémentaires, puisque le CPA est incapable de réprimer l'expression de c-myc en SVF complet, alors qu'il peut stimuler l'expression de c-myc en présence de DCC-SVF β puisque l'AR lié au CPA ne peut pas fixer la β -caténine, la comparaison des événements moléculaires induits par l'AR en présence de CPA ou de R1881 pourrait permettre de différencier la contribution de la β -caténine dans l'effet positif ou négatif sur la transcription de c-myc.

Enfin, les autres modes d'action possibles de l'AR doivent aussi être vérifiés \square des expériences d'EMSA ou une confirmation de nos travaux de ChIP pourraient permettre définitivement de savoir si l'AR se lie sur les ARE potentiels identifiés sur le promoteur de c-myc, et quelle en est la conséquence. Pour déterminer si une interférence entre l'AR et AP-1 est mise en jeu dans la répression de c-myc, nous pourrions examiner la transcription de c-myc en réponse au R1881 dans le contexte d'une sur-expression de c-fos et/ou de c-jun, ou encore de co-activateurs limitants (CBP/p300).

Sur un plan fondamental, ces données permettraient de renforcer les connaissances sur le contrôle de la transcription par l'AR, dans un contexte dynamique de stimulation/répression sur un même gène.

2- Pour terminer, la connexion entre la diminution de l'expression de c-myc et le blocage en phase G1 nécessite d'être approfondie. Dans un premier temps, il est nécessaire de préciser si l'effet anti-prolifératif observé dans notre système est lié à une différenciation proprement dite, et ce à l'aide de marqueurs spécifiques (cytokératines, intégrines, activité télomérase (Ling et al., 2001; Whitacre et al., 2002)).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence des variations d'expression de différents régulateurs du cycle, mais pour la plupart, il nous est encore difficile d'établir leur mode de régulation. Sur un plan mécanistique et fondamental, il serait donc intéressant de déterminer si c-myc contrôle l'expression ou l'activité de ces régulateurs, et si oui de quelle manière. La question se pose alors de savoir si la diminution de c-myc suffit à réguler l'expression de ces protéines, ou si des intermédiaires sont nécessaires, au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Par exemple, nous avons constaté une diminution de l'expression et de l'activité de cdk2 au cours du blocage en phase G1. Or, l'un des gènes-cibles directs de c-myc

est la protéine cdc25A (Galaktionov et al, 1996) □ cette protéine est une phosphatase, qui élimine spécifiquement certains groupements phosphate sur des résidus de cdk2, et ces groupements phosphate sont des groupements inhibiteurs de l'activité kinase. Ainsi, l'activité de cdk2 est stimulée si cdc25A élimine ces phosphate inhibiteurs. Dans notre système, puisque l'expression de c-myc s'effondre rapidement, on peut supposer que l'expression de cdc25A diminue également, par élimination d'un signal transcriptionnel positif □ ceci provoquerait une persistance des phosphates inhibiteurs de cdk2, d'où une diminution de son activité enzymatique. Cette hypothèse mécanistique nécessite à notre sens une investigation plus poussée, par l'analyse de la régulation de cdc25A et de la phosphorylation de cdk2 sur ces résidus inhibiteurs dans nos conditions expérimentales.

De plus nous pouvons également proposer une étude des connexions mécanistiques entre c-myc et p27 □ nous avons montré que p27 est régulée de façon traductionnelle ou post-traductionnelle, et des données indiquent également que les androgènes contrôlent en fait la stabilité de la protéine, *via* la régulation de la protéine Skp2, faisant partie d'un complexe SCF^{Skp2} à activité ubiquitine-ligase (Lu et al., 2002). C-myc pourrait médier ce contrôle, puisqu'il a comme gène-cible le gène Cull1 qui fait également partie de ce complexe (O'Hagan et al., 2000). Il n'existe pas de données directes prouvant que Skp2 est aussi un gène-cible de c-myc, mais il semblerait intéressant d'approfondir la régulation androgénique de ces 2 protéines dans nos conditions, et de déterminer si c-myc est responsable de leur contrôle, et ainsi de la stabilité de p27.

L'extension de nos données à d'autres lignées cellulaires serait aussi indispensable, et le rôle de c-myc pourrait ainsi être analysé dans les modèles androgéno-réprimés de cellules PC-3 ou DU-145 après transfection stable de l'AR. Enfin, des études expérimentales chez l'animal porteur de tumeurs prostatiques permettraient de transposer *in vivo* l'implication de c-myc dans l'effet des androgènes sur la croissance tumorale.

En résumé, ces études mécanistiques permettraient de préciser de quelle manière la régulation négative de c-myc peut conduire à un blocage en phase G1, en mettant en évidence les cascades de signalisation mises en jeu. Ceci permettrait également de cerner la contribution de c-myc par rapport à celle de l'AR vis-à-vis de l'ensemble de ces voies. En d'autres termes, il s'agirait de déterminer quelles sont les voies contrôlées directement par l'AR, comment s'effectue ce contrôle, et quelles sont les voies liées spécifiquement à c-myc.

Sur le plan du contrôle de la prolifération ou de la différenciation cellulaire médié par les androgènes, ceci contribuerait à mettre en évidence des voies de signalisation et des connexions cellulaires pouvant constituer autant de cibles thérapeutiques ou de pistes d'investigation des mécanismes de l'hormono-dépendance, et par conséquent de l'échappement.

MATERIELS ET METHODES

I. Lignées cellulaires

Les lignées de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 et LNCaP-FGC ont été obtenues de l'ATCC (American Type Culture Collection, U.S.A). Les cellules DU-145 ont été mises à disposition généreusement par le Dr. H. Gronemeyer (INSERM, Illkirch, France). Ces 3 lignées ont été établies à partir d'échantillons de métastases d'origine ganglionnaire (LNCaP), osseuse (PC-3) et cérébrale (DU-145), prélevées sur des patients atteints de carcinome prostatique.

La lignée LNCaP-FAR a été créée par Bristol Myers Squibb (U.S.A), et nous a été fournie généreusement par le Dr. H. Gronemeyer. Ces cellules ont été générées par transfection stable des cellules LNCaP avec un plasmide d'expression du récepteur aux androgènes (forme sauvage) couplé à un peptide (FLAG) permettant sa détection grâce à un anticorps spécifique dirigé contre ce peptide.

Toutes ces cellules sont de type épithélial et adhérent.

Les cellules COS, qui ont la particularité d'amplifier un plasmide transfecté, ont été utilisées pour les tests de transfection transitoire, et ont été fournies par le Dr. H. Gronemeyer.

II. Ligands et inhibiteurs

Le Bicalutamide (Casodex[®]) a été fourni généreusement par Astra Zeneca, et mis en solution dans du DMSO.

Le Cyprotérone Acétate (CPA) et l'Hydroxy-Flutamide (OH-Flu) proviennent de Schering et sont mis en solution dans l'éthanol absolu.

Les différents androgènes utilisés (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) sont : méthyltrienolone (R1881), dihydrotestostérone (DHT), déhydroépiandrosterone (DHEA) et son ester sulfate (S-DHEA), Δ 4-Androstènedione, Δ 5-Androstènediol, 5 α -Androstanedione, 5 α /5 β -Androstane-3 α /3 β -Diol, Etiocholanolone et la Testostérone ont été mis en solution dans l'éthanol absolu.

La TSA ou Trichostatin A (Sigma) est un antibiotique (*Streptomyces Sp.*), inhibiteur spécifique des Histones Déacétylases (HDAC) elle a été mise en solution dans du DMSO.

Toutes les solutions-stock sont à 10⁻²M. La structure des stéroïdes et des anti-androgènes utilisés figure en Annexe I.

III. Culture cellulaire

III.1 Milieux de culture

Tous les milieux de culture cellulaire, ainsi que les différents additifs utilisés, ont été fournis par Invitrogen (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), et les recommandations de culture de l'ATCC ont été respectées, dans la mesure du possible.

Ainsi, l'ATCC préconise pour les cellules LNCaP une culture en milieu RPMI 1640. Cependant ce milieu s'oxyde très rapidement, et les cellules supportent mal ce changement. Aussi les cellules LNCaP ont été entretenues dans du milieu MEM-Eagle, supplémenté avec les constituants suivants de façon à reproduire les conditions de l'ATCC : L-Glutamine (2mM final), D-Glucose (4,5g/L final), Na-Pyruvate (1mM final), pénicilline/streptomycine (25U/ml et 25 μ g/ml final respectivement) et serum de veau fœtal (SVF, 10% final). Une fois supplémenté, chaque flacon de milieu est stérilisé par filtration (filtre Millipore 0,22 μ m), et conservé à 4°C.

Les cellules LNCaP-FAR sont entretenues dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec les mêmes additifs que le milieu des cellules LNCaP. La pression de sélection a été continuellement maintenue par l'ajout de Néomycine (G418), à une concentration finale de 0,45mg/ml.

Les cellules PC-3 sont entretenues dans un mélange DMEM/Ham-F12K (50/50, v/v), à 2mM de L-Glutamine, supplémenté avec un mélange pénicilline/streptomycine (25U/ml et 25 μ g/ml final respectivement) et 10% de SVF.

Les cellules DU-145 sont entretenues dans du milieu MEM-Eagle, supplémenté avec de la L-Glutamine (2mM final), des Acides Aminés non Essentiels (0,1mM final), du Na-Pyruvate (1mM final) et de la Gentamycine (40 μ g/ml final).

Les cellules COS sont entretenues dans du milieu DMEM supplémenté avec 5% de SVF, 1g/L de D-Glucose, et le mélange pénicilline/streptomycine décrit ci-dessus.

III.2 Sérum

Concernant le sérum utilisé, nous avons veillé, dans la mesure du possible, à toujours utiliser des mêmes lots de sérum, réservés à l'avance. Les cellules LNCaP, PC-3 et DU-145 ont été cultivées avec les mêmes lots. La lignée LNCaP-FAR a été cultivée avec un lot différent.

Certains travaux ont nécessité l'utilisation de sérum destéroïdé (DCC-SVF). Le SVF est traité avec 1% de charbon végétal Norit en poudre (Prolabo), et 0,1% de Dextran T70 (Pharmacia fine Chemicals, Suède), pendant 30min à 56°C sous agitation. Après 20min de centrifugation à 3000rpm, le surnageant est prélevé et subit le même traitement, à 37°C. Après 60min de centrifugation à 3000rpm, le surnageant est filtré successivement sur filtres Millipore 0,45 μ m et 0,22 μ m. Le DCC-SVF ainsi obtenu est aliquoté et conservé à -20°C.

III.3 Entretien des lignées

Toutes les lignées utilisées sont entretenues à 37°C dans une étuve à atmosphère humide, enrichie à 5% de CO₂. En culture de routine, les cellules sont cultivées dans des flasques de 25cm².

Les différents passages effectués pour l'entretien des cellules sont réalisés à l'aide de Trypsine-EDTA (0,05%-0,02%, Invitrogen). Une fois décollées, les cellules sont individualisées par aspiration-refoulement contre la paroi de la flasque.

Cette étape est très délicate pour les cellules LNCaP, qui ont la particularité de très mal adhérer au support, et forment entre elles des amas de cellules très difficiles à dissocier. La formation d'un tapis cellulaire uniforme nécessite donc une durée d'incubation avec la trypsine assez longue (10min), et surtout une très bonne dissociation de ces amas.

Une fois dissociées, les cellules sont ensuite diluées au 1/10 et distribuées dans de nouvelles boîtes.

Le temps de ré-adhésion des cellules au plastique de culture dépend de la lignée, et passe de 24h pour les cellules PC-3 et DU-145, à 48 voire 72h pour les LNCaP-FAR et les LNCaP.

Les milieux de culture sont ensuite renouvelés tous les 2 ou 3 jours.

IV. Métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP

IV.1 Substrats radiomarqués

Nous avons étudié le métabolisme des stéroïdes radiomarqués suivants (New England Nuclear)☐

- DHEA [1,2,6,7- ³ H]	activité spécifique☐60Ci/mmol
- S-DHEA [7- ³ H]	activité spécifique☐21,1Ci/mmol
- DHT [1,2- ³ H]	activité spécifique☐42Ci/mmol

Le choix de ces solutions de stéroïdes radiomarqués a été effectué de telle sorte que le -³H ne puisse pas être éliminé au cours des diverses réactions du métabolisme (ces positions n'étant pas modifiées par les enzymes connues du métabolisme stéroïdien).

IV.2 Incubation des cellules avec les substrats radiomarqués

Environ 3.10⁶ cellules sontensemencées dans une flasque de 75cm². Les incubations avec les substrats sont effectuées avant que les cellules n'atteignent la confluence.

Comme cela a déjà été décrit dans notre laboratoire (Le Bail et al., 2002), l'incubation s'effectue dans du milieu MEM sans rouge de phénol, sans sérum, et supplémenté en Insuline (5g/l, Sigma), en Ferrotransferrine (10g/l, Sigma) et en BSA (2,5g/l, Sigma). Ce milieu simple (ou TIA) est suffisamment enrichi pour permettre la survie des cellules et l'étude du

métabolisme des stéroïdes radiomarqués, sans contamination par les stéroïdes résiduels qui seraient présents dans du DCC-SVF.

Les tapis cellulaires sont rincés 2 fois avec le milieu TIA, puis incubés en présence des différents substrats radiomarqués dilués dans le TIA. La concentration finale en éthanol (solvant) ne dépasse jamais 0,1%. Les cellules sont incubées avec ces différents substrats pendant un temps variable, dans l'étuve à 37°C.

IV.3 Extraction des produits du métabolisme

IV.3-1 Extraction des formes libres

À l'issue du temps d'incubation, les milieux de culture (volume V) sont prélevés.

L'extraction s'effectue dans une ampoule à décanter, en ajoutant au milieu de culture un mélange (2,5V) de solvants apolaires acétate d'éthyle/cyclohexane (50/50, v/v). Les différentes phases sont mélangées en agitant vigoureusement l'ampoule. Après décantation, 2 phases se sont formées□la phase supérieure, organique, contient les formes libres, apolaires, tandis que la phase inférieure, aqueuse, contient les formes conjuguées, plus polaires. A l'interface se forme une épaisse émulsion, due à la présence des protéines dans le milieu de culture. La phase organique est prélevée. Une seconde extraction, identique, est effectuée sur la phase aqueuse. Les 2 phases organiques ainsi obtenues sont rassemblées, évaporées sous azote, et les extraits secs sont finalement repris dans 1ml d'éthanol.

IV.3-2 Extraction des formes conjuguées

IV.3-2.1 Formes glucurono-conjuguées

La phase aqueuse est incubée pendant 24h à 37°C avec 2000 U/ml de □-Glucuronidase B1 (issue de foie bovin, Sigma), dans un tampon Na-Acétate (0,1M, pH5).

Une fois hydrolysés, les stéroïdes sont extraits selon le même protocole que les formes libres ci-dessus (2x2,5V du mélange acétate d'éthyle/cyclohexane). Après évaporation, ils sont finalement repris dans l'éthanol absolu.

IV.3-2.2 Formes sulfo-conjuguées

Les formes sulfo-conjuguées sont libérées et extraites grâce à une hydrolyse acide. La phase aqueuse issue de l'extraction précédente est amenée à pH1 avec du H₂SO₄ très concentré, après addition de NaCl (20%, p/v). Les groupements sulfate ainsi protonnés ont alors une plus grande affinité pour l'acétate d'éthyle. L'extraction est effectuée en mélangeant la phase aqueuse avec 2x3V d'acétate d'éthyle. Les phases organiques obtenues sont rassemblées puis chauffées à 65°C pendant 3h sous agitation.

Après plusieurs lavages (2x10ml de NaHCO₃, puis 2x10ml d'eau ultrapure), la phase organique est filtrée sur sulfate de sodium anhydre, puis évaporée. L'extrait sec contenant les stéroïdes sulfo-conjugués hydrolysés est enfin repris dans l'éthanol absolu.

IV.4 Comptages

A chaque étape du protocole d'extraction/hydrolyse, un aliquot de 10 à 100µl est prélevé sur chaque phase obtenue, et additionné de 4ml de liquide scintillant (Picofluor 30 Packard). La radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation □ TRICARB 1900 CA (Packard Instrument).

Ces comptages permettront de quantifier les pertes de radioactivité lors des différentes étapes, et de déterminer les proportions relatives des différentes formes de métabolites obtenus.

A chaque extraction à partir d'une phase aqueuse initiale (radioactivité initiale Ri), on obtient une phase organique (radioactivité Rorg) et une phase aqueuse (radioactivité Raq). Le rendement d'extraction est mesuré par le calcul □ Rdt (%) = $\frac{(R_{org} + R_{aq})}{R_i} \times 100$

Ri

IV.5 Séparation et identification des stéroïdes par HPLC

Les métabolites formés sont séparés par un système HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Pression) en phase normale, sur une colonne de silice de 5µm (25 x 0,46 cm). Une pompe HPLC (Kontron 420) maintient à 1ml/min le débit de la phase mobile. Le système comporte également un détecteur à scintillation □ (Packard FLO-ONE/Beta-détecteur Série A-500), avec un débit de liquide scintillant (ULTIMA-FLO™ Packard) fixé à 1,5ml/min. La chaîne d'acquisition se termine par un système d'intégration informatique sur PC (Radiomatic FLO-ONE Control & Analysis Série A500 TR, version 3.01).

La phase mobile utilisée ici est un mélange acétate d'éthyle/iso-octane (36/64, v/v).

Chaque échantillon à analyser est repris dans 100µl de phase mobile, et 20µl de chaque échantillon sont injectés à l'aide d'une seringue Hamilton. Une acquisition s'effectue sur une durée de 30min.

L'identification des métabolites s'effectue par la comparaison de leur temps de rétention avec celui de standards radiomarqués purs (New England Nuclear) injectés en parallèle.

IV.6 Identification des produits par GC-MS

L'identification des différents stéroïdes séparés par HPLC a été confirmée par Chromatographie Gazeuse/Spectrométrie de Masse (GC/MS). Pour ces analyses, les cellules LNCaP ont été incubées en présence de substrats non radiomarqués. Les incubations, ainsi que les procédures d'extraction et d'hydrolyse, ont été réalisées en suivant exactement les mêmes protocoles que pour les substrats radiomarqués.

Après chromatographie des extraits issus du métabolisme radiomarqué, nous avons chromatographié les extraits équivalents du métabolisme non radiomarqué, et récolté, à la

sortie de la colonne, chaque pic d'éluion en fonction des temps de rétention identifiés sur les fractions radioactives. Cette étape de fractionnement des métabolites froids a été effectuée afin d'analyser en GC/MS des fractions aussi pures que possibles, et non pas un mélange de l'ensemble des métabolites, pour faciliter au mieux l'identification des ions caractéristiques de chaque stéroïde. Les métabolites sont ensuite identifiés par comparaison avec des stéroïdes standards, grâce à leur temps de rétention, et à leurs ions caractéristiques (M/Z) issus de leur ionisation. Le Tableau 9 résume les temps de rétention et les ions caractéristiques de chaque stéroïde analysé.

L'analyse GC/MS a été effectuée en collaboration avec le Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherche de la Haute-Vienne (Limoges).

Tableau 9 Temps de rétention et ions caractéristiques de chaque stéroïde standard en GC-MS.

molécules	Temps de rétention (min)	Ions caractéristiques M/Z
17 β -Oestradiol	19,25	416-285
DHEA	18,38	432-417-327
DHT	18,88	434-419
Testostérone	19,49	432-417-208
Epiandrosterone	18,49	434-419-329-239
Δ 4-Androstenedione	19,18	430-415-234
Androstérone	17,2	434-419-329-239
5 α -3 β -17 β -Androstanediol	17,55	436-421-346-241
5 α -3 β -17 α -Androstanediol	18,82	436-421-346-241

IV.7 Préparation du 5 α -androstane-3 β /3 α -diol [3 H] à partir de 5 α -DHT [1,2- 3 H]

Ces stéroïdes sont préparés par réduction de la 5 α -DHT. La DHT est dissoute dans 5ml d'éthanol absolu, et 5mg de BH₄Na sont ajoutés à cette solution. Le mélange réactionnel est laissé 24h à température ambiante, puis évaporé à sec sous azote, et repris par 2ml d'eau acidifiée par de l'acide acétique (Robel et al., 1967). La réaction de réduction produit en fait 2 stéroïdes distincts, le 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol, et son isomère, le 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol. Les stéroïdes sont extraits par le mélange de solvant (2x2,5V) d'acétate d'éthyle/cyclohexane (50/50, v/v), évaporés et repris dans l'éthanol absolu.

Appliquée à la DHT radiomarquée, cette technique permet d'obtenir un mélange des 2 stéroïdes radiomarqués, qui servent de standards pour l'identification des métabolites en HPLC.

L'identité de ces 2 produits a été confirmée par GC-MS, après réduction de DHT non radiomarquée, et comparaison des produits formés aux androstanediols standards.

IV.8 Réaction de saponification

Cette étape permet de déterminer si la phase organique des formes libres contient des stéroïdes sous forme d'esters.

Concrètement, une solution de potasse alcoolique est préparée extemporanément, en diluant 1,5g de potasse dans 2,5ml d'eau ultrapure, puis en complétant à 50ml avec de l'éthanol absolu. La phase organique issue de l'extraction est évaporée sous azote, puis reprise dans 300 μ l d'éthanol. 2ml de la solution de potasse alcoolique sont ajoutés, le mélange est ensuite incubé pendant 1 à 2h à 95-100°C.

Les esters, une fois saponifiés, sont extraits en utilisant le mélange de solvants apolaires (2x2,5V d'acétate d'éthyle/cyclohexane, 50/50, v/v). La phase organique est prélevée, évaporée, reprise dans la phase mobile, puis injectée en HPLC.

V. Tests de prolifération cellulaire

Les tests de prolifération cellulaire sont effectués en plaques 96 puits, dans le milieu de culture habituel des cellules, mais dépourvu de rouge de phénol. En fonction du contexte, le milieu est supplémenté soit en SVF complet, soit en DCC-SVF.

Les cellules sontensemencées de façon homogène à raison de 2000 à 7000 cellules/puits, selon le type de sérum utilisé. Lorsque les cellules ont adhéré, le ligand est ajouté. Pour éviter le décollement des cellules LNCaP lors du changement de milieu, le milieu d'ensemencement n'est pas éliminé. Une solution 2X de ligand préparée dans du milieu frais est ajoutée dans chaque puits. Le pourcentage de solvant introduit ne dépasse jamais 0,1%.

La prolifération cellulaire est mesurée par la technique de réduction du MTT (3-(5,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tetrazolium), déjà décrite dans notre laboratoire (Le Bail et al., 2000). Une solution de MTT (Sigma) à 5mg/ml est préparée dans du PBS. Cette solution est ajoutée au milieu de culture dans chaque puits, à une concentration finale de 0,5mg/ml, puis les plaques sont incubées à 37°C pendant 4h. Pour dissoudre le sel de formazan formé par les cellules, une solution de SDS 10%/HCl 0,01M est ajoutée (100 μ l pour 100 μ l de milieu), et les plaques sont incubées à 37°C pendant 5 à 24h. La mesure de l'absorbance à 550nm rendra compte de la prolifération des cellules traitées avec le ligand par rapport aux cellules témoin traitées avec le solvant seul. En guise de blanc de lecture de l'absorbance, le test MTT est réalisé en parallèle sur des puits ne contenant que du milieu de culture, sans cellules.

VI. Analyse du cycle cellulaire en Cytométrie de Flux

Les cellules sontensemencées dans des flasques de culture de 75cm² (5.10⁵ cellules/boîte), en milieu MEM 10% SVF, sans rouge de phénol. Après 3 jours d'adhésion, le milieu est remplacé par du milieu frais supplémenté en ligand à la concentration voulue, sans que le pourcentage de solvant ne dépasse 0,1%.

A la fin de chaque temps d'incubation, les cellules (adhérentes et flottantes) sont récoltées, comptées (numération au bleu trypan) et une fraction de la suspension (2,5.10⁶

cellules) est prélevée et préparée pour l'analyse du cycle cellulaire. Pour cela, les cellules prélevées sont centrifugées (1000rpm, 10min), puis le culot cellulaire est lysé dans 0,5ml d'un tampon hypotonique (0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrate de sodium, et 50 μ g/ml de Iodure de Propidium), incubé à 4°C et à l'abri de la lumière pendant au moins 16h.

L'analyse de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été effectuée sur un Cytomètre de Flux FACScan (Becton Dickinson) à l'aide du logiciel Cell Quest Software.

VII. Western Blot

VII.1 Méthodologie

VII.1-1 Préparation d'un extrait de protéines cellulaires totales

Les cellules sont ensemencées et traitées de la même façon que pour l'analyse du cycle cellulaire ci-dessus. A la fin de chaque temps de traitement, les cellules sont récoltées à l'aide d'un grattoir, centrifugées, puis le culot est resuspendu à 4°C dans 50-100 μ l d'un tampon de lyse dont la composition finale est la suivante □ NP-40 (détergent, 0,2%), Tris-HCl pH7,5-8 (50mM), KCl (420mM), EGTA (1mM), EDTA (1mM), glycérol (10%) PMSF (Sigma, inhibiteur de protéases, 1mM), Acide okadaïque (Calbiochem, inhibiteur de phosphatases, 0,125 μ M) et PIC (Roche, Cocktail d'Inhibiteurs de Protéases, 0,1%).

L'extraction des protéines cellulaires totales est réalisée par 4 ou 5 cycles de congélation-décongélation successifs. Les lysats sont centrifugés, le surnageant contenant les protéines totales est prélevé, et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein-Assay). Une gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de BSA. Toutes les manipulations s'effectuent sur glace, pour éviter la dégradation des protéines.

Les extraits protéiques sont ensuite conservés à -80°C.

VII.1-2 Séparation par SDS-PAGE et incubation avec les anticorps

Les protéines totales, une fois extraites, sont séparées par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE). Le pourcentage d'acrylamide varie de 8% à 12% selon le poids moléculaire de la protéine d'intérêt.

Selon l'anticorps utilisé et son affinité pour la protéine d'intérêt, 40 à 80 μ g de protéines totales sont dilués dans le tampon de dépôt et déposés sur gel. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose, pendant 1h à 100V. La membrane de nitrocellulose est saturée par une solution de blocage (PBS 1X, lait écrémé 5%, et si nécessaire Tween-20 0,1%), pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite incubée dans la solution de blocage additionnée de l'anticorps primaire, dilué différemment selon le cas (Tableau 10), pendant toute la nuit à 4°C sous agitation. Après 3 lavages successifs de 10min dans une solution de lavage (PBS 1X, Tween-20 0,1%), la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (anti-lapin, souris ou chèvre selon le cas) couplé à la peroxydase de raifort (-HRP), et dilué 2000 fois dans la solution PBS 1X-lait écrémé 5%-Tween20 0,1%. L'incubation a lieu pendant 1h à température ambiante sous

agitation. Enfin, la membrane est à nouveau lavée 3 fois pendant 10min avec la solution de lavage, puis la protéine d'intérêt est détectée par réaction de chimioluminescence (Super signal[®] West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce) sur un film radiographique (Kodak).

Pour vérifier l'homogénéité des quantités de protéines déposées sur le gel, la membrane est ultérieurement lavée, puis incubée avec un anticorps primaire dirigé contre l'actine. L'incubation avec l'anticorps secondaire puis la réaction de chimioluminescence sont effectuées comme décrit précédemment.

VII.2 Anticorps

Les anticorps primaires et secondaires utilisés pour les Western Blot sont listés dans le Tableau 10. Tous ont été caractérisés par le fabricant comme réagissant avec les protéines humaines.

Tableau 10 – Liste des différents anticorps utilisés en Western Blot et caractéristiques.

protéine	type d'Ac	utilisation	Référence commerciale	Référence bibliographique
p27^{kip1}	Lapin pAb	dil 1/1000	C-19 Santa-Cruz	(Connor et al., 2003)
p21^{cip1}	Lapin pAb	dil 1/2000	C-19 Santa-Cruz	(Bastien et al., 2002)
(Phospho)-Rb	Souris mAb	dil 1/500	G3-245 BD Pharmingen	(Hofman et al., 2001)
c-myc	Lapin pAb	dil 1/2000	N-262 Santa-Cruz	(Bernard et al., 2003)
Cycline D3	Lapin pAb	dil 1/1000	C-16 Santa-Cruz	(Knudsen et al., 1998)
Cycline D1	Souris mAb	dil 1/100	HD-11 Santa-Cruz	(Tsihlias et al., 2000)
Cycline B1	Souris mAb	dil 1/200	GNS1 Santa-Cruz	(Tsihlias et al., 2000)
Cycline A	Souris mAb	dil 1/200	BF683 Santa-Cruz	(Knudsen et al., 1998)
Cycline E	Lapin pAb	dil 1/2000	C-19 Santa-Cruz	(Zhuang et al., 2001)
Cdk2	Lapin pAb	dil 1/2000	M2 Santa-Cruz	(Tsihlias et al., 2000)
Cdk1 (cdc2)	Souris mAb	dil 1/200	17 Santa-Cruz	(Cho et al., 2003)
Androgen receptor	Lapin pAb	dil 1 μ g/ml	PG-21 Upstate Biotechnology	(Shang et al., 2002)
Actine	Chèvre pAb	dil 1/5000	C-11 Santa-Cruz	
Anti-lapin-HRP	Chèvre	dil 1/2000	Cell Signaling	
Anti-souris-HRP	Chèvre	dil 1/2000	Cell Signaling	
Anti-chèvre-HRP	Ane	dil 1/2000	Santa-cruz	

VII.3 Vérification de la spécificité des anticorps

VII.3-1 Par transfection dans les cellules COS

Pour vérifier la spécificité des anticorps, nous avons transfecté les cellules COS de façon transitoire avec des plasmides d'expression des différentes protéines étudiées.

VII.3-1.1 Liste des plasmides d'expression

Nous avons pour cela utilisé les plasmides suivants

- pXcD3 exprimant la protéine Cycline D3, fourni par le Dr. H. Gronemeyer.
- pXcD1 exprimant la protéine Cycline D1, fourni par le Dr. H. Gronemeyer.
- pXcE exprimant la protéine Cycline E, fourni par le Dr. H. Gronemeyer.
- pXcA exprimant la protéine Cycline A, fourni par le Dr. H. Gronemeyer.
- pXcdk2 exprimant la protéine cdk2, fourni par le Dr. H. Gronemeyer.
- pXCIP1sens exprimant la protéine p21^{cip1}, fourni par le Dr. B. Wasylyk (IGBMC, Illkirch, France).
- p514-Rb exprimant la protéine Rb, fourni par le Dr. B. Chaton (ESBS, Illkirch, France).

Les cartes du plasmide pXCIP1 et du plasmide p514-Rb figurent en Annexe III ces transgènes sont sous la dépendance d'un promoteur CMV ou SV40, permettant l'expression des protéines de façon constitutive dans les cellules.

VII.3-1.2 Transfection transitoire des cellules COS

Les cellules COS sontensemencées en boîtes de Pétri (3 à 5.10⁶cellules/boîte), dans le milieu de culture habituel Dulbecco à 5% SVF.

Les plasmides sont transfectés par la méthode de précipitation au Phosphate de calcium. Le précipité est préparé en mélangeant 420µl de tampon TE_{0,05} (Tris 1mM, EDTA 0,05mM, pH7,5), 0,5µg de plasmide CMVtkGal (contrôle du taux de transfection), 60µl de CaCl₂ 2M, xµg du plasmide à transfecté, et en complétant avec du pBlueScript («*carrier*») de façon à ce que la quantité totale d'ADN transfecté soit de 15µg dans tous les précipités. Ce mélange est ensuite versé au goutte à goutte dans un tube contenant 480µl de tampon HBS (2X).

Le tampon HBS (2X) a la composition suivante 280mM NaCl, 50mM Hepes, 1,5mM Na₂HPO₄, pH7,12.

Le précipité ainsi formé est incubé à température ambiante pendant 20min, puis ajouté dans la boîte de Pétri. Après une nuit d'incubation à 37°C, les tapis cellulaires sont lavés avec le milieu de culture, puis l'incubation se poursuit encore pendant 16 à 24h.

Les cellules sont alors récoltées par grattage du tapis, et les protéines cellulaires sont extraites puis dosées comme décrit précédemment. La sur-expression de chaque protéine a été mise en évidence en déposant sur un même gel SDS-PAGE une même quantité de protéines extraites de cellules non transfectées ou transfectées avec des quantités croissantes du plasmide. Nous avons ainsi pu vérifier que l'anticorps détecte spécifiquement la protéine sur-

exprimée, et que celle-ci présente le poids moléculaire attendu. Nous avons également utilisé ce système pour affiner les conditions d'incubation de l'anticorps (dilution, solution d'incubation) afin que le signal ne soit pas saturé.

VII.3-2 Autres méthodes

Pour certaines des protéines à étudier, nous ne disposions pas des plasmides d'expression adéquats. Nous avons alors utilisé des contrôles positifs commerciaux, qui consistent en un extrait concentré de la protéine d'intérêt, exprimée chez *E. coli*, et purifiée. Nous avons utilisé ces contrôles positifs pour la protéine c-myc (Santa-Cruz, sc-4084WB), et pour la protéine p27^{kip1} (Santa-Cruz, sc-4091WB).

VIII. Technique d'Immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP)

Cette méthode permet d'analyser le recrutement *in vivo* de protéines d'intérêt sur une région spécifique d'ADN.

VIII.1 Principe

Cette technique récente utilise la capacité du Formaldéhyde à fixer (ou «cross-linker») *in vivo* des interactions ADN-protéines ou dans une moindre mesure protéine-protéine, de façon stable, et ce à partir de cellules vivantes en culture (Orlando, 2000). Une fois les protéines endogènes fixées à la chromatine, il est possible, à l'aide d'anticorps spécifiques de ces protéines, d'immunoprécipiter les complexes chromatine-protéine formés dans les cellules. Étant donnée la taille considérable de la chromatine des cellules eucaryotes, cette étape d'immunoprécipitation (IP) nécessite au préalable de couper la chromatine en petits fragments d'environ 100 à 1500pb, par sonication. Les complexes chromatine-protéine-anticorps, une fois récupérés, sont clivés, et la chromatine «précipitée» est purifiée.

L'extrait obtenu est ainsi enrichi en fragments génomiques représentant l'ensemble des sites d'interaction *in vivo* avec la protéine d'intérêt. La présence dans cet extrait de fragments de chromatine d'un gène ou d'un promoteur spécifique est ensuite détectée par PCR.

Il est ainsi possible de déterminer, pour un gène donné, si le traitement administré aux cellules a conduit à une modification du recrutement de la protéine étudiée sur le promoteur d'un gène donné. On peut ainsi étudier le recrutement des protéines de la machinerie transcriptionnelle, des récepteurs nucléaires, des coactivateurs ou corépresseurs, dans le temps et sur différentes régions d'un promoteur.

Cette technique, puissante, permet donc l'analyse *in vivo* des événements moléculaires qui accompagnent l'activation ou la répression de la transcription d'un gène.

Elle est soumise à 3 étapes majeures qui peuvent limiter son efficacité ou sa fiabilité d'interprétation : la fixation au formaldéhyde, qui doit être forte pour que les complexes soient stables ; l'immunoprécipitation, qui dépend de la qualité de l'anticorps (spécificité et forte affinité pour l'épitope) ; et la PCR qui doit être très spécifique du promoteur choisi, et très sensible, étant donné les faibles quantités de chromatine immunoprécipitée.

La Figure 58 schématise les différentes étapes de cette technique.

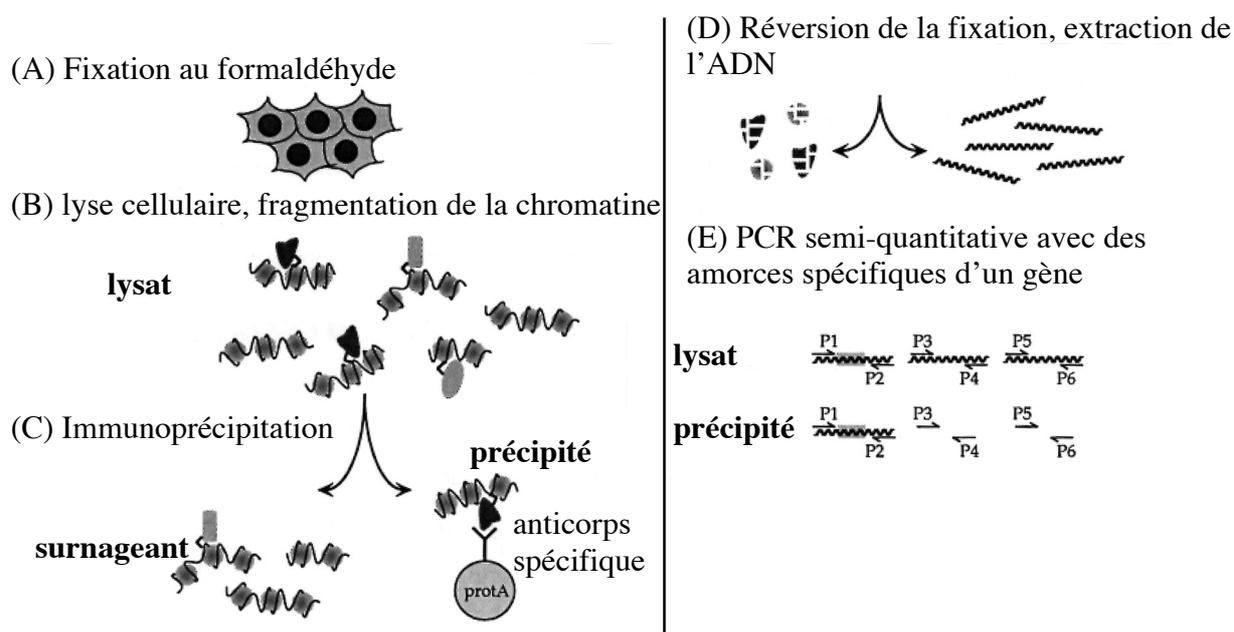


Figure 58 Représentation schématique des étapes de la technique de CHIP.

ProtA = protéine A ou G couplée à des billes d'agarose pour précipiter le complexe anticorps-protéine d'intérêt-chromatine. D'après (Grange et al., 2001).

VIII.2 Méthodologie

Le protocole est adapté de la procédure établie par Upsate Biotechnology.

VIII.2-1 Fixation au formaldéhyde

Les cellules ont étéensemencées en boîtes de Pétri, à une densité choisie en fonction de la quantité de cellules nécessaire à chaque type d'immunoprécipitation (résumé dans le Tableau 12).

L'ensemencement et le traitement des cellules ont été effectués de la même façon et dans le même milieu que pour l'analyse du cycle cellulaire. Puisqu'il s'agit d'étudier des événements moléculaires précoces, les temps de traitement sont en revanche beaucoup plus courts (de l'ordre de 30min à quelques heures).

A l'issue de chaque temps de traitement, les tapis cellulaires sont lavés une fois au PBS(1X), puis sont incubés pendant 15min à température ambiante dans une solution PBS(1X)-Formaldéhyde 1%. La neutralisation du Formaldéhyde est ensuite réalisée par l'ajout de Glycine à une concentration finale de 125mM. Les tapis sont lavés au PBS(1X) froid, puis les cellules sont récoltées par grattage, et centrifugées (1000rpm, 10min, 4°C). Pour éviter la dégradation des protéines, les étapes suivantes se déroulent toujours sur glace.

VIII.2-2 Lyse

Les culots cellulaires sont homogénéisés dans 0,2-0,3ml d'un tampon de lyse (concentrations finales \square 1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8,1, 1mM PMSF, et 0,1% PIC). Après 10min d'incubation sur glace, la chromatine est ensuite fragmentée par sonication (sonde 3mm, Sonicateur Vibra Cell, Bioblock) à 4°C. Les conditions de sonication sont indiquées dans le Tableau 12.

Les échantillons sont centrifugés (12000rpm, 10min, 4°C) pour éliminer les débris membranaires, puis dilués 10 fois dans le tampon d'IP (concentrations finales \square 0,01% SDS, 1,1% Triton X-100, 1,2mM EDTA, 16,7mM Tris-HCl pH8,1, 167mM NaCl, 1mM PMSF, et 0,1% PIC). Un aliquot (2,5%) du lysat dilué est prélevé dans chaque échantillon, et conservé à -20°C \square il représente l'input, c'est-à-dire le témoin de la quantité d'ADN génomique total présent dans chaque échantillon avant l'étape d'IP. L'égalité des inputs entre les échantillons garantit donc que les IP ont été effectuées pour tous les échantillons sur une même quantité de matériel biologique.

VIII.2-3 Incubation avec l'Anticorps

Pour réduire le bruit de fond et éliminer les protéines ou l'ADN interagissant de façon aspécifique avec les billes, un «Pre-clearing» est réalisé sur les lysats pendant au moins 30min à 4°C dans un mélange contenant 16 μ g d'ADN soniqué de sperme de saumon, 40 μ g de BSA, et 120 μ g de billes protéine A/Agarose (soit 80 μ l d'un mélange à 50% préparé dans 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8, et 0,05% azide de sodium). Les échantillons sont centrifugés doucement (1000rpm, 1min, 4°C) pour sédimenter les billes, puis les surnageants sont prélevés, et l'anticorps d'IP est ajouté, à sa concentration optimale (voir Tableau 12). L'anticorps est incubé toute la nuit, à 4°C, sous agitation douce. Les immunocomplexes sont ensuite précipités en incubant les échantillons avec 60 μ l du mélange à 50% ADN de sperme de saumon-BSA-billes protéinesA/agarose, pendant 1h à 4°C sous agitation.

La protéine A couplée aux billes d'agarose lie spécifiquement les anticorps polyclonaux utilisés, et permet donc de précipiter spécifiquement les complexes chromatine-protéine d'intérêt-anticorps.

VIII.2-4 Lavages

Les complexes sont récupérés par centrifugation douce (1000rpm, 1min, 4°C), les surnageants sont éliminés, et les billes sont lavées sous agitation dans 4 tampons successifs, dans l'ordre suivant \square

- tampon de lavage «Low Salt» \square 1ml, 1x10min à 4°C
0,1%SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8,1, et 150mM NaCl
- tampon de lavage «High Salt» \square 1ml, 1x10min à 4°C
0,1%SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8,1, et 500mM NaCl
- tampon de lavage «LiCl» \square 1ml, 1x10min à 4°C

250mM LiCl, 1% NP40, 1% Deoxycholate, 1mM EDTA, et 10mM Tris-HCl pH8,1.

- Tampon TE 1ml, 2x10min à 4°C
10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8

VIII.2-5 Elution et réversion de la fixation

Les complexes sont ensuite élués dans 250µl de tampon d'éluion (1% SDS, 0,1M NaHCO₃), pendant 15min à température ambiante, sous agitation. Après centrifugation (1000rpm, 1min), les éluats (surnageants) sont prélevés, et les billes (culot) sont soumises à une deuxième éluion identique. Les 2 éluats sont rassemblés (v=500µl), puis la fixation protéine-chromatine est réversée en ajoutant dans chaque échantillon 20µl d'une solution de NaCl 5M, et en chauffant à 65°C pendant 4 à 16h après avoir homogénéisé le mélange.

Les inputs, qui n'ont pas subi l'IP, sont eux aussi soumis à cette étape leur volume est ajusté à 500µl avec le tampon d'éluion, le NaCl est ajouté, et ils sont incubés de la même manière.

Les complexes Chromatine-Protéines-Anticorps sont ainsi clivés.

VIII.2-6 Purification de la chromatine

Les protéines sont ensuite digérées, en ajoutant aux échantillons 10µl d'EDTA 0,5M, 20µl de Tris-HCl 1M pH6,5, 20µg de Protéinase K (Roche Diagnostics) et en incubant pendant 1h à 45°C.

La chromatine est ensuite extraite en ajoutant 1V de mélange Phénol Tris-saturé pH8,8/Chloroforme (50/50, v/v). Les échantillons sont vortexés vigoureusement, centrifugés (12000rpm, 15min, 4°C), les surnageants sont prélevés, et la chromatine est précipitée en ajoutant 1V d'éthanol absolu et 1V/10 d'acétate de sodium 3M pH5,2. Après homogénéisation et centrifugation (12000rpm, 15min, 4°C), les culots d'ADN sont lavés (éthanol 70%), asséchés à l'air, et finalement resuspendus dans 40µl d'eau ultrapure.

Ils sont conservés à -20°C jusqu'aux étapes de Polymérisation en Chaîne (PCR).

VIII.2-7 PCR

Pour chaque réaction de PCR, le mélange réactionnel est composé de 0,5 µl de chaque amorce (à 20µM chacune), 7µl de mélange de dNTP (à 1,25mM chacun), 2,5µl de tampon de PCR (10X), et 0,3µl d'ADN Polymérase Taq (5Unités/µl, Promega). Le volume est complété à 22µl avec de l'eau ultrapure.

Le tampon de PCR (10X) a la composition suivante 100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 200mM Tris-HCl (pH8,8), 20mM MgSO₄, 1% Triton X-100, et 20% DMSO.

Un mélange réactionnel est préparé extemporanément pour l'ensemble des PCR à réaliser. Le mélange réactionnel est distribué dans les tubes de PCR (22µl/tube), les échantillons de chromatine à amplifier (3µl) sont ajoutés, l'ensemble est homogénéisé, puis

une goutte d'huile de paraffine est déposé à la surface de chaque mélange, afin d'éviter l'évaporation et conserver la concentration des réactifs lors des cycles de PCR. Les réactions de PCR sont effectuées dans un Thermocycler (Perkin Elmer).

Les produits de PCR, de petite taille (200-300pb), ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, et visualisés par coloration du gel au BET.

Chaque PCR commence par une phase initiale de dénaturation (94°C, 5min), et se termine par une étape finale d'extension (72°C, 5min). Entre ces 2 étapes, une phase de Dénaturation (94°C, 1min), une phase d'Hybridation (1min), et une phase d'Extension (72°C, 1min) se succèdent, selon le nombre de cycles choisi. La température d'Hybridation est adaptée en fonction de chaque couple d'amorces, et de leur T_m spécifique (entre 55 et 65°C). Le nombre de cycles, selon le cas, varie entre 25 et 35. Le Tableau 11 résume les séquences des amorces utilisées pour chaque promoteur.

Tableau 11 □ Liste des amorces utilisées en PCR.

Gène	Séquence (5'-3')	Position
c-myc		
sens	GCGCCCATTAATACCCTTCT	-498/-299 (relatif à P1)
antisens	TGACAAACCGCATCCTTGT	n° accès NCBI D10493
L32		1656/1854
sens	CCGTAGCTGGCGATTGGAAGAC	(relatif à boîte TATA)
antisens	TTGACATATCGGTGTGACTGGTG	n° accès NCBI AB061831
PSA AREIII (enhancer)		-4170/-3978
sens	ACAGACCTACTCTGGAGGAAC	d'après (Shang et al.,
antisens	AAGACAGCAACACCTTTTT	2002)

Une PCR effectuée sur de l'eau à la place de l'ADN a servi de contrôle négatif de la réaction.

Des PCR effectuées sur des quantités croissantes d'ADN génomique (1, 10, 100ng) ont servi de contrôles positifs. L'ADN génomique utilisé pour les contrôles positifs de PCR est extrait à partir de nos cellules (Ramirez-Solis et al., 1992). Les cellules (10 à 15.10⁶) sont récoltées par trypsination, centrifugées (1000rpm, 10min), puis le culot est lavé au PBS (1X) et homogénéisé dans 1ml de tampon de lyse (concentrations finales □ 10mM Tris-HCl pH7,5, 10mM NaCl, 10mM EDTA pH8, 0,5% Sarkosyl, et 1mg/ml de protéinase K rajoutée extemporanément). Après 12-16h d'incubation à 60°C, les tubes sont incubés pendant 1h à 37°C avec 200µg de RNase (DNase-free). 300µl d'une solution NaCl/éthanol sont ajoutés. Cette solution NaCl/éthanol a été préparée en mélangeant 150µl de NaCl 5M dans 10ml final d'éthanol absolu. Elle est conservée à -20°C. Ce mélange permet la précipitation de l'ADN génomique, après 30min d'incubation à température ambiante, sans agiter. L'ADN est récupéré par une centrifugation brève, puis lavé plusieurs fois avec de l'éthanol à 70%. Les culots d'ADN sont asséchés à température ambiante, puis remis en solution dans 100µl de tampon TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8), et laissés 12-16h à 4°C. L'ADN est ensuite dosé par spectrophotométrie (Abs280nm).

VIII.3 Mises au point préliminaires

A partir de ce protocole général, certains paramètres ont fait l'objet d'une mise au point spécifique.

Le choix des anticorps est un paramètre d'une importance fondamentale, en raison des risques élevés de liaison non spécifique introduisant des artefacts expérimentaux□ aussi nous avons utilisé exclusivement des anticorps commerciaux dont l'utilisation en ChIP a fait l'objet de nombreuses publications, ou a été validée au sein du laboratoire.

Par ailleurs, la quantité de cellules et/ou d'anticorps nécessaires à chaque IP doit être ajustée en fonction de l'anticorps choisi, de son affinité pour la protéine, et du niveau d'expression de celle-ci. En ce sens, nous avons reproduit les mêmes conditions que dans les protocoles de la Littérature utilisant ces anticorps, ou à défaut, effectué nous-mêmes différents tests, en adaptant les ensemencements cellulaires et/ou les quantités d'anticorps de façon à obtenir un signal satisfaisant. Ces conditions varient énormément d'un anticorps à l'autre : à titre d'exemple, chaque IP sur les histones H3 acétylées nécessite seulement 10^6 cellules, alors qu'une IP sur le Récepteur aux Androgènes nécessite environ 10^7 cellules.

En fonction de la quantité de cellules nécessaire, le protocole de sonication a également dû être ajusté□ pour obtenir des fragments d'une taille moyenne comprise entre 100 et 1500pb, l'intensité, la durée ou le nombre des pulses de sonication ne sont pas les mêmes selon que l'on travaille sur 10^6 ou sur 10^7 cellules. Et de la même façon, la résistance des cellules à la sonication varie considérablement d'un type cellulaire à l'autre.

Nous avons donc effectué une importante mise au point, sur chaque lignée utilisée, et en fonction de la quantité de cellules nécessaire. A chaque fois, les cellules ont été fixées au formaldéhyde, lysées, et différentes conditions de sonication ont été testées, en faisant varier la durée des pulses, leur nombre, et l'intensité. La chromatine a ensuite été purifiée, et déposée sur gel d'agarose afin d'observer le profil de sonication obtenu, et choisir le protocole le plus adapté. La Figure 59A montre un exemple du profil de sonication obtenu à partir des cellules LNCaP. Cette étape est très importante□ si les fragments de chromatine sont trop courts, les PCR ne pourront fonctionner, puisque les amorces sont déterminées de façon à générer un fragment de 200 à 300pb. Si les fragments sont trop longs, la région du promoteur qui nous intéresse *à priori* sera amplifiée par la PCR, et on interprètera ce signal comme la preuve du recrutement de la protéine d'intérêt sur cette région, alors qu'en fait, la protéine était fixée seulement à une certaine distance de cette région, sur un autre site régulateur. D'où un risque de mauvaise interprétation. La Figure 59B schématise ce biais expérimental.

Cette possibilité d'observer des événements «□ distance□ de façon erronée constitue en fait le principal écueil de cette technique (Grange et al., 2001).

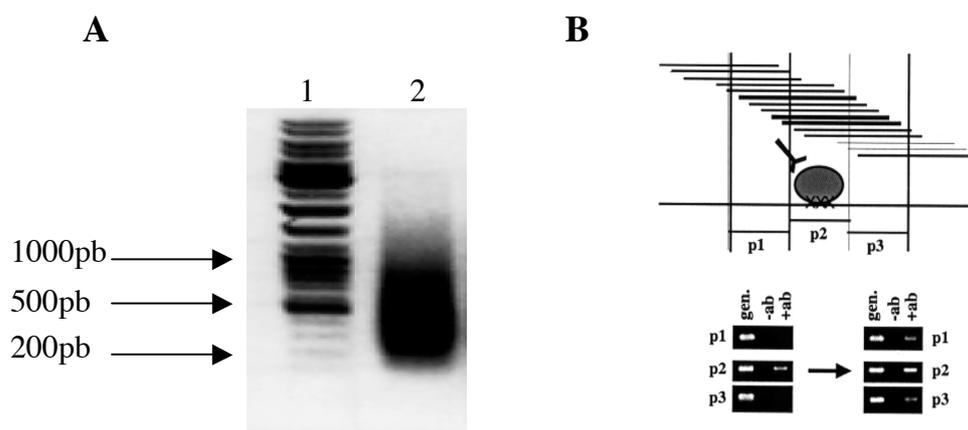


Figure 59 Sonication de la chromatine.

A exemple du profil de fragmentation de la chromatine obtenu à partir de cellules LNCaP (10^7 cellules), fixées, lysées et soniquées $3 \times 10s$ à la puissance maximale. Une fraction de la chromatine a été déposée sur gel d'agarose à 1%, et séparée par électrophorèse. Piste 1 marqueur de poids moléculaire. Piste 2 chromatine fragmentée. **B** analyse PCR d'une interaction ADN-protéine. Dans le cas idéal, seuls les fragments d'ADN contenant le site de liaison à la protéine sont précipités, permettant l'amplification uniquement avec les amorces incluant le site de liaison (p2), comme indiqué à gauche. Si la taille des fragments de sonication est plus grande que le fragment amplifié par PCR, les primers adjacents (p1, p3) peuvent aussi amplifier, conduisant à un site de liaison apparemment étendu, comme indiqué à droite. gen. ADN génomique. -Ab contrôle sans anticorps. +Ab ADN précipité. D'après (Grange et al., 2001).

VIII.4 Anticorps et conditions spécifiques

Le Tableau 12 résume les différentes conditions établies spécifiquement pour chaque anticorps utilisé, et communes aux lignées LNCaP et LNCaP-FAR. Tous ont été caractérisés par le fournisseur comme réagissant avec les protéines humaines.

Tableau 12 Liste des différents anticorps utilisés en ChIP, paramètres expérimentaux spécifiques.

protéine	Type d'anticorps	Nombre de cellules/IP	sonication	Quantité d'Ac/IP	Référence commerciale	Référence
AR	Polyclonal lapin	10^7	$3 \times 10s$, puissance maximale	$4 \mu g$	PG-21, Upstate Biotechnology	(Shang et al., 2002)
Histones H3 acétylées (K9-K14)	Polyclonal lapin	10^6	$2 \times 10s$, 30%	$5 \mu g$	Upstate Biotechnology	(Kang et al., 2002)
HDAC1	Polyclonal lapin	5.10^6	$2 \times 10s$, puissance maximale	$3 \mu g$	Alexis Biochemical	(Hassig et al., 1998)
RNA-Pol II	Polyclonal lapin	5.10^6	$2 \times 10s$, puissance maximale	$3 \mu g$	N-20, santa-Cruz	(Kang et al., 2002)

IX. Extraction des ARN cellulaires totaux

Les cellules sontensemencées et traitées de la même façon que pour l'analyse du cycle cellulaire. A la fin de chaque temps d'incubation, les cellules (environ $5 \cdot 10^6$) sont récoltées, centrifugées (1000rpm, 10min), et le culot est homogénéisé dans 1ml de Trizol Reagent (Gibco-BRL, USA), puis incubé 5min à température ambiante. Après ajout de 0,2ml de chloroforme, le lysat est vortexé, laissé 5min à température ambiante, puis centrifugé (12000rpm, 4°C, 15min). Les ARN sont ainsi séparés de l'ADN et des protéines cellulaires, et se retrouvent dans la phase aqueuse supérieure. Celle-ci est prélevée, et les ARN sont précipités par addition d'1V d'Isopropanol. Le mélange est agité, incubé 10min à température ambiante, puis les ARN sont récupérés par centrifugation (12000rpm, 10min, 4°C). Le culot est lavé avec de l'éthanol à 75% préparé dans de l'eau-DEPC (diethyl pirocarbonate), puis asséché et resuspendu dans 40 μ l d'eau-DEPC. Finalement, les échantillons sont incubés pendant 10min à 55-60°C, pour «désenrouler» les ARN.

Les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie (Abs 260nm) et l'intégrité des ARN est vérifiée en faisant migrer par électrophorèse 1 μ g de chaque échantillon sur un gel d'agarose à 1%, coloré au bromure d'éthidium (BET). Les ARN totaux sont conservés à -80°C.

Toutes les manipulations se font avec des gants, sur glace, et en utilisant des cônes cotonnés «RNase-free», afin de minimiser les risques de dégradation des ARN.

X. Transcription Reverse (RT)

Cette technique permet de transcrire l'ADN complémentaire de l'ARNm cellulaire, grâce à la Transcriptase Reverse (RT) qui synthétise le brin complémentaire d'ADN à partir d'une amorce polydT qui s'hybride à la queue polyA présente à l'extrémité de chaque ARNm eucaryote. Le protocole utilisé suit la procédure du fournisseur (Roche).

Dans un premier temps, 2 μ g d'ARN totaux sont mélangés avec 200ng d'oligodT (New England Biolabs), 1 μ l de mélange de dNTP (à 10mM chacun), et le volume est ajusté à 14,5 μ l avec de l'eau ultrapure. Les échantillons sont chauffés pendant 10min à 70°C, puis refroidis rapidement sur glace.

L'ADN complémentaire est ensuite synthétisé en ajoutant dans chaque tube 4 μ l du tampon (5X) de synthèse de l'ADNc (Roche), 0,5 μ l de RNAsine (à 40U/ μ l) et 1 μ l de RT (à 20U/ μ l, AMV, Roche).

Le tampon (5X) de synthèse de l'ADNc a la composition suivante: 250mM Tris-HCl (pH8,5), 40mM MgCl₂, 150mM KCl, et 5mM DTT (Dithiothreitol).

Le mélange est homogénéisé par agitation douce, incubé pendant 1h à 42°C, puis pendant 10min à 94°C, et finalement refroidi sur glace. Les échantillons sont dilués 2 fois dans de l'eau ultrapure avant de procéder aux réactions de PCR, et conservés à -20°C.

Remarque: les protocoles de RT incluent souvent une étape de digestion des extraits d'ARN totaux avec une DNase, afin de dégrader les traces d'ADN génomique qui persistent après l'extraction. En effet, cet ADN résiduel peut par la suite contaminer les réactions de Polymérisation en chaîne (PCR). Cette étape de digestion impose des pipettages supplémentaires et des extractions-précipitations qui peuvent générer une variabilité inter-échantillon gênante. Aussi nous n'avons pas effectué cette digestion à la DNase, mais pour distinguer les produits de PCR issus de l'ADN complémentaire et ceux issus de l'ADN

génomique contaminant, nous avons dessiné, pour chaque gène analysé, des amorces de PCR qui recouvrent un intron entier. Une amorce est située sur un exon, l'autre amorce sur l'exon suivant. Ainsi, si l'ADN génomique est amplifié lors de la PCR, le produit obtenu sera un fragment beaucoup plus long, du fait de l'intron, que le produit issu de l'ADN complémentaire. Les produits issus de l'ARNm-cible et ceux issus de l'ADN génomique contaminant seront ainsi discriminés par leur taille après électrophorèse sur gel d'agarose.

XI. Réaction de PCR

Chaque réaction de PCR est réalisée sur 2-3 μ l du produit de RT. Le mélange réactionnel, le tampon de PCR, et les étapes des programmes de PCR sont les mêmes que ceux décrits précédemment pour les PCR des expériences d'Immunoprécipitation de la Chromatine.

Les séquences des amorces utilisées pour les gènes analysés sont résumées dans le Tableau 13.

Les produits de PCR (environ 20 μ l) sont finalement séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5%. Les bandes sont révélées sous UV par coloration du gel au BET. Le produit d'une réaction de PCR réalisée sur de l'eau à la place de l'échantillon biologique a servi de contrôle négatif de la réaction.

Tableau 13 Liste des amorces utilisées en RT-PCR.

Gène	Séquence (5'-3')	Taille du fragment
c-myc		
sens	CCTCCAGCTTGTACCTGCAGGAT	336pb
antisens	CAGCAGAAGGTGATCCAGACTCTG	
L32		
sens	GCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTT	509pb
antisens	GAAGGAAGATGCCAGATGGCAGTTTTTAC	
PSA		
sens	CTGTCCGTGACGTGGATT	166pb
antisens	GTGGGCAGCTGTGAGGAC	

XII. Test de Protection à la Ribonucléase (RPA) en Multiplex

Cette technique est une méthode sensible et spécifique permettant la détection simultanée de plusieurs ARNm différents (Prediger, 2001). Nous avons utilisé les kits «Riboquant Multi-Probe RNase Protection Assay System» développés par la société Pharmingen.

Cette technique utilise des ARN-Polymérase, issues des bactériophages T7, qui permettent de synthétiser l'ARN complémentaire d'un brin d'ADN, avec une très grande spécificité. Chaque kit comporte un ensemble d'ADN complémentaires de différents gènes

d'intérêt (une dizaine dans chaque kit). Dans un système de transcription *in vitro* utilisant des dUTP radiomarqués au [³³P]-, l'ARN polymérase T7 va alors diriger la synthèse très spécifique, à partir de ces ADNc, d'ARN anti-sens, marqués au [-³³P]. Ces différentes sondes radiomarquées, en excès, vont s'hybrider spécifiquement avec les ARNm de l'échantillon biologique. Sous l'effet d'une Ribonucléase, les sondes libres et l'ARNm simple brin non hybridé vont ensuite être dégradés, tandis que les sondes radiomarquées hybridées à l'ARNm d'intérêt seront protégées de la digestion. Après purification et séparation sur gel dénaturant de polyacrylamide, les sondes radiomarquées sont visualisées par autoradiographie. La quantité de chaque espèce d'ARNm dans l'échantillon biologique initial peut ainsi être déterminée à partir de l'intensité de la sonde radiomarquée correspondante. L'incorporation, dans chaque kit, d'ADN complémentaires codant pour des gènes contrôle (L32, GAPDH), exprimés de façon ubiquitaire, permet de comparer les niveaux d'expression de différentes espèces d'ARNm entre plusieurs échantillons.

Les RPA ont été effectuées à partir de 2µg d'ARN total de chaque échantillon cellulaire, et nous avons suivi les protocoles et utilisé les réactifs fournis par le fabricant (BD Pharmingen).

Les kits utilisés correspondent aux mélanges de sondes suivants □ Multi-Probe Template Sets Riboquant «**ICC-1**», «**ICC-2**», «**ICYC-1**», «**ICYC-2**» et «**ICK3**».

XIII. Mesure de l'activité de gènes rapporteurs

Cette méthode permet d'analyser l'effet d'un ligand sur un promoteur donné, en transfectant de façon transitoire les cellules avec un plasmide contenant un gène rapporteur (dans notre cas la Luciférase) dont la transcription est placée sous le contrôle du promoteur d'intérêt, entier ou tronqué. Ainsi, l'addition du ligand va stimuler ou réprimer l'activité du promoteur, et ceci se traduit par des variations de transcription de la Luciférase, dont on peut ensuite mesurer l'expression par un test d'activité enzymatique (luminescence).

La co-transfection avec un vecteur d'expression constitutif (CMVtkGal exprimant la □-galactosidase) permet de contrôler l'efficacité et l'homogénéité de la transfection entre les différents échantillons.

Les plasmides rapporteurs utilisés ont été séquencés afin de contrôler la fiabilité de ces constructions. La carte de ces plasmides rapporteurs figure en Annexe IV.

XIII.1 Transfection transitoire des cellules LNCaP □ méthode jetPEI™

Parmi les différentes méthodes de transfection testées la technique du jetPEI™ (Poly Transfection) s'est avérée être la plus efficace, la plus rapide, et la moins toxique. L'agent de transfection (polyéthylénimine) permet de compacter l'ADN en particules cationiques capables d'interagir avec les protéoglycanes anioniques de la surface cellulaire, favorisant ainsi l'entrée du plasmide par endocytose (Boussif et al., 1995).

Les cellules LNCaP ont étéensemencées en plaques 6 puits, dans 2ml de milieu MEM 10% SVF sans rouge de phénol, à raison de 10⁵cellules/puits. Après 3 jours d'adhésion, les cellules ont été transfectées en suivant les procédures du fournisseur.

La quantité totale d'ADN dans chaque précipité a été fixée à $3\mu\text{g/puits}$. L'ADN à transférer (CMVtkGal \square 300ng \square plasmide rapporteur \square $x\mu\text{g}$ \square pBlue-Script *qsp* $3\mu\text{g}$) est mélangé dans 100 μl final de NaCl 150mM.

En parallèle, 6 μl du réactif de transfection jetPEI sont dilués dans 100 μl de NaCl 150mM.

Les 2 solutions (ADN/NaCl et jetPEI/NaCl) sont vortexées, puis la solution de jetPEI/NaCl est incorporée dans la solution ADN/NaCl. Le mélange est incubé 15-30min à température ambiante, pour que les précipités se forment, puis il est déposé dans le milieu de culture des cellules.

Concrètement, un mélange est préparé pour l'ensemble des puits à transférer, et distribué dans chaque puits.

Après 12-16h d'incubation des cellules dans ce milieu de transfection, la moitié (soit 1ml) du milieu de culture est éliminée, et remplacée par 1ml de milieu contenant le ligand concentré 2X. Ceci permet d'éliminer une partie des réactifs de transfection et d'ajouter le ligand sans avoir à vider totalement les puits.

Par ailleurs, le fait de laisser les cellules en présence d'un reste de réactifs de transfection ne pose pas de problème, puisqu'aucune toxicité n'a été observée.

XIII.2 Lyse cellulaire

A l'issue de l'incubation avec le ligand, les milieux de culture sont éliminés, et les cellules sont lysées en ajoutant dans chaque puits 250 μl de tampon de lyse (Passive Lysis Buffer, Promega, dilué 5 fois extemporanément dans de l'eau ultrapure). Après 15min d'incubation à température ambiante sous agitation, les lysats sont centrifugés (10min, 12000rpm, 4°C) et les surnageants sont prélevés.

Les protéines totales sont dosées par la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) déjà décrite.

XIII.3 Mesure de l'activité Luciférase

Le tampon-stock de Luciférase (2X) a la composition suivante \square 40mM Tris-phosphate (pH7,8), 2,14mM MgCl_2 , 5,4mM MgSO_4 , 0,2mM EDTA, 66,6mM DTT, et le pH final est ajusté à 7,8. Il est stable à -20°C .

La réaction nécessite également une solution stock d'ATP (à 10^{-2}M , pH 7,8, dissout dans de l'eau), une solution stock de Coenzyme A (sel de lithium, préparée à 10^{-2}M dans de l'eau) et une solution stock du substrat de la réaction, la Luciférine (dissoute à 10^{-2}M dans du Tris 10mM pH7,8).

Le milieu réactionnel est préparé extemporanément en mélangeant 53 μl de la solution-stock d'ATP, 47 μl de de la solution-stock de Luciférine, 27 μl de la solution-stock de Coenzyme A, 500 μl du tampon Luciférase (2X) et en complétant à 1ml avec de l'eau ultrapure.

Ce mélange est préparé selon le volume nécessaire à l'ensemble des échantillons, à raison de 50 μl /échantillon, et il est maintenu à l'abri de la lumière.

150 μl de chaque lysat sont déposés dans un puits d'une plaque 96 puits (OptiPlateTM 96, Perkin Elmer), et la mesure de luminescence (exprimée en RLU) est réalisée par un

luminomètre (MicroLumat LB96P, EG&G Berthold) qui injecte le milieu réactionnel dans les puits (50 μ l/puits) et effectue la mesure de façon automatisée.

XIII.4 Mesure de l'activité β -Galactosidase

Le test est réalisé en mélangeant 20 μ l de chaque lysat et 180 μ l de milieu réactionnel.

Le milieu réactionnel est préparé en mélangeant 30 μ l d'ONPG (ortho-nitrophenyl- β -D galactopyranoside, à 4mg/ml) et 150 μ l du tampon β -Galactosidase.

Ce tampon β -Gal a la composition suivante \square 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgCl₂, et 50mM β -mercaptoethanol.

Le mélange est préparé extemporanément selon le volume nécessaire à l'ensemble des échantillons, et distribué dans une plaque 96 puits. Chaque lysat est ensuite ajouté, et la plaque est incubée à 37°C, le temps nécessaire à l'apparition de la coloration jaune (3min à 1h maximum).

La réaction est alors stoppée en ajoutant dans chaque puits 75 μ l d'une solution de Na₂CO₃ à 1M.

L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie (Abs420nm), et les unités β -Galactosidase totales sont calculées selon la formule \square

$$U. \beta\text{-Gal totales} = \frac{100 \times \text{Vol total lysat} \times \text{Abs420nm}}{\text{Vol essai} \times \text{temps incub (h)}}$$

XIV. Production et amplification de plasmides \square

Les plasmides à amplifier sont introduits dans la souche bactérienne *E.coli* XL1-blue. La transformation a été effectuée en utilisant environ 10ng de plasmide.

Chaque plasmide est dilué dans de l'eau pour un volume final de 80 μ l, auxquels sont ajoutés 20 μ l de tampon KCM (5X).

Ce tampon KCM (5X) a la composition suivante \square 0,5M KCl, 0,15M CaCl₂, 0,25M MgCl₂, et a été filtré stérilement.

100 μ l de bactéries compétentes sont ajoutées à ce mélange, et l'ensemble est incubé sur glace pendant 20min, puis à température ambiante pendant 10min. Après addition d'1ml de milieu LB Broth, le mélange est incubé à 37°C pendant 30min à 1h. Les tubes sont centrifugés 1min à 13000rpm, le surnageant est grossièrement éliminé, et le culot est homogénéisé dans le faible volume de surnageant restant, avant d'être étalé sur des boîtes de Pétri contenant du LB Agar (solide) et l'antibiotique de sélection (ici Ampicilline à 0,5 μ g/ml final). Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Une colonie isolée sur la boîte de Pétri est ensuite piquée, et une mini-culture est inoculée dans 3ml de milieu LB Broth additionné d'ampicilline (0,5 μ g/ml). L'incubation dure toute la journée à 37°C sous agitation.

Une maxi-culture est inoculée en mélangeant la totalité de la suspension dans 400ml de LB Broth additionné d'ampicilline ($0,5\mu\text{g/ml}$). La culture est incubée toute la nuit sous agitation à 37°C .

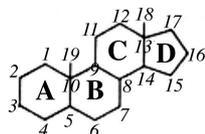
L'ADN est ensuite purifié en utilisant le kit Nucleobond AX-500 (Macherey Nagel). La procédure recommandée par le fournisseur a été suivie strictement.

L'ADN plasmidique est finalement remis en solution dans du tampon TE, puis dosé par spectrophotométrie (Abs 260nm).

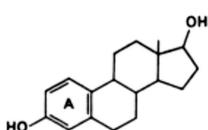
XV. Tests statistiques

L'analyse statistique a été réalisée par une analyse de variance de Anova. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme significative.

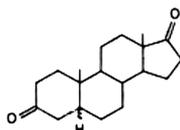
ANNEXE I. Structure des principaux stéroïdes et anti-androgènes



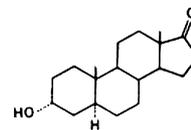
Structure de base des stéroïdes en C19 et numérotation des atomes de carbone



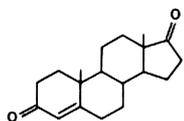
17- β -Oestradiol (E2)



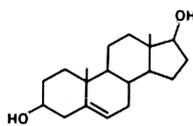
5- α /14-Androstane-3,11-dione



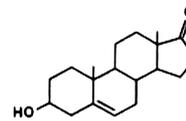
Androstérone



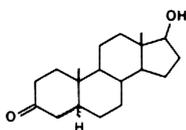
Δ^4 -Androstène-3,11-dione



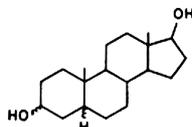
Δ^5 -Androstène-3,11-diol



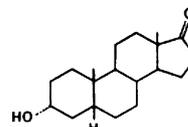
Déhydroépiandrostérone (DHEA)



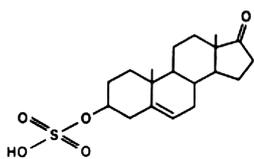
5- α /17-Dihydrotestostérone (DHT)



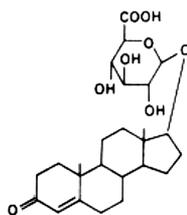
5- α /14-3- β /17- Androstane-3,11,17-triol



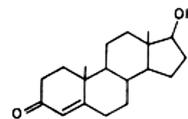
étiocolanone



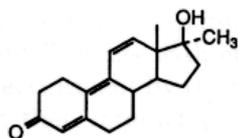
Sulfate de
Déhydroépiandrostérone
(S-DHEA)



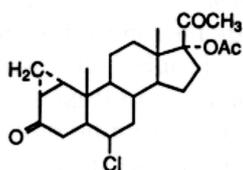
Glucuronide de
Testostérone



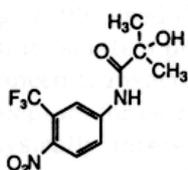
Testostérone



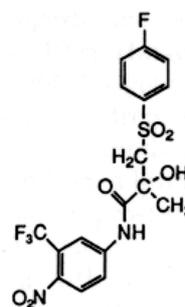
R1881
(méthyltriénolone)



Acétate de cyprotérone
(CPA)



Hydroxy-Flutamide



Bicalutamide
(Casodex, ICI 176334)

ANNEXE II. Le contrôle du cycle cellulaire

I. Vue générale

Le déroulement de chaque phase du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) est contrôlé par 3 familles de protéines régulatrices essentielles □ d'une part les cyclines, d'autre part les kinases cdk (cyclin-dependent kinases) et enfin les inhibiteurs de cdk (CKI).

Sous l'effet d'un stimulus mitogène (facteur de croissance, hormone), l'expression des cyclines impliquées spécifiquement dans la phase G1 augmente transitoirement, et chaque cycline s'associe à une cdk particulière. L'association cdk-cycline active la sous-unité catalytique de la kinase, et la cdk ainsi activée phosphoryle spécifiquement certaines protéines-cible. Les cibles les plus connues dans la phase G1 sont les membres de la famille pRb (rétinoblastoma susceptibility protein), incluant Rb, p107 ou p130. Les cyclines D (D1, D3) sont exprimées essentiellement au cours de la phase G1, elles s'associent à et activent les kinases cdk4/cdk6 pour induire la phosphorylation de Rb. En fin de phase G1, l'expression des cyclines E et A augmente à leur tour, elles activent cdk2 qui maintient Rb dans un état hyperphosphorylé. Cette succession ordonnée d'événements assure la progression de la phase G1 à la phase S □ en effet, lorsque Rb est hypophosphorylé, il séquestre des facteurs de transcription essentiels, appartenant à la famille E2-F. Seule l'hyperphosphorylation de Rb en fin de phase G1 permet la libération de E2-F, qui va alors activer la transcription de gènes codant pour des protéines nécessaires à la réplication de l'ADN (sous-unités □ et □ de la DNA polymérase, thymidilate synthase etc). E2F-1 permet également la transcription des gènes codant pour les cyclines A et E, ce qui renforce la phosphorylation initiale de Rb et l'activation de E2-F. La Figure 60 schématise la succession des différentes étapes du cycle, ainsi que les couples cdk-cyclines impliqués et leurs inhibiteurs.

Le point de la phase G1 au-delà duquel une cellule ne dépend plus de son environnement extracellulaire est appelé point de restriction en G1 ou «point R□ : une fois franchi, la cellule poursuit l'achèvement d'un cycle complet, tant qu'elle a à disposition les facteurs de survie nécessaires (Pardee, 1989).

Les autres phases sont contrôlées de la même manière, les cyclines spécifiques s'accumulent ponctuellement, s'associent aux cdk, des protéines spécifiques sont phosphorylées et les cascades de régulation s'enchaînent pour assurer le bon déroulement de la phase et l'entrée dans la phase suivante. Pour une revue plus complète, voir (Grana & Reddy, 1995; Morgan, 1995).

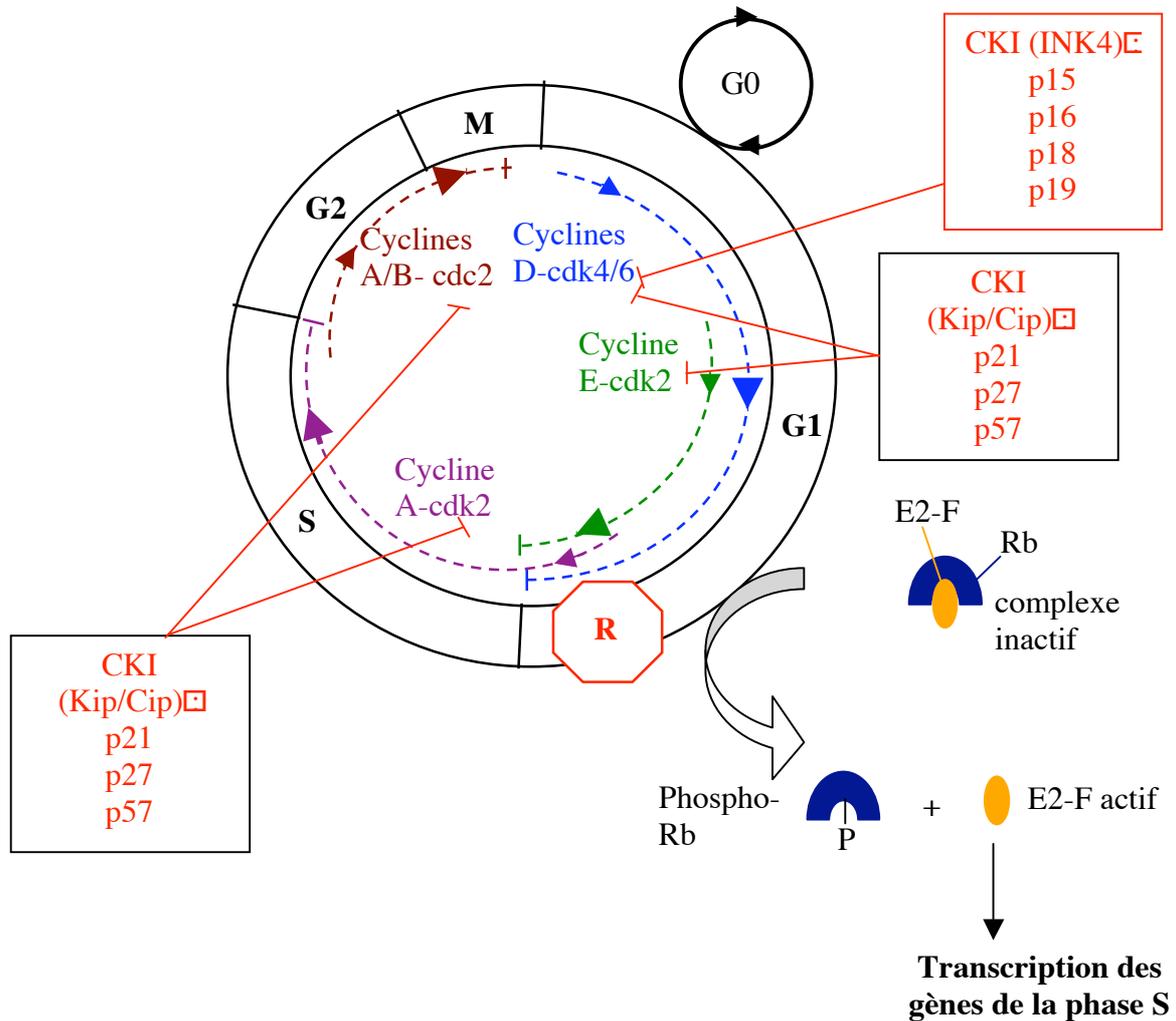


Figure 60 Représentation schématisée des différentes étapes du cycle cellulaire.

Les traits en pointillés représentent les différents couples de cdk-cyclines impliqués dans chaque phase du cycle. Les flèches de taille croissante symbolisent l'augmentation dans le temps de l'expression de chaque cycline. Sont représentées également les 2 familles d'inhibiteurs de cdk (CKI) et les cdk régulées par chaque famille. Enfin, la séquestration des facteurs de transcription E2-F par Rb et la libération de E2-F suite à l'hyper-phosphorylation de Rb en fin de phase G1 sont indiquées. R point de restriction en G1. La kinase cdc2 est aussi appelée cdk1.

II. Niveaux et mode de régulation

Chaque cycline subit un cycle d'accumulation/dégradation dans le temps, permettant l'activité spécifique des kinases nécessaires à un instant donné par exemple, la dégradation de la cycline E en début de phase S permet à la cycline A néo-synthétisée de prendre la place de la cycline E vis-à-vis de la kinase cdk2, ce qui permet de stimuler la transcription d'un nouveau groupe de gènes spécifiques au déroulement de la phase S. De la même façon, la

dégradation de la cycline B est obligatoire pour que les cellules achèvent la Mitose (King et al., 1994).

Ces données suggèrent que l'expression ectopique de ces cyclines ou cdk peut accélérer la progression des cellules dans le cycle—ainsi, il a été montré que l'expression ectopique des cyclines de G1 (cyclines D et E) accélère la progression des cellules vers la phase S (Quelle et al., 1993), ce qui indique que leur niveau d'expression est un facteur limitant dans la progression G1-S.

A l'inverse, puisque l'expression des différentes cyclines et cdk est spécifique d'une phase donnée du cycle, la répression de leur expression ou activité devrait entraîner un arrêt des cellules dans cette phase—effectivement, l'expression ectopique de mutants dominants négatifs de *cdc2* et de *cdk2* bloque les cellules respectivement à la transition G2-M, et en G1 (van den Heuvel & Harlow, 1993), et la micro-injection d'anticorps contre la cycline E ou contre *cdk2* bloque les cellules en G1 (Pagano et al., 1993; Tsai et al., 1993).

En plus de la régulation positive exercée par les cyclines, l'activité enzymatique des cdk est régulée négativement par des inhibiteurs, les CKI. L'expression de ces inhibiteurs de cdk peut être augmentée quand cela s'avère nécessaire, pour bloquer l'activation des cdk par les cyclines.

Les CKI connus sont regroupés en 2 familles de gènes, Ink4 et Cip/kip. La famille Cip/kip inclue les inhibiteurs *p21^{waf1, cip1}*, *p27^{kip1}* et *p57^{kip2}*. Ces inhibiteurs ont un spectre d'action relativement large dans le sens où ils peuvent inhiber de nombreuses cdk, dans différentes phases du cycle (Fig.60). La famille Ink4 inclue les protéines *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}*, *p18^{ink4c}*, *p19^{ink4d}* (Vidal & Koff, 2000). Contrairement aux autres, ces inhibiteurs de la famille Ink4 ont un spectre d'action beaucoup plus étroit, puisqu'ils inhibent spécifiquement les *cdk4* et 6 impliquées dans le contrôle de la phase G1. Un second produit du gène Ink4A a été identifié, *p19^{ARF}*, il lie et inactive la protéine MDM2, permettant d'augmenter la stabilité de *p53* et de provoquer un arrêt dans le cycle (Kamijo et al., 1998).

Les inhibiteurs de cdk interagissent avec les couples cdk-cyclines, et inhibent l'activité kinase. Dans ce contexte, *p21* est un cas particulier, car des travaux ont suggéré que selon son niveau d'expression, *p21* peut inhiber les activités kinase, ou au contraire favoriser l'interaction entre les cdk et les cyclines de la phase G1 (LaBaer et al., 1997; Sugimoto et al., 2002).

Dans ce schéma complexe d'interactions et de régulations, un autre mode de contrôle s'exercerait sur les CKI par les cyclines D—ces cyclines auraient pour fonction additionnelle de séquestrer *p21* ou *p27*, et de les tenir «à distance»—Des couples *cdk2*-cyclines E, beaucoup plus sensibles à l'effet inhibiteur des CKI. La séquestration progressive des CKI par la cycline D néo-formée en cours de G1 permettrait ainsi l'activation pleine de *cdk2* et la progression en phase S (Bouchard et al., 1999; Sherr & Roberts, 1999).

Il existe bien sûr d'autres niveaux de régulation de l'activité et/ou de l'expression des cdk et des cyclines (phosphorylations activatrices ou inhibitrices, dégradation etc), mais nous ne les détaillerons pas plus ici.

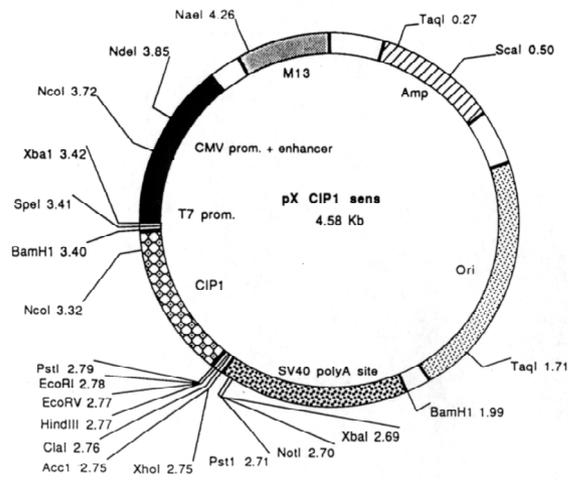
Les différents inhibiteurs de cdk sont eux aussi soumis à différents niveaux de contrôle, différant selon l'inhibiteur considéré—nous retiendrons simplement que la régulation majeure de l'expression de *p21* s'effectue au niveau transcriptionnel chez la plupart des cellules de mammifères (Gartel et al., 1998), alors que *p27* est plutôt régulée au niveau (post-) traductionnel, notamment *via* le contrôle de la dégradation de la protéine (Alessandrini et al., 1997).

III. Les régulateurs du cycle cellulaire sont des cibles des voies de signalisation

Les signaux mitogéniques ou anti-mitogéniques agissent par différentes voies spécifiques, qui culminent dans l'expression des gènes-cible, et/ou dans la régulation de l'activité ou de l'expression des différents régulateurs du cycle cellulaire. Par conséquent, les différents régulateurs du cycle cellulaire, en particulier les inhibiteurs de cdk, sont souvent des cibles directes de nombreuses voies de signalisation. De façon générale, les inhibiteurs de cdk sont souvent les médiateurs des signaux extra- ou intra-cellulaires négatifs visant à arrêter la cellule dans le cycle, ou à la faire «Sortir» du cycle (G0), par exemple dans le cas de la différenciation.

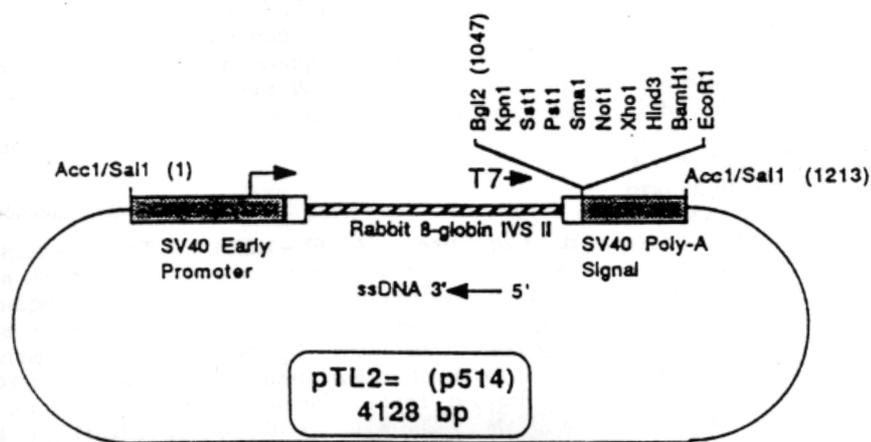
Etant donnée l'importance de ces différents régulateurs dans le contrôle du cycle d'une part, et dans le contrôle de l'intégrité de la cellule d'autre part, il est logique de penser que des anomalies dans l'expression ou la fonction de ces régulateurs/intégrateurs de signaux conduise à une prolifération non contrôlée de cellules présentant des anomalies génétiques. De fait, des défauts des régulateurs positifs et négatifs du cycle sont très fréquents dans la plupart des types de cancer. Les cellules cancéreuses possèdent donc une activité proliférative accrue et dysrégulée.

ANNEXE III. Structure des plasmides d'expression pX-CIP1 et p514-Rb



Plasmid Name: pX CIP1 sens
 Plasmid size: 4.58 kb
 Constructed by: V. Baldin
 Construction date: 2 Mars 1994

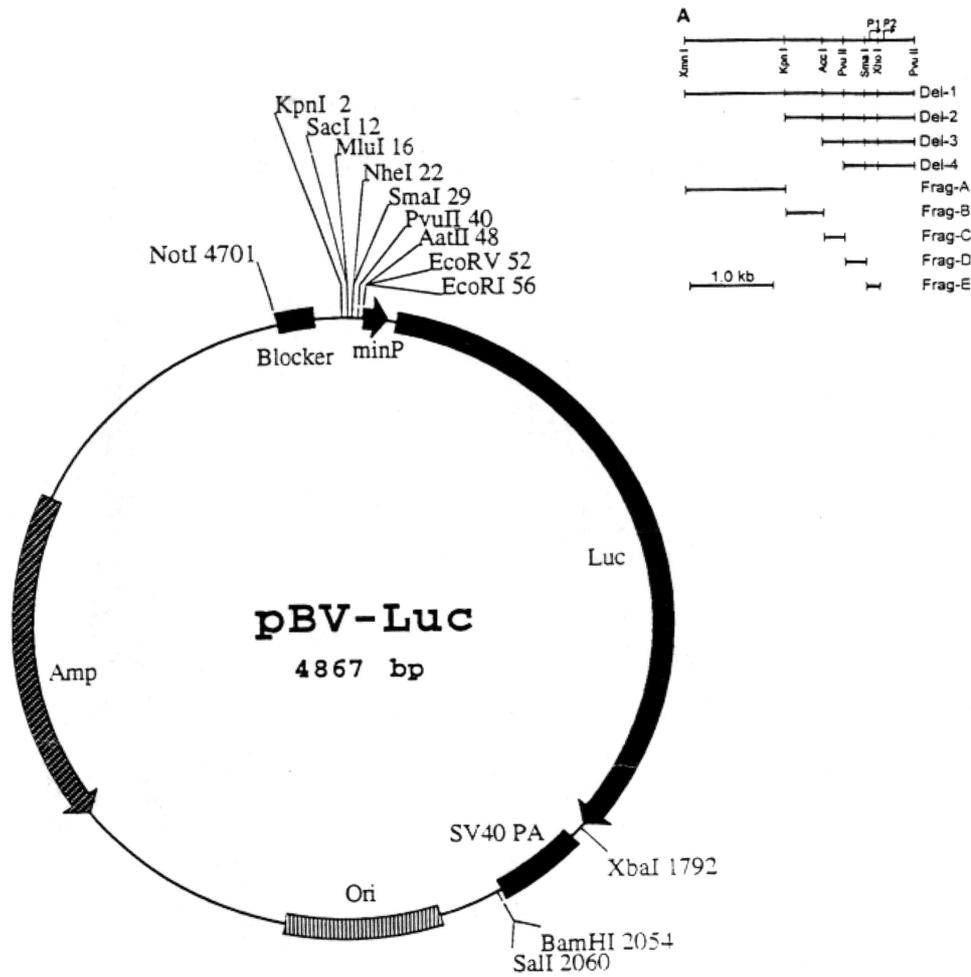
Carte du plasmide pX CIP1 (p21^{cip1}).



Carte du plasmide pR14-Rb.

Le transgène est inséré entre KpnI et BamHI. D'après (Bocco et al., 1993).

ANNEXE IV. Structure des plasmides rapporteurs pDel-Luc



Plasmid name: pBV-Luc
Plasmid size: 4867 bp

The sequence of pBV-Luc, a vector with very low basal expression activity, is available at www.coloncancer.org

Structure du plasmide rapporteur pBV-Luc, et des plasmides dérivés Del-1, Del-2, Del-3, Del-4, Frag-A, Frag-B, Frag-C, Frag-D, et Frag-E.

D'après (He et al., 1998).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaltomaa S., Lipponen P., Eskelinen M., Ala-Opas M., and Kosma V. M. (1999). Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate* **39**: 8-15.
- Abba M. C., Laguens R. M., Dulout F. N., and Golijow C. D. (2004). The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. *Mutat Res* **557**: 151-8.
- Acacio B. D., Stanczyk F. Z., Mullin P., Saadat P., Jafarian N., and Sokol R. Z. (2004). Pharmacokinetics of dehydroepiandrosterone and its metabolites after long-term daily oral administration to healthy young men. *Fertil Steril* **81**: 595-604.
- Adams J. B. (1985). Control of secretion and the function of C19-delta 5-steroids of the human adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol* **41**: 1-17.
- Adams J. M., Harris A. W., Pinkert C. A., Corcoran L. M., Alexander W. S., Cory S., Palmiter R. D., and Brinster R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**: 533-8.
- Adams M. R., Sears R., Nuckolls F., Leone G., and Nevins J. R. (2000). Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol Cell Biol* **20**: 3633-9.
- Adler A. J., Danielsen M., and 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 U S A* **89**: 11660-3.
- Adler A. J., Scheller A., Hoffman Y., and Robins D. M. (1991). Multiple components of a complex androgen-dependent enhancer. *Mol Endocrinol* **5**: 1587-96.
- Adlercreutz H. (1990). Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **201**: 3-23.
- Agus D. B., Cordon-Cardo C., Fox W., Drobnjak M., Koff A., Golde D. W., and Scher H. I. (1999). Prostate cancer cell cycle regulators: response to androgen withdrawal and development of androgen independence. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1869-76.
- Akakura K., Bruchofsky N., Goldenberg S. L., Rennie P. S., Buckley A. R., and Sullivan L. D. (1993). Effects of intermittent androgen suppression on androgen-dependent tumors. Apoptosis and serum prostate-specific antigen. *Cancer* **71**: 2782-90.
- Alessandrini A., Chiaur D. S., and Pagano M. (1997). Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* **11**: 342-5.
- Allan G. F., Leng X., Tsai S. Y., Weigel N. L., Edwards D. P., Tsai M. J., and O'Malley B. W. (1992). Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J Biol Chem* **267**: 19513-20.
- Alland L., Muhle R., Hou H., Jr., Potes J., Chin L., Schreiber-Agus N., and DePinho R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**: 49-55.
- Amir A. L., Barua M., McKnight N. C., Cheng S., Yuan X., and Balk S. P. (2003). A direct beta-catenin-independent interaction between androgen receptor and T cell factor 4. *J Biol Chem* **278**: 30828-34.
- Anderson D. C. (1974). Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* **3**: 69-96.
- Arlt W., Haas J., Callies F., Reincke M., Hubler D., Oettel M., Ernst M., Schulte H. M., and Allolio B. (1999). Biotransformation of oral dehydroepiandrosterone in elderly men: significant increase in circulating estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 2170-6.
- Askew D. S., Ashmun R. A., Simmons B. C., and Cleveland J. L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**: 1915-22.
- Balaji K. C., Koul H., Mitra S., Maramag C., Reddy P., Menon M., Malhotra R. K., and Laxmanan S. (1997). Antiproliferative effects of c-myc antisense oligonucleotide in prostate cancer cells: a novel therapy in prostate cancer. *Urology* **50**: 1007-15.

- Baley P. A., Yoshida K., Qian W., Sehgal I., and Thompson T. C. (1995). Progression to androgen insensitivity in a novel in vitro mouse model for prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **52**: 403-13.
- Bardin C. W., Bullock L. P., Sherins R. J., Mowszowicz I., and Blackburn W. R. (1973). Androgen metabolism and mechanism of action in male pseudohermaphroditism: a study of testicular feminization. *Recent Prog Horm Res* **29**: 65-109.
- Baretton G. B., Klenk U., Diebold J., Schmeller N., and Lohrs U. (1999). Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer* **80**: 546-55.
- Barrett-Connor E., Friedlander N. J., and Khaw K. T. (1990). Dehydroepiandrosterone sulfate and breast cancer risk. *Cancer Res* **50**: 6571-4.
- Bartsch W., Klein H., Schiemann U., Bauer H. W., and Voigt K. D. (1990). Enzymes of androgen formation and degradation in the human prostate. *Ann N Y Acad Sci* **595**: 53-66.
- Bartsch W., Klein H., Sturenburg H. J., and Voigt K. D. (1987). Metabolism of androgens in human benign prostatic hyperplasia: aromatase and its inhibition. *J Steroid Biochem* **27**: 557-64.
- Bartsch W., Krieg M., Becker H., Mohrmann J., and Voigt K. D. (1982). Endogenous androgen levels in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia and normal prostate. *Acta Endocrinol (Copenh)* **100**: 634-40.
- Bastien J., Adam-Stitah S., Plassat J. L., Chambon P., and Rochette-Egly C. (2002). The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells. *J Biol Chem* **277**: 28683-9.
- Baulieu E. E. (1960). [Ester-sulfates of steroid hormones. Isolation of the ester-sulfate of 5-androstene-3 beta-ol-17-one (dehydroepiandrosterone) in an adrenocortical tumor. Absence of the free steroid]. *C R Seances Soc Biol Fil* **251**: 1421-3.
- Baulieu E. E., Corvol P., Desbuquois B., Freychet P., Hanoune J, Jard, S, Labrie, F, Lissitzky, S, Ménard, J, Milgrom, E, Royer, P. (1978). Les hormones stéroïdes. In "Hormones. Aspects fondamentaux et physio-pathologiques" (HERMANN, Ed.), pp. 203-268, PARIS.
- Baulieu E. E., Thomas G., Legrain S., Lahlou N., Roger M., Debuire B., Faucounau V., Girard L., Hervy M. P., Latour F., Leaud M. C., Mokrane A., Pitti-Ferrandi H., Trivalle C., de Lacharriere O., Nouveau S., Rakoto-Arison B., Souberbielle J. C., Raison J., Le Bouc Y., Raynaud A., Girerd X., and Forette F. (2000). Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4279-84.
- Beilin J., Ball E. M., Favaloro J. M., and Zajac J. D. (2000). Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* **25**: 85-96.
- Belanger A., Brochu M., Lacoste D., Noel C., Labrie F., Dupont A., Cusan L., Caron S., and Couture J. (1991). Steroid glucuronides: human circulatory levels and formation by LNCaP cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**: 593-8.
- Belanger B., Belanger A., Labrie F., Dupont A., Cusan L., and Monfette G. (1989). Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men. *J Steroid Biochem* **32**: 695-8.
- Belanger G., Beaulieu M., Marcotte B., Levesque E., Guillemette C., Hum D. W., and Belanger A. (1995). Expression of transcripts encoding steroid UDP-glucuronosyltransferases in human prostate hyperplastic tissue and the LNCaP cell line. *Mol Cell Endocrinol* **113**: 165-73.
- Bello-Fernandez C., Packham G., and Cleveland J. L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 7804-8.
- Bentley D. L., and Groudine M. (1986). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* **321**: 702-6.
- Bentley D. L., and Groudine M. (1988). Sequence requirements for premature termination of transcription in the human c-myc gene. *Cell* **53**: 245-56.

- Berges R. R., Vukanovic J., Epstein J. I., CarMichel M., Cisek L., Johnson D. E., Veltri R. W., Walsh P. C., and Isaacs J. T. (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* **1**: 473-80.
- Bernard D., Pourtier-Manzanedo A., Gil J., and Beach D. H. (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest* **112**: 1724-31.
- Berns E. M., de Boer W., and Mulder E. (1986). Androgen-dependent growth regulation of and release of specific protein(s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *Prostate* **9**: 247-59.
- Berns K., Hijmans E. M., and Bernards R. (1997). Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene* **15**: 1347-56.
- 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**: 731-8.
- Bhatia K., Huppi K., Spangler G., Siwarski D., Iyer R., and Magrath I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. *Nat Genet* **5**: 56-61.
- Bieche I., Parfait B., Tozlu S., Lidereau R., and Vidaud M. (2001). Quantitation of androgen receptor gene expression in sporadic breast tumors by real-time RT-PCR: evidence that MYC is an AR-regulated gene. *Carcinogenesis* **22**: 1521-6.
- Blackwell T. K., Kretzner L., Blackwood E. M., Eisenman R. N., and Weintraub H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* **250**: 1149-51.
- Blackwood E. M., Luscher B., and Eisenman R. N. (1992). Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev* **6**: 71-80.
- Block J. L., Block N. L., and Lokeshwar B. L. (1996). Inhibition of aromatase activity and growth suppression by 4-methoxy-4-androstene-3,17-dione in an androgen sensitive human prostatic carcinoma cell line. *Cancer Lett* **101**: 143-8.
- Blok L. J., Bartlett J. M., Bolt-De Vries J., Themmen A. P., Brinkmann A. O., Weinbauer G. F., Nieschlag E., and Grootegoed J. A. (1992). Effect of testosterone deprivation on expression of the androgen receptor in rat prostate, epididymis and testis. *Int J Androl* **15**: 182-98.
- Blondeau J. P., Baulieu E. E., and Robel P. (1982). Androgen-dependent regulation of androgen nuclear receptor in the rat ventral prostate. *Endocrinology* **110**: 1926-32.
- Bocco J. L., Reimund B., Chatton B., and Kedinger C. (1993). Rb may act as a transcriptional co-activator in undifferentiated F9 cells. *Oncogene* **8**: 2977-86.
- Bouchard C., Thieke K., Maier A., Saffrich R., Hanley-Hyde J., Ansorge W., Reed S., Sicinski P., Bartek J., and Eilers M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* **18**: 5321-33.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., and Behr J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7297-301.
- Brantjes H., Roose J., van De Wetering M., and Clevers H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* **29**: 1410-9.
- Brinkmann A. O., Faber P. W., van Rooij H. C., Kuiper G. G., Ris C., Klaassen P., van der Korput J. A., Voorhorst M. M., van Laar J. H., Mulder E., and et al. (1989). The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem* **34**: 307-10.
- Brochu M., Belanger A., Dupont A., Cusan L., and Labrie F. (1987). Effects of flutamide and aminoglutethimide on plasma 5 alpha-reduced steroid glucuronide concentrations in castrated patients with cancer of the prostate. *J Steroid Biochem* **28**: 619-22.
- Brodie A. M., Son C., King D. A., Meyer K. M., and Inkster S. E. (1989). Lack of evidence for aromatase in human prostatic tissues: effects of 4-hydroxyandrostenedione and other inhibitors on androgen metabolism. *Cancer Res* **49**: 6551-5.
- Brown C. J., Goss S. J., Lubahn D. B., Joseph D. R., Wilson E. M., French F. S., and Willard H. F. (1989). Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* **44**: 264-9.

- Bruchovsky N., Rennie P. S., Coldman A. J., Goldenberg S. L., To M., and Lawson D. (1990). Effects of androgen withdrawal on the stem cell composition of the Shionogi carcinoma. *Cancer Res* **50**: 2275-82.
- Bruchovsky N., Sadar M. D., Akakura K., Goldenberg S. L., Matsuoka K., and Rennie P. S. (1996). Characterization of 5 α -reductase gene expression in stroma and epithelium of human prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol* **59**: 397-404.
- Bruder J. M., Sobek L., and Oettel M. (1997). Dehydroepiandrosterone stimulates the estrogen response element. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**: 461-6.
- Bubulya A., Wise S. C., Shen X. Q., Burmeister L. A., and Shemshedini L. (1996). c-Jun can mediate androgen receptor-induced transactivation. *J Biol Chem* **271**: 24583-9.
- Burnstein K. L., Maiorino C. A., Dai J. L., and Cameron D. J. (1995). Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression. *Mol Cell Endocrinol* **115**: 177-86.
- Buttyan R., Sawczuk I. S., Benson M. C., Siegal J. D., and Olsson C. A. (1987). Enhanced expression of the c-myc protooncogene in high-grade human prostate cancers. *Prostate* **11**: 327-37.
- Buttyan R., Zakeri Z., Lockshin R., and Wolgemuth D. (1988). Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol Endocrinol* **2**: 650-7.
- Campisi J., Gray H. E., Pardee A. B., Dean M., and Sonenshein G. E. (1984). Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell* **36**: 241-7.
- Canelles M., Delgado M. D., Hyland K. M., Lerga A., Richard C., Dang C. V., and Leon J. (1997). Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene* **14**: 1315-27.
- Carrano A. C., Eytan E., Hershko A., and Pagano M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**: 193-9.
- Carter B. S., Beaty T. H., Steinberg G. D., Childs B., and Walsh P. C. (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3367-71.
- Castagnetta L. A., Granata O. M., Bellavia V., Amodio R., Scaccianoce E., Notarbartolo M., Follari M. R., Miceli M. D., and Carruba G. (1997). Product of aromatase activity in intact LNCaP and MCF-7 human cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **61**: 287-92.
- Cato A. C., and Weinmann J. (1988). Mineralocorticoid regulation of transcription of transfected mouse mammary tumor virus DNA in cultured kidney cells. *J Cell Biol* **106**: 2119-25.
- Chang C. S., Kokontis J., and Liao S. T. (1988). Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240**: 324-6.
- Chatterjee B. (2003). The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem* **253**: 89-101.
- Chaudhary D., and Miller D. M. (1995). The c-myc promoter binding protein (MBP-1) and TBP bind simultaneously in the minor groove of the c-myc P2 promoter. *Biochemistry* **34**: 3438-45.
- Chen C. D., Welsbie D. S., Tran C., Baek S. H., Chen R., Vessella R., Rosenfeld M. G., and Sawyers C. L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* **10**: 33-9.
- Chen D., Riedl T., Washbrook E., Pace P. E., Coombes R. C., Egly J. M., and Ali S. (2000). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Mol Cell* **6**: 127-37.
- Chen Y. C., Robles A. I., Martinez L. A., Liu F., Gimenez-Conti I. B., and Conti C. J. (1996). Expression of G1 Cyclins, Cyclin-dependent Kinases, and Cyclin-dependent Kinase inhibitors in Androgen-induced prostate proliferation in castrated rats. *Cell Growth Differ* **7**: 1571-1578.
- Cheng S., Brzostek S., Lee S. R., Hollenberg A. N., and Balk S. P. (2002). Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* **16**: 1492-501.
- Chesire D. R., and Isaacs W. B. (2002). Ligand-dependent inhibition of beta-catenin/TCF signaling by androgen receptor. T cell factor. *Oncogene* **21**: 8453-69.
- Cho N. H., Lim S. Y., Kim Y. T., Kim D., Kim Y. S., and Kim J. W. (2003). G2 checkpoint in uterine cervical cancer with HPV 16 E6 according to p53 polymorphism and its screening value. *Gynecol Oncol* **90**: 15-22.

- Chodak G. W., Kranc D. M., Puy L. A., Takeda H., Johnson K., and Chang C. (1992). Nuclear localization of androgen receptor in heterogeneous samples of normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. *J Urol* **147**: 798-803.
- Choo C. K., Ling M. T., Chan K. W., Tsao S. W., Zheng Z., Zhang D., Chan L. C., and Wong Y. C. (1999). Immortalization of human prostate epithelial cells by HPV 16 E6/E7 open reading frames. *Prostate* **40**: 150-8.
- Cinar B., Koeneman K. S., Edlund M., Prins G. S., Zhau H. E., and Chung L. W. (2001). Androgen receptor mediates the reduced tumor growth, enhanced androgen responsiveness, and selected target gene transactivation in a human prostate cancer cell line. *Cancer Res* **61**: 7310-7.
- Claessens F., Celis L., Peeters B., Heyns W., Verhoeven G., and Rombauts W. (1989). Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 833-40.
- Clark R. V., Hermann D. J., Cunningham G. R., Wilson T. H., Morrill B. B., and Hobbs S. (2004). Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5 α -reductase inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 2179-84.
- Clay C. M., Keri R. A., Finicle A. B., Heckert L. L., Hamernik D. L., Marschke K. M., Wilson E. M., French F. S., and Nilson J. H. (1993). Transcriptional repression of the glycoprotein hormone alpha subunit gene by androgen may involve direct binding of androgen receptor to the proximal promoter. *J Biol Chem* **268**: 13556-64.
- Cleutjens K. B., van der Korput H. A., van Eekelen C. C., van Rooij H. C., Faber P. W., and Trapman J. (1997). An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol* **11**: 148-61.
- Cleutjens K. B., van Eekelen C. C., van der Korput H. A., Brinkmann A. O., and Trapman J. (1996). Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J Biol Chem* **271**: 6379-88.
- Cole M. D. (1986). Activation of the c-myc oncogene. *Basic Life Sci* **38**: 399-406.
- Collette L., Studer U. E., Schroder F. H., Denis L. J., and Sylvester R. J. (2001). Why phase III trials of maximal androgen blockade versus castration in M1 prostate cancer rarely show statistically significant differences. *Prostate* **48**: 29-39.
- Comstock G. W., Gordon G. B., and Hsing A. W. (1993). The relationship of serum dehydroepiandrosterone and its sulfate to subsequent cancer of the prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2**: 219-21.
- Connor M. K., Kotchetkov R., Cariou S., Resch A., Lupetti R., Beniston R. G., Melchior F., Hengst L., and Slingerland J. M. (2003). CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Mol Biol Cell* **14**: 201-13.
- Cooney K. A., McCarthy J. D., Lange E., Huang L., Miesfeldt S., Montie J. E., Oesterling J. E., Sandler H. M., and Lange K. (1997). Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study. *J Natl Cancer Inst* **89**: 955-9.
- Craft N., Chhor C., Tran C., Belldegrun A., DeKernion J., Witte O. N., Said J., Reiter R. E., and Sawyers C. L. (1999a). Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res* **59**: 5030-6.
- Craft N., Shostak Y., Carey M., and Sawyers C. L. (1999b). A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* **5**: 280-5.
- Crawford E. D., Eisenberger M. A., McLeod D. G., Spaulding J. T., Benson R., Dorr F. A., Blumenstein B. A., Davis M. A., and Goodman P. J. (1989). A controlled trial of leuprolide with and without flutamide in prostatic carcinoma. *N Engl J Med* **321**: 419-24.
- Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Cato A. C., Hittmair A., Radmayr C., Eberle J., Bartsch G., and Klocker H. (1993a). Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol* **7**: 1541-50.
- Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Radmayr C., Hittmair A., Zhang J., Thurnher M., Bartsch G., and Klocker H. (1996). Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* **28**: 392-405.

- Culig Z., Hobisch A., Cronauer M. V., Radmayr C., Trapman J., Hittmair A., Bartsch G., and Klocker H. (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* **54**: 5474-8.
- Culig Z., Hobisch A., Hittmair A., Cronauer M. V., Radmayr C., Zhang J., Bartsch G., and Klocker H. (1997a). Synergistic activation of androgen receptor by androgen and luteinizing hormone-releasing hormone in prostatic carcinoma cells. *Prostate* **32**: 106-14.
- Culig Z., Hobisch A., Hittmair A., Peterziel H., Radmayr C., Bartsch G., Cato A. C., and Klocker H. (1997b). Hyperactive androgen receptor in prostate cancer: what does it mean for new therapy concepts? *Histol Histopathol* **12**: 781-6.
- Culig Z., Hoffmann J., Erdel M., Eder I. E., Hobisch A., Hittmair A., Bartsch G., Utermann G., Schneider M. R., Parczyk K., and Klocker H. (1999). Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *Br J Cancer* **81**: 242-51.
- Culig Z., Klocker H., Eberle J., Kaspar F., Hobisch A., Cronauer M. V., and Bartsch G. (1993b). DNA sequence of the androgen receptor in prostatic tumor cell lines and tissue specimens assessed by means of the polymerase chain reaction. *Prostate* **22**: 11-22.
- Cunha G. R. (1996). Growth factors as mediators of androgen action during male urogenital development. *Prostate Suppl* **6**: 22-5.
- Cunha G. R., Donjacour A. A., Cooke P. S., Mee S., Bigsby R. M., Higgins S. J., and Sugimura Y. (1987). The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev* **8**: 338-62.
- Dahlman-Wright K., Grandien K., Nilsson S., Gustafsson J. A., and Carlstedt-Duke J. (1993). Protein-protein interactions between the DNA-binding domains of nuclear receptors: influence on DNA-binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* **45**: 239-50.
- Dai J. L., and Burnstein K. L. (1996). Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. *Mol Endocrinol* **10**: 1582-94.
- Dai J. L., Maiorino C. A., Gkonos P. J., and Burnstein K. L. (1996). Androgenic up-regulation of androgen receptor cDNA expression in androgen-independent prostate cancer cells. *Steroids* **61**: 531-9.
- Daksis J. I., Lu R. Y., Facchini L. M., Marhin W. W., and Penn L. J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* **9**: 3635-45.
- Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J., Patterson D., Gallo R. C., and Croce C. M. (1982a). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7824-7.
- Dalla-Favera R., Gelmann E. P., Martinotti S., Franchini G., Papas T. S., Gallo R. C., and Wong-Staal F. (1982b). Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 6497-501.
- Dalton S. (1992). Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *Embo J* **11**: 1797-804.
- Damassa D. A., Lin T. M., Sonnenschein C., and Soto A. M. (1991). Biological effects of sex hormone-binding globulin on androgen-induced proliferation and androgen metabolism in LNCaP prostate cells. *Endocrinology* **129**: 75-84.
- Dani C., Blanchard J. M., Piechaczyk M., El Sabouty S., Marty L., and Jeanteur P. (1984). Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 7046-50.
- de Ruiter P. E., Teuwen R., Trapman J., Dijkema R., and Brinkmann A. O. (1995). Synergism between androgens and protein kinase-C on androgen-regulated gene expression. *Mol Cell Endocrinol* **110**: R1-6.
- Dean M., Levine R. A., and Campisi J. (1986). c-myc regulation during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells is posttranscriptional and associated with growth arrest. *Mol Cell Biol* **6**: 518-24.
- Dedhar S., Rennie P. S., Shago M., Hagesteijn C. Y., Yang H., Filmus J., Hawley R. G., Bruchovsky N., Cheng H., Matusik R. J., and et al. (1994). Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* **367**: 480-3.

- Denis L. J., Carnelro de Moura J. L., Bono A., Sylvester R., Whelan P., Newling D., and Depauw M. (1993). Goserelin acetate and flutamide versus bilateral orchiectomy: a phase III EORTC trial (30853). EORTC GU Group and EORTC Data Center. *Urology* **42**: 119-29; discussion 129-30.
- Denison S. H., Sands A., and Tindall D. J. (1989). A tyrosine aminotransferase glucocorticoid response element also mediates androgen enhancement of gene expression. *Endocrinology* **124**: 1091-3.
- DesJardins E., and Hay N. (1993). Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Mol Cell Biol* **13**: 5710-24.
- Dijkman G. A., Fernandez del Moral P., Debruyne F. M., and Janknegt R. A. (1995). Improved subjective responses to orchiectomy plus nilutamide (anandron) in comparison to orchiectomy plus placebo in metastatic prostate cancer. International Anandron Study Group. *Eur Urol* **27**: 196-201.
- Dimberg A., Bahram F., Karlberg I., Larsson L. G., Nilsson K., and Oberg F. (2002). Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1). *Blood* **99**: 2199-206.
- Dotto G. P., Gilman M. Z., Maruyama M., and Weinberg R. A. (1986). c-myc and c-fos expression in differentiating mouse primary keratinocytes. *Embo J* **5**: 2853-7.
- Dotzlaw H., Moehren U., Mink S., Cato A. C., Iniguez Lluhi J. A., and Baniahmad A. (2002). The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Mol Endocrinol* **16**: 661-73.
- Duan R., Porter W., and Safe S. (1998). Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology* **139**: 1981-90.
- Dubik D., and Shiu R. P. (1992). Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene* **7**: 1587-94.
- Eastman-Reks S. B., and Vedeckis W. V. (1986). Glucocorticoid inhibition of c-myc, c-myb, and c-Ki-ras expression in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Res* **46**: 2457-62.
- Easwaran V., Pishvaian M., Salimuddin, and Byers S. (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* **9**: 1415-8.
- Eaton N. E., Reeves G. K., Appleby P. N., and Key T. J. (1999). Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* **80**: 930-4.
- Eder I. E., Culig Z., Ramoner R., Thurnher M., Putz T., Nessler-Menardi C., Tiefenthaler M., Bartsch G., and Klocker H. (2000). Inhibition of Lncap prostate cancer cells by means of androgen receptor antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther* **7**: 997-1007.
- Eick D. (1990). Elongation and maturation of c-myc RNA is inhibited by differentiation inducing agents in HL60 cells. *Nucleic Acids Res* **18**: 1199-205.
- Eilers M., Picard D., Yamamoto K. R., and Bishop J. M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* **340**: 66-8.
- Elghany N. A., Schumacher M. C., Slattery M. L., West D. W., and Lee J. S. (1990). Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology* **1**: 107-15.
- Ellem S. J., Schmitt J. F., Pedersen J. S., Frydenberg M., and Risbridger G. P. (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 2434-41.
- Elo J. P., Kvist L., Leinonen K., Isomaa V., Henttu P., Lukkarinen O., and Vihko P. (1995). Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 3494-500.
- Evan G. I., Wyllie A. H., Gilbert C. S., Littlewood T. D., Land H., Brooks M., Waters C. M., Penn L. Z., and Hancock D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**: 119-28.
- Faber P. W., van Rooij H. C., Schipper H. J., Brinkmann A. O., and Trapman J. (1993). Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. The role of Sp1. *J Biol Chem* **268**: 9296-301.

- Facchini L. M., Chen S., Marhin W. W., Lear J. N., and Penn L. Z. (1997). The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol Cell Biol* **17**: 100-14.
- Facchini L. M., and Penn L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* **12**: 633-51.
- Feldman B. J., and Feldman D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* **1**: 34-45.
- Fenton M. A., Shuster T. D., Fertig A. M., Taplin M. E., Kolvenbag G., Bubley G. J., and Balk S. P. (1997). Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* **3**: 1383-8.
- Flynn M. A., Weaver-Osterholtz D., Sharpe-Timms K. L., Allen S., and Krause G. (1999). Dehydroepiandrosterone replacement in aging humans. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 1527-33.
- Forsthoefel A. M., and Thompson E. A. (1987). Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells. *Mol Endocrinol* **1**: 899-907.
- Foury O., Nicolas B., Joly-Pharaboz M. O., and Andre J. (1998). Control of the proliferation of prostate cancer cells by an androgen and two antiandrogens. Cell specific sets of responses. *J Steroid Biochem Mol Biol* **66**: 235-40.
- Fronsdal K., Engedal N., Slagsvold T., and Saatcioglu F. (1998). CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor and mediates cross-talk with AP-1. *J Biol Chem* **273**: 31853-9.
- Fu M., Wang C., Wang J., Zhang X., Sakamaki T., Yeung Y. G., Chang C., Hopp T., Fuqua S. A., Jaffray E., Hay R. T., Palvimo J. J., Janne O. A., and Pestell R. G. (2002). Androgen receptor acetylation governs trans activation and MEKK1-induced apoptosis without affecting in vitro sumoylation and trans-repression function. *Mol Cell Biol* **22**: 3373-88.
- Fujimoto N., Yeh S., Kang H. Y., Inui S., Chang H. C., Mizokami A., and Chang C. (1999). Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate. *J Biol Chem* **274**: 8316-21.
- Fulton R., Forrest D., McFarlane R., Onions D., and Neil J. C. (1987). Retroviral transduction of T-cell antigen receptor beta-chain and myc genes. *Nature* **326**: 190-4.
- Furr B. J. (1989). Pharmacology of the luteinising hormone-releasing hormone (LHRH) analogue, Zoladex. *Horm Res* **32 Suppl 1**: 86-92.
- Furr B. J., Valcaccia B., Curry B., Woodburn J. R., Chesterson G., and Tucker H. (1987). ICI 176,334: a novel non-steroidal, peripherally selective antiandrogen. *J Endocrinol* **113**: R7-9.
- Furuya Y., and Isaacs J. T. (1993). Differential gene regulation during programmed death (apoptosis) versus proliferation of prostatic glandular cells induced by androgen manipulation. *Endocrinology* **133**: 2660-6.
- Galaktionov K., Chen X., and Beach D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**: 511-7.
- Gandarillas A., and Watt F. M. (1997). c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* **11**: 2869-82.
- Gartel A. L., Goufman E., Tevosian S. G., Shih H., Yee A. S., and Tyner A. L. (1998). Activation and repression of p21(WAF1/CIP1) transcription by RB binding proteins. *Oncogene* **17**: 3463-9.
- Gartel A. L., Ye X., Goufman E., Shianov P., Hay N., Najmabadi F., and Tyner A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4510-5.
- Georget V., Lobaccaro J. M., Terouanne B., Mangeat P., Nicolas J. C., and Sultan C. (1997). Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* **129**: 17-26.
- Georget V., Terouanne B., Nicolas J. C., and Sultan C. (2002). Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry* **41**: 11824-31.
- Geyer J., Godoy J. R., and Petzinger E. (2004). Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 300-6.
- Ghanadian R., Masters J. R., and Smith C. B. (1981). Altered androgen metabolism in carcinoma of the prostate. *Eur Urol* **7**: 169-70.

- Gioeli D., Ficarro S. B., Kwiek J. J., Aaronson D., Hancock M., Catling A. D., White F. M., Christian R. E., Settlage R. E., Shabanowitz J., Hunt D. F., and Weber M. J. (2002). Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem* **277**: 29304-14.
- Giovannucci E., Stampfer M. J., Krithivas K., Brown M., Dahl D., Brufsky A., Talcott J., Hennekens C. H., and Kantoff P. W. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3320-3.
- Goldenberg S. L., Bruchovsky N., Gleave M. E., Sullivan L. D., and Akakura K. (1995). Intermittent androgen suppression in the treatment of prostate cancer: a preliminary report. *Urology* **45**: 839-44; discussion 844-5.
- Goldenberg S. L., Gleave M. E., Taylor D., and Bruchovsky N. (1999). Clinical Experience with Intermittent Androgen Suppression in Prostate Cancer: Minimum of 3 Years' Follow-Up. *Mol Urol* **3**: 287-292.
- Gordon G. B., Bush T. L., Helzlsouer K. J., Miller S. R., and Comstock G. W. (1990). Relationship of serum levels of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to the risk of developing postmenopausal breast cancer. *Cancer Res* **50**: 3859-62.
- Grad J. M., Dai J. L., Wu S., and Burnstein K. L. (1999). Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Mol Endocrinol* **13**: 1896-911.
- Grana X., and Reddy E. P. (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* **11**: 211-9.
- Grange H., Thomassin M., Flavin V., Orlando V., and Breiling A. (2001). EMBO course on in vivo DNA-protein interactions.
- Gregory C. W., He B., Johnson R. T., Ford O. H., Mohler J. L., French F. S., and Wilson E. M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* **61**: 4315-9.
- Griep A. E., and Westphal H. (1988). Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6806-10.
- Guenther M. G., Barak O., and Lazar M. A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* **21**: 6091-101.
- Guillemette C., and Belanger A. (1995). Glucuronosyltransferase activity in human cancer cell line LNCaP. *Mol Cell Endocrinol* **107**: 131-9.
- Guillemette C., Hum D. W., and Belanger A. (1995). Specificity of glucuronosyltransferase activity in the human cancer cell line LNCaP, evidence for the presence of at least two glucuronosyltransferase enzymes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**: 355-62.
- Guo Y., and Kyprianou N. (1998). Overexpression of transforming growth factor (TGF) beta1 type II receptor restores TGF-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* **9**: 185-93.
- Hagenbuch B., and Meier P. J. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**: 1-18.
- Ham J., Thomson A., Needham M., Webb P., and Parker M. (1988). Characterization of response elements for androgens, glucocorticoids and progestins in mouse mammary tumour virus. *Nucleic Acids Res* **16**: 5263-76.
- Hann S. R., and Eisenman R. N. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* **4**: 2486-97.
- Hann S. R., King M. W., Bentley D. L., Anderson C. W., and Eisenman R. N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* **52**: 185-95.
- Hassig C. A., Tong J. K., Fleischer T. C., Owa T., Grable P. G., Ayer D. E., and Schreiber S. L. (1998). A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3519-24.
- Hay N., Bishop J. M., and Levens D. (1987). Regulatory elements that modulate expression of human c-myc. *Genes Dev* **1**: 659-71.

- Hay N., Takimoto M., and Bishop J. M. (1989). A FOS protein is present in a complex that binds a negative regulator of MYC. *Genes Dev* **3**: 293-303.
- Hayashi K., Makino R., Kawamura H., Arisawa A., and Yoneda K. (1987). Characterization of rat c-myc and adjacent regions. *Nucleic Acids Res* **15**: 6419-36.
- He B., Kempainen J. A., Voegel J. J., Gronemeyer H., and Wilson E. M. (1999). Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain. *J Biol Chem* **274**: 37219-25.
- He T. C., Sparks A. B., Rago C., Hermeking H., Zawel L., da Costa L. T., Morin P. J., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**: 1509-12.
- Heckert L. L., Wilson E. M., and Nilson J. H. (1997). Transcriptional repression of the alpha-subunit gene by androgen receptor occurs independently of DNA binding but requires the DNA-binding and ligand-binding domains of the receptor. *Mol Endocrinol* **11**: 1497-506.
- Heinlein C. A., and Chang C. (2002a). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* **23**: 175-200.
- Heinlein C. A., and Chang C. (2002b). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* **16**: 2181-7.
- Heinzel T., Lavinsky R. M., Mullen T. M., Soderstrom M., Laherty C. D., Torchia J., Yang W. M., Brard G., Ngo S. D., Davie J. R., Seto E., Eisenman R. N., Rose D. W., Glass C. K., and Rosenfeld M. G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**: 43-8.
- Heisler L. E., Evangelou A., Lew A. M., Trachtenberg J., Elsholtz H. P., and Brown T. J. (1997). Androgen-dependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* **126**: 59-73.
- Helzlsouer K. J., Alberg A. J., Gordon G. B., Longcope C., Bush T. L., Hoffman S. C., and Comstock G. W. (1995). Serum gonadotropins and steroid hormones and the development of ovarian cancer. *Jama* **274**: 1926-30.
- Helzlsouer K. J., Gordon G. B., Alberg A. J., Bush T. L., and Comstock G. W. (1992). Relationship of prediagnostic serum levels of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to the risk of developing premenopausal breast cancer. *Cancer Res* **52**: 1-4.
- Henriksson M., Bakardjiev A., Klein G., and Luscher B. (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* **8**: 3199-209.
- Henriksson M., and Luscher B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* **68**: 109-82.
- Hermeking H., Rago C., Schuhmacher M., Li Q., Barrett J. F., Obaya A. J., O'Connell B. C., Mateyak M. K., Tam W., Kohlhuber F., Dang C. V., Sedivy J. M., Eick D., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2229-34.
- Hobisch A., Culig Z., Radmayr C., Bartsch G., Klocker H., and Hittmair A. (1996). Androgen receptor status of lymph node metastases from prostate cancer. *Prostate* **28**: 129-35.
- Hofman K., Swinnen J. V., Verhoeven G., and Heyns W. (2001). E2F activity is biphasically regulated by androgens in LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 97-101.
- Holt J. T., Redner R. L., and Nienhuis A. W. (1988). An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* **8**: 963-73.
- Horoszewicz J. S., Leong S. S., Kawinski E., Karr J. P., Rosenthal H., Chu T. M., Mirand E. A., and Murphy G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **43**: 1809-18. <http://www-dep.iarc.fr> (2000).
- Hudson D. L., Guy A. T., Fry P., O'Hare M. J., Watt F. M., and Masters J. R. (2001). Epithelial cell differentiation pathways in the human prostate: identification of intermediate phenotypes by keratin expression. *J Histochem Cytochem* **49**: 271-8.
- Huggins C., Stevens R., and Hodges C. (1941). Studies on prostatic cancer. II. The effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Arch. Surg.* **43**: 209-223.

- Huot R. I., and Shain S. A. (1988). Differential metabolism of dehydroepiandrosterone sulfate and estrogen conjugates by normal or malignant AXC/SSh rat prostate cells and effects of these steroid conjugates on cancer cell proliferation in vitro. *J Steroid Biochem* **29**: 617-21.
- Hurlstone A., and Clevers H. (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *Embo J* **21**: 2303-11.
- Husmann D. A., Wilson C. M., McPhaul M. J., Tilley W. D., and Wilson J. D. (1990). Antipeptide antibodies to two distinct regions of the androgen receptor localize the receptor protein to the nuclei of target cells in the rat and human prostate. *Endocrinology* **126**: 2359-68.
- Ikonen T., Palvimo J. J., and Janne 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**: 29821-8.
- Ikonen T., Palvimo J. J., Kallio P. J., Reinikainen P., and Janne O. A. (1994). Stimulation of androgen-regulated transactivation by modulators of protein phosphorylation. *Endocrinology* **135**: 1359-66.
- Isaacs J. T., and Coffey D. S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl* **2**: 33-50.
- Janknegt R. A., Abbou C. C., Bartoletti R., Bernstein-Hahn L., Bracken B., Brisset J. M., Da Silva F. C., Chisholm G., Crawford E. D., Debruyne F. M., and et al. (1993). Orchiectomy and nilutamide or placebo as treatment of metastatic prostatic cancer in a multinational double-blind randomized trial. *J Urol* **149**: 77-82; discussion 83.
- Jansen-Durr P., Meichle A., Steiner P., Pagano M., Finke K., Botz J., Wessbecher J., Draetta G., and Eilers M. (1993). Differential modulation of cyclin gene expression by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3685-9.
- Jenkins R. B., Qian J., Lieber M. M., and Bostwick D. G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* **57**: 524-31.
- Jenster G., de Ruiter P. E., van der Korput H. A., Kuiper G. G., Trapman J., and Brinkmann A. O. (1994). Changes in the abundance of androgen receptor isotypes: effects of ligand treatment, glutamine-stretch variation, and mutation of putative phosphorylation sites. *Biochemistry* **33**: 14064-72.
- Jenster G., van der Korput H. A., van Vroonhoven C., van der Kwast T. H., Trapman J., and Brinkmann A. O. (1991). Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Mol Endocrinol* **5**: 1396-404.
- Joly-Pharaboz M. O., Soave M. C., Nicolas B., Mebarki F., Renaud M., Foury O., Morel Y., and Andre J. G. (1995). Androgens inhibit the proliferation of a variant of the human prostate cancer cell line LNCaP. *J Steroid Biochem Mol Biol* **55**: 67-76.
- Jonat C., Rahmsdorf H. J., Park K. K., Cato A. C., Gebel S., Ponta H., and Herrlich P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* **62**: 1189-204.
- Jones R. M., Branda J., Johnston K. A., Polymenis M., Gadd M., Rustgi A., Callanan L., and Schmidt E. V. (1996). An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol Cell Biol* **16**: 4754-64.
- Jorgensen J. S., and Nilson J. H. (2001). AR suppresses transcription of the alpha glycoprotein hormone subunit gene through protein-protein interactions with cJun and activation transcription factor 2. *Mol Endocrinol* **15**: 1496-504.
- Kallio P. J., Janne O. A., and Palvimo J. J. (1994). Agonists, but not antagonists, alter the conformation of the hormone-binding domain of androgen receptor. *Endocrinology* **134**: 998-1001.
- Kallio P. J., Poukka H., Moilanen A., Janne O. A., and Palvimo J. J. (1995). Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific DNA element. *Mol Endocrinol* **9**: 1017-28.
- Kaltz-Wittmer C., Klenk U., Glaessgen A., Aust D. E., Diebold J., Lohrs U., and Baretton G. B. (2000). FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest* **80**: 1455-64.

- Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S. C., Heyman R. A., Rose D. W., Glass C. K., and Rosenfeld M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**: 403-14.
- Kamijo T., Weber J. D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M. F., and Sherr C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8292-7.
- Kang H. Y., Yeh S., Fujimoto N., and Chang C. (1999). Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *J Biol Chem* **274**: 8570-6.
- Kang Z., Pirskanen A., Janne O. A., and Palvimo J. J. (2002). Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J Biol Chem* **277**: 48366-71.
- Karn J., Watson J. V., Lowe A. D., Green S. M., and Vedeckis W. (1989). Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. *Oncogene* **4**: 773-87.
- Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H., and et al. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**: 1491-4.
- Katz A. E., Benson M. C., Wise G. J., Olsson C. A., Bandyk M. G., Sawczuk I. S., Tomashefsky P., and Buttyan R. (1989). Gene activity during the early phase of androgen-stimulated rat prostate regrowth. *Cancer Res* **49**: 5889-94.
- Keath E. J., Caimi P. G., and Cole M. D. (1984). Fibroblast lines expressing activated c-myc oncogenes are tumorigenic in nude mice and syngeneic animals. *Cell* **39**: 339-48.
- Kelly K., Cochran B. H., Stiles C. D., and Leder P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* **35**: 603-10.
- Kelly W. K., and Scher H. I. (1993). Prostate specific antigen decline after antiandrogen withdrawal: the flutamide withdrawal syndrome. *J Urol* **149**: 607-9.
- Kemppainen J. A., Lane M. V., Sar M., and Wilson E. M. (1992). Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones. *J Biol Chem* **267**: 968-74.
- Kihara-Negishi F., Yamamoto H., Suzuki M., Yamada T., Sakurai T., Tamura T., and Oikawa T. (2001). In vivo complex formation of PU.1 with HDAC1 associated with PU.1-mediated transcriptional repression. *Oncogene* **20**: 6039-47.
- Kim I. Y., Kim J. H., Zelner D. J., Ahn H. J., Sensibar J. A., and Lee C. (1996). Transforming growth factor-beta1 is a mediator of androgen-regulated growth arrest in an androgen-responsive prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinology* **137**: 991-9.
- King R. W., Jackson P. K., and Kirschner M. W. (1994). Mitosis in transition. *Cell* **79**: 563-71.
- Kinoshita H., Shi Y., Sandefur C., Meisner L. F., Chang C., Choon A., Reznikoff C. R., Bova G. S., Friedl A., and Jarrard D. F. (2000). Methylation of the androgen receptor minimal promoter silences transcription in human prostate cancer. *Cancer Res* **60**: 3623-30.
- Klein H., Bressel M., Kastendieck H., and Voigt K. D. (1988). Quantitative assessment of endogenous testicular and adrenal sex steroids and of steroid metabolizing enzymes in untreated human prostatic cancerous tissue. *J Steroid Biochem* **30**: 119-30.
- Klocker H., Culig Z., Hobisch A., Cato A. C., and Bartsch G. (1994). Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. *Prostate* **25**: 266-73.
- Klotz L. H., Herr H. W., Morse M. J., and Whitmore W. F., Jr. (1986). Intermittent endocrine therapy for advanced prostate cancer. *Cancer* **58**: 2546-50.
- Knudsen K. E., Arden K. C., and Cavenee W. K. (1998). Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**: 20213-22.
- Knudsen K. E., Cavenee W. K., and Arden K. C. (1999). D-type cyclins complex with the androgen receptor and inhibit its transcriptional transactivation ability. *Cancer Res* **59**: 2297-301.
- Koh E., Kanaya J., and Namiki M. (2001). Adrenal steroids in human prostatic cancer cell lines. *Arch Androl* **46**: 117-25.
- Koh S. S., Li H., Lee Y. H., Widelitz R. B., Chuong C. M., and Stallcup M. R. (2002). Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-

- catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J Biol Chem* **277**: 26031-5.
- Kohl N. E., and Ruley H. E. (1987). Role of c-myc in the transformation of REF52 cells by viral and cellular oncogenes. *Oncogene* **2**: 41-8.
- Kokontis J., Takakura K., Hay N., and Liao S. (1994). Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation. *Cancer Res* **54**: 1566-73.
- Kokontis J. M., Hay N., and Liao S. (1998). Progression of LNCaP prostate tumor cells during androgen deprivation: hormone-independent growth, repression of proliferation by androgen, and role for p27Kip1 in androgen-induced cell cycle arrest. *Mol Endocrinol* **12**: 941-53.
- Kokontis J. M., and Liao S. (1999). Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam Horm* **55**: 219-307.
- Korinek V., Barker N., Morin P. J., van Wichen D., de Weger R., Kinzler K. W., Vogelstein B., and Clevers H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* **275**: 1784-7.
- Krongrad A., Wilson C. M., Wilson J. D., Allman D. R., and McPhaul M. J. (1991). Androgen increases androgen receptor protein while decreasing receptor mRNA in LNCaP cells. *Mol Cell Endocrinol* **76**: 79-88.
- Kuil C. W., Berrevoets C. A., and Mulder E. (1995). Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. *J Biol Chem* **270**: 27569-76.
- Kuil C. W., and Mulder E. (1994). Mechanism of antiandrogen action: conformational changes of the receptor. *Mol Cell Endocrinol* **102**: R1-5.
- Kuil C. W., and Mulder E. (1996). Deoxyribonucleic acid-binding ability of androgen receptors in whole cells: implications for the actions of androgens and antiandrogens. *Endocrinology* **137**: 1870-7.
- Kuiper G. G., De Ruiter P. E., and Brinkmann A. O. (1993). Androgen receptor phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* **684**: 224-6.
- La Spada A. R., Wilson E. M., Lubahn D. B., Harding A. E., and Fischbeck K. H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* **352**: 77-9.
- LaBaer J., Garrett M. D., Stevenson L. F., Slingerland J. M., Sandhu C., Chou H. S., Fattaey A., and Harlow E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**: 847-62.
- Labrie C., Belanger A., and Labrie F. (1988). Androgenic activity of dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology* **123**: 1412-7.
- Labrie C., Simard J., Zhao H. F., Belanger A., Pelletier G., and Labrie F. (1989). Stimulation of androgen-dependent gene expression by the adrenal precursors dehydroepiandrosterone and androstenedione in the rat ventral prostate. *Endocrinology* **124**: 2745-54.
- Labrie C., Trudel C., Li S., Martel C., Couet J., and Labrie F. (1991). Combination of an antiandrogen and a 5 alpha-reductase inhibitor: a further step towards total androgen blockade? *Endocrinology* **129**: 566-8.
- Labrie F., Belanger A., Cusan L., and Candas B. (1997). Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 2403-9.
- Labrie F., Belanger A., Simard J., Labrie C., and Dupont A. (1993a). Combination therapy for prostate cancer. Endocrine and biologic basis of its choice as new standard first-line therapy. *Cancer (Phila.)* **71**: 1059-1067.
- Labrie F., Dupont A., Belanger A., St-Arnaud R., Giguere M., Lacourciere Y., Emond J., and Monfette G. (1986). Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocr Rev* **7**: 67-74.
- Labrie F., Dupont A., Simard J., Luu-The V., and Belanger A. (1993b). Intracrinology: the basis for the rational design of endocrine therapy at all stages of prostate cancer. *Eur Urol* **24 Suppl 2**: 94-105.

- Larsson L. G., Ivhed I., Gidlund M., Pettersson U., Vennstrom B., and Nilsson K. (1988). Phorbol ester-induced terminal differentiation is inhibited in human U-937 monoblastic cells expressing a v-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 2638-42.
- Lavenu A., Pournin S., Babinet C., and Morello D. (1994). The cis-acting elements known to regulate c-myc expression ex vivo are not sufficient for correct transcription in vivo. *Oncogene* **9**: 527-36.
- Le Bail J. C., Aubourg L., and Habrioux G. (2000). Effects of pinostrobin on estrogen metabolism and estrogen receptor transactivation. *Cancer Lett* **156**: 37-44.
- Le Bail J. C., Lotfi H., Charles L., Pepin D., and Habrioux G. (2002). Conversion of dehydroepiandrosterone sulfate at physiological plasma concentration into estrogens in MCF-7 cells. *Steroids* **67**: 1057-64.
- Leav I., McNeal J. E., Kwan P. W., Komminoth P., and Merk F. B. (1996). Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Prostate* **29**: 137-45.
- Lee D. K., and Chang C. (2003). Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol* **84**: 41-9.
- Lee D. K., Duan H. O., and Chang C. (2000). From androgen receptor to the general transcription factor TFIIH. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH(2)-terminal associated coactivator. *J Biol Chem* **275**: 9308-13.
- Lee D. K., Duan H. O., and Chang C. (2001). Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. *J Biol Chem* **276**: 9978-84.
- Lee D. K., Li M., and Chang C. (2003). The second largest subunit of RNA polymerase II interacts with and enhances transactivation of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 162-9.
- Lee T. C., and Ziff E. B. (1999). Mxi1 is a repressor of the c-Myc promoter and reverses activation by USF. *J Biol Chem* **274**: 595-606.
- Lee Y. F., Shyr C. R., Thin T. H., Lin W. J., and Chang C. (1999). Convergence of two repressors through heterodimer formation of androgen receptor and testicular orphan receptor-4: a unique signaling pathway in the steroid receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14724-9.
- Leone G., DeGregori J., Sears R., Jakoi L., and Nevins J. R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* **387**: 422-6.
- Li P., Yu X., Ge K., Melamed J., Roeder R. G., and Wang Z. (2002). Heterogeneous expression and functions of androgen receptor co-factors in primary prostate cancer. *Am J Pathol* **161**: 1467-74.
- Liao G., Chen L. Y., Zhang A., Godavarthy A., Xia F., Ghosh J. C., Li H., and Chen J. D. (2003). Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem* **278**: 5052-61.
- Lindsten T., June C. H., and Thompson C. B. (1988). Multiple mechanisms regulate c-myc gene expression during normal T cell activation. *Embo J* **7**: 2787-94.
- Ling M. T., Chan K. W., and Choo C. K. (2001). Androgen induces differentiation of a human papillomavirus 16 E6/E7 immortalized prostate epithelial cell line. *J Endocrinol* **170**: 287-96.
- Lobaccaro J. M., Poujol N., Terouanne B., Georget V., Fabre S., Lumbroso S., and Sultan C. (1999). Transcriptional interferences between normal or mutant androgen receptors and the activator protein 1--dissection of the androgen receptor functional domains. *Endocrinology* **140**: 350-7.
- Louie M. C., Yang H. Q., Ma A. H., Xu W., Zou J. X., Kung H. J., and Chen H. W. (2003). Androgen-induced recruitment of RNA polymerase II to a nuclear receptor-p160 coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 2226-30.
- Lu J., and Danielsen M. (1998). Differential regulation of androgen and glucocorticoid receptors by retinoblastoma protein. *J Biol Chem* **273**: 31528-33.
- Lu L., Schulz H., and Wolf D. A. (2002). The F-box protein SKP2 mediates androgen control of p27 stability in LNCaP human prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* **3**: 22.
- Lu S., Liu M., Epner D. E., Tsai S. Y., and Tsai M. J. (1999). Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Mol Endocrinol* **13**: 376-84.

- Lu S., Tsai S. Y., and Tsai M. J. (1997). Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. *Cancer Res* **57**: 4511-6.
- Luscher B., and Eisenman R. N. (1990). New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes Dev* **4**: 2025-35.
- Ma T., Copland J. A., Brasier A. R., and Thompson E. A. (2000). A novel glucocorticoid receptor binding element within the murine c-myc promoter. *Mol Endocrinol* **14**: 1377-86.
- Ma T., Mahajan P. B., and Thompson E. A. (1992). Glucocorticoid regulation of c-myc promoter utilization in P1798 T-lymphoma cells. *Mol Endocrinol* **6**: 960-8.
- Maggiolini M., Donze O., Jeannin E., Ando S., and Picard D. (1999). Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res* **59**: 4864-9.
- Magrath I. (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* **55**: 133-270.
- Majello B., De Luca P., Suske G., and Lania L. (1995). Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene* **10**: 1841-8.
- 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., and Lamb D. J. (2000). Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* **60**: 944-9.
- Marcu K. B., Bossone S. A., and Patel A. J. (1992). myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* **61**: 809-60.
- Marivoet S., Van Dijck P., Verhoeven G., and Heyns W. (1992). Interaction of the 90-kDa heat shock protein with native and in vitro translated androgen receptor and receptor fragments. *Mol Cell Endocrinol* **88**: 165-74.
- Maruyama K., Schiavi S. C., Huse W., Johnson G. L., and Ruley H. E. (1987). myc and E1A oncogenes alter the responses of PC12 cells to nerve growth factor and block differentiation. *Oncogene* **1**: 361-7.
- Masiello D., Chen S. Y., Xu Y., Verhoeven M. C., Choi E., Hollenberg A. N., and Balk S. P. (2004). RECRUITMENT OF β -CATENIN BY WILD TYPE OR MUTANT ANDROGEN RECEPTORS CORRELATES WITH LIGAND STIMULATED GROWTH OF PROSTATE CANCER CELLS. *Mol Endocrinol*.
- Masiello D., Cheng S., Bublely G. J., Lu M. L., and Balk S. P. (2002). Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem* **277**: 26321-6.
- Mateyak M. K., Obaya A. J., Adachi S., and Sedivy J. M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* **8**: 1039-48.
- Matias P. M., Donner P., Coelho R., Thomaz M., Peixoto C., Macedo S., Otto N., Joschko S., Scholz P., Wegg A., Basler S., Schafer M., Egner U., and Carrondo M. A. (2000). Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. *J Biol Chem* **275**: 26164-71.
- Matusik R. J., Fleming W. H., Hamel A., Westenbrink T. G., Hrabarchuk B., MacDonald R., Ramsey E., Gartner J. G., Pettigrew N. M., Johnston B., and et al. (1987). Expression of the c-myc proto-oncogene in prostatic tissue. *Prog Clin Biol Res* **239**: 91-112.
- Matzkin H., and Soloway M. S. (1992). Immunohistochemical evidence of the existence and localization of aromatase in human prostatic tissues. *Prostate* **21**: 309-14.
- McDonnell T. J., Troncoso P., Brisbay S. M., Logothetis C., Chung L. W., Hsieh J. T., Tu S. M., and 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**: 6940-4.
- McEwan I. J., and 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**: 8485-90.
- Melkounian Z. K., Martirosyan A. R., and Strobl J. S. (2002). Myc protein is differentially sensitive to quinidine in tumor versus immortalized breast epithelial cell lines. *Int J Cancer* **102**: 60-9.
- Miller L. D., Park K. S., Guo Q. M., Alkharouf N. W., Malek R. L., Lee N. H., Liu E. T., and Cheng S. Y. (2001). Silencing of Wnt signaling and activation of multiple metabolic pathways in response to thyroid hormone-stimulated cell proliferation. *Mol Cell Biol* **21**: 6626-39.

- Mirosevich J., Bentel J. M., Zeps N., Redmond S. L., D'Antuono M. F., and Dawkins H. J. (1999). Androgen receptor expression of proliferating basal and luminal cells in adult murine ventral prostate. *J Endocrinol* **162**: 341-50.
- Miyamoto H., and Chang C. (2000). Antiandrogens fail to block androstenedione-mediated mutated androgen receptor transactivation in human prostate cancer cells. *Int J Urol* **7**: 32-4.
- Miyamoto H., Rahman M. M., and Chang C. (2004). Molecular basis for the antiandrogen withdrawal syndrome. *J Cell Biochem* **91**: 3-12.
- Miyamoto H., Yeh S., Lardy H., Messing E., and Chang C. (1998). Delta5-androstenediol is a natural hormone with androgenic activity in human prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11083-8.
- Mizokami A., Koh E., Fujita H., Maeda Y., Egawa M., Koshida K., Honma S., Keller E. T., and Namiki M. (2004). The adrenal androgen androstenediol is present in prostate cancer tissue after androgen deprivation therapy and activates mutated androgen receptor. *Cancer Res* **64**: 765-71.
- Mizokami A., Yeh S. Y., and Chang C. (1994). Identification of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element and other cis-acting elements in the human androgen receptor gene promoter. *Mol Endocrinol* **8**: 77-88.
- Montgomery B. T., Young C. Y., Bilhartz D. L., Andrews P. E., Prescott J. L., Thompson N. F., and Tindall D. J. (1992). Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate* **21**: 63-73.
- Montie J. E., and Pienta K. J. (1994). Review of the role of androgenic hormones in the epidemiology of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology* **43**: 892-9.
- Moore J. P., Hancock D. C., Littlewood T. D., and Evan G. I. (1987). A sensitive and quantitative enzyme-linked immunosorbence assay for the c-myc and N-myc oncoproteins. *Oncogene Res* **2**: 65-80.
- Moore M. R., Zhou J. L., Blankenship K. A., Strobl J. S., Edwards D. P., and Gentry R. N. (1997). A sequence in the 5' flanking region confers progesterin responsiveness on the human c-myc gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**: 243-52.
- Mora G. R., Prins G. S., and Mahesh V. B. (1996). Autoregulation of androgen receptor protein and messenger RNA in rat ventral prostate is protein synthesis dependent. *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**: 539-49.
- Morales A. J., Nolan J. J., Nelson J. C., and Yen S. S. (1994). Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* **78**: 1360-7.
- Morgan D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-4.
- Morin P. J., Sparks A. B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B., and Kinzler K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**: 1787-90.
- Mulholland D. J., Cheng H., Reid K., Rennie P. S., and Nelson C. C. (2002). The androgen receptor can promote beta-catenin nuclear translocation independently of adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* **277**: 17933-43.
- Mulholland D. J., Read J. T., Rennie P. S., Cox M. E., and Nelson C. C. (2003). Functional localization and competition between the androgen receptor and T-cell factor for nuclear beta-catenin: a means for inhibition of the Tcf signaling axis. *Oncogene* **22**: 5602-13.
- Nagy L., Kao H. Y., Chakravarti D., Lin R. J., Hassig C. A., Ayer D. E., Schreiber S. L., and Evans R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373-80.
- Nakhla A. M., and Rosner W. (1994). Characterization of ALVA-41 cells, a new human prostatic cancer cell line. *Steroids* **59**: 586-9.
- Namer M. (1988). Clinical applications of antiandrogens. *J Steroid Biochem* **31**: 719-29.
- Nazareth L. V., and Weigel N. L. (1996). Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem* **271**: 19900-7.
- Negri-Cesi P., Colciago A., Poletti A., and Motta M. (1999). 5alpha-reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate* **41**: 224-32.

- Negri-Cesi P., and Motta M. (1994). Androgen metabolism in the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Steroid Biochem Mol Biol* **51**: 89-96.
- Negri-Cesi P., Poletti A., Colciago A., Magni P., Martini P., and Motta M. (1998). Presence of 5 α -reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *Prostate* **34**: 283-91.
- Neumann F., and Topert M. (1986). Pharmacology of antiandrogens. *J Steroid Biochem* **25**: 885-95.
- Newton C. J., Trapp T., Pagotto U., Renner U., Buric R., and Stalla G. K. (1994). The oestrogen receptor modulates growth of pituitary tumour cells in the absence of exogenous oestrogen. *J Mol Endocrinol* **12**: 303-12.
- Ning Y. M., and Robins D. M. (1999). AML3/CBF α 1 is required for androgen-specific activation of the enhancer of the mouse sex-limited protein (Slp) gene. *J Biol Chem* **274**: 30624-30.
- Nishikura K. (1986). Sequences involved in accurate and efficient transcription of human c-myc genes microinjected into frog oocytes. *Mol Cell Biol* **6**: 4093-8.
- O'Hagan R. C., Ohh M., David G., de Alboran I. M., Alt F. W., Kaelin W. G., Jr., and DePinho R. A. (2000). Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* **14**: 2185-91.
- Obaya A. J., Mateyak M. K., and Sedivy J. M. (1999). Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* **18**: 2934-41.
- Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H., and Nakatani Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**: 953-9.
- Omer C. A., Miller P. J., Diehl R. E., and Kral A. M. (1999). Identification of Tcf4 residues involved in high-affinity beta-catenin binding. *Biochem Biophys Res Commun* **256**: 584-90.
- Onclercq R., Babinet C., and Cremisi C. (1989). Exogenous c-myc gene overexpression interferes with early events in F9 cell differentiation. *Oncogene Res* **4**: 293-302.
- Orentreich N., Brind J. L., Rizer R. L., and Vogelmann J. H. (1984). Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* **59**: 551-5.
- Orlando V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* **25**: 99-104.
- Ozanne D. M., Brady M. E., Cook S., Gaughan L., Neal D. E., and Robson C. N. (2000). Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol* **14**: 1618-26.
- Packham G., and Cleveland J. L. (1995). c-Myc and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1242**: 11-28.
- Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V., Ansorge W., Bartek J., and Draetta G. (1993). Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol* **121**: 101-11.
- Pardee A. B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-8.
- Paris F., Servant N., Terouanne B., and Sultan C. (2002). Evaluation of androgenic bioactivity in human serum by recombinant cell line: preliminary results. *Mol Cell Endocrinol* **198**: 123-9.
- Park J. J., Irvine R. A., Buchanan G., Koh S. S., Park J. M., Tilley W. D., Stallcup M. R., Press M. F., and Coetzee G. A. (2000). Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) is a coactivator of the androgen receptor. *Cancer Res* **60**: 5946-9.
- Pawlowski J. E., Ertel J. R., Allen M. P., Xu M., Butler C., Wilson E. M., and Wierman M. E. (2002). Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* **277**: 20702-10.
- Payne G. S., Bishop J. M., and Varmus H. E. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* **295**: 209-14.
- Pelengaris S., Khan M., and Evan G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* **2**: 764-76.
- Perez-Roger I., Kim S. H., Griffiths B., Sewing A., and Land H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* **18**: 5310-20.
- Perez-Roger I., Solomon D. L., Sewing A., and Land H. (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* **14**: 2373-81.

- Peterziel H., Culig Z., Stober J., Hobisch A., Radmayr C., Bartsch G., Klocker H., and Cato A. C. (1995). Mutant androgen receptors in prostatic tumors distinguish between amino-acid-sequence requirements for transactivation and ligand binding. *Int J Cancer* **63**: 544-50.
- Pfahl M. (1993). Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* **14**: 651-8.
- Philipp A., Schneider A., Vasrik I., Finke K., Xiong Y., Beach D., Alitalo K., and Eilers M. (1994). Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. *Mol Cell Biol* **14**: 4032-43.
- Pietenpol J. A., Munger K., Howley P. M., Stein R. W., and Moses H. L. (1991). Factor-binding element in the human c-myc promoter involved in transcriptional regulation by transforming growth factor beta 1 and by the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10227-31.
- Pizzagalli F., Varga Z., Huber R. D., Folkers G., Meier P. J., and St-Pierre M. V. (2003). Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 3902-12.
- Prediger E. A. (2001). Detection and quantitation of mRNAs using ribonuclease protection assays. *Methods Mol Biol* **160**: 495-505.
- Prendergast G. C., and Ziff E. B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* **251**: 186-9.
- Prins G. S., and Woodham C. (1995). Autologous regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid in the separate lobes of the rat prostate gland. *Biol Reprod* **53**: 609-19.
- Prochownik E. V., and Kukowska J. (1986). Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* **322**: 848-50.
- Prochownik E. V., Kukowska J., and Rodgers C. (1988). c-myc antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G1 progression in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **8**: 3683-95.
- Pugh B. F., and Tjian R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**: 1935-45.
- Pulverer B. J., Fisher C., Vousden K., Littlewood T., Evan G., and Woodgett J. R. (1994). Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene* **9**: 59-70.
- Qin C., Singh P., and Safe S. (1999). Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17beta-estradiol in MCF-7 cells: role of estrogen receptor-Sp1 complexes. *Endocrinology* **140**: 2501-8.
- Quarmany V. E., Beckman W. C., Jr., Cooke D. B., Lubahn D. B., Joseph D. R., Wilson E. M., and French F. S. (1990a). Expression and localization of androgen receptor in the R-3327 Dunning rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **50**: 735-9.
- Quarmany V. E., Beckman W. C., Jr., Wilson E. M., and French F. S. (1987). Androgen regulation of c-myc messenger ribonucleic acid levels in rat ventral prostate. *Mol Endocrinol* **1**: 865-74.
- Quarmany V. E., Yarbrough W. G., Lubahn D. B., French F. S., and Wilson E. M. (1990b). Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol* **4**: 22-8.
- Quelle D. E., Ashmun R. A., Shurtleff S. A., Kato J. Y., Bar-Sagi D., Roussel M. F., and Sherr C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* **7**: 1559-71.
- Rabbitts P. H., Watson J. V., Lamond A., Forster A., Stinson M. A., Evan G., Fischer W., Atherton E., Sheppard R., and Rabbitts T. H. (1985). Metabolism of c-myc gene products: c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *Embo J* **4**: 2009-15.
- Raffo A. J., Perlman H., Chen M. W., Day M. L., Streitman J. S., and Buttyan R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* **55**: 4438-45.
- Ramirez-Solis R., Rivera-Perez J., Wallace J. D., Wims M., Zheng H., and Bradley A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem* **201**: 331-5.
- Rao K. V., Johnson W. D., Bosland M. C., Lubet R. A., Steele V. E., Kelloff G. J., and McCormick D. L. (1999). Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by early and delayed administration of dehydroepiandrosterone. *Cancer Res* **59**: 3084-9.

- Ray R., and Miller D. M. (1991). Cloning and characterization of a human c-myc promoter-binding protein. *Mol Cell Biol* **11**: 2154-61.
- Raynaud J. P., and Ojasoo T. (1986). The design and use of sex-steroid antagonists. *J Steroid Biochem* **25**: 811-33.
- Reisman D., Elkind N. B., Roy B., Beamon J., and Rotter V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ* **4**: 57-65.
- Reiter W. J., Pycha A., Schatzl G., Pokorny A., Gruber D. M., Huber J. C., and Marberger M. (1999). Dehydroepiandrosterone in the treatment of erectile dysfunction: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Urology* **53**: 590-4; discussion 594-5.
- Rennie P. S., Bruchovsky N., Goldenberg S. L., Lawson D., Fletcher T., and Foekens J. A. (1988). Relative effectiveness of alternative androgen withdrawal therapies in initiating regression of rat prostate. *J Urol* **139**: 1337-42.
- Rennie P. S., Bruchovsky N., Leco K., Sheppard P. C., McQueen S. A., Cheng H., Snoek R., Hamel A., Bock M. E., MacDonald B. S., Nickel B. E., Chang C., Liao S., Cattini P. A., and Matusik R. J. (1993). Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol Endocrinol* **7**: 23-36.
- Rhoden E. L., Gobbi D., Rhoden C. R., Menti E., Roehle A. N., Hartmann A., and Morgentaler A. (2003). Effects of chronic administration of dehydroepiandrosterone on serum testosterone levels and prostatic tissue in rats. *J Urol* **170**: 2101-3.
- Riegman P. H., Vlietstra R. J., van der Korput J. A., Brinkmann A. O., and Trapman J. (1991). The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* **5**: 1921-30.
- Rijnders A. W., van der Korput J. A., van Steenbrugge G. J., Romijn J. C., and Trapman J. (1985). Expression of cellular oncogenes in human prostatic carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **132**: 548-54.
- Robel P., Emiliozzi R., and Baulieu E. E. (1967). Metabolism of dehydroisoandrosterone glucuronide. *J Clin Endocrinol Metab* **27**: 1290-302.
- Robins D. M., Scheller A., and Adler A. J. (1994). Specific steroid response from a nonspecific DNA element. *J Steroid Biochem Mol Biol* **49**: 251-5.
- Roche P. J., Hoare S. A., and Parker M. G. (1992). A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* **6**: 2229-35.
- Rochette-Egly C., Adam S., Rossignol M., Egly J. M., and Chambon P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**: 97-107.
- Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S., and Polakis P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* **272**: 1023-6.
- Ruizeveld de Winter J. A., Trapman J., Vermey M., Mulder E., Zegers N. D., and van der Kwast T. H. (1991). Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* **39**: 927-36.
- Ruizeveld de Winter J. A., van Weerden W. M., Faber P. W., van Steenbrugge G. J., Trapman J., Brinkmann A. O., and van der Kwast T. H. (1992). Regulation of androgen receptor expression in the human heterotransplantable prostate carcinoma PC-82. *Endocrinology* **131**: 3045-50.
- Saartok T., Dahlberg E., and Gustafsson J. A. (1984). Relative binding affinity of anabolic-androgenic steroids: comparison of the binding to the androgen receptors in skeletal muscle and in prostate, as well as to sex hormone-binding globulin. *Endocrinology* **114**: 2100-6.
- Saatcioglu F., Claret F. X., and Karin M. (1994). Negative transcriptional regulation by nuclear receptors. *Semin Cancer Biol* **5**: 347-59.
- 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., and 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 U S A* **98**: 4904-9.
- Sadi M. V., Walsh P. C., and Barrack E. R. (1991). Immunohistochemical study of androgen receptors in metastatic prostate cancer. Comparison of receptor content and response to hormonal therapy. *Cancer* **67**: 3057-64.

- Sam K., Labrie F., and Poirier D. (2000). N-Butyl-N-methyl-11-(3'-hydroxy-21', 17'-carbolactone-19'-nor-17'alpha-pregna-1',3', 5'(10')-trien-7'alpha-yl)-undecanamide: an inhibitor of type 2 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase that does not have oestrogenic or androgenic activity. *Eur J Med Chem* **35**: 217-25.
- Sanford E. J., Paulson D. F., Rohner T. J., Jr., Santen R. J., and Bardin C. W. (1977). The effects of castration on adrenal testosterone secretion in men with prostatic carcinoma. *J Urol* **118**: 1019-21.
- Sasaki S., Lesoon-Wood L. A., Dey A., Kuwata T., Weintraub B. D., Humphrey G., Yang W. M., Seto E., Yen P. M., Howard B. H., and Ozato K. (1999). Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *Embo J* **18**: 5389-98.
- Sato N., Gleave M. E., Bruchovsky N., Rennie P. S., Goldenberg S. L., Lange P. H., and Sullivan L. D. (1996). Intermittent androgen suppression delays progression to androgen-independent regulation of prostate-specific antigen gene in the LNCaP prostate tumour model. *J Steroid Biochem Mol Biol* **58**: 139-46.
- Sato N., Sadar M. D., Bruchovsky N., Saatcioglu F., Rennie P. S., Sato S., Lange P. H., and Gleave M. E. (1997). Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. *J Biol Chem* **272**: 17485-94.
- Schatten H., Ripple M., Balczon R., Weindruch R., Chakrabarti A., Taylor M., and Hueser C. N. (2000). Androgen and taxol cause cell type-specific alterations of centrosome and DNA organization in androgen-responsive LNCaP and androgen-independent DU145 prostate cancer cells. *J Cell Biochem* **76**: 463-77.
- Scher H. I., and Kelly W. K. (1993). Flutamide withdrawal syndrome: its impact on clinical trials in hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* **11**: 1566-72.
- Schiller C. D., Schneider M. R., Hartmann H., Graf A. H., Klocker H., and Bartsch G. (1991). Growth-stimulating effect of adrenal androgens on the R3327 Dunning prostatic carcinoma. *Urol Res* **19**: 7-13.
- Schuurmans A. L., Bolt J., Veldscholte J., and Mulder E. (1990). Stimulatory effects of antiandrogens on LNCaP human prostate tumor cell growth, EGF-receptor level and acid phosphatase secretion. *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**: 849-53.
- Sciarra A., Casale P., Colella D., Di Chiro C., and Di Silverio F. (1999). Hormone-refractory prostate cancer? Anti-androgen withdrawal and intermittent hormone therapy. *Scand J Urol Nephrol* **33**: 211-6.
- Screaton R. A., Penn L. Z., and Stanners C. P. (1997). Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. *J Cell Biol* **137**: 939-52.
- Sears R., Leone G., DeGregori J., and Nevins J. R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* **3**: 169-79.
- Sears R. C., and Nevins J. R. (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* **277**: 11617-20.
- Selcer K. W., Kabler H., Sarap J., Xiao Z., and Li P. K. (2002). Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCaP human prostate cancer cells. *Steroids* **67**: 821-6.
- Sella A., Flex D., Sulkes A., and Baniel J. (1998). Antiandrogen withdrawal syndrome with cyproterone acetate. *Urology* **52**: 1091-3.
- Seth A., Gonzalez F. A., Gupta S., Raden D. L., and Davis R. J. (1992). Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **267**: 24796-804.
- Shang Y., Myers M., and Brown M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* **9**: 601-10.
- Sharma M., Zarnegar M., Li X., Lim B., and Sun Z. (2000). Androgen receptor interacts with a novel MYST protein, HBO1. *J Biol Chem* **275**: 35200-8.
- Sheaff R. J., Groudine M., Gordon M., Roberts J. M., and Clurman B. E. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* **11**: 1464-78.
- Sheiness D., and Bishop J. M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* **31**: 514-21.

- Sheiness D., Fanshier L., and Bishop J. M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* **28**: 600-10.
- Sherr C. J., and Roberts J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**: 1501-12.
- Shichiri M., Hanson K. D., and Sedivy J. M. (1993). Effects of c-myc expression on proliferation, quiescence, and the G0 to G1 transition in nontransformed cells. *Cell Growth Differ* **4**: 93-104.
- Siebenlist U., Bressler P., and Kelly K. (1988). Two distinct mechanisms of transcriptional control operate on c-myc during differentiation of HL60 cells. *Mol Cell Biol* **8**: 867-74.
- Siebenlist U., Hennighausen L., Battey J., and Leder P. (1984). Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory region of the c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Cell* **37**: 381-91.
- Siiteri P. K., and Wilson J. D. (1970). Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J Clin Invest* **49**: 1737-45.
- Silva I. S., Morsch D. M., Urnauer L., and Spritzer P. M. (2001). Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res* **27**: 153-69.
- Simard J., Veilleux R., de Launoit Y., Haagensen D. E., and Labrie F. (1991). Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* **51**: 4336-41.
- Simental J. A., Sar M., Lane M. V., French F. S., and Wilson E. M. (1991). Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem* **266**: 510-8.
- Simpson R. U., Hsu T., Begley D. A., Mitchell B. S., and Alizadeh B. N. (1987). Transcriptional regulation of the c-myc protooncogene by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL-60 promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* **262**: 4104-8.
- Small E. J., and Carroll P. R. (1994). Prostate-specific antigen decline after casodex withdrawal: evidence for an antiandrogen withdrawal syndrome. *Urology* **43**: 408-10.
- Small E. J., and Srinivas S. (1995). The antiandrogen withdrawal syndrome. Experience in a large cohort of unselected patients with advanced prostate cancer. *Cancer* **76**: 1428-34.
- Smith C. B., Masters J. R., Metcalfe S. A., and Ghanadian R. (1983). Androgen metabolism by human prostatic tumours in organ culture. *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**: 929-34.
- Smith C. M., Ballard S. A., Wyllie M. G., and Masters J. R. (1994). Comparison of testosterone metabolism in benign prostatic hyperplasia and human prostate cancer cell lines in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* **50**: 151-9.
- Smith T., Chisholm G. D., and Habib F. K. (1982). Failure of human benign prostatic hyperplasia to aromatise testosterone. *J Steroid Biochem* **17**: 119-20.
- Soeffing W. J., and Timms B. G. (1995). Localization of androgen receptor and cell-specific cytokeratins in basal cells of rat ventral prostate. *J Androl* **16**: 197-208.
- Song C. S., Jung M. H., Kim S. C., Hassan T., Roy A. K., and Chatterjee B. (1998). Tissue-specific and androgen-repressible regulation of the rat dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene promoter. *J Biol Chem* **273**: 21856-66.
- Song L. N., Coghlan M., and Gelmann E. P. (2004). Antiandrogen effects of mifepristone on coactivator and corepressor interactions with the androgen receptor. *Mol Endocrinol* **18**: 70-85.
- Song L. N., Herrell R., Byers S., Shah S., Wilson E. M., and Gelmann E. P. (2003). Beta-catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **23**: 1674-87.
- Sonnenschein C., Olea N., Pasanen M. E., and Soto A. M. (1989). Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Res* **49**: 3474-81.
- Sorrentino V., Drozdoff V., McKinney M. D., Zeitz L., and Fleissner E. (1986). Potentiation of growth factor activity by exogenous c-myc expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 8167-71.
- Soto A. M., and Sonnenschein C. (1991). Regulation of cell proliferation: the negative control perspective. *Ann N Y Acad Sci* **628**: 412-8.

- Spencer C. A., and Groudine M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* **56**: 1-48.
- Spencer T. E., Jenster G., Burcin M. M., Allis C. D., Zhou J., Mizzen C. A., McKenna N. J., Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J., and O'Malley B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**: 194-8.
- Spitz M. R., Currier R. D., Fueger J. J., Babaian R. J., and Newell G. R. (1991). Familial patterns of prostate cancer: a case-control analysis. *J Urol* **146**: 1305-7.
- Spotts G. D., Patel S. V., Xiao Q., and Hann S. R. (1997). Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol* **17**: 1459-68.
- Staller P., Peukert K., Kiermaier A., Seoane J., Lukas J., Karsunky H., Moroy T., Bartek J., Massague J., Hanel F., and Eilers M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* **3**: 392-9.
- Stanbrough M., Leav I., Kwan P. W., Bubley G. J., and Balk S. P. (2001). Prostatic intraepithelial neoplasia in mice expressing an androgen receptor transgene in prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10823-8.
- Stanton L. W., Fahrlander P. D., Tesser P. M., and Marcu K. B. (1984a). Nucleotide sequence comparison of normal and translocated murine c-myc genes. *Nature* **310**: 423-5.
- Stanton L. W., Yang J. Q., Eckhardt L. A., Harris L. J., Birshtein B. K., and Marcu K. B. (1984b). Products of a reciprocal chromosome translocation involving the c-myc gene in a murine plasmacytoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 829-33.
- Steinberg G. D., Carter B. S., Beaty T. H., Childs B., and Walsh P. C. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* **17**: 337-47.
- Steiner P., Philipp A., Lukas J., Godden-Kent D., Pagano M., Mittnacht S., Bartek J., and Eilers M. (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J* **14**: 4814-26.
- Steinfeld H. J., and Wondisford F. E. (1997). Thyrotropin (TSH) beta-subunit gene expression--an example for the complex regulation of pituitary hormone genes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **105**: 196-203.
- Steketee K., Timmerman L., Ziel-van der Made A. C., Doesburg P., Brinkmann A. O., and Trapman J. (2002). Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int J Cancer* **100**: 309-17.
- Stewart T. A., Pattengale P. K., and Leder P. (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* **38**: 627-37.
- Stone N. N., Fair W. R., and Fishman J. (1986). Estrogen formation in human prostatic tissue from patients with and without benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **9**: 311-8.
- Stoner E. (1990). The clinical development of a 5 alpha-reductase inhibitor, finasteride. *J Steroid Biochem Mol Biol* **37**: 375-8.
- Sugimoto M., Martin N., Wilks D. P., Tamai K., Huot T. J., Pantoja C., Okumura K., Serrano M., and Hara E. (2002). Activation of cyclin D1-kinase in murine fibroblasts lacking both p21(Cip1) and p27(Kip1). *Oncogene* **21**: 8067-74.
- Sulcova J., Hill M., Hampl R., and Starka L. (1997). Age and sex related differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J Endocrinol* **154**: 57-62.
- Suzuki H., Akakura K., Komiya A., Aida S., Akimoto S., and Shimazaki J. (1996). Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *Prostate* **29**: 153-8.
- Suzuki M., Suzuki H., Sugimoto Y., and Sugiyama Y. (2003). ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* **278**: 22644-9.
- Syms A. J., Norris J. S., Panko W. B., and Smith R. G. (1985). Mechanism of androgen-receptor augmentation. Analysis of receptor synthesis and degradation by the density-shift technique. *J Biol Chem* **260**: 455-61.

- Takeda H., Nakamoto N., Kokontis J., Chodak G. W., and Chang C. (1991). Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate : Immunohistochemical and in situ hybridization analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **177**: 488-496.
- Takimoto M., Quinn J. P., Farina A. R., Staudt L. M., and Levens D. (1989). fos/jun and octamer-binding protein interact with a common site in a negative element of the human c-myc gene. *J Biol Chem* **264**: 8992-9.
- Tan J., Sharief Y., Hamil K. G., Gregory C. W., Zang D. Y., Sar M., Gumerlock P. H., deVere White R. W., Pretlow T. G., Harris S. E., Wilson E. M., Mohler J. L., and French F. S. (1997). Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol Endocrinol* **11**: 450-9.
- Tan J. A., Joseph D. R., Quarmby V. E., Lubahn D. B., Sar M., French F. S., and Wilson E. M. (1988). The rat androgen receptor: primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein. *Mol Endocrinol* **2**: 1276-85.
- Taplin M. E., Bubley G. J., Ko Y. J., Small E. J., Upton M., Rajeshkumar B., and Balk S. P. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res* **59**: 2511-5.
- Taplin M. E., Bubley G. J., Shuster T. D., Frantz M. E., Spooner A. E., Ogata G. K., Keer H. N., and Balk S. P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* **332**: 1393-8.
- 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., and Small E. J. (2003). Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. *J Clin Oncol* **21**: 2673-8.
- Taub R., Kirsch I., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Aaronson S., and Leder P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 7837-41.
- Terouanne B., Tahiri B., Georget V., Belon C., Poujol N., Avances C., Orio F., Jr., Balaguer P., and Sultan C. (2000). A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects. *Mol Cell Endocrinol* **160**: 39-49.
- Thompson T. C., Southgate J., Kitchener G., and Land H. (1989). Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* **56**: 917-30.
- Tilley W. D., Marcelli M., Wilson J. D., and McPhaul M. J. (1989). Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 327-31.
- Tomura A., Goto K., Morinaga H., Nomura M., Okabe T., Yanase T., Takayanagi R., and Nawata H. (2001). The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein. *J Biol Chem* **276**: 28395-401.
- Trapman J., Klaassen P., Kuiper G. G., van der Korput J. A., Faber P. W., van Rooij H. C., Geurts van Kessel A., Voorhorst M. M., Mulder E., and Brinkmann A. O. (1988). Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **153**: 241-8.
- Tremblay M. R., Luu-The V., Leblanc G., Noel P., Breton E., Labrie F., and Poirier D. (1999). Spironolactone-related inhibitors of type II 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: chemical synthesis, receptor binding affinities, and proliferative/antiproliferative activities. *Bioorg Med Chem* **7**: 1013-23.
- Truica C. I., Byers S., and Gelmann E. P. (2000). Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer Res* **60**: 4709-13.
- Tsai L. H., Lees E., Faha B., Harlow E., and Riabowol K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene* **8**: 1593-602.
- Tsihlias J., Zhang W., Bhattacharya N., Flanagan M., Klotz L., and Slingerland J. (2000). Involvement of p27Kip1 in G1 arrest by high dose 5 alpha-dihydrotestosterone in LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene* **19**: 670-9.
- Tut T. G., Ghadessy F. J., Trifiro M. A., Pinsky L., and Yong E. L. (1997). Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 3777-82.

- Tyagi R. K., Lavrovsky Y., Ahn S. C., Song C. S., Chatterjee B., and Roy A. K. (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* **14**: 1162-74.
- Ugele B., and Simon S. (1999). Uptake of dehydroepiandrosterone-3-sulfate by isolated trophoblasts from human term placenta, JEG-3, BeWo, Jar, BHK cells, and BHK cells transfected with human sterylsulfatase-cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* **71**: 203-11.
- Umekita Y., Hiipakka R. A., Kokontis J. M., and Liao S. (1996). Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11802-7.
- van de Wetering M., Cavallo R., Dooijes D., van Beest M., van Es J., Loureiro J., Ypma A., Hursh D., Jones T., Bejsovec A., Peifer M., Mortin M., and Clevers H. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**: 789-99.
- van den Heuvel S., and Harlow E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**: 2050-4.
- van der Kwast T. H., Schalken J., Ruizeveld de Winter J. A., van Vroonhoven C. C., Mulder E., Boersma W., and Trapman J. (1991). Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer. *Int J Cancer* **48**: 189-93.
- van Laar J. H., Bolt-de Vries J., Voorhorst-Ogink M. M., and Brinkmann A. O. (1989). The human androgen receptor is a 110 kDa protein. *Mol Cell Endocrinol* **63**: 39-44.
- van Weerden W. M., van Kreuningen A., Elissen N. M., de Jong F. H., van Steenbrugge G. J., and Schroder F. H. (1992). Effects of adrenal androgens on the transplantable human prostate tumor PC-82. *Endocrinology* **131**: 2909-13.
- Vaughn E., and Cox D. (1998). Chronic administration of dehydroepiandrosterone (DHEA) does not increase serum testosterone or prostatic specific antigen (PSA) in normal men. *J. Urol*: 159-278.
- Veldscholte J., Berrevoets C. A., Brinkmann A. O., Grootegoed J. A., and Mulder E. (1992a). Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation. *Biochemistry* **31**: 2393-9.
- Veldscholte J., Berrevoets C. A., and Mulder E. (1994). Studies on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Steroid Biochem Mol Biol* **49**: 341-6.
- Veldscholte J., Berrevoets C. A., Ris-Stalpers C., Kuiper G. G., Jenster G., Trapman J., Brinkmann A. O., and Mulder E. (1992b). 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**: 665-9.
- Veldscholte J., Ris-Stalpers C., Kuiper G. G., Jenster G., Berrevoets C., Claassen E., van Rooij H. C., Trapman J., Brinkmann A. O., and Mulder E. (1990a). A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 534-40.
- Veldscholte J., Voorhorst-Ogink M. M., Bolt-de Vries J., van Rooij H. C., Trapman J., and Mulder E. (1990b). Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta* **1052**: 187-94.
- Vidal A., and Koff A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**: 1-15.
- Vigushin D. M., and Coombes R. C. (2004). Targeted histone deacetylase inhibition for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**: 205-18.
- Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P., Tanner M., Keinanen R., Palmberg C., Palotie A., Tammela T., Isola J., and Kallioniemi O. P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* **9**: 401-6.
- Vlach J., Hennecke S., Alevizopoulos K., Conti D., and Amati B. (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* **15**: 6595-604.
- Vlach J., Hennecke S., and Amati B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* **16**: 5334-44.

- Voeller H. J., Truica C. I., and Gelmann E. P. (1998). Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* **58**: 2520-3.
- Waller A. S., Sharrard R. M., Berthon P., and Maitland N. J. (2000). Androgen receptor localisation and turnover in human prostate epithelium treated with the antiandrogen, casodex. *J Mol Endocrinol* **24**: 339-51.
- Wang L. G., Liu X. M., Kreis W., and Budman D. R. (1999). Phosphorylation/dephosphorylation of androgen receptor as a determinant of androgen agonistic or antagonistic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 21-8.
- Wang Q., Lu J., and Yong E. L. (2001). Ligand- and coactivator-mediated transactivation function (AF2) of the androgen receptor ligand-binding domain is inhibited by the cognate hinge region. *J Biol Chem* **276**: 7493-9.
- Wang Q., Sharma D., Ren Y., and Fondell J. D. (2002). A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem* **277**: 42852-8.
- Warriar N., Page N., Koutsilieris M., and Govindan M. V. (1994). Antiandrogens inhibit human androgen receptor-dependent gene transcription activation in the human prostate cancer cells LNCaP. *Prostate* **24**: 176-86.
- Watson R. R., Huls A., Araghinikou M., and Chung S. (1996). Dehydroepiandrosterone and diseases of aging. *Drugs Aging* **9**: 274-91.
- Weigel N. L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* **319** (Pt 3): 657-67.
- Welch P. J., and Wang J. Y. (1992). Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3093-7.
- Whitacre D. C., Chauhan S., Davis T., Gordon D., Cress A. E., and Miesfeld R. L. (2002). Androgen induction of in vitro prostate cell differentiation. *Cell Growth Differ* **13**: 1-11.
- Wilding G., Chen M., and Gelmann E. P. (1989). Aberrant response in vitro of hormone-responsive prostate cancer cells to antiandrogens. *Prostate* **14**: 103-15.
- Willert K., and Nusse R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 95-102.
- Wolf D. A., Herzinger T., Hermeking H., Blaschke D., and Horz W. (1993). Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol* **7**: 924-36.
- Wolf D. A., Kohlhuber F., Schulz P., Fittler F., and Eick D. (1992a). Transcriptional down-regulation of c-myc in human prostate carcinoma cells by the synthetic androgen mibolerone. *Br J Cancer* **65**: 376-82.
- Wolf D. A., Schulz P., and Fittler F. (1991). Synthetic androgens suppress the transformed phenotype in the human prostate carcinoma cell line LNCaP. *Br J Cancer* **64**: 47-53.
- Wolf D. A., Schulz P., and Fittler F. (1992b). Transcriptional regulation of prostate kallikrein-like genes by androgen. *Mol Endocrinol* **6**: 753-62.
- Wong C. I., Zhou Z. X., Sar M., and Wilson E. M. (1993). Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem* **268**: 19004-12.
- Wu C. P., and Gu F. L. (1991). The prostate in eunuchs. *Prog Clin Biol Res* **370**: 249-55.
- Yamakawa-Karakida N., Sugita K., Inukai T., Goi K., Nakamura M., Uno K., Sato H., Kagami K., Barker N., and Nakazawa S. (2002). Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces apoptosis of leukemia cells by down-regulating the c-myc gene expression via blockade of the Tcf-4 activity. *Cell Death Differ* **9**: 513-26.
- Yamamoto A., Hashimoto Y., Kohri K., Ogata E., Kato S., Ikeda K., and Nakanishi M. (2000). Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J Cell Biol* **150**: 873-80.
- Yang F., Li X., Sharma M., Sasaki C. Y., Longo D. L., Lim B., and Sun Z. (2002). Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem* **277**: 11336-44.
- Yang W., Shen J., Wu M., Arsura M., FitzGerald M., Suldan Z., Kim D. W., Hofmann C. S., Pianetti S., Romieu-Mourez R., Freedman L. P., and Sonenshein G. E. (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**: 1688-702.

- Yeh S., and 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**: 5517-21.
- Yeh S., Lin H. K., Kang H. Y., Thin T. H., Lin M. F., and Chang C. (1999). From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5458-63.
- Yeh S., Miyamoto H., Nishimura K., Kang H., Ludlow J., Hsiao P., Wang C., Su C., and Chang C. (1998). Retinoblastoma, a tumor suppressor, is a coactivator for the androgen receptor in human prostate cancer DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 361-7.
- Young C. Y., Montgomery B. T., Andrews P. E., Qui S. D., Bilhartz D. L., and Tindall D. J. (1991). Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res* **51**: 3748-52.
- Yu J., Angelin-Duclos C., Greenwood J., Liao J., and Calame K. (2000). Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol* **20**: 2592-603.
- Yu X., Li P., Roeder R. G., and Wang Z. (2001). Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split. *Mol Cell Biol* **21**: 4614-25.
- Yuan S., Trachtenberg J., Mills G. B., Brown T. J., Xu F., and Keating A. (1993). Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA. *Cancer Res* **53**: 1304-11.
- Yuan X., Lu M. L., Li T., and Balk S. P. (2001). SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem* **276**: 46647-54.
- Yuh Y. S., and Thompson E. B. (1989). Glucocorticoid effect on oncogene/growth gene expression in human T lymphoblastic leukemic cell line CCRF-CEM. Specific c-myc mRNA suppression by dexamethasone. *J Biol Chem* **264**: 10904-10.
- Zelcer N., Reid G., Wielinga P., Kuil A., van der Heijden I., Schuetz J. D., and Borst P. (2003). Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* **371**: 361-7.
- Zhao X. Y., Boyle B., Krishnan A. V., Navone N. M., Peehl D. M., and Feldman D. (1999). Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol* **162**: 2192-9.
- Zhou H. Y., Chang S. M., Chen B. Q., Wang Y., Zhang H., Kao C., Sang Q. A., Pathak S. J., and Chung L. W. (1996). Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15152-7.
- Zhou F., Medh R. D., and Thompson E. B. (2000). Glucocorticoid mediated transcriptional repression of c-myc in apoptotic human leukemic CEM cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **73**: 195-202.
- Zhou Z. X., Sar M., Simental J. A., Lane M. V., and 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**: 13115-23.
- Zhuang Y. H., Sarca D., Weisz A., Altucci L., Cicatiello L., Rollerova E., Tuohimaa P., and Ylikomi T. (2001). Cell type-specific induction of cyclin D and cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) expression by estrogen in rat endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* **78**: 193-9.
- Zilliacus J., Wright A. P., Carlstedt-Duke J., and Gustafsson J. A. (1995). Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol Endocrinol* **9**: 389-400.
- Zwicker J., Lucibello F. C., Wolfrain L. A., Gross C., Truss M., Engeland K., and Muller R. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *Embo J* **14**: 4514-22.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Schéma représentant le principe de l'Intracrinologie dans une cellule prostatique chez l'homme non castré.	11
Figure 2	Schéma des domaines fonctionnels de l'AR humain.	13
Figure 3	Représentation schématique de l'interaction de l'AR avec les facteurs généraux de la transcription sur le promoteur d'un gène-cible.	18
Figure 4	Schéma des différentes stratégies de l'hormono-thérapie du cancer de la prostate évolué.	32
Figure 5	Schéma de la structure du gène c-myc humain.	37
Figure 6	Profils d'expression de c-myc et des protéines associées dans des cellules cyclantes et différenciées.	40
Figure 7	Représentation schématique des séquences cis-régulatrices identifiées sur le gène c-myc humain.	44
Figure 8	Protocole d'étude du métabolisme des stéroïdes par les cellules LNCaP.	51
Figure 9	Radiochromatogrammes des stéroïdes libres et conjugués issus de l'incubation de la DHT (2nM) en absence de cellules.	54
Figure 10	Répartition des différentes formes de métabolites après incubation des cellules LNCaP.	55
Figure 11	Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus du métabolisme de la DHT (2nM) par les cellules LNCaP.	57
Figure 12	Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués hydrolysés issus du métabolisme de la DHT (2nM) par les cellules LNCaP.	59
Figure 13	Schéma récapitulatif des différents métabolites formés par les cellules LNCaP à partir de la DHT.	60
Figure 14	Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus de l'incubation des cellules LNCaP avec la DHEA (10nM) ou avec la DHT (2nM).	61
Figure 15	Radiochromatogrammes des stéroïdes libres issus de l'incubation des cellules LNCaP avec la DHEA (10nM).	62
Figure 16	Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués issus de l'incubation des cellules LNCaP avec la DHEA (10nM).	63
Figure 17	Schéma récapitulatif des différents métabolites formés par les cellules LNCaP à partir de la DHEA.	64
Figure 18	Radiochromatogrammes des stéroïdes de la fraction libre issus de l'incubation des cellules LNCaP avec du S-DHEA (1µM).	65
Figure 19	Radiochromatogrammes des stéroïdes glucurono-conjugués et sulfo-conjugués issus de l'incubation des cellules LNCaP avec du S-DHEA (1µM).	67
Figure 20	Schéma récapitulatif des différents métabolites formés par les cellules LNCaP à partir du S-DHEA.	68
Figure 21	Schéma du métabolisme observé dans les cellules LNCaP.	70
Figure 22	Effets de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.	77
Figure 23	Effets de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% DCC-SVF.	78
Figure 24	Effets de la DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.	79
Figure 25	Effets de la DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% DCC-SVF.	80
Figure 26	Effets du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.	81
Figure 27	Effets du S-DHEA sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% DCC-SVF.	82
Figure 28	Effets du R1881 ou de la DHT sur la prolifération des cellules LNCaP en milieu 10% SVF.	90
Figure 29	Répartition dans le cycle cellulaire des cellules LNCaP en réponse au R1881 100nM en milieu 10% SVF.	92
Figure 30	Effet-dose du R1881 sur la distribution dans le cycle cellulaire des cellules LNCaP cultivées en milieu 10% SVF.	93

Figure 31	Analyse de la population sub-G1 sous l'effet du traitement des cellules LNCaP au R1881 en milieu 10% SVF. Exemples représentatifs.....	94
Figure 32	Photos représentatives des modifications morphologiques induites par le R1881 dans les cellules LNCaP vivantes.....	95
Figure 33	Répartition dans le cycle cellulaire des cellules DU-145 et PC-3 en réponse au R1881 100nM en milieu 10% SVF.....	96
Figure 34	Répartition dans le cycle cellulaire des cellules LNCaP-FAR en réponse au R1881 en milieu 10% SVF.....	97
Figure 35	Effets du CPA sur la réponse proliférative des cellules LNCaP au R1881, en milieu 10% SVF.....	99
Figure 36	Régulation de l'expression des cyclines en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	101
Figure 37	Régulation de l'expression des cdk en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	102
Figure 38	Régulation de l'expression des inhibiteurs de cdk p21 et p27 en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	103
Figure 39	Régulation du niveau de phosphorylation de Rb en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	104
Figure 40	Régulation des niveaux d'ARNm des régulateurs du cycle cellulaire en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	106
Figure 41	Régulation du niveau d'ARNm du TGF- β 1 en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	108
Figure 42	Régulation du niveau d'expression de la protéine c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	109
Figure 43	Régulation du niveau d'ARNm de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	110
Figure 44	Régulation du niveau d'expression de la protéine c-myc en réponse au R1881 dans les lignées PC-3 et DU-145.....	111
Figure 45	Régulation du niveau d'expression de c-myc en réponse au R1881 dans la lignée LNCaP-FAR en milieu 10% SVF.....	112
Figure 46	Effets des antagonistes de l'AR sur l'expression de l'ARNm de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP.....	113
Figure 47	Activité du promoteur de c-myc en réponse au R1881 dans les cellules LNCaP en milieu 10% SVF.....	115
Figure 48	Effets du R1881 sur l'acétylation des histones H3 du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP.....	116
Figure 49	Effets du R1881 sur l'acétylation des histones H3 du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.....	117
Figure 50	Effets du R1881 sur le recrutement de HDAC-1 au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.....	118
Figure 51	Effets de la TSA sur la déacétylation des histones H3 du promoteur de c-myc induite par le R1881 dans les cellules LNCaP-FAR.....	119
Figure 52	Effets de la TSA sur la répression de l'expression de l'ARNm de c-myc induite par le R1881 dans les cellules LNCaP-FAR.....	120
Figure 53	Effets du R1881 sur le recrutement de la RNA Polymérase II au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.....	121
Figure 54	Effets du R1881 sur le recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc dans les cellules LNCaP-FAR.....	123
Figure 55	Effets de la déprivation puis de la restauration androgénique sur l'expression de l'ARNm de c-myc, sur la prolifération des cellules LNCaP, et sur le recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc.....	125
Figure 56	Effets du R1881 sur la prolifération, sur l'expression de l'ARNm de c-myc, et sur le recrutement de l'AR au niveau du promoteur de c-myc, dans les cellules LNCaP cultivées en présence de 10% DCC-SVF.....	128

Figure 57	□ Mécanismes potentiels impliqués dans le contrôle de l'expression de c-myc par la voie AR/Tcf/□-caténine dans les cellules LNCaP.....	150
Figure 58	□ Représentation schématique des étapes de la technique de ChIP.....	171
Figure 59	□ Sonication de la chromatine.....	176
Figure 60	□ Représentation schématique des différentes étapes du cycle cellulaire.	186
Tableau 1	□ Séquences des ARE fonctionnels de différents gènes régulés par les androgènes.....	21
Tableau 2	□ Liste des gènes-cibles de c-myc.	42
Tableau 3	□ Rôle des différentes séquences cis-régulatrices identifiées sur le promoteur de c-myc.....	45
Tableau 4	□ Temps de rétention moyen des différents standards radiomarqués utilisés en HPLC.	53
Tableau 5	□ Métabolisme de la DHT (2nM) par les cellules LNCaP.	58
Tableau 6	□ Métabolisme de la DHEA (10nM) par les cellules LNCaP.	62
Tableau 7	□ Métabolisme du S-DHEA (1μM) par les cellules LNCaP	66
Tableau 8	□ Comparaison de l'effet-dose du R1881 sur la distribution des cellules LNCaP et LNCaP-FAR dans le cycle après 2 jours de traitement.	98
Tableau 9	□ Temps de rétention et ions caractéristiques de chaque stéroïde standard en GC-MS.....	165
Tableau 10	□ Liste des différents anticorps utilisés en Western Blot et caractéristiques.....	168
Tableau 11	□ Liste des amorces utilisées en PCR.....	174
Tableau 12	□ Liste des différents anticorps utilisés en ChIP, paramètres expérimentaux spécifiques....	176
Tableau 13	□ Liste des amorces utilisées en RT-PCR.....	178

Summary

Prostate cancer is the second leading cause of cancer-related death for men in France, responsible for 11% of the total cancer-death rate. Its incidence rises with age, and due to increased life expectancy, prostate cancer could become an important public health challenge in the future. Non-localised disease is mainly treated by anti-hormonal therapy, based on the well-known principle that prostate cells depend on androgens for proliferation. Active androgens are essentially synthesized by the testicles, but prostatic cells are also able to convert the adrenal precursors into active androgens (DHT), and this intracrine pathway for the steroidogenesis may limit the efficiency of orchidectomy as treatment of prostatic carcinoma. Moreover, evolution of the tumor from an androgen-dependent to an androgen-independent state enables it to progressively escape anti-hormonal therapy. Previous work in the laboratory has shown that mammary cancer cells can convert adrenal precursors, particularly S-DHEA, into estrogens, which then modulate the proliferation rate of the cells.

The first purpose of our work was thus to examine the effects of adrenal precursors, DHEA and S-DHEA, on an androgen-dependent prostatic human cancer cell line, LNCaP. Initially, we analysed the metabolism of these precursors by LNCaP cells. We have shown that, at physiological plasma concentrations, both DHEA and S-DHEA can be transformed into active androgens. However, the cells also possess powerful elimination activities, such as glucuronosyl-transferase. Although S-DHEA physiological concentration is very high, the quantity of active androgens formed is not as important as expected, because of systems which limit the bioconversion into active hormones. Secondly, we analysed the proliferation of LNCaP cells under treatment with these adrenal precursors. We established that both DHEA and S-DHEA can induce effects that are qualitatively similar to those mediated by the active androgen, DHT, but physiological concentrations do not induce significant effects, suggesting that metabolism or detoxification can indeed limit the biological properties of adrenal precursors.

The main purpose of our work consisted in determining the mechanisms by which androgens can paradoxically inhibit the proliferation of the LNCaP cells. We have shown 1) that treatment by androgens regulates the expression of different proteins involved in the cell cycle control, thereby leading to an arrest of the cells in the G1 phase of the cell cycle, 2) that the proto-oncogene *c-myc* is a target-gene of the Androgen Receptor (AR), and 3) that positive or negative regulation of *c-myc* expression is strongly correlated to the positive or negative regulation of cell proliferation according to the androgenic context. *C-myc* could thus be considered as a dual mediator of the different proliferative effects of androgens. We next examined the molecular basis of the regulation of *c-myc* expression under androgen treatment using Chromatin Immunoprecipitation technology, and we demonstrated that androgens repress *c-myc* gene transcription through chromatin remodelling of the promoter. Finally, analysis of the AR recruitment to the *c-myc* promoter under different androgenic conditions allowed us to propose a hypothetical model of the transcriptional repression of the *c-myc* gene by AR in the presence of an agonist.

Résumé

A l'origine de 11% des décès par cancer, le cancer de la prostate est la 2^o cause de mortalité par cancer chez l'homme en France. Son incidence augmente avec l'âge, et du fait de l'augmentation de l'espérance de vie, il pourrait devenir un grave problème de santé publique dans les années à venir. Il est depuis longtemps établi que la progression de ce cancer dépend des androgènes, ce qui a conduit à la mise en place de la thérapie anti-hormonale, la principale thérapie actuellement utilisée dans les stades non localisés. Cependant, cette thérapie se heurte à 2 obstacles majeurs □ d'une part le principe d'intracrinologie, qui confère aux cellules prostatiques une certaine indépendance pour la production d'androgènes vis-à-vis des testicules (principale cible de la thérapie) □ et d'autre part l'acquisition d'une androgéno-indépendance, qui permet aux cellules prostatiques d'échapper à la thérapie.

Des travaux antérieurs du Laboratoire ont montré que des cellules cancéreuses mammaires peuvent transformer les androgènes surrénaliens en oestrogènes actifs sur la prolifération cellulaire. Dans la continuité de ces travaux, notre premier objectif a été d'étudier les effets des androgènes surrénaliens, la DHEA et le S-DHEA, vis-à-vis de cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes, la lignée LNCaP. Cette étude a été réalisée sous 2 angles complémentaires □ d'une part le métabolisme de ces androgènes surrénaliens par les cellules, d'autre part leur effet en termes de prolifération. Nous avons montré que la DHEA et le S-DHEA sont transformés en androgènes actifs mais qu'il existe de puissantes voies de détoxification, et bien que la concentration physiologique du S-DHEA soit très élevée, son métabolisme est freiné, de telle sorte que la quantité d'androgènes formés n'est pas excessive par rapport à sa concentration physiologique. En termes de prolifération, ces précurseurs peuvent induire des effets semblables qualitativement à ceux de la DHT (androgène actif), mais ils sont inefficaces à concentration physiologique, suggérant que le métabolisme et la détoxification ont permis de limiter considérablement leurs effets. Ces données ont donc permis de relativiser, dans nos cellules, l'impact de l'Intracrinologie par rapport à ce qui avait été démontré dans les cellules cancéreuses mammaires.

Le principal objectif de notre travail a ensuite consisté à examiner les mécanismes par lesquels les androgènes peuvent avoir un effet anti-prolifératif paradoxal sur la lignée LNCaP. Nous avons montré que le traitement par les androgènes dirige la régulation de protéines contrôlant la progression du cycle cellulaire, et ces régulations aboutissent à une accumulation des cellules dans la phase G1. Nous avons démontré que le proto-oncogène c-myc est un gène-cible de l'AR, et que la régulation positive ou négative de son expression est parfaitement corrélée à la régulation de la prolifération, positive ou négative, selon le contexte androgénique. C-myc occuperait donc une place cruciale comme médiateur binaire des effets biologiques des androgènes. Enfin, une étude moléculaire du promoteur de c-myc, par la technique de ChIP, nous a permis d'aborder des mécanismes originaux de la répression transcriptionnelle de c-myc par les androgènes, impliquant un remodelage chromatinien, et finalement de proposer un schéma de la répression transcriptionnelle de c-myc par l'AR en présence d'hormones agonistes.